



UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorat de Medicina Interna
Departament de Medicina

**ESTUDI DE LES MUTACIONS DEL GEN EGFR
EN PACIENTS D'ESTADIS AVANÇATS DE
CPCNP**

Tesi Doctoral presentada per Cristina Queralt Herrero

Directors

Dr. Rafael Rosell Costa i Dr. Miquel Tarón Roca

Badalona 2014

Vull donar les gràcies, en primer lloc, al Dr. Rafael Rosell i al Dr Miquel Tarón per permetre'm endinsar-me en aquesta aventura que finalment ha donat els seus fruits, no només a nivell acadèmic sinó també assistencial, posant el nostre granet de sorra en la millora del tractament dels pacients avançats de CPCNP. Gràcies a la seva tenacitat, aquest treball ha estat possible.

Agrair el temps que la Dra. Teresa Morán i Dr. Enric Carcereny han invertit en l'assessorament dels temes purament clínics i al Dr. José Luis Mate pel seu ajut com a expert d'anatomia patològica.

També vull donar les gràcies a la Lourdes Franquet pel seu ajut incondicional d'intendència i a la Kate Williams pel cop de mà amb el resum en anglès.

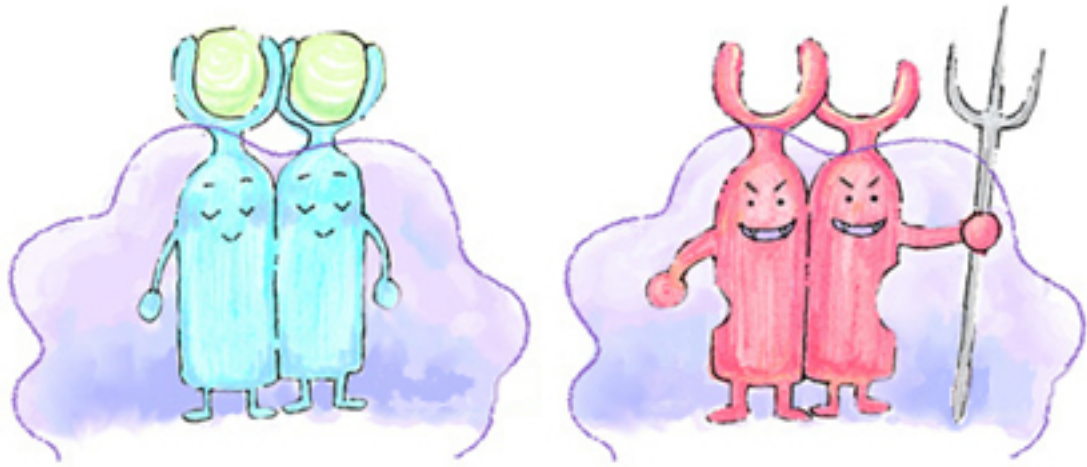
Cal fer una menció especial a les meves companyes de microdissecció, equip que treballa a l'ombra, María Pérez, Mónica Botia i Montse Tierno, per la seva dedicació, professionalitat i entrega. També vull agrair al Dr. Jordi Codony per la motivació i l'impuls per començar aquest treball.

Evidentment vull agrair l'entusiasme dels meus companys de l'EGFR team al llarg d'aquests 10 anys de trajectòria, tant en els difícils inicis (Dra. Clara Mayo, Dr. Miguel Ángel Molina, Anna Prades i Jordi Beltran) com en el manteniment del vigorós ritme de treball, sostingut per l'ajut incondicional de la Itziar de Aguirre.

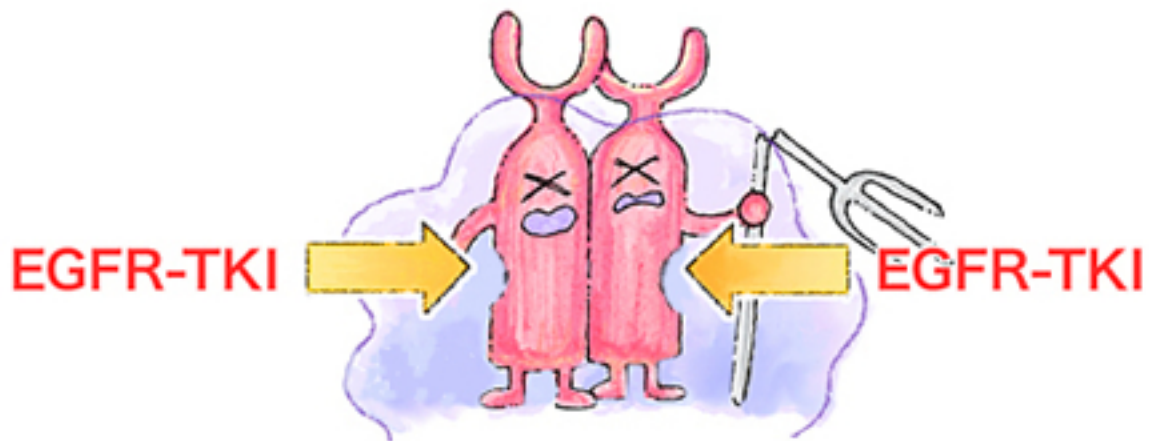
A nivell acadèmic, vull agrair al Departament de Lingüística, i especialment a l'Anna Estapé per ajudar-me en la redacció, en català com Déu mana, d'aquets treball.

Ja a nivell personal vull donar les gràcies a la meva família, amics i especialment al meu company de vida, per la paciència que han demostrat durant la redacció, inacabable, d'aquest treball i sobretot, els ànims i el suport incondicional. Ara que això s'ha acabat, s'haurà de celebrar! He, he, he....

Finalment, esmentar a tots els data mànagers, metges i pacients que han participat en aquest treball durant tots aquests anys i que, sense ells, no haguera estat possible.



MUTACIÓ



ABREVIATURES

ABL	de l'anglès <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
ADN	Àcid DesoxiriboNuclèic
AKT	de l'anglès <i>v- akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ALK	de l'anglès <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
ARMS	de l'anglès <i>Amplification-Refractory Mutation System</i>
ARN	Àcid RiboNuclèic
ASA	amplificació específica d'al·lel
ASCO	de l'acrònim <i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATP	Adenosin Tri Fosfat
BAD	de l'anglès <i>Bcl2-Associated Death promoter</i>
BIM	de l'anglès <i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BLAST	de l'anglès <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRAF	de l'anglès <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CA-SSR1	de l'anglès <i>CA Simple Sequence Repeat 1</i>
CGCE	de l'anglès <i>Cycling Gradient Capillary Electrophoresis</i>
CI	Intèrval de Confiança
COLD-PCR	de l'anglès <i>Coamplification at Lower Denaturation temperature-PCR</i>
CPCNP	Carcinoma Pulmonar de Cèl·lula No Petita
CPCP	Carcinoma Pulmonar de Cèl·lula Petita
c-Src	de l'anglès <i>cellular-sarcoma</i>
Ct	de l'anglès <i>Cycle threshold</i>
CTCE	de l'anglès <i>Cycling Temperature Capillary Electrophoresis</i>
DCE	electroforesi desnaturalitzant capil·lar
ddNTP	didioxinucleòtid
DHPLC	de l'anglès <i>Denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i>

ABREVIATURES

DISSECT	de l'anglès <i>Differential Strand Separation at Critical Temperature</i>
EBUS-TBNA	de l'anglès <i>EndoBronchial UltraSound-guided TransBronchial Needle Aspiration</i>
ECOG	de l'anglès <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGF	factor de creixement epidèrmic
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic
EML4	de l'anglès <i>Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4</i>
EMT	transició epiteli mesènquima
ERK-1 i ERK-2	de l'anglès <i>Extracellular signal-Regulated Kinase 1 i 2</i>
EURTAC	de l'acrònim <i>EUropean TARceva vs Chemotherapy</i>
FAD	de l'anglès <i>Food and Drug Administration</i>
FGFR1	de l'anglès <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FISH	de l'anglès <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
FLEX	de l'acrònim <i>First Line ErbituX</i>
FRET	de l'anglès <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
FRLP	de l'anglès <i>FRagment Lenght Polymorphism</i>
GDP-GTP	guanosin difosfat/trifosfat
Grb2	de l'anglès <i>Growth factor Receptor Bound protein 2</i>
HDAC	Histona DeAcetilasa
HER-2	de l'anglès <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HGF	factor de creixement hepàtic
HR	de l'anglès <i>Hazard Ratio</i>
HRM	de l'anglès <i>High Resolution Melting</i>
hsRNA	de l'anglès <i>heterochromatin associated small RNA</i>
IASLC	de l'anglès <i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
IDEAL	de l'acrònim <i>Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung cancer</i>
IGF-1R	de l'anglès <i>Insuline-like Growth Factor 1 Receptor</i>

ABREVIATURES

HDAC	Histona DeAcetilasa
IHQ	Immunohistoquímica
INTACT	de l'acrònim <i>Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Therapy</i>
INTEREST	de l'acrònim <i>Iressa NSCLC Trial Evaluating Response and Survival versus Taxotere</i>
IPASS	de l'acrònim <i>Iressa Pan-Asia Study</i>
IP ₃	Inositol trifosfat
IQR	Rang Interquartílic
ISEL	de l'acrònim <i>Iressa Survival Evaluation in Lung càncer</i>
ITQ	inhibidor de la tirosina quinasa
JAK	de l'anglès <i>Janus Kinase</i>
JNK	de l'anglès <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
K-RAS	de l'anglès <i>Kirsten RAt Sarcoma oncogene homolog</i>
LKB1	de l'anglès <i>Liver Kinase B1</i>
MALDI-TOF	de l'anglès <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight mass spectrometry</i>
MAPK	Proteïna quinasa d'activació mitogènica
MEK	de l'anglès <i>Extracellular signal-Regulated Kinase Kinase</i>
ME-PCR	de l'anglès <i>Mutant Enrichment-PCR</i>
MET	de l'anglès <i>c-Mesenchymal-Epithelial Transition factor</i>
mTOR	de l'anglès <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
NCBI	de l'anglès <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEJSG002	de l'acrònim North-East Japan Study Group
NFκB	de l'anglès <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	de l'anglès <i>Next Generation Sequencing</i>
NSCLC	càncer de pulmó de cèl·lula no petita
NTC	control negatiu sense ADN
OR	de l'anglès <i>Odds Ratio</i>

ABREVIATURES

OMS	Organització Mundial de la Salut
pb	parell de bases
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDK1	Proteïna quinasa 1depenent d'inositol
PFS	supervivència lliure de progressió
PH	de l'anglès <i>Pleckstrin Homology</i>
PI3K/PIK3CA	Fosfatidilinositol 3 quinasa/ domini catalític
PI3P	Fosfatidilinositol trifosfat
PLC _γ	γ1 isoforma de la fosfolipasa C
PNA	de l'anglès <i>Protein Nucleic Acid</i>
PS	estat funcional
PTEN	de l'anglès <i>Phosphatase and TENsin homologue</i>
QV	de l'anglès <i>Quality Value</i>
RAF	de l'anglès <i>RApidly growing Fibrosarcomes</i>
RAS	de l'anglès <i>RAt Sarcoma</i>
RFLP	de l'anglès <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RT-PCR	de l'anglès <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SH2-SH3	de l'anglès <i>Src Homology 2-3</i>
SLADB	de l'acrònim <i>Spanish Lung Adenocarcinoma Data Base</i>
SNP	de l'anglès <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SOS	de l'anglès <i>Son of Sevenless</i>
SOX-2	de l'anglès <i>Sex determining region Y-bOX 2</i>
SSCP	de l'anglès <i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
STAT	proteïna de transducció de senyal i transactivació
TAILOR	de l'acrònim <i>TArceva Italian Lung Optimization tRial</i>
TALENT	de l'acrònim <i>Tarceva in Lung Cancer</i>
TGCE	electroforesi capil·lar per gradient de temperatura

ABREVIATURES

TGF- α	Factor α de Creixement Transformant
TITAN	de l'acrònim <i>Tarceva In Treatment of Advanced NSCLC</i>
TK	de l'anglès <i>tirosine kinasa</i>
TKI	de l'anglès <i>tirosine kinasa inhibitor</i>
TMDA	de l'anglès <i>TaqMan Mutation Detection Assay</i>
TNM	de l'anglès <i>Tumor Nodal Metastases</i>
TP63	factor de transcripció 63
TQ	Tirosina Quinasa
TRIBUTE	de l'acrònim <i>Tarceva Responses in Conjunction with paclitaxel and carboplatin</i>
TS	Timidilat Sintasa
UICC	Unió Internacional Contra el Càncer
VEGF	de l'anglès <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
WJTOG 0403	de l'acrònim <i>West Japan Thoracic Oncology Group trial</i>
WT	de l'anglès <i>Wild Type</i>
Y	tirosina

1	INTRODUCCIÓ	21
1.1	Generalitats del càncer de pulmó	23
1.1.1	Incidència	23
1.1.2	Etiologia.....	23
1.2	Classificació del càncer de pulmó	24
1.2.1	Carcinoma de pulmó de cèl·lules petites (CPCP)	25
1.2.2	Carcinoma de pulmó de cèl·lules no petites (CPCNP)	25
1.3	Estadiatge del càncer de pulmó	28
1.4	Tractament de CPCNP	30
1.4.1	Cirurgia	30
1.4.2	Radioteràpia	31
1.4.3	Quimioteràpia	31
1.5	EGFR	34
1.5.1	Característiques de la família EGFR	34
1.5.2	Vies de transducció de senyal	38
1.5.3	Alteracions gèniques	40
1.5.4	Estratègies de tractament.....	47
1.6	Els ITQ com alternativa a la quimioteràpia convencional.....	50
1.6.1	Estudis amb pacients no seleccionats.....	51
1.6.2	Estudis amb pacients seleccionats.....	53
1.6.3	Resistència a ITQ	55
1.7	Tècniques per detectar les mutacions d'EGFR.....	59
1.7.1	Detecció de les mutacions d'EGFR en teixit tumoral.....	59
1.7.2	Detecció de les mutacions d'EGFR en sang perifèrica	67
2	HIPÒTESI I OBJECTIUS	73
3	PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES	77
3.1	Optimització de les tècniques d'anàlisi.....	79
3.2	Mètode estàndard: Seqüenciació Sanger	80
3.2.1	Optimització de la tècnica amb línies cel·lulars mutades.....	80
3.2.2	Optimització de la tècnica amb teixit tumoral inclòs en parafina	82
3.3	Tècnica d'anàlisi de fragments per analitzar delecions : GeneScan	86
3.3.1	Optimització de la tècnica per a mostres de teixit inclòs en parafina.....	86

3.3.2	Avaluació de la tècnica.....	87
3.3.3	Optimització de la tècnica per a mostres de sang perifèrica.....	90
3.3.4	Avaluació de la tècnica.....	92
3.4	Tècnica de discriminació al·lèlica per analitzar mutacions puntuals: TaqMan ..	94
3.4.1	Optimització de la tècnica per analitzar les mutacions L858R i T790M dels exons 21 i 20, per a mostres de teixit inclòs en parafina	95
3.4.2	Avaluació de la tècnica.....	96
3.4.3	Optimització de la tècnica per analitzar la mutació L858R en mostres de sang perifèrica.....	99
3.4.4	Avaluació de la tècnica.....	101
3.5	Validació clínica de les tècniques d'anàlisi en mostres de teixit inclòs en parafina	103
3.5.1	Validació clínica de la tècnica de seqüenciació Sanger	103
3.5.2	Validació clínica de les tècniques de GeneScan i TaqMan dels pacients inclosos en l'SLADB	103
3.6	Validació clínica de les tècniques d'anàlisi en mostres de sang perifèrica.....	104
3.6.1	Validació clínica de les tècniques de GeneScan i TaqMan dels pacients inclosos en l'SLADB	104
3.7	Assaig EURTAC.....	104
3.7.1	Anàlisi de les mutacions d'EGFR per les tècniques de GeneScan i TaqMan de les mostres de teixit inclòs en parafina	104
3.7.2	Validació clínica de l'anàlisi de la mutació T790M de les mostres de teixit inclòs en parafina.....	105
3.7.3	Anàlisi de les mutacions d'EGFR per les tècniques de GeneScan i TaqMan de l'ADN circulant de sang perifèrica	105
3.8	Tractament estadístic de les dades.....	106
4	RESULTATS	107
4.1	Validació analítica del mètode estàndard: seqüenciació Sanger	109
4.1.1	Optimització amb línies cel·lulars mutades	109
4.1.2	Optimització amb teixit inclòs en parafina	112
4.2	Validació clínica de la tècnica de seqüenciació Sanger en mostres de teixit inclòs en parafina	114
4.3	Validació analítica de les tècniques de GeneScan i TaqMan en mostres de teixit inclòs en parafina	116

4.3.1	Optimització de la tècnica de GeneScan.....	117
4.3.2	Avaluació de la tècnica.....	118
4.3.3	Optimització de la tècnica TaqMan per analitzar les mutacions L858R i T790M.....	124
4.3.4	Avaluació de la tècnica.....	126
4.4	Validació clínica de les tècniques de GeneScan i TaqMan dels pacients inclosos en l'SLADB	135
4.5	Validació analítica de les tècniques de GeneScan i TaqMan en mostres de sang perifèrica	141
4.5.1	Optimització de la tècnica de GeneScan.....	141
4.5.2	Avaluació de la tècnica.....	144
4.5.3	Optimització de la tècnica TaqMan	147
4.5.4	Avaluació de la tècnica.....	149
4.6	Validació clínica de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR de l'ADN circulant de sang perifèrica dels pacients inclosos en l'SLADB	152
4.7	Assaig EURTAC.....	155
4.7.1	Anàlisi de les mutacions per les tècniques de GeneScan i TaqMan	155
4.7.2	Validació clínica de l'anàlisi de la mutació T790M de l'exó 20.....	161
4.7.3	Anàlisi de les mutacions d'EGFR de l'ADN circulant de sang perifèrica	165
5	DISCUSSIÓ	171
5.1	Validació analítica de la tècnica de seqüenciació Sanger	173
5.2	Validació clínica de la tècnica de seqüenciació Sanger.....	176
5.3	Validació analítica de les tècniques de GeneScan i TaqMan	177
5.3.1	Optimització de les tècniques de GeneScan i TaqMan en mostres de teixit inclòs en parafina.....	178
5.3.2	Avaluació de les tècniques.....	180
5.4	Validació analítica de les tècniques de GeneScan i TaqMan en mostres d'ADN circulant de sang perifèrica	188
5.4.1	Optimització de les tècniques de GeneScan i TaqMan.....	191
5.4.2	Avaluació de les tècniques.....	192
5.5	Validació clínica de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR en teixit inclòs en parafina dels pacients de l'SLADB i l'EURTAC.....	195

ÍNDIX

5.6	Validació clínica de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR en l'ADN circulant de sang perifèrica dels pacients de l'SLADB i l'EURTAC	201
5.7	Validació clínica de la detecció de la mutació T790M de l'exó 20 dels pacients inclosos en l'EURTAC.....	204
6	CONCLUSIONS.....	211
7	BIBLIOGRAFIA.....	215
8	ANNEX-I.....	I-1
9	ANNEX-II.....	II-1

1 INTRODUCCIÓ

Troba un treball que t'agradi

i no tornaràs a treballar

ni un sol dia de la teva vida

(Confuci)

1.1 Generalitats del càncer de pulmó

1.1.1 Incidència

Es parla de càncer de pulmó quan apareix qualsevol neoplàsia maligna originada a l'àrea broncopulmonar. Agrupant ambdós sexes, es tracta del tipus de tumor més freqüent i és considerat la primera causa de mort per càncer a escala mundial.

Per a la població masculina, la major incidència la trobem a l'Europa central i de l'est, seguida per l'Amèrica del Nord, mentre que per a la població femenina la incidència és més elevada als Estats Units i ocupa la tercera posició, amb una taxa de mortalitat igual a la del càncer de mama (JEMAL *et al.* 2011).

A Catalunya, la taxa ajustada d'incidència de càncer de pulmó en la població masculina és del 52,91 per 100.000 habitants i any, fet que el col·loca en el segon tipus de càncer respecte a la incidència, mentre que per a la població femenina és del 4,69. El càncer de pulmó entre la població femenina ha anat augmentant a tot el món. A Catalunya, entre els anys 1985 i 2004, aquest increment ha estat del 2,68% (BORRÀS JM. 2008).

Malgrat que en els darrers anys s'ha avançat en el coneixement de la malaltia i el seu tractament, la taxa de supervivència global als 5 anys no s'ha incrementat excessivament i continua situant-se al voltant del 14% en homes i del 20% en dones. Aquesta baixa taxa de supervivència s'atribueix a que només un terç dels pacients es diagnostiquen en estadis inicials de la malaltia, quan són susceptibles a la resecció per cirurgia. Normalment aquest diagnòstic té lloc en estadis avançats, quan la progressió és més ràpida. En molts casos el pacient presenta altres patologies, freqüentment associades al tabaquisme com ara la malaltia pulmonar obstructiva crònica i/o malalties cardiovasculars, que fan més complex el tractament.

1.1.2 Etiologia

L'any 1939 es va presentar el primer treball epidemiològic on es postulava l'estreta relació entre tabaquisme i càncer de pulmó. (PROCTOR 2001). S'estima que el 90-95% dels casos està relacionat amb aquest hàbit a més de ser la causa de prop del 30% de les morts per càncer en els països desenvolupats (MONTES *et al.* 2004).

Entre els components del fum del tabac, s'han trobat més de 20 elements carcinògens, agents químics i radicals lliures que es consideren responsables del desenvolupament del carcinoma pulmonar com ara el 1,3-butadiè, l'òxid d'etilè, el benzè, aldehids,

hidrocarburs aromàtics policíclics o nitrosamines. Molts d'aquests elements, actuen a nivell de l'ADN (Àcid DesoxiriboNuclèic) creant adductes quan els seus metabòlits carcinogènics s'uneixen covalentment a la guanina i citosina. Si el mecanisme de reparació cel·lular no és capaç de revertir aquest adducte, comporta un canvi en la seqüència de l'ADN i per tant l'aparició d'una alteració genètica permanent que pot afectar l'activació d'oncogens (HUSSAIN and HARRIS 1998; SEKIDO *et al.* 1998).

Altres factors que augmenten el risc de desenvolupar càncer de pulmó vénen condicionats per l'entorn laboral. Les persones exposades a substàncies com l'asbest, l'arsènic, el crom, el níquel o el radó tenen més risc de desenvolupar aquesta malaltia. Altrament, l'exposició al fum del tabac de forma regular també n'augmenta el risc malgrat no es sigui fumador actiu. L'exposició a la radiació ionitzant també fa augmentar el risc proporcionalment al temps d'exposició i és sinèrgic amb el tabaquisme (ALBERG *et al.* 2007).

Independentment de l'ambient que envolta els individus, hi ha certa susceptibilitat genètica que augmenta la possibilitat de desenvolupar un càncer de pulmó, sobretot en persones amb historial familiar. Paral·lelament, s'ha comprovat l'associació entre diversos locus com ara el 15q25 o el 6q23-25 o l'existència de determinats polimorfismes en enzims de reparació a l'ADN amb l'augment del risc de desenvolupar aquest tipus de càncer (BRENNAN *et al.* 2011).

Finalment, l'edat també és un factor a tenir en compte ja que comporta la inherent exposició acumulativa de molts dels factors de risc anteriorment exposats. Aquests factors, combinats amb la pèrdua natural de l'eficàcia de les vies de reparació del dany a l'ADN, provoca que el risc augmenti proporcionalment al pas dels anys (BALDUCCI and BEGHE 2001).

1.2 Classificació del càncer de pulmó

Quan es parla genèricament de càncer de pulmó, s'hi inclouen els tipus més comuns de carcinomes de pulmó i bronquis. Al voltant el 95% dels casos de carcinoma pulmonar són de tipus epitelial.

El càncer de pulmó o carcinoma broncogènic es divideix per al seu estudi i tractament en dos grans grups: el carcinoma de cèl·lules petites (CPCP) i el carcinoma de cèl·lules no petites (CPCNP).

El sistema de classificació actual del càncer de pulmó es basa en els criteris de l'última classificació de la Organització Mundial de la Salut (OMS) de l'any 2004 i en les modificacions dels grups d'experts internacionals (TRAVIS *et al.* 2011).

1.2.1 Carcinoma de pulmó de cèl·lules petites (CPCP)

Representa al voltant del 15% dels carcinomes pulmonars, normalment en pacients d'edat avançada i està altament relacionat amb el tabaquisme, l'exposició a asbest i redó. Es tracta d'un tipus de càncer molt agressiu, amb molta facilitat per produir metàstasis ja des dels seus estadis més primerencs. La supervivència als 5 anys es situa al voltant d'un 5%.

Genèticament, és un tipus de càncer que presenta moltes alteracions com ara pèrdues o guanys cromosòmics, estimulació de gens com la telomerasa, mutacions, hipofosforilacions de gens supressors i alteracions en múltiples vies de transducció de senyal que el fan atractiu per aplicar-hi tractaments específics (D'ANGELO and PIETANZA 2010; VAN MEERBEECK *et al.* 2011).

1.2.2 Carcinoma de pulmó de cèl·lules no petites (CPCNP)

Aproximadament el 85% del càncer de pulmó correspon a aquest tipus tumoral que es subclassifica en carcinoma escatós, adenocarcinoma, carcinoma de cèl·lules grans amb els seus diferents graus de diferenciació. Fins a mitjan segle passat el tipus cel·lular predominant era l'escatós. Actualment, i en gran part pel canvi d'hàbit tabàquic, aquesta relació s'ha revertit a favor de l'adenocarcinoma (MONTESINOS *et al.* 2011).

1.2.2.1 Carcinoma escatós

És el subtipus cel·lular més relacionat amb el tabaquisme dins del CPCNP, on representa el 20-30% d'aquests tumors i es localitza, preferentment, en la zona central dels bronquis. Es caracteritza per l'existència de ponts intercel·lulars i una alta queratinització que s'utilitza per identificar aquest tipus de tumor en preparacions histològiques i citològiques. Les cèl·lules acostumen a ser grans amb un citoplasma abundant i dens, amb nucli hipercromàtic irregular i nuclèols petits.

Des d'un punt de vista genètic, el carcinoma escatós té una sèrie de gens amplificats. Entre ells SOX2, FGFR1, PIK3CA i TP63. El gen SOX2 regula la supervivència cel·lular i,

1- INTRODUCCIÓ

mitjançant la tècnica de FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), es troba amplificat en un 68% i sobreamplificat en un 20% dels casos. FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor) es relaciona amb la proliferació cel·lular i es detecta per FISH en un 22% dels casos (WEISS *et al.* 2010). El gen PIK3CA (Fosfatidilinositol 3 quinasa domini catalític) està amplificat en un 33% dels casos quan s'analitza per PCR quantitativa (YAMAMOTO *et al.* 2008) i per últim, TP63 (Transcription factor 63) està relacionat amb la carcinogènesi, i es troba una freqüència d'amplificació del 88% per FISH (MASSION *et al.* 2003).

També s'han detectat mutacions en diversos gens com ara PIK3CA en un 6,5% dels casos (KAWANO *et al.* 2006). Per una altra banda, malgrat que la forma truncada EGFRvIII té una freqüència al voltant del 5% i es considera l'alteració més freqüent d'EGFR en aquest tipus histològic, també s'han descrit mutacions del domini tirosina quinasa en un percentatge menor al 5% (DRILON *et al.* 2012; PEREZ-MORENO *et al.* 2012).

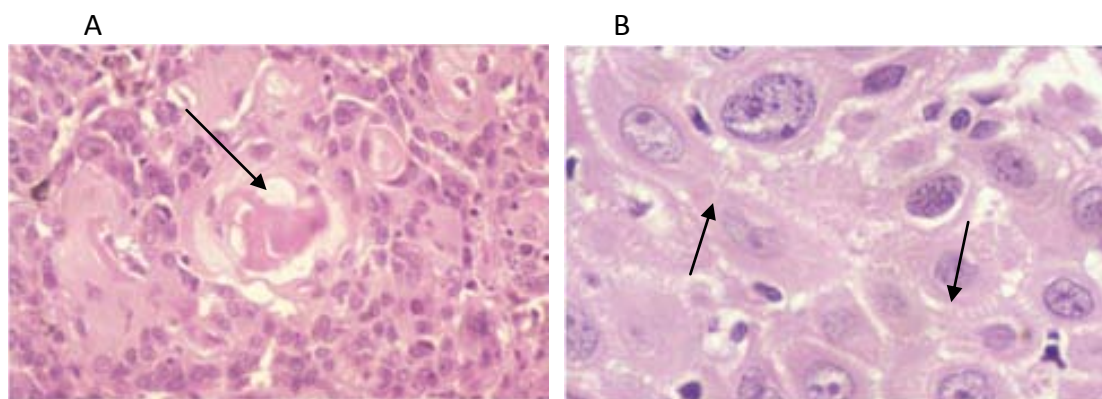


Fig. 1. En A, imatge de carcinoma escatós moderadament diferenciat. S'observa la producció de queratina per les cèl·lules tumorals, marcat amb una fletxa negra. En B es poden observar els ponts intercel·lulars en un carcinoma escatós poc diferenciat, indicats per les fletxes negres (tinció: hematoxilina-eosina, 400 augments).

1.2.2.2 Adenocarcinoma

Es tracta del tipus histològic més freqüent ja que representa pràcticament el 50% dels casos de CPCNP. Malgrat aquest tipus de carcinoma es relaciona amb individus fumadors, és la histologia més freqüent entre la població no fumadora. Els adenocarcinomes de pulmó habitualment es localitzen en els camps pulmonars perifèrics i no és infreqüent que envaeixin les pleures. El tret histològic més característic és la seva capacitat de formar estructures glandulars que, en moltes ocasions, requereixen de tècniques de detecció de mucina per tal de posar-les de manifest ja que no sempre són evidents.

Molecularment s'ha identificat una sèrie de gens que poden modular respostes al tractament. Entre ells es troben les mutacions mútuament excloents d'EGFR (10-40%),

K-RAS (38%), HER-2 (2-4%) o BRAF (2%) que es troben aproximadament en el 50% dels casos o les translocacions d'ALK (4%), RET (1%) o ROS-1 (2%) (GREULICH 2010; SAINTIGNY and BURGER 2012; BOS M. 2013).

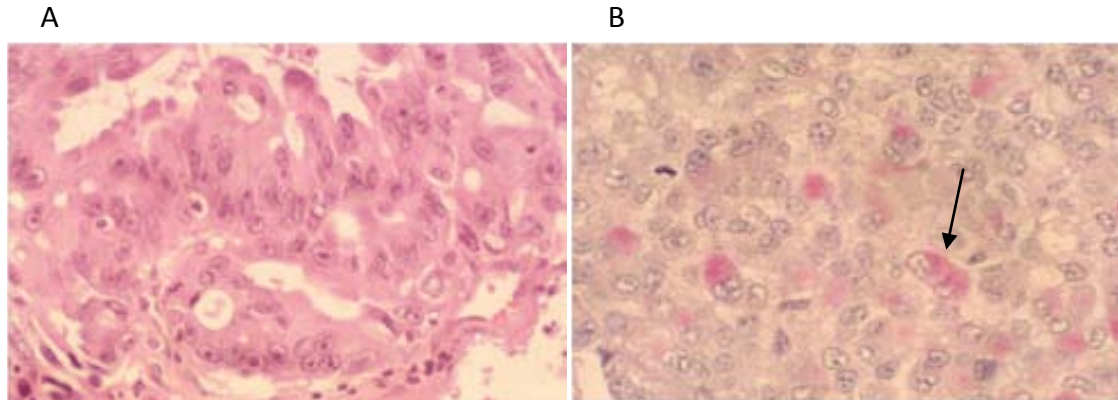


Fig. 2. En A es pot observar un adenocarcinoma moderadament diferenciat on s'aprecien les glàndules compactes constituïdes per cèl·lules tumorals atípiques (tinció: hematoxilina-eosina, 400 augments). En B es pot observar un adenocarcinoma pobrement diferenciat on hi ha una tinció positiva en el citoplasma de les cèl·lules tumorals mucosecretories (tinció: PAS-DIASTASA, 400 augments).

1.2.2.3 Carcinoma de cèl·lules grans

Aquest tipus de carcinoma és poc freqüent i representa el 3% dels casos de CPCNP, predominantment en població masculina fumadora. És un tipus de tumor agressiu i de difícil diagnòstic ja que, per definició, no tenen trets de diferenciació citoplasmàtica, ja sigui en la direcció de l'adenocarcinoma o del carcinoma escamós (GOLLARD *et al.* 2010). Es tracta d'un tipus de tumor format per cèl·lules poligonals amb un nucli gran que es desenvolupa freqüentment en les zones pulmonars perifèriques.

1.2.2.4 Carcinoma adenoescatós

El carcinoma adenoescatós és el subtipus histològic més infreqüent dins dels CPCNP, amb una incidència del 0,4 a un 4% dels casos. Estan formats per una barreja d'adenocarcinoma i carcinoma escatós en diferents proporcions i són molt més agressius que els dos tipus histològics per separat. Acostumen a fer metàstasis amb molta facilitat i presenten mal pronòstic. S'ubiquen preferentment en la perifèria del pulmó (BASTIDE *et al.* 2010).

1.3 Estadiatge del càncer de pulmó

La classificació de les malalties neoplàsiques evoluciona paral·lelament amb el coneixement genètic dels tumors. Aquest fet permet no només un diagnòstic més acurat sinó també estimar el pronòstic i la valoració dels resultats del tractament. Des que es va publicar per primer cop el sistema d'estadiatge TNM l'any 1968, hi ha hagut una evolució constant en la classificació tumoral conduïda per la International Union Against Cancer (UICC). Aquesta classificació té en compte l'extensió i severitat d'un càncer ja sigui en el seu estadi més inicial com en la seva fase metastàsica ja que d'aquests paràmetres en depenen la supervivència i el tractament que rebrà el pacient.

La classificació de l'estadi de la malaltia es basa en el sistema TNM (Tumor Nodal Metastasis) on la "T" descriu les característiques del tumor primari, la "N" descriu l'afectació o no ganglionar i la "M" indica presència o absència de metastasis a distància. La definició dels components d'aquest sistema d'estadiatge es poden veure en la Taula 1.

Per a cada pacient existeixen dues classificacions TNM del tumor que corresponen, per una banda a l'estadiatge clínic (s'afegeix una "c" davant del TNM), basat en la història clínica, examen físic i altres proves realitzades anteriorment al tractament, etc., i per una altra banda, a l'estadi patològic basat en el TNM patològic (s'afegeix una "p" davant del TNM) aplicable als casos on s'ha utilitzat la cirurgia quan s'ha avaluat l'estat dels marges del tumor extirpat, la presència o no d'invasió limfovascular i el grau histològic (MIRSADRAEE *et al.* 2012).

Un cop s'ha definit el TNM del pacient cal classificar el tumor segons uns estadis que van de 0 a IV on s'agrupen els tumors per pronòstic i tractament similars. Els pacients amb estadis inicials tenen millor pronòstic (CRINO *et al.* 2010).

Malgrat que des del gener del 2010 el sistema vigent és el que es descriu en la 7a edició de la *TNM classification of malignant tumors* de la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), publicada per la UIIC (TRAVIS *et al.* 2011), aquest treball es basa en l'estadiatge de la 6a edició ja que els pacients que es descriuen van ser estadificats anteriorment a la nova classificació.

TUMOR (T)	
T0	No evidència de tumor primari
TX	Tumor primari que no pot ser avaluat
	Presència de cèl·lules malignes en l'esput o en el rentat bronquial
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor < 3cm sense evidència d'invasió més proximal del bronqui lobar
T2	Tumor > 3cm
	Tumor de qualsevol mida amb qualsevol de les següents característiques:
	-Extensió proximal \geq 2cm distal de la carina
	-Invasió de la pleura visceral
T3	-Atelèctasi o pneumonitis obstructiva sense comprometre el pulmó sencer
	Tumor de qualsevol mida amb qualsevol de les següents característiques:
	-Invasió de la paret toràcica, del diafragma, de la pleura mediastínica o del pericardi parietal
	-Tumor amb extensió proximal < 2cm de la carina
T4	-Atelèctasi o pneumonitis obstructiva del pulmó sencer
	Tumor de qualsevol mida que envaeix qualsevol de les estructures següents: mediastí, cor, tràquea, esòfag, grans vasos, carina, cossos vertebrals
	Embassament pleural o pericàrdic maligne
	Nòdul/s satèl·lit/s en el mateix nòdul que el tumor primari
GANGLIS LIMFÀTICS (N)	
Nx	Regionals no avaluables
N0	Regionals sense metàstasi
N1	Ipsilaterals hiliars i/o peribronquials amb metàstasi
N2	Limfàtics ipsilaterals mediastínic i/o subcarinals amb metàstasi
N3	Limfàtics mediastínic contralaterals, hiliars contralaterals, escalens ipsilaterals o contralaterals, supraclaviculars amb metàstasi
METÀSTASIS A DISTÀNCIA (M)	
Mx	Metàstasi a distància no avaluables
M0	Sense metàstasi a distància
M1	Amb metàstasi a distància

Taula 1 Definició dels diferents components del sistema d'estadificació TNM corresponents a la 6a edició.

En la Taula 2 es poden veure els canvis en la classificació dels estadiatges on s'han subdividit els descriptors T1, T2 i M1 en "a" i "b" cadascun.

1- INTRODUCCIÓ

Estadi	6a Edició	7a Edició
IA	T1, N0, M0	T1a-T1b, N0, M0
IB	T2, N0, M0	T2a, N0, M0 T1a-T1b, N1, M0
IIA	T1, N1, M0	T2a, N1, M0 T2b, N0, M0
IIB	T2, N1, M0	T2b, N1, M0
	T3, N0, M0	T3, N0, M0
	T3, N1, M0	T1-T2, N2, M0
IIIA	T1-T3, N2, M0	T3, N1-N2, M0 T4, N0-N1, M0
		T4, N0-N2, M0
IIIB	T1-T4, N3, M0	T1-T4, N3, M0
	IV	T1-T4, N0-N3, M1

Taula 2. Canvis promoguts per la 7a edició de la TNM classification of malignant tumors per quadrar els estadiatsges amb la prognosi i el tractament. Un dels canvis importants és que l'estadi IIA passa a T2(a) N1 i que l'estadi T4 N0 o N1 és l'estadi IIIA i no IIB com fins ara (UyBico et al. 2010).

1.4 Tractament de CPCNP

El tractament dels pacients dependrà, en gran mesura, de l'estadiatge per TNM del tumor. Els principals procediments es descriuen a continuació.

1.4.1 Cirurgia

S'aplica la cirurgia en tots aquells pacients que presenten el tumor localitzat, classificats en la seva majoria com a estadis I i II, sempre que no hi hagi patologies associades i la funció pulmonar sigui correcta. La supervivència als 5 anys és del 50% en estadis I i del 35% en estadis II. En tumors T1N0 la supervivència després de la cirurgia pot assolir el 80% (NONAKA *et al.* 2003). En pacients d'estadis més avançats (IIIA-IIIB), malgrat que són considerats inoperables, s'han estudiat combinacions de quimio-radioteràpia i cirurgia amb bons resultats respecte a la supervivència (MACCHIARINI *et al.* 1994). Hi ha tres tipus principals de resecció: la pneumonectomia on s'extirpa tot el pulmó; la lobectomia on s'extirpa un dels lòbuls pulmonars i la resecció en cunya on s'extirpa una part del lòbul del pulmó.

Per poder determinar amb més exactitud l'estadiatge del tumor (és usual que el càncer de pulmó faci metàstasis a través dels nòduls limfàtics) també es fa la linfadenectomia, extirpació dels ganglis de drenatge adjacents a la zona operada (PASS *et al.* 2010).

1.4.2 Radioteràpia

La radioteràpia és una altra estratègia de tractament d'un tumor localitzat o inclús de metàstasis, que es pot aplicar com a tractament per si mateix o en combinació amb cirurgia o quimioteràpia (PRICE 2003). És molt útil en els casos en què el tumor està localitzat en zones de difícil accés o bé en persones d'edat avançada amb altres malalties associades quan la cirurgia està contraindicada (HAYAKAWA 2003). La radioteràpia és un tractament que utilitza raigs d'alta energia per eliminar les cèl·lules tumorals. La radiació es produeix mitjançant una màquina externa al cos (radioteràpia externa), o bé a través de material radioactiu que s'introdueix directament al tumor (braquiteràpia). El tipus més utilitzat en el càncer de pulmó és la radioteràpia externa (DEVITA V. 2011).

S'ha comprovat que les cèl·lules hipòxiques que es troben en tumors de mida gran són poc sensibles a la radiació. Per tant, aquest tractament és aconsellable en tumors petits on la dosi de la radiació és proporcional a la mort cel·lular que provoca (HAYAKAWA 2003).

1.4.3 Quimioteràpia

1.4.3.1 Adjuvència

L'ús de quimioteràpia després de la cirurgia és un règim estàndard per a d'altres tipus de tumors com el càncer de mama o de còlon. Malgrat el benefici respecte a la supervivència que comporta l'extirpació completa del tumor, alguns pacients tornen a recaure per l'existència de micrometàstasis indetectables en el moment de la cirurgia i que provoquen el desenvolupament de tumors en localitzacions llunyanes a la del tumor original. L'aplicació de quimioteràpia després de la intervenció ha demostrat ser una estratègia útil per evitar la recaiguda del pacient (ARRIAGADA *et al.* 2004; PIGNON *et al.* 2008).

Tant l'American Society of Clinical Oncology com la guia de la National Comprehensive Cancer Network recomanen l'ús de la quimioteràpia adjuvant en pacients de CPCNP d'estadis IIA i III operables.

1.4.3.2 Neoadjuvència

El tractament amb quimioteràpia abans de la cirurgia té com a objectiu reduir les micrometàstasis en llocs allunyats del tumor principal i disminuir-ne la mida per tal d'incrementar-ne la reseccabilitat, factor associat a un augment de la supervivència (GRAY *et al.* 2009).

L'aplicació d'aquest règim de tractament és controvertit. Mentre que els resultats d'alguns treballs no demostren cap diferència respecte a la supervivència i la PFS (supervivència lliure de progressió) entre l'aplicació o no de neoadjuvència respecte a la cirurgia (DEPIERRE *et al.* 2002; FELIP *et al.* 2010; GILLIGAN *et al.* 2007), altres estudis posen de manifest que la quimioteràpia prèvia a la cirurgia aporta un clar benefici per al pacient (ROSELL *et al.* 1999; SCAGLIOTTI *et al.* 2012; SONG *et al.* 2010).

1.4.3.3 Primera línia

La primera referència que es té del tractament amb quimioteràpia data de l'any 1948 quan l'equip de Karnofsky va descriure el benefici de l'ús pal·liatiu del gas nitrogen en pacients amb tumors d'origen broncogènic, alguns dels quals CPCNP (KARNOFSKY *et al.* 1948). Després d'aquesta publicació tan esperançadora, el progrés de la quimioteràpia en tumors pulmonars va ser molt modest ja que tots els agents coneguts com a primera generació (metotrexat, ciclofosfamida, vincristina i doxorubicina) eren inactius per als CPCNP malgrat haver-se utilitzat àmpliament en SCCL.

A finals dels anys 80, el descobriment d'una segona generació d'agents (cisplatí, ifosfamida, mitomicina C, vindesina i etopòsit) va comportar l'assoliment de respostes objectives (CULLEN *et al.* 1999; SPIRO *et al.* 2004; THONGPRASERT *et al.* 1999). La metanàlisi realitzada pel Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group l'any 1995 va demostrar el benefici, respecte a la supervivència, que comporta utilitzar el cisplatí en la quimioteràpia dels pacients de diversos estadis de CPCNP respecte al millor tractament de suport (PIGNON *et al.* 2008).

A finals dels 90, una nova generació d'agents terapèutics, coneguts com a tercera generació, que inclouen vinques i taxans, es van administrar com monoteràpia o en combinació amb cisplatí o carboplatí (molècula basada en el cisplatí que en redueix la toxicitat) per tractar els pacients de CPCNP. Els resultats obtinguts d'una metanàlisi on es van recollir diverses combinacions d'aquests nous agents amb derivats del platí (cisplatí/paclitaxel, carboplatí/paclitaxel, cisplatí/gemcitabina, cisplatí/docetaxel) van mostrar un modest benefici respecte al millor tractament de suport existent o inclús amb règims basats en agents de segona generació (BAGGSTROM *et al.* 2007). En estadis avançats de CPCNP, les combinacions en doblats del cisplatí o carboplatí amb

gemcitabina, vinorelbina o taxans es consideren els tractaments estàndard de referència (PFISTER *et al.* 2004).

Durant uns anys es van realitzar uns estudis en què es prescindia del platí per evitar toxicitat, i es combinaven paclitaxel/gemcitabina o gemcitabina/vinorelbina respecte a règims basats en platí, però els resultats no van ser positius (D'ADDARIO *et al.* 2005). S'ha comprovat que el fet d'afegir un nou compost en el règim de quimioteràpia en doblet no incrementa la resposta al tractament i inclús, molts cops, se n'augmenta la toxicitat (SCULIER and MORO-SIBILOT 2009).

Actualment, malgrat que la quimioteràpia en pacients avançats respòn al patró de tractament pal·liatiu, s'està treballant en la implantació de nous fàrmacs com ara l'antiangiogènec bevacizumab, anticòs que inhibeix el receptor del VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor), aprovat per l'FDA (Food and Drug Administration) en primera línia (SANDLER *et al.* 2006) o el pemetrexed, inhibidor de la timidilat sintasa (TS), relacionada amb la metabolització dels nucleòtids necessaris en la síntesi d'ADN (SCAGLIOTTI *et al.* 2008).

En els darrers anys s'estan desenvolupant una sèrie de fàrmacs basats en l'anàlisi de biomarcadors del pacient que permeten un tractament personalitzat de quimioteràpia com per exemple els inhibidors del domini tirosina quinasa (ITQ), erlotinib i gefitinib dels quals es parlarà en un altre apartat.

1.4.3.4 Segona línia

Malgrat que s'ha progressat molt en el tractament amb quimioteràpia dels tumors pulmonars, els pacients d'estadis avançats recauen després del tractament. Un dels avantatges a favor de tractaments posteriors a la primera línia és la disponibilitat de nous fàrmacs que permeten incrementar la supervivència i el control dels símptomes sense afectar la qualitat de vida del pacient (SCULIER and MORO-SIBILOT 2009).

Actualment hi ha tres fàrmacs aprovats per l'FDA que es poden aplicar en segona línia: docetaxel, pemetrexed i erlotinib, aquest darrer també indicat per a línies de tractament posteriors. Aquests tres agents tenen eficàcies similars respecte a la resposta i la supervivència però difereixen respecte a la toxicitat. L'administració d'un o altre depèn de diversos factors, la majoria relacionats amb les condicions generals del pacient (STINCHCOMBE and SOCINSKI 2008) (veure Taula 3)

1- INTRODUCCIÓ

Estadi	Procediment estàndard	Estratègia de futur
I	Cirurgia	Teràpia adjuvant (químio-radio o combinació de dos agents de quimioprevenció)
II	Cirurgia	Teràpia adjuvant (químio-radio o combinació de dos agents de quimioprevenció)
IIIA	Quimioradioteràpia Cirurgia en pacients seleccionats	Neoadjuvència i tractament combinat per a tumors primaris de baix estadiatge
IIIB	Quimioradioteràpia	Neoadjuvència i tractament combinat per a tumors primaris de baix estadiatge
IV	Quimioteràpia basada en cisplatí Cirurgia en tumors primaris amb una sola metastasi	Combinació de fàrmacs de quimioteràpia o tractament amb l'agent únic més eficaç

Taula 3. Recomanacions de tractament i estratègies de futur dels tumors de CPCNP segons el seu estadi. En fases primerenques, els tumors són susceptibles a cirurgia mentre que per a estadis avançats el més recomanat és la quimioteràpia.

1.5 EGFR

Malgrat que el bon funcionament de la família dels Receptors del Factor de Creixement Epidèrmic és essencial per al normal desenvolupament tissular, l'activitat desregulada dels membres d'aquesta família té un paper destacat en el procés de carcinògenesi. Molts processos tumorals s'originen per desregulacions de les vies de transducció de senyal dependents d'EGFR com ara la sobreexpressió, amplificació gènica, mutacions activadores o pèrdua dels factors reguladors, que afecten de forma directa els receptors.

Tots aquests processos contribueixen a que l'estudi de la família d'EGFR sigui primordial per entendre el seu paper en el desenvolupament i tractament del càncer (ZHANG *et al.* 2006a).

1.5.1 Característiques de la família EGFR

Diferents famílies de receptors de factors de creixement estan implicades en el desenvolupament cel·lular, entre elles la família EGFR. Des que va ser descoberta per l'equip de Carpenter l'any 1975 i es va demostrar l'activitat quinasa, la seva relació amb processos de migració, diferenciació i proliferació cel·lular i el seu paper decisiu en la patogènia i progressió de molts tipus de tumor, s'ha vist que és cabdal per entendre els

processos neoplàsics (BLUME-JENSEN and HUNTER 2001; HYNES 2005; JORISSEN *et al.* 2003; RAYMOND *et al.* 2000).

La família EGFR està formada per quatre membres: EGFR (també anomenat ErbB1 o Her1), ErbB2 (Her2, Neu), ErbB3 (Her3) i ErbB4 (Her4). Els lligands d'aquests receptors es poden classificar en tres grups: els que s'uneixen específicament a EGFR (Factor de Creixement Epidèrmic (EGF), Factor α de Creixement Transformant (TGF- α), amfiregulina i epígen); els que ho fan tant a EGFR com a ErbB4 (betacel·lulina, l'heparina-binding EGF i l'epiregulina) i els que ho fan tant a ErbB3 com a ErbB4 (neuregulina) (HYNES 2005). No es coneix cap lligand d'ErbB2 (GARRIDO-CASTRO AC. 2013; JORISSEN *et al.* 2003).

Les proteïnes d'aquesta família presenten quatre dominis funcionals: un domini extracel·lular d'unió als lligands, codificat pels exons 1-16, un domini transmembrana per l'exó 17, un domini d'activitat tirosina quinasa (TQ) que comprèn els exons 18-24 i un domini regulador C-terminal, de l'exó 25 al 28 (LEAHY 2004; ROSKOSKI 2004) (Fig. 3).

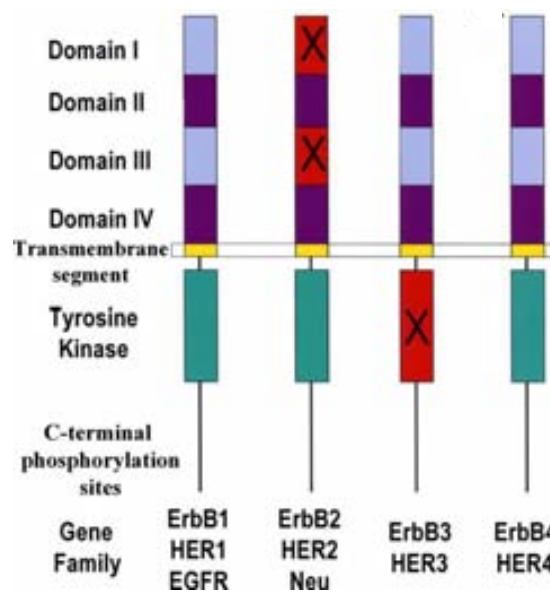


Fig. 3. Estructura de la família EGFR. El domini extracel·lular inactiu d'Her-2 i el domini TQ inactiu d'Her-3 són representats en vermell i amb una X.

El domini extracel·lular està dividit en quatre regions. Les regions I i III on s'estableix la unió amb els lligands i les regions II i IV necessàries per al procés de dimerització, un cop el lligand s'ha unit al receptor. En aquest procés cal que hi hagi una rotació del receptor per tal que les regions II i IV quedin al descobert i es pugui iniciar al procés d'activació (Fig. 4).

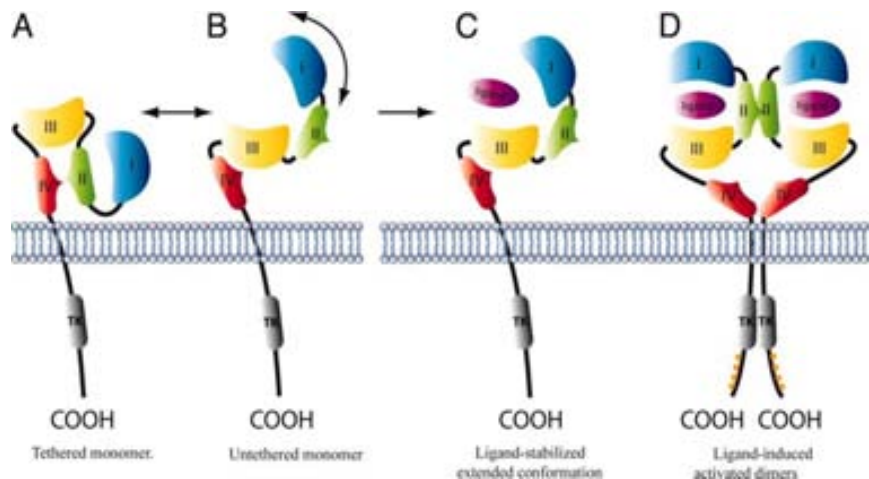


Fig. 4. Canvi de conformació del receptor. La forma replegada comporta que les regions II i IV estiguin unides. És la forma autoinhibida del receptor o “tethered form” (A). Per a que el lligand s’uneixi a les regions I i III, cal que el receptor es trobi en la seva forma estesa on aquestes regions queden al descobert (B). El lligand s’uneix simultàniament a les regions I i III del receptor i l’estabilitza (C), de manera que la regió II pot interactuar amb la d’altres receptors per a la seva dimerització i activació (FERGUSON *et al.* 2003; LEAHY 2004; LI *et al.* 2005; ROSKOSKI 2004).

Un cop el lligand s’uneix al receptor té lloc la dimerització (homodimerització si els dos receptors són iguals o heterodimerització si són diferents). Malgrat que qualsevol combinació entre els membres de la família EGFR és activa (menys els homodímers d’Her-3 ja que la seva activitat quinasa és molt feble) (SHI *et al.* 2010; JURA *et al.* 2009; VLAHOVIC and CRAWFORD 2003), s’ha demostrat que els heterodímers en general i en concret la combinació EGFR-Her2 són més actius que la resta d’homodímers (Tzahar, Waterman *et al.* 1996; Rubin and Yarden 2001; Yuan, Zhu *et al.* 2012) o d’heterodímers (GRAUS-PORTA *et al.* 1997; RUBIN and YARDEN 2001).

Així, doncs, la dimerització del receptor comporta l’estimulació intrínseca de l’activitat del domini TQ que s’autotransfosforila. El domini TQ bilobulat, característic de totes les proteïnes quinasa, està format per dues subunitats esfèriques: el lòbul N i el lòbul C. El lloc d’unió a l’ATP (Adenosin Trifosfat) necessari per iniciar el procés de fosforilació es troba entre els dos lòbuls (GAZDAR *et al.* 2004; ROSKOSKI 2004; ZHANG *et al.* 2006b) (Fig. 5).

Cada membre de la família EGFR és capaç d’activar diferents molècules de senyalització que s’uneixen a residus específics de fosfotirosina ubicades en el domini intracel·lular del receptor. Per tant, segons la combinació homo/heterodímer i dels residus que s’hagin fosforilat, s’activaran diferents vies de transducció de senyal (HYNES 2005; SCHULZE *et al.* 2005). El senyal que s’origina després de la dimerització no és només una suma de la capacitat fosforiladora de cada monòmer sinó que l’heterodímer assumeix un rol que no és possible en forma homodimèrica (ZACZEK *et al.* 2005) (Fig.6).

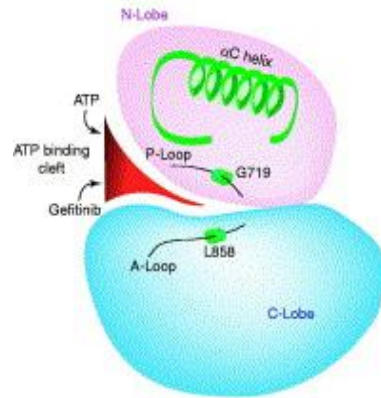


Fig. 5. Estructura bilobulada del domini TQ d'EGFR. El lòbul superior conté una estructura d'hèlix α i una regió rica en glicina en el lloc d'unió a l'ATP. En el lòbul inferior és on es troba la regió catalítica (Gazdar, 2004).

En concret, el gen d'EGFR (ErbB1) es localitza en el cromosoma 7p12-13 i codifica una glicoproteïna transmembrana de 170kDa amb activitat tirosina quinasa que transfereix el fosfat de l'ATP a residus de tirosina (HUBBARD and TILL 2000).

A partir d'aquest moment, quan es parla d'EGFR es fa referència al membre EGFR i no a la família.

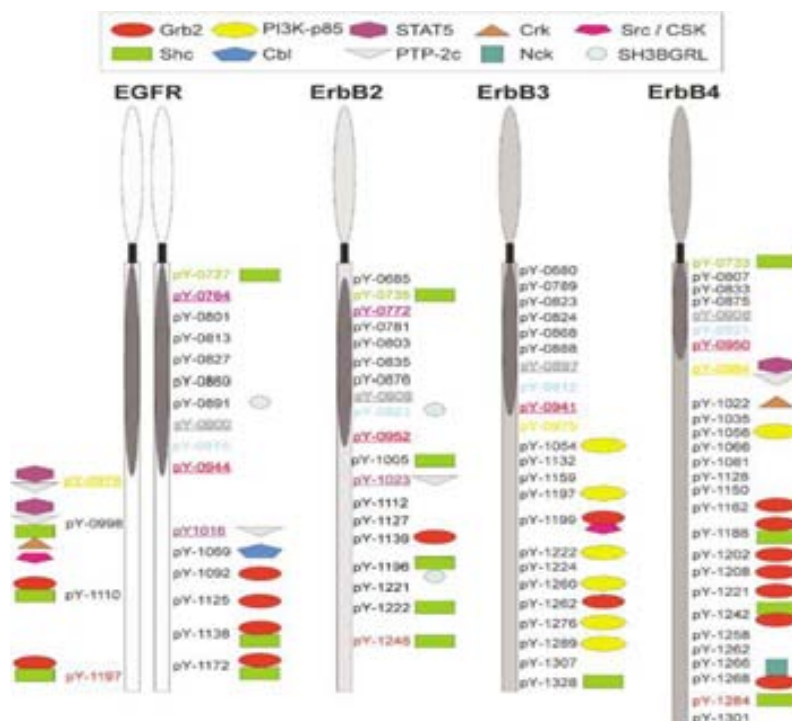


Fig. 6. Esquema del perfil d'interacció de la família EGFR. Les proteïnes amb què interaccionen les diferents tirosines (Y) fosforilades estan representades amb símbols de colors. Com es pot apreciar, no tots els membres de la família interactuen amb les mateixes proteïnes. També és important la Y fosforilada per a la posterior transducció de senyal (SCHULZE et al. 2005).

1.5.2 Vies de transducció de senyal

La dimerització dels receptors comporta l'activació de les proteïnes associades mitjançant una cascada de fosforilacions que es transmet fins al nucli i permet la transcripció gènica de resposta cel·lular a l'estímul (MENDELSON and BASELGA 2006).

La transducció del senyal es transmet per les següents vies principals:

1.5.2.1 Via de la proteïna quinasa d'activació mitogènica (MAPK)

Aquesta via de transducció de senyal s'inicia quan, a través del seu domini SH2, la proteïna adaptadora Grb2 s'uneix a les fosfotirosines del receptor dimeritzat i pot unir-se a SOS. Un cop SOS és actiu, pot activar RAS a través d'un intercanvi GDP-GTP (guanosin difosfat/trifosfat). RAS activa RAF (una serina-treonina quinasa) que al seu torn activa MEK (també serina-treonina quinasa) i finalment a MAPK, ERK-1 i ERK-2, que regulen molècules de transcripció relacionades amb la proliferació cel·lular i la supervivència (GAZDAR 2010; MENDELSON and BASELGA 2006).

Tot aquest procés pot ser modulats per altres proteïnes com ara MET, IGF-1R, LKB1 o la proteïna de fusió EML4-ALK (GAZDAR 2010).

1.5.2.2 Via de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)

La via de PI3K s'activa quan es dimeritza el receptor a través de la fosforilació de la proteïna c-Src (JORISSEN *et al.* 2003) i es produeix fosfatidilinositol trifosfat (PI3P) que s'uneix al domini PH (Pleckstrin Homology) d'AKT (serina-treonina quinasa) i de PDK1. Aquesta darrera proteïna també fosforila AKT. Finalment, AKT acaba fosforilant mTOR que modula les respostes de creixement cel·lular, proliferació i mobilitat (BLUME-JENSEN and HUNTER 2001; MENDELSON and BASELGA 2006; VIVANCO and SAWYERS 2002). L'activació d'AKT mitjançant la fosforilació/inactivació de les proteïnes proapoptòtiques BAD i caspasa 9, permet escapar als estímuls d'apoptosi (DOMIN 2008). Per una altra banda aquesta via també està regulada per PTEN (Phosphatase and TENsin homologue). Una pèrdua d'aquest gen, ja sigui per metilació del promotor com per delecions, comporta la hiperactivació d'AKT amb el conseqüent descontrol en la proliferació cel·lular (SCAGLIOTTI *et al.* 2004).

1.5.2.3 Via de la γ 1 isoforma de la fosfolipasa C (PLC γ)

La proteïna PLC γ s'uneix directament a les Y fosforilades d'EGFR després del procés de dimerització i catalitza la hidròlisi de PI3P produint segons missatgers com ara 1,2-diacetilglicerol i inositol trifosfat (IP₃). Mitjançant l'ús d'ions de calci, IP₃ pot activar altres vies com la de NF κ B i propiciar un seguit de respostes cel·lulars dependents de l'alliberament al citoplasma de Ca²⁺, entre ells l'activació de quinases dependents de calmodulina. L'activació de PKC (proteïna quinasa C) pot estimular les vies de RAF-MEK-MAPK i JNK (GAZDAR 2010; JORISSEN *et al.* 2003).

Així, doncs, la via de transducció de PI3K pot ser activada de dues maneres: de forma directa mitjançant l'activació de PLC γ 1 per part d'EGFR o de forma indirecta a través d'AKT. També s'ha comprovat la interacció directa entre aquestes dues proteïnes mitjançant el domini SH3 de PLC γ 1 i els dominis rics en prolina d'AKT (WANG and BRATTAIN 2006).

1.5.2.4 Via de la proteïna de transducció de senyal i transactivació (STAT)

La família STAT es considera com un grup de factors de transcripció latents en el citoplasma. Poden actuar tant a nivell citoplasmàtic com factors de transducció o a nivell nuclear com factors de transcripció gràcies al seu domini d'unió a l'ADN. El senyal es transmet directament de l'estímul extern al nucli sense segons missatgers (LEVY and DARNELL 2002).

La via de transducció de senyal està formada per una sèrie d'elements: un receptor, la proteïna JAK (janus quinasa) i el factor de transcripció STAT (SHEPHERD *et al.* 2005). En el cas que l'activació sigui a través de la família d'EGFR, no és necessària la intervenció de JAK ja que STAT és capaç d'unir-se directament a les fosfotirosines del dímer d'EGFR mitjançant el seu domini Src 2. Llavors es desencadena un procés de fosforilació i la proteïna es dimeritza formant tant homo com heterodímers. La dimerització de la proteïna STAT permet la seva entrada en el nucli cel·lular per tal d'actuar com a factor de transcripció en processos com ara apoptosi, proliferació i diferenciació (SCAGLIOTTI *et al.* 2004; SILVA 2004)

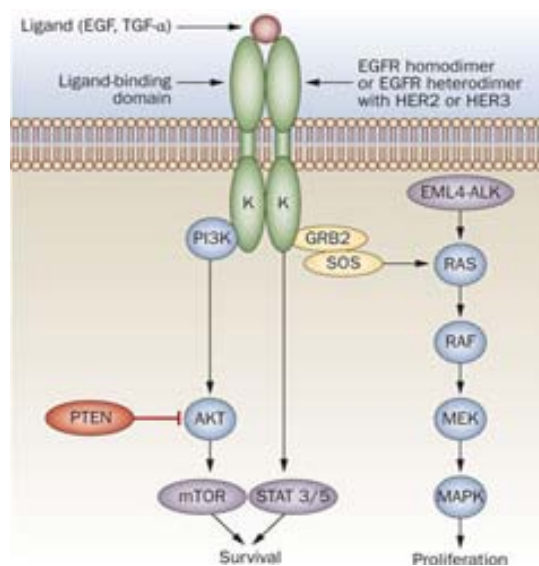


Fig. 7. Esquema de les principals vies de transducció de senyal que s'activen per l'homo/dimerització d'EGFR.

La inhibició d'aquestes vies comporta l'aturada de la proliferació cel·lular i l'activació de l'apoptosi (NIEDERST and ENGELMAN 2013).

1.5.3 Alteracions gèniques

1.5.3.1 Polimorfismes

El gen EGFR, com molts d'altres, té una sèrie de polimorfismes en la seva seqüència. Tot i que s'ha demostrat que molts d'ells no tenen rellevància clínica, hi ha treballs que postulen que poden exercir certa influència en la resposta al tractament (BANDRES *et al.* 2007; MA *et al.* 2009; SHITARA *et al.* 2012; ZHANG *et al.* 2013) o conferir un major risc d'aparició de càncer pulmonar (LIU *et al.* 2011a; ZHANG *et al.* 2006a).

D'entre aquests polimorfismes destaca la CA-SSR1 (simple sequence repeat 1) localitzada en l'extrem 5' de l'intró 1. Es tracta d'un locus altament polimòrfic que conté de 14 a 22 repeticions del dinucleòtid CA. S'ha comprovat que el nombre de repeticions està relacionat amb l'origen ètnic dels individus, de manera que els individus asiàtics presenten repeticions més llargues que els caucàsics. (NOMURA *et al.* 2007). S'ha descrit una relació inversament proporcional entre la llargada dels al·lels i l'expressió d'EGFR: els al·lels amb 22 repeticions redueixen un 80% l'expressió gènica comparat amb els al·lels de 16 repeticions (GEBHARDT *et al.* 1999; SUZUKI *et al.* 2008). Aquest polimorfisme s'ha correlacionat amb una millor resposta al tractament amb ITQ (AMADOR *et al.* 2004;

LIU *et al.* 2008; MA *et al.* 2009) i un increment en la supervivència en aquells pacients amb més repeticions (NIE *et al.* ; TISEO *et al.* 2008).

Associats a la CA-SSR1 s'han descrit un parell de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) ubicats també en la regió promotora del gen i relacionats amb la regulació de l'expressió d'EGFR. Es tracta dels polimorfismes -216G/T, situat 216 pb *upstream* del codó inicial ATG i lloc important d'unió al factor de transcripció SP1, i -191C/A, associat a l'increment de l'expressió. Diversos treballs han demostrat que aquests polimorfismes es poden considerar factors predictius de la resposta al tractament amb ITQ (ARAUJO *et al.* 2007; JUNG *et al.* 2012).

1.5.3.2 Amplificació gènica i sobreexpressió

La resposta al tractament en pacients sense mutacions en el domini TQ ha suscitat un debat molt actiu en els darrers anys. Un dels temes més debatuts ha estat la relació entre l'amplificació gènica i la sobreexpressió del gen EGFR amb la resposta al tractament i la supervivència.

La sobreexpressió es pot analitzar per diferents metodologies en funció del material genètic que es vulgui estudiar. Per exemple, si s'analitza la quantitat de proteïna expressada per un gen, les tècniques més utilitzades són el Western Blot, l'immunoassaig enzimàtic o la immunohistoquímica (IHQ), considerada la tècnica de referència per quantificar la sobreexpressió proteïca i basada en l'ús d'anticossos marcats amb fluorocroms que s'uneixen a la proteïna. Per una altra banda, la sobreexpressió respecte a l'ARN (Àcid Ribonuclèic) es detecta mitjançant Northern Blot o RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) o si el que es vol detectar és l'amplificació de l'ADN, les tècniques més utilitzades són el FISH o la PCR quantitativa.

La sobreexpressió d'EGFR, que oscil·la entre el 43-89%, s'ha descrit en diversos treballs. Segons la histologia, els carcinomes escatosos presenten una sobreexpressió del 84%; els adenocarcinomes del 65% i els carcinomes de cèl·lules grans del 68%. No s'ha trobat sobreexpressió en carcinomes de pulmó de cèl·lules petites (HIRSCH *et al.* 2003a).

El benefici que comporta l'amplificació o la polisomia respecte al tractament és força controvertit ja que hi ha treballs tant a favor de la relació entre el nombre de còpies del gen i una major supervivència (CAPPUZZO *et al.* 2005; DAHABREH *et al.* 2010; TSAO *et al.* 2005; ZHU *et al.* 2008b) com estudis amb resultats contradictoris (SASAKI *et al.* 2008; SONE *et al.* 2007).

Tant els resultats de l'estudi fase III FLEX (First Line ErbituX) en pacients amb CPCNP en què s'afegeix erbitux (cetuximab) en el tractament en primera línia (PIRKER 2012) com els que s'obtenen de metanàlisis amb més de 5.000 pacients, posen de manifest que

aquesta sobreexpressió es pot considerar un factor pronòstic de supervivència estadísticament significatiu (LEE *et al.* 2010) i un biomarcador per a la predicció de la resposta a ITQ (CAPPUZZO *et al.* 2005; MASCAUX *et al.* 2011).

Respecte a l'amplificació gènica analitzada per FISH, s'han descrit percentatges que varien del 31% al 47% en diversos estudis clínics com ara l'ISEL (Iressa Survival Evaluation in Lung cancer) o el BR.21 i s'ha demostrat la correlació entre aquesta amplificació i un benefici respecte a respostes al tractament i la supervivència (16% respecte a 3% en respostes al tractament en pacients amb moltes còpies respecte a poques còpies amb Hazard Ratio (HR) 0,61; 95% interval de confiança (CI), 0,36 a 1,04; P=0,067 respecte a la supervivència dels pacients amb moltes còpies per a l'ISEL, HR 0,44; 95% CI, 0,23 a 0,82; P=0,008 per al BR.21) (CAPPUZZO *et al.* 2005; HIRSCH *et al.* 2006; TSAO *et al.* 2005; ZHU *et al.* 2008a). Malgrat tot, quan el tractament del tumor es basa en l'administració de ITQ, la importància de la sobreexpressió i l'amplificació desapareixen respecte a l'existència de les mutacions en el domini TQ (DACIC *et al.* 2006; NAKAMURA *et al.* 2006). Respecte a aquesta darrera consideració, s'ha demostrat que l'amplificació gènica s'observa més freqüentment en tumors EGFR mutats que en els wt (wild type) (56% respecte 26%) i que els tumors amb alta polisomia (més de 6 còpies per cèl·lula) pateixen amplificació dels al·les mutats (TAKANO *et al.* 2005; TARON *et al.* 2005).

Cal remarcar que tots els estudis basats en l'anàlisi de la sobreexpressió i amplificació d'EGFR per IHQ i FISH, respectivament, recomanen la corroboració dels resultats per altres mètodes de detecció. Aquestes tècniques, malgrat ser les estàndard d'anàlisi, presenten alguns factors que poden esbiaixar els resultats com ara els anticossos utilitzats o els rangs d'acceptació de resultats (DACIC *et al.* 2006; SCAGLIOTTI *et al.* 2004).

Finalment, tot i que l'amplificació gènica es considera el mecanisme principal de sobreexpressió (CAPPUZZO *et al.* 2005; HIRSCH *et al.* 2003b; LEE *et al.* 2010; LIANG *et al.* 2010; SUZUKI *et al.* 2005), hi ha un percentatge de tumors en què la sobreexpressió no ve acompanyada d'amplificació gènica (HIRSCH *et al.* 2003b), de manera que es pot interpretar que hi ha altres mecanismes que modulen l'expressió (PINTER *et al.* 2008).

1.5.3.3 Mutacions del domini extracel·lular: EGFRVIII

Hi ha una versió del gen EGFR que té delecionats els exons 2 al 7 i que comporta el truncament del domini extracel·lular d'unió als lligands de la proteïna. Tot i que no hi ha unió a lligand, aquest receptor està constitutivament actiu. S'ha vist que malgrat que aquest receptor té tendència a homodimeritzar-se, l'heterodimerització amb Her-2 és possible (CHU *et al.* 1997). El domini TQ també pateix modificacions: per una banda s'activa constitutivament la via de PI3K i per una altra apareixen noves tirosines

susceptibles de fosforilació que permeten l'activació de diferents vies de transducció de senyal (PEDERSEN *et al.* 2001).

Aquest receptor truncat és freqüent en glioblastomes (60%) tot i que també s'ha detectat en altres tipus tumorals com en la histologia escatosa de CPCNP. El fet de que només sigui present en cèl·lules tumorals ha contribuït que s'hagi convertit en diana terapèutica. Actualment el tractament es basa en anticossos i inhibidors de l'activitat tirosina quinasa (KUAN *et al.* 2001; MELLINGHOFF *et al.* 2005).

1.5.3.4 Mutacions del domini TQ

L'any 2004 tres grups de recerca (LYNCH *et al.* 2004; PAEZ *et al.* 2004; PAO *et al.* 2004) van descriure, quasi simultàniament, el descobriment d'unes mutacions activadores del domini TQ del gen EGFR en una sèrie de pacients amb CPCNP, molt sensibles a ITQ. Aquesta descoberta va resoldre l'enigma de per què hi havia un subgrup de pacients tractats amb aquests fàrmacs que responien d'una manera excepcional. La resposta es podia explicar mitjançant la presència d'aquestes mutacions en pacients joves de sexe femení, no fumadors i amb histologia tumoral d'adenocarcinoma. Aquestes mutacions són força més freqüents en població asiàtica (40-50%) que en població caucàsica (15%) (PAO *et al.* 2005).

Malgrat que s'han descrit més de 192 mutacions entre diversos treballs (MU *et al.* 2005; SHIGEMATSU *et al.* 2005) s'ha demostrat que les que tenen capacitat de modular la resposta als ITQ estan localitzades entre els exons 18 i 21 que formen part del domini TQ (DE GUNST *et al.* 2007; LYNCH *et al.* 2004; WU *et al.* 2011). Es tracta de petites delecions de 9 a 24pb en l'exó 19 i de mutacions puntuals en els exons 18 i 21. Les delecions de l'exó 19 i les mutacions de l'exó 21 representen el 90% del total de les mutacions descrites en el gen. Diversos treballs han demostrat que aquestes mutacions són mútuament excloents (MITSUDOMI *et al.* 2005; PAN *et al.* 2005; TAKANO *et al.* 2007; YATABE *et al.* 2011).

Per demostrar que les mutacions eren les precursors del desenvolupament tumoral, es va idear un model animal amb ratolins transgènics que expressaven el gen EGFR delecionat o amb la mutació L858R de l'exó 21. Diferents estudis van comprovar que aquests ratolins desenvolupaven adenocarcinomes i que la massa tumoral disminuïa amb el tractament amb ITQ. A més es va observar que el senyal constitutivament activat del gen EGFR era necessari per mantenir el tumor (GREULICH *et al.* 2005; JI *et al.* 2006; POLITI *et al.* 2006).

Gràcies a diversos treballs, s'ha comprovat que cada mutació, malgrat que totes elles estiguin ubicades molt a prop del domini d'unió a l'ATP, provoca un patró diferent de fosforilació de les tirosines del receptor que comporta una diferent activació de les vies de transducció de senyal (CHEN *et al.* 2006; SORDELLA *et al.* 2004).

1.5.3.4.1 Mutacions de sensibilitat al tractament: exó 19, 21 i 18

Les delecions més comunes de l'exó 19 comprenen els aminoàcids de la signatura proteica ELREA. Les més freqüents són les delecions de 15pb dels codons delE746-A750 en un 68,1% dels casos, seguida per la delecio de 18pb que consisteix en la delL747-P753insS, en un 6,8%; la delecio de 9pb representada per delL747_E749, en un 6,4% dels casos; la delecio de 24pb corresponent als codons delS752_I759, en un 0,7% i finalment la delecio de 12 pb dels codons delE746_E749, en un 0,5% (BREVET *et al.* 2010).

Deletion size	AA mutation	COSMIC (n = 1531)
	No mutation	
Del-9	L747_E749del	6.4%
	K745_L747del	0.2%
Del-12	E746_E749del	0.2%
Del-15	E746_A750del*	68.1%
	L747_T751del	6.4%
	K745_E749del	0.9%
	A750_K754del	0.12%
Del-18	E746_T751del	0.7%
	L747_S752del	2.4%
	E746_S752>X†	3.8%
	L747_P753del	0.4%
	L747_P753>Q	1.1%
	L747_P753>S	6.7%
Del-24	E746_P753del	0.4%
	L747_K754del	0.12%
	A750_K757del	0.12%
	T751_E758del	0.06%
	S752_I759del	0.7%

Taula 4. Delecions més comunes de l'exó 19 amb la seva freqüència. Com es pot observar, la delecio de 15pb és la més freqüent mentre que les de 12pb i 24 pb són les menys comunes.

Les delecions comporten la fosforilació constant del receptor sense necessitat d'unió a lligand i activen la via d'AKT i STAT de supervivència cel·lular (SORDELLA *et al.* 2004). A més s'ha comprovat, per estudis de cinètica enzimàtica, que els receptors delecionats presenten una afinitat molt més alta per als ITQ que no pas els wt (CAREY *et al.* 2006).

Malgrat que no s'ha detectat cap relació entre la mida de la delecio i el tractament amb ITQ (TARON M. 2010) s'han observat diferents rangs de respostes del 70 al 100%, depenent dels aminoàcids delecionats i de la posicio de la delecio (CHUNG *et al.* 2012).

Recentment s'han descrit insercions en l'exó 19 que, mitjançant models cel·lulars, també estan relacionades amb la sensibilitat (semblant a la que confereixen les delecions) als ITQ. La seva freqüència és al voltant de l'1% (HE *et al.* 2012).

En l'exó 21 s'han descrit dues mutacions puntuals que modulen la resposta als ITQ. La més comuna, present en un 40% dels casos, està ubicada en el codó 858 on hi ha una substitucio de leucina per arginina (L858R). Mitjançant models cristal·logràfics s'ha comprovat que aquesta mutacio provoca que l'activitat quinasa del receptor estigui

constitutivament activa ja que impedeix que pugui tornar a la conformació inactiva (YUN *et al.* 2007). Estudis enzimàtics han posat de manifest que la mutació L858R és 20 cops més afí per l'ITQ que no pas el receptor wt (Eck and YUN 2010; YUN *et al.* 2007). D'aquesta manera s'explica la resposta tumoral al tractament.

En el mateix exó també hi ha la mutació puntual L861Q, en una freqüència del 2% i on es substitueix una leucina per una glutamina. Molt propera a la mutació L858R, la L861Q sembla que també estaria implicada en el mateix mecanisme d'activació constitutiva del receptor. Estudis enzimàtics han demostrat que l'afinitat per l'ATP és més gran que en la resta de mutacions, de manera que la seva unió amb els ITQ és més feble i per tant, no hi ha tan bona resposta al tractament (KANCHA *et al.* 2011; YUNG *et al.* 2009).

En l'exó 18 hi ha una mutació puntual en el codó G719S on la glicina és substituïda per una serina, molt a prop del lloc d'unió de l'ATP amb la quinasa. Cristal·logràficament s'ha vist que la seva aparició té un efecte semblant a l'estabilització de la forma activa del receptor però d'una manera més indirecta que no les mutacions de l'exó 21 (Eck and YUN 2010). Estudis enzimàtics han demostrat que la mutació de l'exó 18 confereix 10 cops més afinitat pels ITQ que no pas el receptor wt. Tot i que queda lluny de l'alta afinitat per als ITQ dels receptors mutats en la posició L858R, aquesta mutació modula, modestament, la resposta al tractament (YUN *et al.* 2007).

1.5.3.4.2 La mutació T790M : resistència al tractament amb ITQ

L'any 2005 es va descobrir que la mutació puntual ubicada en el codó 790 de l'exó 20, on es produeix un canvi de treonina a metionina, era la causa de la resistència al tractament amb ITQ quan es van analitzar mostres dels pacients que havien progressat a aquests fàrmacs (KOBAYASHI *et al.* 2005; PAO *et al.* 2005). Es va estudiar el paper d'aquesta mutació en l'aparició de la resistència a ITQ mitjançant l'ús d'un model cel·lular què se li havia introduït la mutació T790M. En tractar la línia cel·lular sensible al tractament amb gefitinib es va comprovar que s'havia tornat resistent al fàrmac (GREULICH *et al.* 2005; PAO *et al.* 2005).

Per determinar quin era l'origen estructural d'aquesta resistència, es van realitzar diversos estudis cristal·logràfics. La mutació T790M també està ubicada molt a prop del lloc d'unió de l'ATP, però a diferència de les anteriors, sembla que provocaria un canvi de conformació que impediria la unió de l'ITQ al receptor, comportant la no resposta al tractament (Eck and YUN 2010; KUMAR *et al.* 2008).

Malgrat que més de la meitat dels pacients amb mutacions de sensibilitat i tractats amb ITQ progressen al tractament, la detecció de la mutació T790M en el moment del diagnòstic s'ha descrit al voltant del 5% (INUKAI *et al.* 2006; MA *et al.* 2011; TOYOOKA *et al.*

1- INTRODUCCIÓ

2005). Tot i així, i utilitzant tècniques d'anàlisi més sensibles, diversos treballs descriuen freqüències superiors al 30% en pacients no tractats amb ITQ, com ara el grup de Su o de Rosell (31,5% i 35%, respectivament) (Su et al. 2012; ROSELL *et al.* 2011).

S'han postulat diverses hipòtesis sobre la mutació T790M, en base al coneixement previ de l'existència de les mutacions que confereixen resistència al tractament en leucèmies. Aquestes mutacions s'havien observat en gens de característiques similars a la família EGFR, com els gens ABL o c-KIT. Una de les teories de l'aparició de la mutació T790M es basa en la preexistència d'aquesta mutació en un nombre petit de cèl·lules que són seleccionades amb el tractament. Com que la resta de les cèl·lules són sensibles als fàrmacs, es van seleccionant les cèl·lules resistents que poden proliferar sense problema i augmentar la massa tumoral (INUKAI *et al.* 2006) (Fig. 8). Malgrat que aquesta és la hipòtesi més acceptada, una altra possibilitat contempla l'aparició de la mutació provocada pel tractament (WENYONG CHEN 2011).

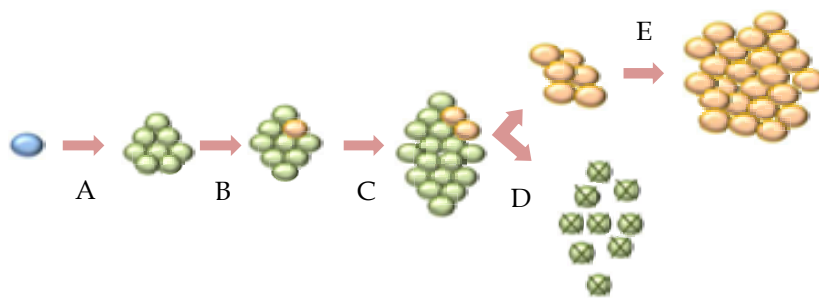


Fig. 8. Hipòtesi de selecció cel·lular de la clona resistent. La cèl·lula progenitora (en blau) pateix una activació oncogènica provocada per l'aparició d'una mutació (cèl·lules en verd) de sensibilitat del gen EGFR (A). A mida que la proliferació avança, una de les cèl·lules muta en la posició T790M (en taronja) de l'exó 20 relacionada amb resistència als ITQ (B). Totes les cèl·lules, tant mutades sensibles com resistents, proliferen conjuntament (C). Quan s'aplica un ITQ com a tractament (D), les cèl·lules amb la mutació de sensibilitat són eliminades mentre que les resistents continuen proliferant convertint el tumor en resistent al fàrmac. Adaptat d' Inukai, 2006.

Tot i que la mutació en la posició T790M de l'exó 20 és la que influeix en la modulació de la resposta als ITQ, s'han descrit moltes altres mutacions amb un paper incert tant des del punt de vista de la resposta com de la resistència al tractament. Entre aquestes darreres, les insercions de 14 aminoàcids, generalment entre els residus Glu762 to Cys775 de l'exó 20, ubicades en el lòbul N del domini TQ. Malgrat que no està reportat amb exactitud la seva freqüència la base de dades de mutacions somàtiques del Wellcome Trust Sanger Institute (COSMIC) postula que és de l'1,6% en l'anàlisi de 7.066 mostres de CPCNP. Com que no hi ha models animals ni línies cel·lulars amb aquesta alteració tan poc freqüent, la seva implicació clínica no està del tot dilucidada. Tot i així, sembla que conferiria una resistència semblant a la de la mutació T790M (ARCILA *et al.* 2013; YASUDA *et al.* 2012).

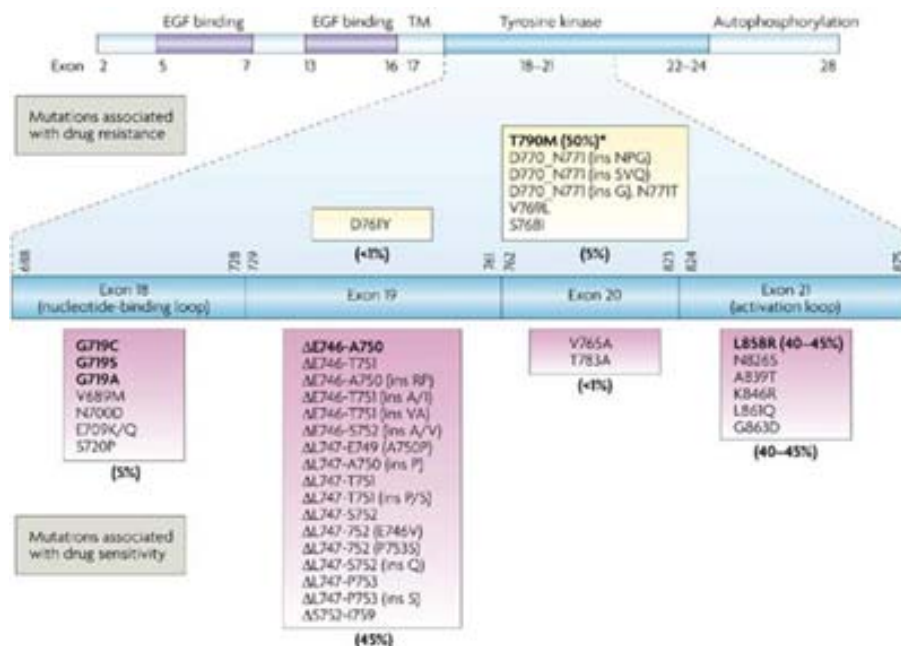


Fig. 9. Esquema de les mutacions del gen EGFR. En aquesta figura es van representar les principals mutacions distribuïdes per exons i dominis. Les mutacions dels requadres magenta estan relacionades amb sensibilitat al tractament amb ITQ, mentre que les que estan en els requadres grocs són les relacionades amb resistència al tractament. Sota els requadres estan representades les freqüències en què es troben les mutacions en pacients de CPCNP. Com es pot veure, les delecions de l'exó 19 i les mutacions puntuals de l'exó 21 representen el 90% del total. En negreta es ressalta la mutació més freqüent en cada exó (SHARMA *et al.* 2007). La llista completa de mutacions i les seves freqüències està indexada en la pàgina web "EGFR mutation database" (<http://www.somaticmutations-egfr.org/NSCLC.html>).

1.5.4 Estratègies de tractament

Hi ha diverses estratègies per al tractament dels pacients amb CPCNP amb fàrmacs dissenyats contra la família EGFR:

1.5.4.1 Anticossos monoclonals

Els anticossos monoclonals s'han desenvolupat a partir del coneixement dels mecanismes d'unió dels lligands als receptors per poder inhibir diversos membres de la família EGFR. Són altament específics i es poden combinar amb químic i radioteràpia (SRIDHAR *et al.* 2003). La seva activitat es basa en la capacitat d'unió al domini extracel·lular del receptor competint amb el lligand.

Dins d'aquest grup trobem diversos agents:

Cetuximab és un anticòs quimèric humà-ratolí que, en unir-se al domini extracel·lular del receptor, n'impedeix l'activació. El seu mecanisme d'acció, que ha estat descrit en

diversos estudis, es basa en la unió de cetuximab al domini III del receptor impedit la dimerització i bloquejant l'autofosforilació. Amb aquests treballs s'ha comprovat que la inhibició d'un dels dos dominis d'unió al lligand (domini I o III) és suficient per bloquejar l'activació (LI *et al.* 2005).

Aquest anticòs és àmpliament utilitzat en el tractament de càncer de còlon i de cap i coll combinat amb quimioteràpia (MENDELSON and BASELGA 2006). En un subgrup de pacients amb CPCNP s'ha aconseguit una elevada resposta (DIENSTMANN *et al.* 2011).

Matuzumab és un anticòs resultant de la immunització de BALB/c de ratolí amb la línia cel·lular de carcinoma humà A431. Mitjançant estudis de cristal·lografia s'ha comprovat que, tot i que aquest anticòs també s'uneix al domini III del domini extracel·lular d'EGFR com ho fa cetuximab, l'epítip d'unió és diferent, de manera que permetria l'ús terapèutic dels dos anticòs en combinació (SCHMIEDEL *et al.* 2008).

Panitumumab és un anticòs completament humà que redueix el risc de reaccions d'hipersensibilitat. Com els altres dos anticòs, el seu lloc d'unió és el domini III del domini extracel·lular d'EGFR. Malgrat que diversos estudis havien postulat que el panitumumab i el cetuximab s'unien exactament en els mateixos epítips, el treball de Voigt demostra que el panitumumab també es pot unir en d'altres llocs d'unió. Això comporta que els pacients que tenen una mutació en el domini extracel·lular que impedeix l'activitat inhibidora de cetuximab puguin ser tractats amb aquest altre anticòs (VOIGT *et al.* 2012).

Necitumumab també és un altre anticòs completament humà. Mitjançant estudis de cristal·lografia s'ha comprovat que es tracta d'un anticòs molt semblant a cetuximab amb l'avantatge que necitumumab no comporta tants problemes d'hipersensibilitat (LI *et al.* 2008c). D'altres treballs han posat de manifest que té una activitat antiEGFR superior a cetuximab que el podrien convertir en un potencial tractament en pacients amb CPCNP (SAXENA B. 2011).

Finalment, nimotuzumab és, com els anteriors, un anticòs d'origen humà que s'uneix també al domini III del domini extracel·lular d'EGFR amb moderada afinitat i impedeix la unió amb el lligand. D'aquesta manera, no permet la torsió del receptor i no exposa els dominis de dimerització. Podria ser una alternativa a l'ús de cetuximab en pacients amb CPCNP (BOLAND and BEBB 2009).

1.5.4.2 Toxines conjugades

Una altra estratègia és utilitzar toxines conjugades covalentment a un lligand o bé a un anticòs antiEGFR. Quan aquest lligand s'uneix al receptor es produeix la internalització

de la toxina que inhibeix les corresponents vies de transducció de senyal. Aquestes toxines poden ser d'òrgens molt diferents (bacterià, com l'endotoxina A de *Pseudomonas* o la toxina de la diftèria; vegetal, etc.) o inclús petites molècules d'unió a l'ADN. Aquest tipus de tractament presenta una sèrie d'avantatges: en tractar-se del lligand o l'anticòs del receptor diana s'assegura l'especificitat d'acció de la toxina que pot interactuar amb d'altres mecanismes que, *a priori*, no tenen per què estar regulats pel receptor. En contrapartida si el receptor també es troba en cèl·lules wt pot haver toxicitat i en moltes ocasions, la concentració necessària per produir l'efecte tòxic pot ser massa elevada per ser viable en un sistema *in vivo* (CASSELL and GRANDIS 2010; TEICHER and CHARI 2010).

Aquesta estratègia s'ha aplicat en tumors de cap i coll, glioblastomes i leucèmies (CASSELL and GRANDIS 2010). També s'ha aplicat en limfomes no de Hodgkind's amb èxit, conjugant-les amb radionuclis.

1.5.4.3 Oligonucleòtids *antisense*

Els oligonucleòtids *antisense* consisteixen en fragments monocatenaris d'ADN d'uns 20pb de llarg que s'uneixen a l'ARN missatger i entorpeixen la funció dels ribosomes durant la traducció. Per evitar la degradació d'aquests oligonucleòtids per les nucleases, cal modificar-los amb fosfotioat que els estabilitza i n'impedeix la degradació. Aquesta estratègia s'ha provat en CPCNP en combinació amb quimioteràpia (JORISSEN *et al.* 2003).

1.5.4.4 Inhibidors de tirosina quinasa (ITQ)

Els inhibidors de la tirosina quinasa són petites molècules que competeixen amb l'ATP per la unió al domini TQ en el domini intracel·lular del receptor. Generalment actuen incrementant els processos d'apoptosi i inhibeixen els de proliferació cel·lular i angiogènesi. Els principals ITQ són gefitinib i erlotinib, anilinoquinazolines orals dissenyades per unir-se de manera reversible i específica al receptor EGFR inhibint l'autofosforilació. Estudis *in vitro* han demostrat que aquests ITQ poden inhibir l'activitat d'EGFR a una concentració suficientment baixa com per què no afecti significativament l'activitat d'altres quinases (WAKELING *et al.* 2002).

Entre els ITQ també hi ha l'afatinib, inhibidor irreversible aprovat per l'FDA l'any 2013 per administrar-lo en primera línia en pacients amb mutacions d'EGFR. D'aquest fàrmac se'n parla més endavant.

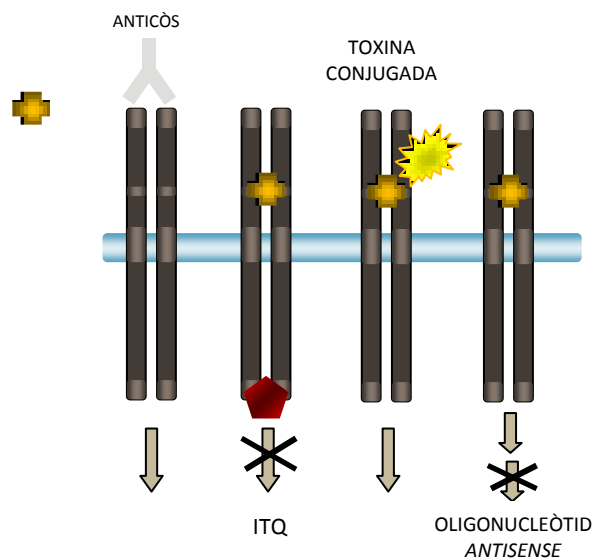


Fig. 10. Resum dels mecanismes d'acció de les diferents estratègies de tractament antiEGFR. Es pot veure que l'activitat dels anticòssos i les toxines conjugades es duu a terme en l'exterior de la membrana cel·lular mentre que els ITQ i els oligonucleòtids antisense requereixen la internalització cel·lular. Modificació de West, 2008.

1.6 Els ITQ com alternativa a la quimioteràpia convencional

La relació d'EGFR amb el desenvolupament de càncer de pulmó i les limitades opcions de tractament en estadis avançats van propiciar l'ús de nous fàrmacs que tenien com a diana terapèutica el gen EGFR en pacients amb CPCNP.

Els estudis fase I en què es va demostrar la capacitat antitumoral dels dos inhibidors orals de la TQ, erlotinib i gefitinib, van ser seguits en molt poc temps per estudis extensius fase II on es va provar l'ús d'aquests inhibidors en pacients amb CPCNP resistents a la quimioteràpia (BASELGA *et al.* 2002; HERBST *et al.* 2002).

El fet de desconèixer el paper determinant de les mutacions d'EGFR respecte al tractament amb ITQ va comportar que els resultats obtinguts d'alguns estudis clínics arribessin a ser contradictoris si no tenien en compte les característiques genètiques dels pacients (GARASSINO *et al.* 2009).

A continuació s'exposen els principals assaigs clínics realitzats amb erlotinib i gefitinib.

1.6.1 Estudis amb pacients no seleccionats

1.6.1.1 Assaig fase II: IDEAL-1/2

IDEAL (Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung cancer) és un assaig clínic aleatoritzat fase II on es va avaluar la dosi d'administració de gefitinib en monoteràpia (250mg en l'IDEAL-1 i de 500mg en l'IDEAL-2) en pacients que ja havien rebut alguna línia de quimioteràpia basada en platí i docetaxel. Es va poder comprovar que les respostes i les supervivències eren molt similars (18% i 10% respecte a respostes, i la supervivència a l'any del 27% i 35%, respectivament). S'acordà que la dosi d'administració del fàrmac en estudis posteriors seria de 250mg ja que el seu efecte tòxic era menor (FUKUOKA *et al.* 2003; KRIS *et al.* 2003). Curiosament es van obtenir millors resultats en un subgrup de pacients amb certes característiques com ara origen asiàtic ($p=0,002$), sexe femení, no fumador i histologia d'adenocarcinoma (OR de 2,65 pel sexe i 3,45 per l'histologia) (MILLER *et al.* 2004).

1.6.1.2 Assaig fase III: BR.21

BR.21 és un assaig clínic fase III on es va avaluar l'efecte d'erlotinib monoteràpia en segona o tercera línia en pacients amb CPCNP avançat respecte a placebo. L'assignació dels pacients al grup de tractament amb erlotinib o placebo es va aleatoritzar en proporció 2:1. Amb aquest assaig es va demostrar que la resposta, la PFS i la supervivència eren molt superiors en el grup tractat amb erlotinib (respostes del 8,9% i menor a l'1% $p<0,001$; PFS de 2,2 respecte a 1,8 mesos HR 0,61; 95% CI, 0,51 A 0,74; $P<0,001$; supervivència de 6,7 respecte als 4,7 mesos HR 0,70; 95% CI, 0,58 a 0,85; $P<0,001$, pels tractats amb erlotinib respecte placebo, respectivament). En l'anàlisi multivariada, ser no fumador i tenir histologia adenocarcinoma estava associat a resposta (SHEPHERD *et al.* 2005).

En base a aquests resultats, l'any 2004 l'FDA va aprovar erlotinib com a tractament en segona o tercera línia per als pacients de CPCNP avançats.

1.6.1.3 Assaig fase III: INTACT-1/2

Els bons resultats obtinguts en estudis inicials i les evidències preclíniques de sinergisme entre gefitinib i quimioteràpia van comportar realitzar dos estudis clínics aleatoritzats fase III: INTACT-1 i INTACT-2 (Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Therapy). La finalitat era comprovar el benefici, en primera línia, d'administrar gefitinib en combinació amb quimioteràpia estàndard (gemcitabina/cisplatí per l'INTACT-1 o

paclitaxel/carboplatí per l'INTACT-2). Malauradament no van proporcionar resultats favorables (GIACCONE *et al.* 2004; HERBST *et al.* 2004).

1.6.1.4 Assaig fase III: ISEL

ISEL és un assaig comparatiu fase III on es va avaluar l'efecte de gefitinib monoteràpia respecte a placebo en pacients amb CPCNP avançat, que havien progressat al tractament. La mitjana de supervivència mostrava una tendència favorable per al grup tractat amb gefitinib però amb una diferència que no va ser estadísticament significativa (5,6 mesos pel tractament amb gefitinib respecte a 5,1 mesos per al placebo; HR 0,89; 95% CI, 0,77 a 1,02, $p=0,087$) (THATCHER *et al.* 2005). Es va fer l'anàlisi de les mutacions d'EGFR i malgrat que el nombre de pacients mutats era massa petit, es va comprovar que responien millor al tractament (37,5% de respostes dels pacients mutats respecte al 2,6% dels pacients wt) (HIRSCH *et al.* 2006).

Com a conseqüència d'aquests resultats, l'FDA va restringir l'ús de gefitinib en els estudis clínics que s'estaven duent a terme.

1.6.1.5 V-15-32 i INTEREST: Estudis amb resultat contradictori

També en segona línia de tractament com L'ISEL, es van publicar l'any 2008 els resultats dos estudis fase III on s'avaluava la no inferioritat per a la supervivència de gefitinib enfront de docetaxel en pacients avançats de CPCNP prèviament tractats amb quimioteràpia. Mentre que l'estudi V-15-32, que incloïa població japonesa, no va demostrar aquesta no inferioritat entre els dos tractaments (MARUYAMA *et al.* 2008), l'estudi INTEREST (Iressa NSCLC Trial Evaluating Response and Survival versus Taxotere) va demostrar aquesta diferència (7,6 mesos amb erlotinib respecte als 8,0 mesos de docetaxel; HR 1,020; 96% CI, 0,905 a 1,15) (KIM *et al.* 2008).

De totes maneres, l'anàlisi posterior de les mutacions d'EGFR va posar de manifest que els pacients mutats tenien una millor PFS (DOUILLARD *et al.* 2010).

1.6.1.6 Estudis fase III: TRIBUTE I TALENT

Els estudis TRIBUTE (Tarceva Responses in Conjunction with paclitaxel and carboplatin) i TALENT (Tarceva in Lung Cancer) van avaluar l'efecte d'erlotinib en combinació amb quimioteràpia estàndard (paclitaxel/carboplatí per al TRIBUTE o gemcitabina/cisplatí per al TALENT) en primera línia de tractament. Com en el cas dels altres estudis realitzats amb gefitinib, no es van obtenir resultats favorables per a la supervivència (GATZEMEIER *et*

al. 2007; HERBST *et al.* 2005). Es va fer l'anàlisi de detecció de les mutacions d'EGFR en l'estudi TRIBUTE. Es va comprovar que els pacients amb mutacions responien millor al tractament ($P < 0,05$), mentre que no es va assolir la significació estadística respecte a la supervivència i PFS ($P = 0,092$ i $P = 0,96$), respectivament (EBERHARD *et al.* 2005).

1.6.2 Estudis amb pacients seleccionats

1.6.2.1 Estudi fase III: IPASS

L'ISEL donava a entendre que hi havia un subgrup de pacients asiàtics que, tractats amb gefitinib, assolien una millor supervivència, tot i que la diferència no era estadísticament significativa. En l'anàlisi de covariància es va descobrir que aquest augment en la supervivència era més clar entre els pacients no fumadors amb histologia d'adenocarcinoma (CHANG *et al.* 2006).

L'any 2006 es va iniciar l'estudi fase III IPASS (Iressa Pan ASia Study) que investigava l'efectivitat en primera línia del tractament amb gefitinib en els pacients clínicament seleccionats d'origen asiàtic amb adenocarcinoma avançat, fumador lleuger o no fumador. En aquests pacients preseleccionats es van analitzar les mutacions i el número de còpies del gen EGFR previ tractament i l'expressió proteica. Els resultats van mostrar que no hi havia diferència significativa en la mitjana de supervivència entre els pacients tot i que la resposta i la PFS era millor en els tractats amb ITQ que amb quimioteràpia amb una diferència del 71% respecte al 47%; $p < 0,001$ per la resposta i amb una HR de 0,74; 95% CI, 0,65 a 0,85; $p < 0,001$ per a la PFS. Analitzant el subgrup de pacients tractats amb gefitinib la PFS era superior per als mutats que per als wt (HR 0,48; 95% CI, 0,36 a 0,64; $p < 0,001$).

Per tant, es va concloure que les mutacions d'EGFR eren un bon biomarcador de predicció de la PFS i la resposta al tractament en primera línia amb gefitinib respecte a quimioteràpia amb carboplatí/paclitaxel (Mok *et al.* 2009).

Gràcies a aquests resultats, l'any 2009 es va aprovar a Europa l'ús de gefitinib per als pacients amb CPCNP en estadis avançats mutats d'EGFR sense tractament previ de quimioteràpia.

1.6.2.2 Estudis fase III: WJTOG3405 i NEJSG002

Un cop descobert el paper destacat de les mutacions en relació amb el tractament, es van realitzar una sèrie d'estudis comparatius entre quimioteràpia i tractament amb ITQ amb resultats semblants a l'IPASS, en població asiàtica. Així, l'estudi West Japan Thoracic Oncology Group 3405 trial (WJTOG3405) que comparava gefitinib respecte a

cisplatí/docetaxel i l'estudi North-East Japan Study group 002 trial (NEJSG002) que comparava gefitinib respecte a carboplatí/paclitaxel descriuen millors respostes i PFS dels pacients tractats amb ITQ que amb quimioteràpia (62% respecte al 32% de respostes ($p < 0,001$) i PFS de 9,2 respecte a 6,3 mesos, respectivament (HR 0,48; 95% CI, 0,33 a 0,71; $p < 0,001$) de l'estudi WJTOG3405; 74% respecte al 31% de respostes ($p < 0,001$) i PFS de 10,8 respecte a 5,4 mesos, respectivament (HR 0,30; 95% CI, 0,22 a 0,41; $p < 0,001$) de l'estudi NEJ002. Com en el cas de l'IPASS, no hi havia diferència respecte a la supervivència entre tractaments (MAEMONDO *et al.* 2010; MITSUDOMI *et al.* 2010). Aquests estudis van assentar les bases de la selecció del tractament segons el perfil genètic.

1.6.2.3 Estudi fase III: OPTIMAL

Per tal d'avaluar l'efecte d'erlotinib en pacients avançats amb mutacions d'EGFR, l'any 2008 es va iniciar l'estudi fase III OPTIMAL, en què es comparava la PFS assolida amb erlotinib respecte al tractament amb gemcitabina/carboplatí en primera línia, en població xinesa. Els resultats van demostrar que el tractament amb erlotinib era significativament superior a la quimioteràpia, en termes de resposta i PFS (83% respecte al 36%, respectivament per a la resposta i 13,1 mesos respecte a 4,6 mesos ($p < 0,001$), respectivament (HR 0,16; 95% CI, 0,10 a 0,26; $p < 0,001$) per a la PFS) (ZHOU *et al.* 2011). Per a la supervivència no es van obtenir diferències entre tractaments.

1.6.2.4 Assaig fase III: EURTAC

EURTAC (EUROpean TARceva vs Chemotherapy), que es va iniciar l'any 2007, és un assaig fase III en què es compara el tractament amb erlotinib enfront de quimioteràpia (cisplatí o carboplatí amb gemcitabina o docetaxel) en primera línia en pacients avançats amb mutacions d'EGFR, en població caucàsica. Els resultats demostren que la resposta al tractament i la PFS dels pacients de la branca d'erlotinib és significativament superior a la dels pacients tractats amb quimioteràpia (63% respecte al 18% ($p < 0,001$), respectivament per a la resposta i de 9,4 mesos respecte als 5,2 mesos (HR 0,37; 95% CI, 0,25 a 0,54; $p < 0,001$). Com en els estudis anteriors, no es va assolir cap diferència respecte a la supervivència (ROSELL *et al.* 2012).

Tots aquests resultats demostren la importància de l'anàlisi d'aquestes mutacions per a la pràctica clínica. En la següent taula es poden veure els principals estudis amb ITQ i els seus resultats respecte a la resposta, supervivència i PFS.

Estudi	Estadiatge	Branques de tractament	Nº de pacients	Respostes		Mitjana PFS		Mitjana de supervivència	
				(%)	p	mesos	p	mesos	p
IPASS	IIIB-IV	gefitinib vs	132	71	< 0,001	9,6	< 0,001	21,6	ns
		CbP	129	47		6,3	21,9		
WJTOG3405	IIIB-IV	gefitinib vs	86	62,1	< 0,0001	9,2	< 0,0001	35,5	ns
		CD	86	32,2		6,3	38,8		
OPTIMAL	IIIB-IV	gefitinib vs	82	83	< 0,0001	13,1	< 0,0001		
		CbG	72	36		4,6			
NEJ002	IIIB-IV	gefitinib vs	114	73,7	< 0,001	10,8	< 0,001	27,7	0,483
		CbP	114	30,7		5,4	26,6		
EURTAC	IIIB-IV	erlotinib vs	86	63	< 0,001	9,7	< 0,0001	19,3	0,87
		platins	87	18		5,2	19,5		

Taula 5. Resum dels principals estudis clínics on s'avalua l'efecte del tractament amb ITQ en monoteràpia en primera línia en pacients avançats de CPCNP. CD: cisplatí/docetaxel; CbP: carboplatí/paclitaxel; CbG: carboplatí/gemcitabina. EGFR + tots els pacients eren mutats d'EGFR.

1.6.3 Resistència a ITQ

Malgrat que s'ha demostrat que els pacients amb mutacions de sensibilitat del gen EGFR són els que responen al tractament amb ITQ, invariablement es desenvolupa una resistència a aquests fàrmacs que provoca una progressió de la malaltia (KOBAYASHI *et al.* 2005). El temps a la progressió depèn del tipus de mutació de sensibilitat tot i que pot variar d'un pacient a un altre (SHARMA *et al.* 2007).

Hi ha dos mecanismes principals responsables d'aquest fenomen: el que es coneix com resistència primària, en aquells pacients que no responen al tractament des de l'inici, i la resistència adquirida, en aquells pacients que responen al tractament però que experimenten una recaiguda després de la resposta als ITQ (CHONG and JANNE 2013).

1.6.3.1 Resistència primària

En termes generals, la resistència primària consisteix, principalment, en alteracions en els gens que modulen la resposta als ITQ, independentment de l'estat mutacional d'EGFR. Entre aquestes alteracions s'han descrit les mutacions, mútuament excloents amb les d'EGFR, dels codons 12 i 13 de K-RAS, mediador de la transducció del senyal de la via MAPK, amb una freqüència d'entre el 15-25% dels pacients de CPCNP (LINARDOU *et al.* 2008).

1- INTRODUCCIÓ

Per una altra banda, els gens relacionats amb la via PI3K/AKT també són causants de la resistència al tractament amb ITQ. Per exemple, l'amplificació o sobreexpressió del gen MET, descrit en un 20% dels casos de resistència adquirida, i el seu lligand HGF (Hepatocyte Growth Factor), que s'ha vist sobreexpressat en un 29% de tumors primaris mutats d'EGFR (YANO *et al.* 2011). Aquests dos gens estan relacionats amb la fosforilació d'Her-3 que activa la via de PI3K/AKT malgrat que EGFR estigui inactiu. En el treball de Capuzzo es descriu que un 2,5% dels pacients que encara no havien estat tractats amb ITQ presentaven sobreexpressió de MET en uns nivells semblants als de la línia cel·lular resistent a aquests fàrmacs (CAPPUZZO *et al.* 2009).

Paral·lelament, la pèrdua de PTEN faria augmentar l'activitat d'aquesta via i, per tant, la supervivència de les cèl·lules malgrat que siguin sensibles al fàrmac (YAMAMOTO *et al.* 2010). També s'ha comprovat que les mutacions del principal domini catalític del gen PI3KCA són responsables de l'adquisició de resistència quan són introduïdes en línies cel·lulars (SEQUIST, WALTMAN *et al.* 2011). Aquestes mutacions s'han descrit en un 5% dels pacients resistents als ITQ incloent pacients mutats d'EGFR que encara no havien estat exposats al tractament amb aquests inhibidors (KAWANO *et al.* 2006). Per una altra banda, la baixa expressió de BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death) gen relacionat amb el procés d'apoptosi, comporta la resistència al tractament amb ITQ. Els gens relacionats amb aquest procés com ara HDAC (Histona DeAcetilasa) són també objecte d'estudi per la seva relació amb la resistència primària (GONG *et al.* 2007).

També s'ha de tenir en compte la mutació en la posició T790M del gen EGFR com a causa de la resistència primària en aquells casos en què aquesta mutació és present quan el pacient encara no ha estat tractat amb ITQ. Aquesta freqüència representa al voltant del 30% dels casos (ROSELL *et al.* 2011; SU *et al.* 2012).

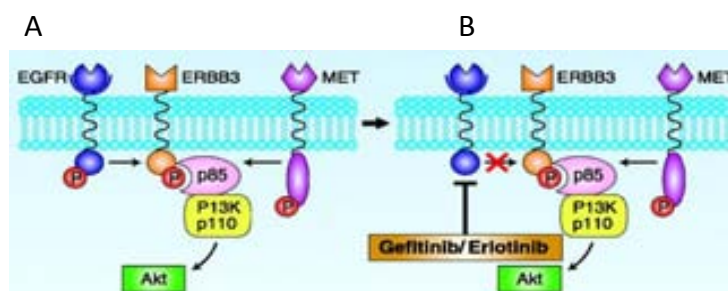


Fig. 11. Acció de MET en el procés de resistència primària al tractament amb ITQ. En la figura A, MET pot activar la via PI3K/Akt mitjançant la seva relació amb HER-3. En els pacients amb amplificació de MET (B), els ITQ erlotinib i gefitinib inhibeixen l'activació d'EGFR però no d'HER-3, que activa la via PI3K/Akt independentment de l'acció del fàrmac (ENGELMAN *et al.* 2008).

1.6.3.2 Resistència adquirida

Per una altra banda, la resistència adquirida es basa, essencialment, en l'aparició de la mutació en la posició T790M de l'exó 20 del gen EGFR (veure Figura 6). S'han descrit altres mutacions que també confereixen certa resistència als ITQ com la L747S i la D761Y, en l'exó 19, o la T854A, en l'exó 21 (BALAK *et al.* 2006; BEAN *et al.* 2008; COSTA *et al.* 2008b). La mutació T790M es detecta al voltant del 80% dels pacients que han progressat al tractament amb ITQ (SU *et al.* 2012).

Un altre fenomen de resistència adquirida és la transformació histològica de les cèl·lules cap a l'estat de mesènquima (EMT) de manera que perden el seu fenotip epitelial i generen nous patrons d'expressió gènica, com ara la pèrdua de l'expressió d'E-cadherina o l'augment d'expressió de vimentina, que comporten una agressivitat invasiva més alta (SUDA *et al.* 2011). Malgrat que el mecanisme no es coneix completament, sembla que hi estarien relacionats, de manera directa o indirecta, el gen NOTCH o TGF- β , entre d'altres.

Altres gens amb alteracions que potencialment poden estar relacionats amb aquesta resistència podrien ser ROS1, AXL, ALK, RET, JAK-2, d'HER-2, BRAF, IGFR o MEK1, entre d'altres (PAO and GIRARD 2011; PAO and HUTCHINSON 2012), així com la via de NF κ B (BIVONA *et al.* 2011). Per una altra banda, alteracions en els citocroms del metabolisme del fàrmac com ara CYP3A4 i CYP3A1 també podrien estar-hi relacionats. Tots aquests gens s'estan estudiant actualment, per discernir, inequívocament, el seu paper en la resistència als ITQ.

Malauradament, els mecanismes que originen la resistència al tractament amb ITQ encara són desconeguts per a un 40% dels pacients amb mutacions de sensibilitat del gen EGFR. El que s'ha comprovat és que poden coexistir diferents mecanismes de resistència al mateix temps en un mateix pacient: per exemple, es pot donar el cas de l'existència de la mutació de resistència T790M al mateix temps que l'activació de MET (BEAN *et al.* 2007).

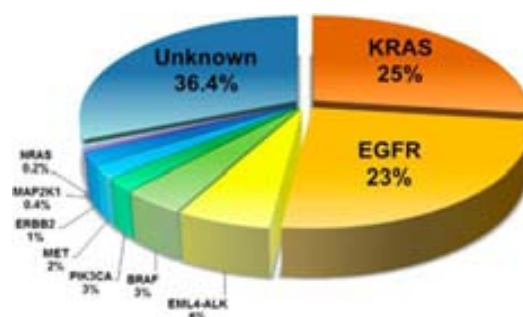


Fig. 12. Esquema de les principals alteracions que han estat descrites com a moduladores de les respostes als ITQ, que confereixen resistència al tractament. Com es pot veure en la figura, encara resta un alt percentatge d'alteracions no conegudes.

1.6.3.3 Estratègies per superar la resistència als ITQ

Malgrat que hi ha diferents estratègies per revertir la resistència adquirida, s'ha demostrat que els pacients que progressen al tractament amb ITQ presenten més freqüentment la mutació 790M que qualsevol altre mecanisme de resistència (ENGELMAN and JANNE 2008). Per tant, en els darrers anys, s'han desenvolupat una sèrie d'agents que s'uneixen irreversiblement a EGFR mitjançant una unió covalent amb un residu del domini d'unió de l'ATP. D'aquesta manera l'ATP no s'hi pot unir i s'inhibeix l'activitat quinasa del receptor (YUN *et al.* 2008).

Els inhibidors irreversibles que s'estudien actualment són neratinib, afatinib i dacomitinib.

Neratinib és un inhibidor irreversible que s'uneix a tots els membres de la família EGFR menys a HER-3. En un estudi fase II es va determinar que neratinib no era un bon tractament, malgrat que les dades preclíniques eren favorables per als pacients que havien desenvolupat resistència als ITQ per la mutació T790M. Només un petit subgrup de pacients portadors de la mutació de sensibilitat G719X de l'exó 18 es beneficiaven d'aquest inhibidor. D'acord amb aquests resultats, neratinib ha deixat d'administrar-se a pacients de CPCNP tot i que s'investiga com a inhibidor d'HER-2 en càncer de mama (BURSTEIN *et al.* 2010; KWAK 2011).

Afatinib és un inhibidor oral irreversible que s'uneix a tots els membres de la família EGFR menys a HER-3. El grup de Li ha demostrat, basant-se en models cel·lulars i xenografts, que en els doble mutants L858R i T790M, afatinib és més actiu que no pas gefitinib (LI *et al.* 2008a). L'activitat d'aquest inhibidor *in vivo* s'ha investigat en l'estudi LUX-Lung-1. Es tracta d'un estudi comparatiu fase IIb/III on es va avaluar l'efecte d'afatinib monoteràpia en pacients amb adenocarcinoma avançat, que havien progressat al tractament amb quimioteràpia seguit de ITQ, respecte a placebo. Es va comprovar que no aportava cap benefici per a la supervivència però sí respecte a la PFS (MILLER *et al.* 2012). En posteriors estudis, LUX-Lung-2 i LUX-Lung-3, aquest fàrmac ha demostrat la seva activitat antitumoral (SEQUIST *et al.* 2013; YANG *et al.* 2012).

Dacomitinib és un inhibidor irreversible que s'uneix a tots els membres de la família EGFR menys a HER-3, i que va demostrar la seva activitat en models animals resistents al tractament amb gefitinib (ENGELMAN *et al.* 2007). Basant-se en els bons resultats obtinguts en estudis previs en primera línia en pacients avançats, es va desenvolupar un estudi fase II on es comparava erlotinib enfront d'aquest inhibidor en pacients que havien progressat a l'anterior règim de quimioteràpia. Es va poder comprovar que l'ús de dacomitinib augmentava la PFS respecte a erlotinib (RAMALINGAM *et al.* 2012).

Tot i que aquests inhibidors poden ser útils en el tractament de pacients resistents als ITQ, l'equip de Yun postula que no és necessari que l'inhibidor sigui irreversible: un

inhibidor reversible que s'unís al receptor EGFR-T790M mutat amb una afinitat suficient per competir amb l'ATP seria suficient per revertir la resistència (YUN *et al.* 2008).

Per una altra banda es treballa en la recerca de combinacions de fàrmacs per tal de combatre la resistència multifactorial T790M concomitant a altres alteracions que també confereixen resistència als ITQ.

1.7 Tècniques per detectar les mutacions d'EGFR

Tal com s'ha comentat en apartats anteriors, les mutacions en el gen EGFR han marcat la pauta de tractament de tots aquells pacients portadors de les mutacions. Les respostes assolides en pacients d'estadis avançats, descrites al voltant del 80%, entre les quals hi ha remissions completes, és un fenomen conegut com efecte Llätzer (ROSELL *et al.* 2011; ROSELL *et al.* 2009; SUTANI *et al.* 2006; TAMURA *et al.* 2008).

S'ha descrit la correlació entre algunes de les característiques dels pacients com ara l'origen asiàtic, el fet de ser no fumador de sexe femení i amb histologia d'adenocarcinoma i les mutacions del gen EGFR. És en aquest tipus de pacient on, de forma sistemàtica, l'anàlisi de les mutacions proporciona un major número de casos susceptibles a beneficiar-se del tractament amb ITQ (RIELY *et al.* 2006; SHUKUYA *et al.* 2011).

1.7.1 Detecció de les mutacions d'EGFR en teixit tumoral

Històricament, l'anàlisi de les mutacions d'EGFR es realitza del teixit inclòs en parafina, utilitzat en el diagnòstic de la malaltia, procedint a la macro o microdissecció de la zona tumoral i la posterior anàlisi (CORTES-FUNES *et al.* 2005; DO *et al.* 2008; ELLISON *et al.* 2010; ROSELL *et al.* 2009; TARON *et al.* 2005). S'ha comprovat que, tant durant com després del procés de fixació del teixit, es malmet la integritat de l'ADN i es produeixen canvis en la seva composició nucleotídica. Aquests canvis també poden venir provocats per l'envelliment dels blocs (DO and DOBROVIC 2009; GILBERT *et al.* 2007; INOUE *et al.* 1996; PLESEC and HUNT 2009). Per evitar que aquesta degradació interfereixi en l'anàlisi de les mutacions, o bé en el cas que el teixit inclòs en parafina no estigui disponible, també s'han realitzat estudis mutacionals de teixit criopreservat (ARAKI *et al.* 2011; ASANO *et al.* 2006; HOSHI *et al.* 2007).

La dificultat, en molts casos, per obtenir aquest tipus de mostra en pacients avançats ha comportat la necessitat de treballar amb biòpsies i mostres no quirúrgiques, d'obtenció menys agressiva per al pacient com, per exemple, les citologies o mostres extretes per

1- INTRODUCCIÓ

EBUS-TBNA (EndoBronchial UltraSound-guided TransBronchial Needle Aspiration) (BUTTITTA *et al.* 2013; GARCIA-OLIVE *et al.* 2010; KHODE *et al.* 2013; TANAKA *et al.* 2007). Com que en moltes ocasions aquestes mostres contenen molt poca quantitat de teixit tumoral s'han desenvolupat tècniques amb alta sensibilitat que requereixen molt poques cèl·lules tumorals per detectar, amb èxit, les mutacions d'EGFR (MOLINA-VILA *et al.* 2008).

Gràcies a l'evolució de les tècniques moleculars, s'han pogut desenvolupar diversos mètodes per detectar les mutacions d'aquest gen. A continuació se'n descriuen els més utilitzats.

1.7.1.1 Mètodes de cribatge

Aquests mètodes són molt útils per detectar qualsevol alteració present en un gen, fins i tot les que no han estat descrites, per la qual cosa permeten obtenir una exhaustiva informació del gen d'estudi. Els més utilitzats són:

1.7.1.1.1 Seqüenciació Sanger o directa

Aquesta tècnica, desenvolupada per l'equip de Sanger l'any 1977 (SANGER *et al.* 1977) es considera el mètode estàndard per detectar mutacions. Es basa en la síntesi d'una cadena complementària d'ADN mitjançant una reacció enzimàtica que va afegint els dideoxinucleòtids (ddNTP) marcats, cadascun amb un fluorocrom diferent. A aquests ddNTP els manca el grup OH que permet l'extensió, de manera que la reacció s'atura en cada incorporació de ddNTP a la nova cadena (Fig. 13).

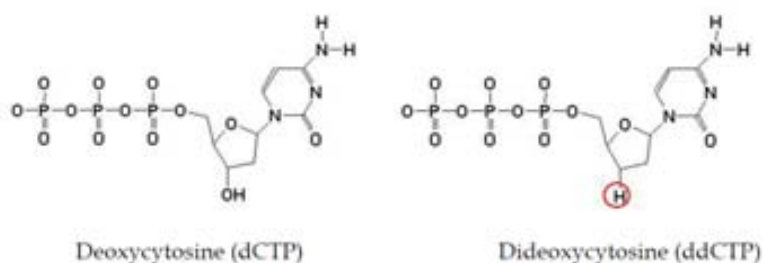


Fig. 13. Estructura d'un dNTP respecte a un ddNTP. Com es pot veure en un cercle vermell, els ddNTP han estat modificats per què no es produeixi l'extensió de la cadena. En aquest cas està representada una deòxi/dideòxicitosina.

Amb la seqüenciació directa, tots els fragments generats passen al llarg dels capil·lars d'un equip de seqüenciació on té lloc l'electroforesi necessària per què els fragments s'ordenin per mida. La seqüència s'obté per la lectura de la fluorescència emesa per cada fluorocrom quan és excitat pel làser de l'aparell (OLIVA *et al.* 2004).



Fig. 14. Mètode de detecció de mutacions per seqüenciació automàtica Sanger. Els ddNTP estan marcats amb diferents fluorocroms que, quan són incorporats en la cadena de nova síntesi, aturen l'elongació. Mitjançant l'excitació dels fluorocroms pel làser de l'equip, s'obté la seqüència d'ADN.

1.7.1.1.2 Piroseqüenciació

Aquesta tècnica, desenvolupada l'any 1996, es basa en l'alliberament de pirofosfat per la unió d'un nucleòtid a la nova cadena i que es transforma en llum mitjançant una reacció enzimàtica durant l'elongació de l'ADN. A diferència de la seqüenciació Sanger on tots els ddNTP estan disponibles al mateix temps, en aquest mètode es van afegint els nucleòtids un per un, de manera que si un s'uneix, allibera el pirofosfat que es detectarà en forma de llum per l'equip. Si no s'uneix no hi haurà senyal. A continuació un enzim degrada els nucleòtids no units, i el procés torna a començar de nou (RONAGHI 2001) (Fig. 15).

Aquest mètode permet obtenir un nombre elevat de seqüències del mateix fragment i resulta molt útil per detectar mutacions puntuals. Un dels equips que forma part de la Next Generation Sequencing i que es basa en aquesta tecnologia és el 454 FLX Pyrosequencer de Roche.

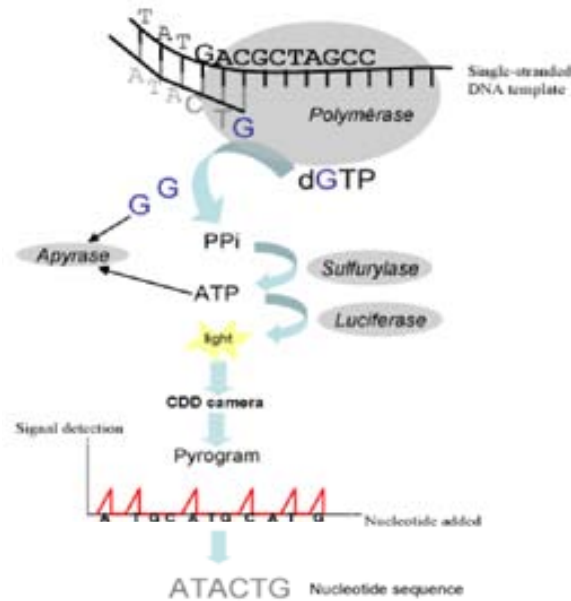


Fig. 15. Quan el nucleòtid és incorporat per la polimerasa a la cadena de nova síntesi, s'allibera un pirofosfat que és transformat en llum per una luciferasa. Aquest senyal és captat per la càmera de l'equip que interpreta el nucleòtid que s'ha incorporat i ho transforma en seqüència.

1.7.1.1.3 Next generation sequencing (NGS)

Aquesta tècnica es basa en el concepte de crear milions de reaccions de seqüència independents per obtenir milers de còpies d'una sèrie de fragments que, en solapar-se, conformen una regió més extensa de la qual es poden descriure totes les alteracions. Hi ha diverses estratègies emmarcades dins d'aquesta macroseqüenciació. El whole genome sequence consisteix a fer llibreries de tot l'ADN genòmic, seqüenciar aquests fragments milers de vegades i alinear-los amb una seqüència de referència per poder detectar qualsevol alteració. També permet realitzar el que es coneix com exome sequence, on només es seqüencien els exons o, en aquesta línia, també es pot amplificar i obtenir milers de seqüències d'una zona concreta d'un gen per tal de detectar petites variacions de seqüència que es poden trobar en freqüències molt baixes i que difícilment es detecten mitjançant altres tècniques (Liu *et al.* 2012) a partir de fragments amplificats per PCR (reacció en cadena de la polimerasa).

Actualment hi ha cases comercials que estan apostant per aquesta tecnologia i han desenvolupat equips d'amplificació i anàlisi. Entre aquests trobem Myseq d'Illumina o la plataforma SOLiD de Life Technologies.

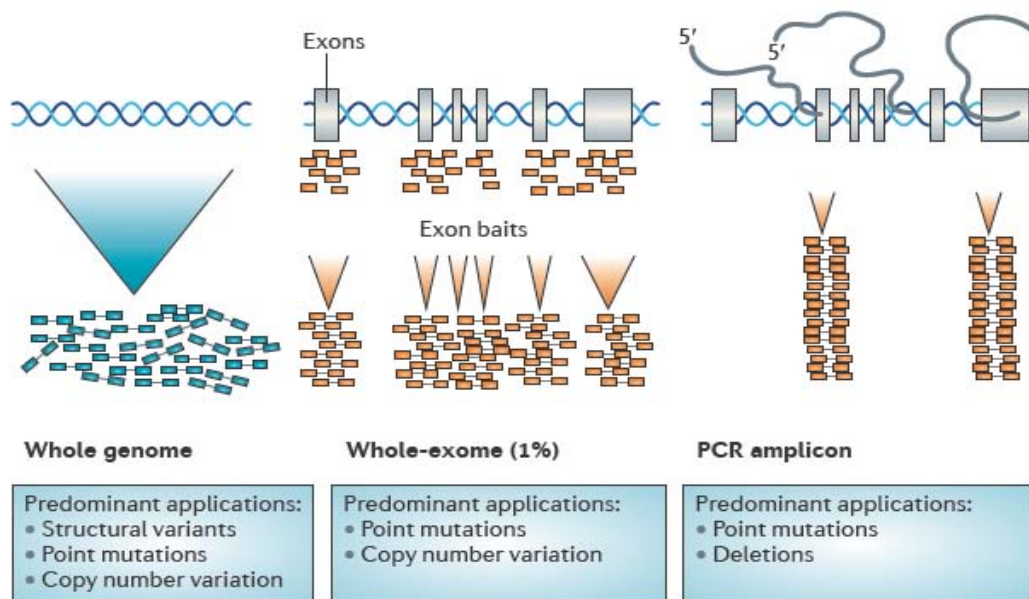


Fig. 16. Principals aplicacions de la Next Generation Sequencing. Com es pot observar, no només es pot utilitzar per analitzar petits fragments amplificats per PCR sinó que també es poden seqüenciar genomes sencers amb l'obtenció de milers de còpies.

1.7.1.1.4 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Es basa en l'amplificació per PCR del fragment d'ADN que es vol estudiar i la posterior desnaturalització (separació de les cadenes de l'ADN) per temperatura. Aquest producte desnaturalitzat adopta una conformació tridimensional característica que s'analitza per electroforesi en gel d'acrilamida. La diferència de mobilitat entre el fragment d'estudi amplificat i el mateix fragment wt determina l'existència de possibles variacions en la seqüència que poden detectar, fins i tot, la diferència d'una sola base. Aquesta tècnica és molt útil, no només per detectar delecions sinó també per detectar polimorfismes i, per tant, mutacions puntuals (MARCHETTI *et al.* 2005).

1.7.1.1.5 HRM (High Resolution Melting)

L'HRM és un mètode de detecció d'alteracions genètiques basat en la monitorització a temps real dels canvis de fluorescència produïts per l'alliberament d'una molècula fluorescent intercalada en l'ADN, que es va desnaturalitzant gradualment amb increments de temperatura molt petits, durant el procés d'amplificació per PCR. Aquesta fluorescència alliberada genera el que es coneix com corba de *melting*. Si les dues cadenes d'ADN tenen la mateixa seqüència de nucleòtids les dues corbes seran idèntiques. Si una de les cadenes conté una mutació, la temperatura necessària per desnaturalitzar l'ADN serà diferent que la wt i apareixerà una corba de *melting* diferent

1- INTRODUCCIÓ

(KAPABIOSYSTEMS). Aquesta tècnica és molt útil per detectar mutacions puntuals com la dels exons 18 i 21 d'EGFR (Do *et al.* 2008).

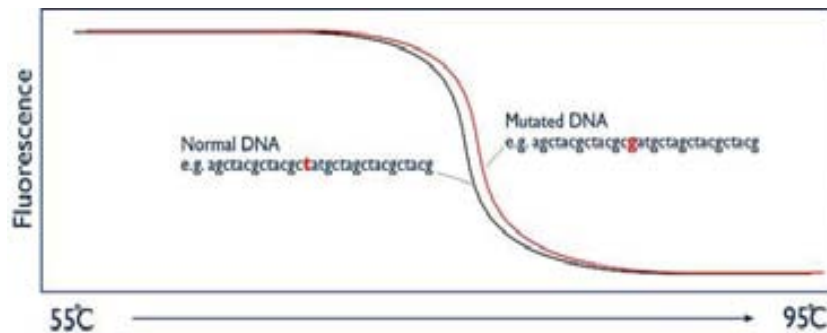


Fig. 17. Representació de les corbes de melting d'una mostra mutada. Els canvis de nucleòtid en la seqüència d'ADN provoquen canvis en la temperatura de desnaturalització. Es pot veure en blau que la corba corresponent a l'al·lel wt és diferent a la que apareix per al mutat, en vermell.

1.7.1.2 Mètodes basats en posicions conegudes

Es tracta de tècniques basades en l'amplificació per PCR d'un fragment de seqüència coneguda. Requereixen, per tant, del coneixement previ de la posició de la mutació que es vol estudiar. Un dels problemes d'aquest tipus de tècniques és que les mutacions que no estan incloses en el fragment amplificat no es poden detectar, de manera que no es poden descobrir noves mutacions. La majoria de mètodes utilitzats per detectar mutacions corresponen a aquest grup ja que la major part de les que s'ha comprovat que tenen rellevància clínica estan descrites en posicions conegudes.

A continuació es descriuen els més utilitzats:

1.7.1.2.1 Anàlisi de fragments per electroforesi capil·lar (GeneScan)

Es basa en l'amplificació per PCR del fragment d'ADN que es vol estudiar utilitzant un encebador marcat amb un fluorocrom. Les còpies d'ADN es que es generen es barregen amb un estàndard de mida, també fluorescent, i emeten fluorescència quan són excitades pel làser de l'equip durant l'electroforesi capil·lar. Aquest estàndard de mida coneguda permet discernir la mida del fragment amplificat de manera que es poden discriminar dos fragments amb la diferència d'una sola base (APPLIED-BIOSYSTEMS 2012). Aquesta tècnica és molt útil per a l'anàlisi d'insercions o de delecions.

1.7.1.2.2 Discriminació al·lèlica per TaqMan

La discriminació al·lèlica es basa en la comparació de la fluorescència basal emesa per unes sondes específiques no extensibles que s'uneixen a l'ADN. Aquestes sondes contenen un fluorocrom diferent dependent de si hibriden amb l'al·lel mutat o el wt, i un *quencher* que inhibeix la fluorescència del fluorocrom mitjançant el sistema FRET (Förster Resonance Energy Transfer). No es produeix alliberament de la fluorescència fins que l'activitat 5' exonucleasa de la polimerasa degrada la sonda i la distància entre el fluorocrom i l'inhibidor augmenta (LIVAK 1999).

Segons la proporció de la fluorescència emesa, els al·lells es poden discriminar entre els mutats, que hauran emès el màxim de fluorescència de la sonda que hibridava amb la seqüència portadora de la mutació i mínima per la seqüència wt, i els al·lells wt on la proporció de fluorescències serà inversa. És una tècnica molt útil per detectar mutacions puntuals de posició coneguda com les dels exons 18 i 21 del gen EGFR (ENDO *et al.* 2005).

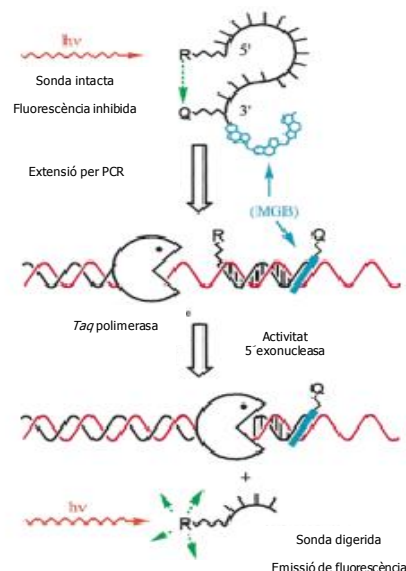


Fig. 18. Esquema de la reacció de discriminació al·lèlica. La fluorescència de les sondes MGB ve determinada per un fluorocrom ubicat en l'extrem 5'. En l'extrem 3' es troba el quencher que inhibeix la fluorescència del fluorocrom via FRET. Un cop té lloc la reacció d'amplificació, l'activitat 5' exonucleasa de la Taq Polymerasa va digerint la sonda, de manera que la fluorescència alliberada pel fluorocrom ja no és inhibida i per tant l'equip capta el senyal.

1.7.1.2.3 Scorpion ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

Aquesta tècnica combina l'especificitat del sistema ARMS amb la detecció de la fluorescència de les sondes escorpions. El sistema està compost per una sonda específica flanquejada per unes seqüències complementàries que en hibridar formen una característica estructura en forma de llaç (escorpion). En aquesta conformació, el fluorocrom no emet fluorescència per la proximitat del *quencher*. Un altre element és un

1- INTRODUCCIÓ

bloquejador que inhibeix l'amplificació de l'ADN en absència de la seqüència complementària a la sonda, que impedeix que la conformació del llaç es desplegui. Finalment, cal un encebador específic que s'uneixi a l'ADN i a partir del qual s'iniciï l'amplificació per PCR. Un cop el procés d'amplificació comença, el llaç s'obre, la sonda hibrida amb la seqüència complementària de la nova cadena, la distància entre fluorocrom i *quencher* augmenta i l'equip capta la fluorescència emesa (THELWELL *et al.* 2000).

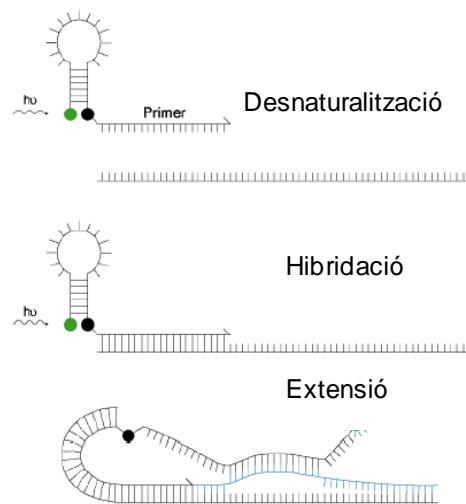


Fig. 19. Estructura d'una sonda escorpion unida a un dels encebadors en forma de llaç. El quencher, per proximitat, inhibeix la fluorescència del fluorocrom. Quan es produeix l'extensió, la sonda es desplega, la distància entre el quencher i el fluorocrom augmenta i la fluorescència s'allibera.

Diverses cases comercials han desenvolupat kits basats en aquest mètode per detectar les mutacions de l'exó 18 i 21 d'EGFR com el de Qiagen anomenat TheraScreen® EGFR29 Mutation Kit test o els de Roche (DxS EGFR Mutation Test Kit i el Cobas que permet analitzar fins a 41 posicions diferents mitjançant amplifícacions multiplexades) (LOPEZ-RIOS *et al.* 2013). Aquests sistemes redueixen la manipulació de la mostra i, per tant, les contaminacions.

1.7.1.2.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

L'aparició d'un canvi en la seqüència d'ADN pot generar una diana per a un enzim de restricció. Aquesta tècnica es basa en l'amplificació de l'ADN per PCR i la seva posterior digestió amb un enzim de restricció que tallarà les còpies on troba la diana. D'aquesta manera i amb un gel d'agarosa, es poden distingir els al·lels mutats dels wt pel diferent patró de bandes.

Encara que hi ha el risc que errors durant l'activitat de la polimerasa creïn aquestes dianes i s'obtinguin falsos positius, aquest mètode s'ha utilitzat per detectar mutacions i delecions del gen EGFR (ASANO *et al.* 2006; KAWADA *et al.* 2008).

1.7.1.2.5 Detecció de mutacions amb anticossos

Aquesta tècnica difereix de la resta perquè es basa en la detecció de l'alteració en la proteïna i no en l'ADN, mitjançant la hibridació amb anticossos específics. És aconsellable per a mostres massa petites perquè es puguin analitzar amb altres mètodes (BREVET *et al.* 2010; SIMONETTI *et al.* 2010). Malgrat que un dels desavantatges és que cada tipus de mutació requereix el seu propi anticòs, hi ha autors que la recomanen com a un primer cribatge dels pacients per a una posterior anàlisi basada en tècniques moleculars (KOZU *et al.* 2011). Com que a més és una tècnica que preserva l'estructura tissular, permet determinar la influència de les mutacions en el teixit sa adjacent (Yu *et al.* 2009).

1.7.2 Detecció de les mutacions d'EGFR en sang perifèrica

En els darrers anys s'han desenvolupat diferents estratègies, tant metodològiques com d'obtenció de material tumoral, per poder detectar les mutacions del gen EGFR. En pacients avançats de CPCNP, l'obtenció d'una biòpsia és freqüentment inviable, de manera que s'han utilitzat altres fonts de material tumoral com ara líquid pleural, rentats bronco-alveolars o esputs (BUTTITTA *et al.* 2013; GARCIA-OLIVE *et al.* 2010; HUBERS *et al.* 2013; KHODE *et al.* 2013; SOH *et al.* 2006; TANAKA *et al.* 2007). Malgrat que s'han descrit tècniques que requereixen molt poques cèl·lules tumorals (MOLINA-VILA *et al.* 2008) o fins i tot l'ús de les cèl·lules tumorals circulants (CTC) per detectar mutacions (MAHESWARAN *et al.* 2008), la necessitat d'accedir a la mostra tumoral d'una forma poc agressiva per al pacient ha dut a considerar la sang perifèrica com una alternativa a l'anàlisi de les mutacions en teixit.

Des que l'equip de Mandel va descobrir l'existència d'ADN circulant en la sang perifèrica l'any 1948 (MANDEL and MÉTAIS 1948), s'han dut a terme molts estudis per determinar la importància d'aquest fet en relació amb el desenvolupament de diverses patologies. Així, l'equip de Leon (LEON *et al.* 1977) va comprovar que la concentració d'ADN circulant era més elevada en pacients amb càncer que no pas en individus sans, el grup d'Anker va demostrar que molt d'aquest ADN lliure provenia de les cèl·lules tumorals (ANKER *et al.* 1999) i l'equip de Sozzi va correlacionar la seva concentració amb l'estadificació del pacient (SOZZI *et al.* 2001). A partir d'aquests treballs s'han realitzat diversos estudis de

1- INTRODUCCIÓ

detecció d'alteracions genètiques presents en aquest ADN circulant (metil·lació, mutacions, pèrdua d'heterozigocitat...) i la seva correlació amb el teixit tumoral (Fig. 20).

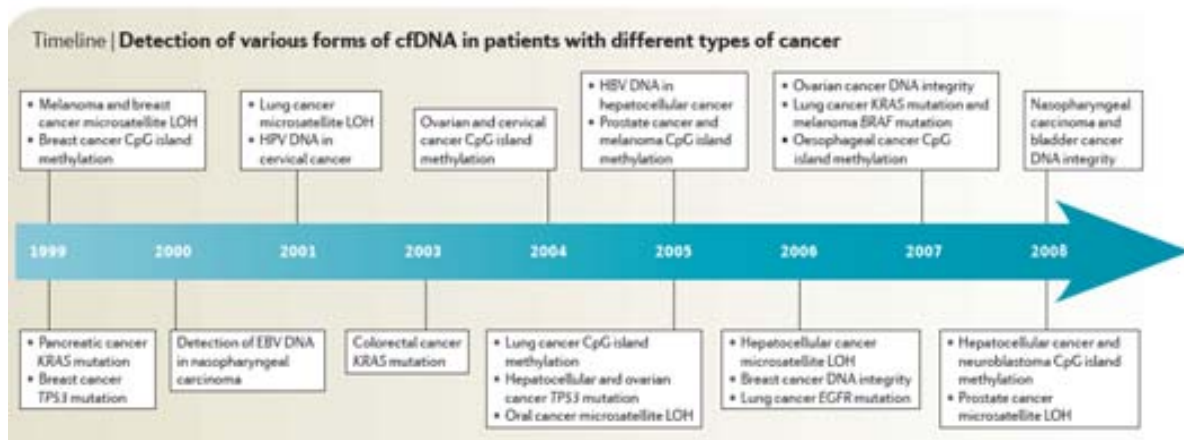


Fig. 20. Esquema de les principals alteracions genètiques estudiades en l'ADN circulant en diferents tipus de tumors en els darrers 15 anys (SCHWARZENBACH *et al.* 2011).

S'ha de tenir en compte que aquest ADN circulant no només prové de les cèl·lules tumorals: hi ha d'altres mecanismes patològics i fisiològics com ara processos inflamatoris, lesions benignes o traumes tissulars que també alliberen ADN al torrent sanguini (SAUKKONEN *et al.* 2008).

L'origen d'aquest ADN circulant es pot explicar per quatre mecanismes bàsics: necrosi, apoptosi, alliberament actiu d'ADN de les cèl·lules i per lisi de micrometàstasis (MITTRA *et al.* 2012; ZIEGLER *et al.* 2002). Un esquema de tots aquests processos es pot veure en la Fig. 21.

En el cas de la necrosi i com a conseqüència de la hipòxia que es produeix en el nucli tumoral per la manca d'irrigació sanguínia, i per tant, d'oxigenació, el número de cèl·lules que pateixen necrosi augmenta. Aquest procés implica la degradació de l'ADN que es fragmenta a l'atzar i s'allibera al torrent sanguini (SCHWARZENBACH *et al.* 2009).

L'apoptosi o mort cel·lular programada implica la degradació de l'ADN segons una pauta molt característica de fragments formada per nucleosomes. Aquests nucleosomes consisteixen en un nucli format per un octàmer d'histones embolcat dues vegades per una cadena d'ADN de 200pb. En condicions fisiològiques normals, els nucleosomes són compactats en partícules apoptòtiques que són fagocitades pels macròfags. En tumors grans de proliferació ràpida o després del tractament amb quimioteràpia hi ha un excés de mort cel·lular. En aquest cas, als macròfags els és difícil fagocitar l'excés de cèl·lules apoptòtiques i aquests nucleosomes s'alliberen al torrent sanguini (STOLLAR and STEPHENSON 2002; WARD *et al.* 2008).

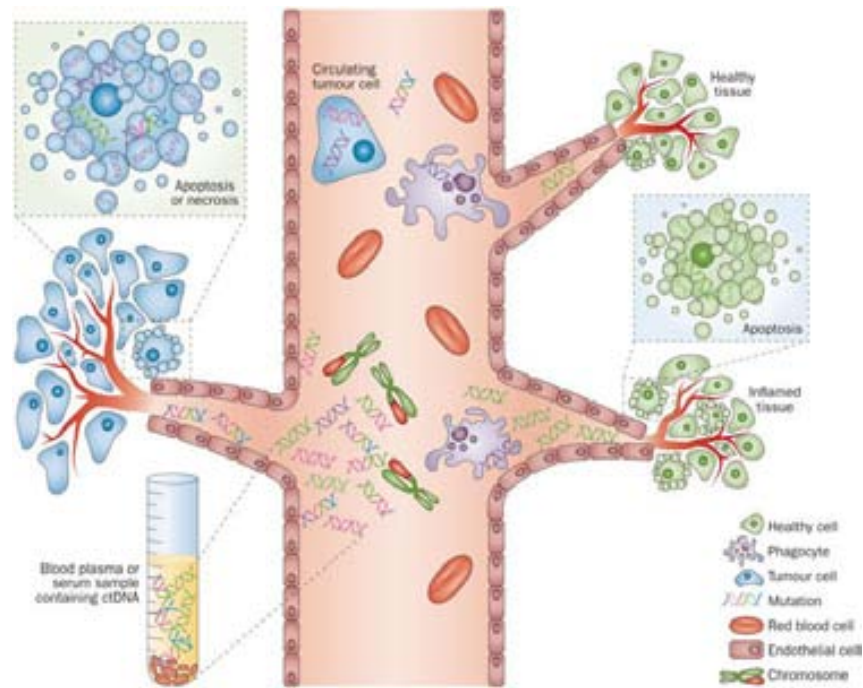


Fig. 21. Esquema dels diferents mecanismes que alliberen ADN al torrent sanguini. Com es pot veure, el teixit sa també allibera ADN mitjançant diversos mecanismes com ara l'apoptosi. Per una altra banda, les cèl·lules circulants tumorals o l'apoptosi i necrosi dels tumors són responsables de l'alliberament d'ADN al torrent sanguini (CROWLEY *et al.* 2013).

Diversos treballs descriuen que els fragments petits d'ADN circulant d'entre 70 i 200pb corresponen a l'ADN alliberat per processos d'apoptosi mentre que els fragments més grans provenen de la necrosi cel·lular (FLEISCHACKER and SCHMIDT 2007).

Un altre mecanisme consisteix en l'alliberament actiu d'ADN anomenat fracció d'ADN metabòlic. S'ha comprovat que aquesta fracció d'ADN, unida a glicoproteïnes, circula pel torrent sanguini actuant com a missatger entre cèl·lules i teixits. A més, sembla que desenvolupa funcions de regulació de la transcripció de l'ARN (GAHAN *et al.* 2008).

Finalment, el darrer mecanisme de lisi de micrometàstasi consisteix en l'alliberament d'ADN al torrent sanguini per part de cèl·lules tumorals circulants que s'han separat del teixit d'origen durant el procés de transició epiteli-mesènquima o bé per la lisi de dipòsits micrometastàsics en llocs distants del tumor original (GARCIA-OLMO *et al.* 2010).

Tot aquest ADN circula per la sang en forma de nucleosomes o bé unit a les proteïnes de membrana amb dominis d'unió a l'ADN de la superfície de les cèl·lules sanguínies (FLEISCHACKER *et al.* 2011).

La degradació d'aquest ADN circulant depèn dels mecanismes de filtració del sistema circulatori, ja sigui en el fetge o en els ronyons, del sistema limfàtic, o bé de la degradació activa pels enzims anomenats DNases. S'ha calculat que la vida mitjana

d'aquest ADN circulant varia de quinze minuts a diverses hores (FLEISCHHACKER and SCHMIDT 2007; TAMKOVICH *et al.* 2006).

Un dels problemes que comporta l'anàlisi de les mutacions a partir de l'ADN circulant és que la baixa freqüència d'algunes mutacions en el teixit tumoral determina la baixa quantitat d'al·lels mutats alliberats al torrent sanguini. La necessitat de detectar aquesta baixa proporció d'al·lels mutats respecte a la gran quantitat d'al·lels wt han propiciat el desenvolupament de metodologies molt específiques i sensibles.

1.7.2.1 Tècniques de detecció de les mutacions en sang perifèrica

Moltes de les metodologies utilitzades per detectar les mutacions en sang perifèrica són les mateixes que s'apliquen en la detecció de les mutacions en teixit. Entre aquestes hi ha la tècnica SARMS (KIMURA *et al.* 2006c; MAHESWARAN *et al.* 2008) o els kits comercials (GOTO *et al.* 2012). Per una altra banda, hi ha treballs que modifiquen les tècniques ja descrites per augmentar la sensibilitat de detecció de mutacions de l'ADN circulant. A continuació se'n descriuen les més utilitzades.

1.7.2.1.1 Tècniques basades en l'anàlisi de canvis de conformació per electroforesi capil·lar

Aquestes tècniques, basades en la modificació de les utilitzades per a l'anàlisi de mutacions en teixit, incorporen l'electroforesi capil·lar per incrementar la sensibilitat de detecció. Per exemple, la DCE (electroforesi desnaturalitzant capil·lar) (LI-SUCHOLEIKI and THILLY 2000; MINARIK 2011), la TGCE (electroforesi capil·lar per gradient de temperatura) (HSIA *et al.* 2005), la CGCE (Cycling Gradient Capillary Electrophoresis) (MINARIK *et al.* 2003) o la CTCE (Cycling Temperature Capillary Electrophoresis) (EKSTROM *et al.* 2007) totes elles derivades de la tècnica de SSCP.

1.7.2.1.2 Tècniques basades en PCR

Aquest grup de tècniques es centra en minimitzar al màxim l'amplificació de la gran quantitat d'ADN wt que hi ha en la mostra de sang perifèrica, enriquint la fracció d'al·lels mutats. Són els mètodes més utilitzats per detectar mutacions de l'ADN circulant.

Entre d'altres, les que més s'utilitzen són la ME-PCR (Mutant Enrichment PCR) o la COLD-PCR (Coamplification at Lower Denaturation temperature-PCR). En el cas de la ME-PCR, es digereix l'ADN wt amb un enzim de restricció prèviament o durant el procés d'amplificació de manera que només s'amplifica l'ADN mutat (HE *et al.* 2009; JIANG *et al.* 2011). Per una altra banda, la COLD-PCR utilitza temperatures baixes d'*annealing* de

manera que els encebadors no poden unir-se als fragments wt perquè no s'han pogut desnaturalitzar i s'han mantingut en forma de doble cadena. Els fragments mutats, que acostumen a formar dobles cadenes imperfectes a causa precisament de la mutació, poden ser amplificats perquè s'hi poden unir els encebadors (LI *et al.* 2008b).

Una altra via és inhibir l'amplificació de l'ADN wt amb una sonda proteica anomenada PNA (Protein Nucleic Acid) que s'hi uneix específicament enriquint la població d'ADN mutat. Com que l'estructura del PNA es basa en una cadena de fosfodièster, ni les nucleases ni les proteases poden degradar-la, de manera que la seva unió a l'ADN és altament estable (PELLESTOR and PAULASOVA 2004; YEH *et al.* 2010). L'ús d'aquest tipus de sonda sola, o en combinació amb un altre sonda proteica molt semblant anomenada LNA (Locked Nucleic Acid) que va unida a un fluorocrom per facilitar la seva detecció, s'ha aplicat en l'estudi de les mutacions d'EGFR en sang perifèrica de pacients de CPCNP (INOUE *et al.* 2009; ROSELL *et al.* 2009; SUTANI *et al.* 2006). Aquest tipus d'enriquiment dels al·lels mutats mitjançant la inhibició dels wt és el que es coneix com PCR PNA-clamping.

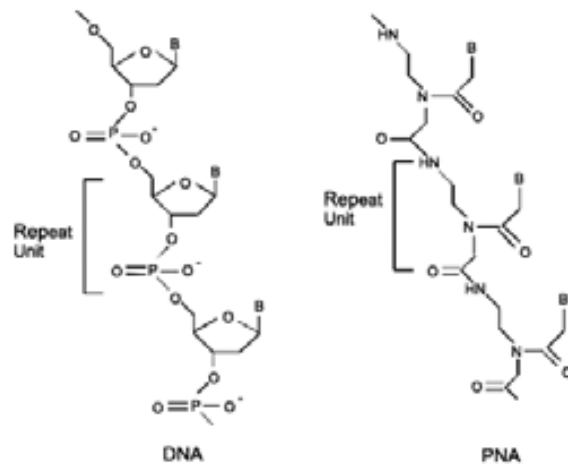


Fig. 22. Comparació de l'estructura de l'ADN i la sonda proteica PNA. Com es pot apreciar, la semblança d'estructura entre ambdues molècules confereix una alta especificitat i estabilitat d'unió.

Finalment, entre els mètodes més utilitzats, es troba la PCR digital, que consisteix a preparar dilucions molt elevades de la mostra que són repartides en diversos pouets d'una placa. A continuació es procedeix a l'amplificació per PCR incorporant en la reacció unes sondes marcades amb fluorocroms. Només els pouets que continguin els al·lels mutats amplificaran i donaran senyal fluorescent (ZHAO *et al.* 2013). Actualment s'estan desenvolupant kits comercials que permeten la detecció de diverses mutacions al mateix temps com la que ofereix Boreal Genomics mitjançant la plataforma de seqüenciació Miseq d'Illumina.

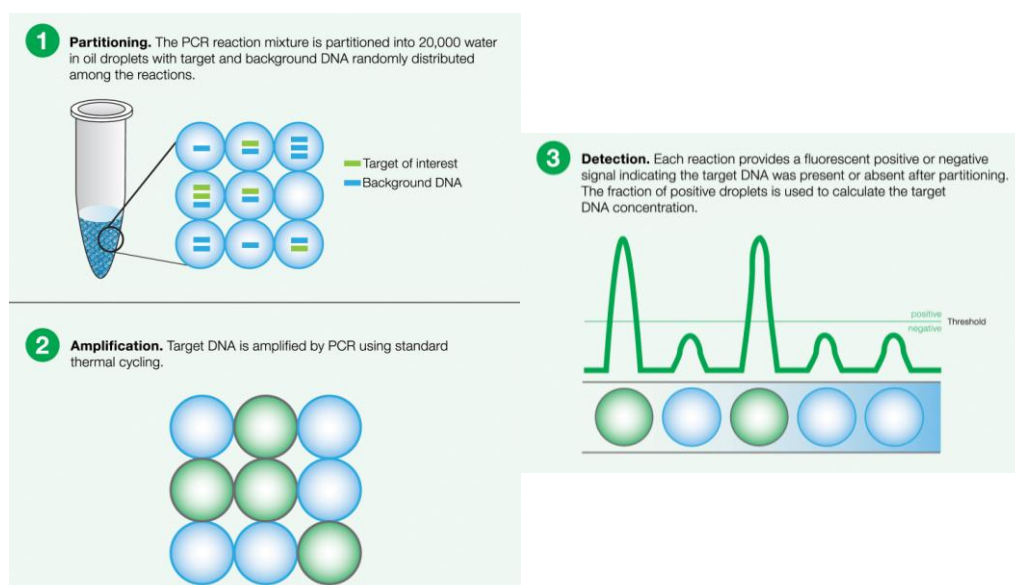


Fig. 23. Esquema del funcionament de la PCR digital. De la mostra original es realitzen múltiples dilucions per reduir els al·lels presents en cada pouet (1). A continuació hi ha l'amplificació on la sonda marcada amb fluorescència s'uneix a l'al·lel mutat (2). La lectura de la fluorescència alliberada indica els pouets on hi ha l'ADN mutat (3).

1.7.2.1.3 BEAMing (Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics)

Aquesta tècnica la va desenvolupar el grup de Diehl per detectar mutacions del gen K-RAS en l'ADN circulant de pacients amb càncer de còlon (DIEHL *et al.* 2005). Consisteix en l'amplificació d'una sola molècula d'ADN que hibrida amb un encebador o una sonda específica per a la mutació, marcada fluorescentment i unida a una partícula magnètica. Per citometria es poden detectar les partícules que emeten fluorescència i es poden recuperar mitjançant un camp magnètic. Les partícules en què no hi hagi hagut amplificació o bé hi havia un al·lel wt no són recuperades (TANIGUCHI *et al.* 2011).

2 HIPÒTESI I OBJECTIUS

El pensament és la llavor de l'acció

(Ralph Emerson)

En l'actual era de la medicina personalitzada és cabdal l'anàlisi de les alteracions genètiques de les neoplàsies dels pacients abans de proporcionar-los un tractament, per tal d'administrar el més favorable segons les seves característiques genètiques. La relació que existeix entre la presència de les mutacions en el domini TQ del gen EGFR i la resposta al tractament amb ITQ és avalada per molts estudis.

Per una altra banda, la disponibilitat de biòpsies que garanteixin suficient material tumoral per analitzar les mutacions d'EGFR és baixa en pacients d'estadis avançats. Malgrat que s'han desenvolupat noves tècniques d'anàlisi amb altes sensibilitats per detectar mutacions, la necessitat d'accedir a una mostra tumoral d'una forma poc agressiva per al pacient ha dut a considerar l'ADN circulant de la sang perifèrica com una alternativa al teixit inclòs en parafina. Aquest tipus de mostra ja havia demostrat una bona correlació amb les alteracions detectades en el teixit del mateix pacient.

Tenint en compte aquestes premisses, s'ha treballat amb la següent hipòtesi:

És possible detectar les mutacions del gen EGFR en l'ADN circulant de la sang perifèrica dels pacients avançats de CPCNP.

Malgrat que la seqüenciació Sanger es considera el mètode estàndard per analitzar mutacions, presenta algunes limitacions com ara la sensibilitat de detecció o la quantitat d'ADN necessari per detectar alteracions genètiques, factors que dificulten la utilització de mostres amb poca cel·lularitat tumoral. Per tant, és necessari el desenvolupament de noves tècniques que permetin l'anàlisi de les mutacions d'EGFR independentment de la quantitat de material tumoral del qual es parteixi.

Tenint en compte la hipòtesi de treball, es van plantejar els següents objectius:

2.1 Optimitzar la tècnica de seqüenciació Sanger per analitzar les mutacions més freqüents del gen EGFR dels exons 19 i 21 de mostres de teixit inclòs en parafina.

2.2 Optimitzar i validar analíticament les tècniques de biologia molecular, alternatives a la seqüenciació Sanger, que permetin detectar les mutacions més freqüents del gen EGFR dels exons 19, 20 i 21, partint de teixit inclòs en parafina.

2.3 Validar clínicament les mutacions del gen EGFR mitjançant l'anàlisi prospectiu dels pacients de CPCNP de l'SLADB (Spanish Lung Adenocarcinoma Data Base) respecte a la

2- HIPÒTESI I OBJECTIUS

resposta als ITQ, la PFS i la supervivència dels pacients segons les dades descrites en la bibliografia.

2.4 Optimitzar i validar analíticament les tècniques de biologia molecular que permetin detectar les mutacions més freqüents dels exons 19 i 21 del gen EGFR en l'ADN circulant de la sang perifèrica.

2.5 Validar clínicament les mutacions del gen EGFR detectades en l'ADN circulant de la sang perifèrica mitjançant l'anàlisi retrospectiu dels pacients amb CPCNP inclosos en l'SLADB. Corroborar els resultats obtinguts respecte a la resposta als ITQ, la PFS i la supervivència dels pacients segons les dades descrites en la bibliografia.

2.6 Analitzar les mutacions més freqüents del gen EGFR dels exons 19, 20 i 21 com a diagnòstic, en pacients de CPCNP inclosos en l'assaig clínic fase III EURTAC, partint de mostres de teixit inclòs en parafina.

2.7 Analitzar les mutacions més freqüents del gen EGFR dels exons 19 i 21 a partir de l'ADN circulant de la sang perifèrica dels pacients de CPCNP inclosos en l'assaig clínic fase III EURTAC.

3 PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

*Anem a fer les coses bé,
que malament ja surten soles*

(anònim)

3.1 Optimització de les tècniques d'anàlisi

Tots els encebadors utilitzats en les amplificacions, que es troben en els esquemes I i II de l'annex I, estan dissenyats sobre la seqüència de referència d'EGFR NC_000007.12 del GenBank mitjançant el programa de disseny d'encebadors *Primer Express* (APPLIED-BIOSYSTEMS). Aquest programa, a més de suggerir la parella d'encebadors més eficient per amplificar la regió d'estudi, calcula les temperatures d'*annealing* ideals i les possibles hibridacions entre els encebadors. Un cop dissenyats, es va procedir a comprovar, amb el programa Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la pàgina *web* de l'NCBI (National Center for Biotechnology Information) amb el *link*: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome, les homologies entre la seqüència dels amplicons generats pels encebadors dissenyats respecte a tot el genoma. D'aquesta manera s'obté informació sobre possibles hibridacions no específiques amb altres gens. Tots els encebadors de PCR (tant els de primera com de *nested* PCR) es van dissenyar sobre la zona intrònica. Els amplicons no superen els 500pb ja que, com ja s'ha comentat anteriorment, el procés de fixació i imbibició en parafina malmet la integritat de l'ADN. Per una altra banda, els encebadors de GeneScan i TaqMan es van dissenyar per amplificar regions menors a 150pb per utilitzar-los també en l'anàlisi de l'ADN circulant de sang perifèrica, molt degradat i fragmentat. El codi d'*Ensembl* utilitzat per identificar i ubicar les mutacions en el gen és el ENSG00000146648.

Tots els ADN que s'han utilitzat per optimitzar les tècniques, així com els dels controls utilitzats en les amplificacions, ja sigui per PCR o per TaqMan, van ser quantificats amb l'equip Nanodrop spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific). La concentració ve determinada per la lectura a A_{260} mentre que la puresa es va mesurar per la relació de les lectures A_{260}/A_{280} .

La concentració de treball de l'ADN dels limfòcits i de les línies cel·lulars utilitzats durant el procés d'optimització de les tècniques va ser de 25ng/ μ l per tal de simular les concentracions més baixes d'ADN obtingudes de l'extracció per fenol-cloroform-alcohol isoamílic de les mostres incloses en parafina.

Per una altra banda, la concentració de treball de tots els controls de GeneScan i TaqMan i dels limfòcits i de les línies cel·lulars utilitzats durant el procés d'optimització de les tècniques per a mostres de poca cel·lularitat tumoral i de sang perifèrica va ser d'1ng/ μ l. D'aquesta manera s'equipara la concentració, per una banda a l'obtinguda de les mostres amb poca cel·lularitat tumoral i per l'altra, a la mínima quantitat d'ADN circulant que s'obté de l'extracció amb el kit comercial QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (Izasa).

Finalment, tots els controls com els ADN utilitzats per posar a punt l'anàlisi de la mutació T790M en teixit inclòs en parafina també estaven a 1ng/μl, concentració menor a la que presentaven les mostres analitzades.

3.2 Mètode estàndard: Seqüenciació Sanger

L'estratègia seguida per a la validació analítica per detectar les mutacions d'EGFR en mostres de teixit tumoral inclòs en parafina i de mostres amb poca cel·lularitat tumoral es va basar en la prèvia detecció d'aquestes mutacions en línies cel·lulars mutades.

3.2.1 Optimització de la tècnica amb línies cel·lulars mutades

Es va utilitzar ADN de diverses fonts:

1-ADN de la línia cel·lular PC9. Conté una deleció de 15pb en l'exó 19. Es va obtenir de l'empresa certificada Hofmann-La Roche Ltd (Roche Specimen ID: CLBA00359).

2-ADN de la línia cel·lular H1975. Conté les mutacions puntuals L858R de l'exó 21 i T790M de l'exó 20. Es va obtenir de l'empresa certificada American Type Culture Collection.

3-ADN de limfòcit. L'origen somàtic de les mutacions del gen EGFR permet que aquest ADN sigui apte per considerar-lo control wt.

3.2.1.1 Extracció d'ADN

L'ADN de les línies cel·lulars i del limfòcit es va extreure amb el kit comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Izasa), seguint el protocol d'ús. Aquest kit es basa en la digestió de la mostra amb proteasa, per tal d'eliminar les membranes cel·lulars, i un parell de rentats amb dos tampons que eliminen les restes proteiques i les sals. Durant aquest procés, l'ADN de les mostres queda purificat i adherit a la membrana de sílice de les columnes d'extracció. Per recuperar-lo només cal afegir aigua destil·lada. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció II).

3.2.1.2 Amplificació per PCR

Per posar a punt les PCR d'amplificació dels exons 19 i 21 es va utilitzar l'ADN wt de limfòcit.

Per controlar l'astringència de la PCR i evitar l'amplificació de fragments inespecífics, es van combinar dues concentracions de $MgCl_2$, necessari per a l'activitat polimerasa de l'enzim, a 1mM (considerada baixa concentració) i a 3mM (considerada concentració mitja) i quatre temperatures d'*annealing* (58°C, 60°C, 62°C i 64°C).

L'estratègia era amplificar aquests exons amb una única PCR. Es van provar dos cicles de repetició diferents (35 i 40 cicles) i tres polimerases: Ecotaq (Ecogen), enzim utilitzat rutinàriament en amplificacions per PCR; Platinum® Taq DNA Polymerase (INVITROGEN) que redueix els dímers entre encebadors a més d'aconseguir amplificacions amb poca concentració d'ADN inicial (INVITROGEN 2010) i HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN) que com l'anterior, redueix la formació de dímers entre els encebadors i permet l'amplificació de fragments amb alta especificitat (QIAGEN 2008). En la següent taula es pot observar l'esquema de treball.

Temperatura °C	Concentració $MgCl_2$ (mM)	Nº de cicles
58	1	35
		40
	3	35
		40
60	1	35
		40
	3	35
		40
62	1	35
		40
	3	35
		40
64	1	35
		40
	3	35
		40

Taula 6. Estratègia seguida per posar a punt l'amplificació per PCR dels exons 19 i 21 d'EGFR de l'ADN de limfòcit per a la posterior anàlisi per seqüenciació Sanger.

3.2.1.3 Electroforesi en gel d'agarosa

La visualització de les bandes d'amplificació per electroforesi es va fer mitjançant la tinció dels gels d'agarosa amb SYBR® Safe. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció IX).

3.2.1.4 Purificació per digestió enzimàtica

La reacció de seqüenciació requereix que els components de la PCR (encebadors i dNTP) siguin eliminats per tal que no interfereixin en la incorporació dels ddNTP marcats amb fluorocroms. La purificació del producte de PCR es va fer per la digestió enzimàtica conjunta de l'exonucleasa I i la shrimp alkaline phosphatase. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció X).

3.2.1.5 Reacció de seqüenciació i precipitació

La reacció de seqüència es basa en la incorporació de ddNTP fluorescents i modificats per evitar la continuació de la síntesi un cop s'han unit a la nova cadena d'ADN complementari. Les condicions de la reacció són estàndards. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció XI).

El producte d'aquesta reacció es va precipitar amb acetat de sodi, EDTA i etanol. Les sals funcionen de *carrier* dels fragments d'ADN que d'una altra manera quedarien en suspensió i es perdrien. L'etanol ajuda en la precipitació de les seqüències. Per millorar el rendiment i eliminar restes d'encebadors i de ddNTP no incorporats es realitzà un segon rentat amb etanol al 70%. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció XI).

Un cop optimitzades les PCR es va comprovar que les seqüències obtingudes tant en sentit *forward* com en *reverse* eren correctes, comparant-les amb la seqüència de referència del gen NC_000007.12 del GenBank. A continuació es van analitzar les mutacions de les línies cel·lulars mutades, repetint tot el procés per a tots els exons (19, 20 i 21).

L'èxit en la detecció de les mutacions de les línies cel·lulars mutades va servir de base per posar a punt la tècnica en mostres incloses en parafina.

3.2.2 Optimització de la tècnica amb teixit tumoral inclòs en parafina

El teixit obtingut per cirurgia o com a biòpsia es va fixar en formol per imbibició i es va fer un bloc de parafina del que, mitjançant un micròtom, es van fer talls de poques micres de gruix que es van adherir en un portaobjectes. Aquests portaobjectes, amb les seccions de teixit adherit, es van tenyir, en aquest cas amb hematoxilina-eosina, per tal de visualitzar i distingir els tipus cel·lulars de la mostra.

3- PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES



Fig. 24. El teixit inclòs en parafina es va tallar amb un micròtom per tal d'aconseguir seccions de poques micres de gruix. Aquests talls es van muntar en un portaobjectes i es van tenyir amb hematoxilina-eosina per tal que un patòleg valorés les àrees tumorals per a la seva posterior microdissecció.

Per microdisseccionar el teixit calia que aquestes seccions, també tenyides amb hematoxilina-eosina, quedessin adherides a la membrana d'un portaobjectes especial que permetia que les àrees microdisseccionades fossin catapultades pel làser de l'aparell. Les instruccions de treball estan adjuntes en l'annex I (instruccions III, IV i V).



Fig. 25. Microdissecció de les àrees tumorals d'un teixit inclòs en parafina. En la primera imatge, que correspon a una secció del teixit tenyit amb hematoxilina-eosina, es poden apreciar les zones tumorals que són "retallades" pel microdissector. Aquestes àrees són catapultades per un pols de làser al tap de l'ependorf on hi ha el tampó corresponent.

Es va treballar amb dos tipus de mostra:

1. ADN de teixit tumoral inclòs en parafina de pacients amb CPCNP. Les seccions de $4\mu\text{m}$, tenyides amb hematoxilina-eosina, van ser avaluades per un patòleg que va marcar les zones amb més concentració de cèl·lules tumorals. Generalment, es van microdisseccionar $0,7\text{mm}^2$ de teixit tumoral.
2. ADN de mostres amb poca cel·lularitat tumoral de pacients amb CPCNP. Una mostra es considera que té poca cel·lularitat tumoral quan l'àrea de la neoplàsia és inferior a $0,7\text{mm}^2$. Es procedeix de la mateixa manera que per a les mostres anteriors.

3- PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

La poca quantitat tumoral obliga a microdisseccionar, generalment, una àrea de només 0,12mm² de teixit.

3.2.2.1 Extracció de l'ADN

1. Teixit tumoral inclòs en parafina

Les àrees microdisseccionades recuperades en un *ependorf* amb 200µl de tampó de digestió, es van incubar durant almenys 16 hores a 60°C per tal que la proteïnasa K, que conté el tampó, digeri el teixit i s'alliberés l'ADN cel·lular. A continuació es van afegir 10µl més de proteïnasa K, per acabar de digerir el teixit, i es procedí a l'extracció d'ADN amb fenol-cloroform-alcohol isoamílic. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció VI).

2. Mostres amb poca cel·lularitat tumoral

La minsa quantitat de tumor va comportar que no fos viable l'ús de les tècniques d'extracció d'ADN convencionals. Es van digerir les mostres en 20µl del tampó d'amplificació de l'ADN per PCR. En la següent figura es pot veure el procés de microdissecció d'aquest tipus de mostra.



Fig. 26. Microdissecció de les cèl·lules tumorals d'una mostra de teixit inclòs en parafina amb poca cel·lularitat neoplàsica. En la primera imatge, que correspon a una mostra tenyida amb hematoxilina-eosina, es pot apreciar un grup de cèl·lules. Un cop identificades són "retallades" pel microdissector i catapultades per un pols de làser al tap de l'ependorf on hi ha el tampó corresponent.

En aquest tampó s'havia afegit proteïnasa K per digerir les membranes cel·lulars i alliberar l'ADN. La incubació amb el tampó va ser de 5 a 16 hores a 60°C. Tot seguit es va realitzar un xoc tèrmic per inactivar l'enzim.

3.2.2.2 Amplificació per PCR

1. Teixit tumoral inclòs en parafina

3- PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

Per amplificar l'ADN del teixit inclòs en parafina es va partir de les condicions optimitzades de PCR per a l'ADN de limfòcit i de les línies cel·lulars.

Es va comprovar que amb una sola amplificació no s'assolia la intensitat de banda suficient com per poder seqüenciar els exons 19 i 21 amb èxit. Calia reajustar els cicles de PCR i realitzar una reamplificació o *nested* (reamplificació de l'ADN que ja ha estat amplificat en una PCR prèvia).

Mantenint les condicions d'amplificació ja posades a punt, es va optar per disminuir els cicles de la primera PCR a 20 i 25 repeticions. Per optimitzar la *nested* PCR es van combinar dues temperatures d'*annealing* (62°C i 64°C) amb dos cicles de repetició diferents (35 i 40 cicles). L'esquema de treball es pot veure en la següent taula.

Temperatura °C	Nº de cicles
62	35
	40
64	35
	40

Taula 7. Ajust de les condicions de la *nested* PCR de mostres de teixit inclòs en parafina mantenint les concentracions dels reactius ja optimitzats.

2. Mostres amb poca cel·lularitat tumoral

Paral·lelament, es van modificar les condicions d'amplificació de les mostres de teixit inclòs en parafina amb poca cel·lularitat tumoral per la baixa concentració d'ADN. Es va augmentar la concentració del MgCl₂, del tampó de PCR i les unitats de l'enzim polimerasa. Per una altra banda, es van provar dues temperatures d'amplificació per ajustar l'astringència de la reacció (62°C i 64°C) i dos cicles d'amplificació (20 i 25 cicles).

A continuació, per optimitzar la *nested* PCR es van combinar dues temperatures d'*annealing* (62°C i 64°C) amb dos cicles de repetició diferents (35 i 40 cicles). L'esquema de treball va ser el següent.

A		B	
Temperatura °C	Nº de cicles	Temperatura °C	Nº de cicles
62	20	62	35
	25		40
64	20	64	35
	25		40

Taula 8. Ajust de les condicions d'amplificació de mostres de teixit inclòs en parafina amb poca cel·lularitat tumoral. En A es descriuen les condicions per a la primera PCR mentre que en B es descriuen les de la *nested* PCR.

3.2.2.3 Electroforesi en gel d'agarosa

Després de la PCR es van visualitzar les bandes d'amplificació per electroforesi en un gel d'agarosa a l'1% tenyit amb SYBR® Safe (INVITROGEN), tal com es descriu en la instrucció IX de l'annex I.

3.2.2.4 Purificació per digestió enzimàtica

La purificació del producte de PCR es va fer per la digestió enzimàtica conjunta de l'exonucleasa I i la shrimp alkaline phosphatase, tal com es descriu en la instrucció X de l'annex I.

3.2.2.5 Reacció de seqüenciació i precipitació

Es va afegir un volum d'entre 1,5µl i 4µl del producte purificat a la reacció de seqüència dependent de la intensitat de la banda d'amplificació observada en el gel d'agarosa.

La precipitació es va realitzar amb acetat de sodi, EDTA i etanol. Tot el procés es va fer tal com es descriu en la instrucció XI de l'annex I.

3.3 Tècnica d'anàlisi de fragments per analitzar delecions : GeneScan

3.3.1 Optimització de la tècnica per a mostres de teixit inclòs en parafina

Com ja s'ha comentat anteriorment, un dels objectius era posar a punt una altra metodologia per detectar les mutacions d'EGFR més sensible i ràpida que la seqüenciació Sanger. Per analitzar les delecions de l'exó 19 es va optimitzar la tècnica de GeneScan, tant per a mostres de teixit inclòs en parafina com per a mostres de sang perifèrica.

Aquesta tècnica requereix que un dels encebadors estigui associat a un fluorocrom, en aquest cas, es va marcar el *reverse* amb FAM per tal que el làser de l'equip detectés el producte amplificat durant l'anàlisi de fragments. Es van dissenyar uns encebadors que permetessin amplificar 120 pb (la mida òptima es situa entre els 100-400pb) comprnent la zona on s'havien descrit totes les delecions de l'exó 19 (des de 9 a 24pb).

Com que aquesta mida també era adequada per amplificar mostres de sang perifèrica on l'ADN està molt degradat, es van utilitzar els mateixos encebadors per als dos tipus de mostra.

Per posar a punt la PCR es va utilitzar l'ADN del limfòcit i de la línia cel·lular delecionada PC9, utilitzant les condicions de les PCR optimitzades anteriorment. Es van combinar dues temperatures d'*annealing* a 58°C i 60°C i dos cicles d'amplificació diferents, 35 i 40 cicles. L'esquema de treball es pot veure en la següent taula:

Temperatura °C	Nº de cicles
58	35
	40
60	35
	40

Taula 9. Condicions de temperatura i repeticions d'amplificació que es van provar per optimitzar la PCR en l'anàlisi de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan.

Després de l'amplificació, es van visualitzar les bandes obtingudes per electroforesi en un gel d'agarosa al 2% tenyit amb SYBR® Safe (INVITROGEN). Segons la intensitat de la banda es va diluir i resuspendre la mostra amb formamida i l'estàndard de longitud GeneScan™ 500(-250) LIZ® (APPLIED-BIOSYSTEMS) necessari per poder determinar la mida de les delecions. Les mostres van sotmetre's a un xoc tèrmic per desnaturalitzar l'ADN. La formamida, agent desnaturalitzant, manté les cadenes separades per realitzar l'electroforesi capil·lar.

Un cop optimitzada la PCR es van amplificar, amb les mateixes condicions, mostres de teixit inclòs en parafina i mostres amb poca cel·lularitat tumoral. En ambdós casos es va afegir en la PCR un control delecionat i un de wt.

3.3.2 Avaluació de la tècnica

3.3.2.1 Límit de detecció

Es va realitzar un banc de dilucions seriadades en aigua destil·lada de l'ADN de la línia PC9. Es van analitzar 20 rèpliques de cada concentració (0,5ng/µL; 50pg/µL; 5pg/µL i 0,5pg/µL) per determinar la mínima concentració d'ADN delecionat necessari per ser detectat.

Paral·lelament, es va microdisseccionar un nombre creixent de cèl·lules d'una extensió cel·lular de la línia PC9, d'1 fins a 40 cèl·lules, fent 20 rèpliques de cada. Es van

3- PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

resuspendre en el tampó de PCR, es va amplificar l'exó 19 i s'analitzà per la tècnica de GeneScan. Així es va determinar la mínima quantitat cel·lular tumoral necessària per detectar les delecions en mostres amb poca cel·lularitat neoplàsica.

3.3.2.2 Titulació de l'ADN delecionat

Es va realitzar un banc de dilucions seriades de l'ADN de la línia PC9 diluït amb l'ADN wt de limfòcit en concentracions creixents (1:10; 1:100 i 1:250), i es van analitzar 20 rèpliques de cada. Així es va comprovar la proporció mínima d'ADN delecionat respecte a ADN wt que requereix aquesta tècnica per detectar les delecions.

Concentració d'ADN de PC9 (pg/ μ L)	Concentració d'ADN de limfòcit (pg/ μ L)	Factor de dilució d'ADN delecionat
100	1000	1:10
100	10000	1:100
100	25000	1:250

Taula 10. Dilucions de l'ADN delecionat de la línia PC9 amb ADN wt de limfòcit per tal de comprovar la mínima quantitat necessària per a que la tècnica de GeneScan detecti la delecio.

3.3.2.3 Repetibilitat i reproducibilitat

La repetibilitat es defineix com la capacitat de la tècnica de GeneScan per obtenir el mateix resultat independentment de les vegades que es repeteixi l'anàlisi. Es va utilitzar l'ADN de les línies PC9 (com control positiu de delecio) i H1975 (com control negatiu de delecio) i es va repetir l'anàlisi 25 cops al llarg de quatre mesos.

La reproducibilitat es defineix com la capacitat de la tècnica de GeneScan per obtenir el mateix resultat seguint el mateix protocol per diferents individus. Dues persones van analitzar, en paral·lel, 22 mostres de teixit inclòs en parafina, tant delecionades (6 delecionades de 15pb; 1 de 12pb; 1 de 18pb i 1 de 24pb) com wt.

3.3.2.4 Sensibilitat i especificitat

La sensibilitat es defineix com la capacitat de la tècnica per detectar la delecio en mostres realment delecionades, en aquest cas, la capacitat de la tècnica de GeneScan per detectar la delecio en 170 teixits inclosos en parafina ja detectats delecionats per seqüenciació Sanger.

El càlcul de la sensibilitat es realitzà mitjançant la fórmula:

$$\text{sensibilitat} = \frac{PR}{PR + FN}$$

on PR són positius reals (el pacient és delecionat tant per seqüenciació Sanger com per la tècnica de GeneScan) i FN falsos negatius (pacients que són delecionats per seqüenciació Sanger però que es detecten wt per la tècnica de GeneScan)

L'especificitat és la capacitat de la tècnica per no detectar la delecio en mostres realment no delecionades. Dit d'una altra manera, la capacitat que presenta la tècnica de GeneScan detectar no delecionat un pacient wt analitzat prèviament per seqüenciació Sanger.

El càlcul de l'especificitat es va realitzar amb la fórmula:

$$\text{especificitat} = \frac{NR}{NR + FP}$$

on NR són negatius reals (el pacient és wt tant per seqüenciació Sanger com per la tècnica de Genescan) i FP falsos positius (pacients que són wt per seqüenciació Sanger però per la tècnica de GeneScan es detecten delecionats)

3.3.2.5 Heterogeneïtat tumoral

Es van microdisseccionar diverses àrees tumorals (de 2 a 6) o bé diversos grups cel·lulars (de mostres amb poca cel·lularitat) de 36 mostres (21 d'elles delecionades: 16 mostres amb una delecio de 15pb, 3 mostres amb una delecio de 18pb i 2 mostres amb una delecio de 24 pb; i de 15 wt) i es va determinar si la delecio era homogènia en tot el tumor o bé no seguia un model de clonalitat inicial.

Un cop que aquesta tècnica es va considerar apta per detectar les delecions de l'exó 19 en mostres de teixit inclòs en parafina, es van reanalitzar els 20 pacients delecionats per seqüenciació Sanger dels estudis utilitzats en la validació clínica.

3.3.3 Optimització de la tècnica per a mostres de sang perifèrica

Es va optimitzar la tècnica de GeneScan per detectar les delecions en l'ADN circulant de la sang perifèrica dels pacients a partir de les condicions establertes per a les mostres de teixit inclòs en parafina.

Per tal d'enriquir la quantitat d'ADN delecionat es va afegir la sonda proteica PNA que s'uneix específicament als al·lels wt i n'impedeix la seva amplificació. Això va comportar la necessitat d'afegir nous controls en les PCR. Es van afegir la línia cel·lular PC9 i el limfòcit, en dues amplificacions paral·leles amb PNA i sense PNA. Amb PNA s'esperava veure la delecio de la línia PC9 quasi en homozigosi i molt poca amplificació del limfòcit. Això indicava que la sonda PNA estava actuant correctament. En la reacció sense PNA s'esperava veure la línia PC9 delecionada en heterozigosi i amplificació del limfòcit. Això indicava que la PCR havia funcionat. Els controls negatius de PCR, on no s'havia afegit ADN, s'amplificaven sense PNA per poder comprovar qualsevol contaminació que haguera quedat inhibida si s'hagués afegit PNA en la reacció. La relació dels controls utilitzats es troba adjunta en l'annex I (instrucció XVII).

La naturalesa proteica del PNA comporta que no sigui gaire soluble en aigua destil·lada. El fabricant recomana que es resuspengui a 60°C i es mantingui a -20°C fins el seu ús.

3.3.3.1 Obtenció de l'ADN circulant

Per extreure la sang perifèrica dels pacients es van utilitzar dos tubs col·lectors, un amb K₃/EDTA que evita la coagulació de la sang i del què s'obté el plasma del pacient, i un altre anomenat SST amb un gel inert que separa el coàgul del sèrum un cop es centrifuga. El procediment per obtenir el sèrum i el plasma es basa en un parell de centrifugacions i la recuperació del sobrenedant. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció I).

L'ADN de la sang perifèrica es va extreure mitjançant el kit comercial QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (Izasa), partint de 200µl per duplicat seguint el protocol d'ús del kit fins als darrers passos que, per augmentar la concentració d'ADN, es va eluir una de les rèpliques en 50µl d'aigua destil·lada. Per resuspendre la segona rèplica s'utilitzà l'eluit de la primera. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció XVI).

Per analitzar les mutacions d'EGFR (tant l'exó 19 com el 21) de la sang perifèrica dels pacients, es van realitzar dues extraccions d'ADN independents, tant de sèrum com de plasma.

3.3.3.2 Optimització de l'amplificació

Arran les condicions optimitzades per amplificar l'ADN de teixit inclòs en parafina, es va comprovar el grau d'amplificació per GeneScan de l'ADN circulat de la sang perifèrica de cinc individus sans. Es va incloure la línia cel·lular PC9 com control positiu delecionat i de limfòcit com control wt.

Com que la intensitat de la banda d'amplificació, visualitzada per l'electroforesi en gel d'agarosa, era molt baixa es va realitzar una *nested* PCR de 30 cicles utilitzant els mateixos encebadors que en la primera PCR i de nou es van visualitzar les bandes en un gel d'agarosa. Es van fer les dilucions pertinents, es van preparar les mostres amb formamida i l'estàndard de longitud GeneScan™ 500(-250) LIZ® i es van analitzar en l'equip 3130 Genetic Analyzer (APPLIED-BIOSYSTEMS).

Un cop comprovat que l'amplificació era adequada, es va afegir a la reacció la sonda PNA específica per a la seqüència wt de l'exó 19. L'esquema detallat de la situació dels encebadors i de la sonda PNA es troba en l'annex I (Esquema II).

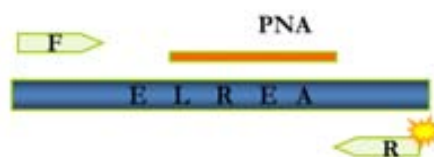


Fig. 27. Esquema dels encebadors (en verd) i de la sonda PNA (en vermell) respecte a la zona de deleció de l'exó 19 (ELREA). Com es pot apreciar, l'encebador reverse té associat un fluorocrom (en forma d'estrella groga) que emet el senyal necessari per a l'anàlisi per la tècnica de GeneScan.

Per determinar la concentració de PNA necessària per inhibir l'ADN wt i detectar les delecions, es van provar concentracions creixents de sonda (1µM; 2µM; 3µM; 4µM i 5µM). Es va analitzar la línia PC9, com control positiu delecionat i el limfòcit com control wt. Paral·lelament, es van analitzar els ADN de sang perifèrica de pacients amb diverses longituds de deleció (9pb, 15pb, 18pb i 24pb) comprovades prèviament per seqüenciació Sanger en la corresponent mostra de teixit inclòs en parafina. Es van preparar les mostres amb formamida i l'estàndard de longitud GeneScan™ 500(-250) LIZ® i es van analitzar en l'equip 3130 Genetic Analyzer (APPLIED-BIOSYSTEMS).

Malgrat utilitzar concentracions de sonda PNA elevades, l'amplificació amb una sola PCR era insuficient per detectar la deleció. Com que l'estratègia era inhibir el màxim d'ADN wt en la primera PCR i acabar la inhibició en la *nested* PCR, les concentracions de sonda que es van provar en la segona amplificació van ser inferiors (2 µM; 3 µM i 4 µM). En la següent taula es mostren les combinacions de sonda provades.

Concentració de PNA 1a PCR (μM)	Concentració de PNA <i>nested</i> (μM)
1	2
	3
	4
2	2
	3
	4
3	2
	3
	4
4	2
	3
	4
5	2
	3
	4

Taula 11. Combinació de concentracions de sonda PNA que es van provar per analitzar l'exó 19 de l'ADN de sang perifèrica, tant en la primera PCR com en la nested.

3.3.4 Avaluació de la tècnica

Es va afegir la sonda PNA en totes les reaccions.

3.3.4.1 Límit de detecció

Es va realitzar un banc de dilucions seriades de l'ADN de la línia PC9 en aigua destil·lada. Es van analitzar 10 rèpliques de cada concentració (0,5ng/ μL ; 50pg/ μL ; 5pg/ μL i 1pg/ μL) per determinar la mínima concentració d'ADN delecionat necessari per ser detectat.

3.3.4.2 Titulació de l'ADN delecionat

Es va comprovar la capacitat de la tècnica de GeneScan per detectar la delecio en aquest tipus de mostra on la proporció d'ADN delecionat, respecte al wt, és molt baixa. Aquesta alta proporció d'ADN wt pot interferir en l'anàlisi, comportant el risc de considerar un pacient wt quan en realitat està delecionat.

Es va realitzar un banc de dilucions seriades de l'ADN de la línia PC9 diluït en ADN wt de limfòcit en concentracions creixents (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:5.000 i 1:10.000), analitzant 10 rèpliques de cada. La següent taula mostra les dilucions analitzades:

Concentració d'ADN de PC9 (pg/μL)	Concentració d'ADN de limfòcit (pg/μL)	Factor de dilució d'ADN delecionat
20	200	1:10
20	2000	1:100
20	20000	1:1000
20	100000	1:5000
20	200000	1:10000

Taula 12. Dilucions de l'ADN delecionat de la línia PC9 amb ADN wt de limfòcit per comprovar la mínima concentració necessària d'ADN delecionat per a que la tècnica de GeneScan detecti la delecio.

3.3.4.3 Repetibilitat i reproducibilitat

La repetibilitat es defineix com la capacitat de la tècnica de GeneScan per obtenir el mateix resultat independentment de les vegades que es repeteixi l'anàlisi. Es va utilitzar l'ADN de les línies PC9 (com control delecionat) i H1975 (com control negatiu de delecio) i es va repetir l'anàlisi 20 cops al llarg de tres mesos.

La reproducibilitat es defineix com la capacitat de la tècnica de GeneScan per obtenir el mateix resultat seguint el mateix protocol per diferents individus. Dues persones van analitzar, en paral·lel, l'ADN de 25 mostres de sang perifèrica de pacients que havien estat detectats delecionats de l'exó 19 utilitzant l'ADN de teixit inclòs en parafina, per aquesta mateixa tècnica. D'aquestes 25 mostres analitzades, 9 pacients eren wt i 14 eren pacients delecionats amb diferent longitud de delecio (3 eren delecionats de 9pb, 9 de 15pb i 2 de 18pb).

3.3.4.4 Sensibilitat i especificitat

Es defineix com la capacitat de la tècnica per detectar les delecions en l'ADN de la sang perifèrica dels pacients que se'ls havia detectat prèviament la delecio en teixit inclòs en parafina.

Per avaluar aquests paràmetres es va analitzar l'ADN circulant de la sang perifèrica de 98 pacients: 16 individus sans, 49 pacients wt i 33 delecionats, tots ells analitzats prèviament a partir del teixit inclòs en parafina.

El càlcul es realitzà mitjançant la fórmula:

$$sensibilitat = \frac{PR}{PR + FN}$$

3- PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

on PR són positius reals (el pacient està delecionat per la tècnica de GeneScan tant en el teixit inclòs en parafina com en l'ADN de sang perifèrica) i FN falsos negatius (pacients que són delecionats en l'anàlisi d'ADN de teixit inclòs en parafina però que la tècnica de GeneScan detecta wt l'ADN circulant de sang perifèrica)

L'especificitat es defineix com la capacitat que presenta la tècnica de GeneScan, a partir de l'anàlisi de l'ADN circulant de sang perifèrica, per detectar no delecionat un pacient wt analitzat prèviament a partir del teixit inclòs en parafina.

El càlcul es va realitzar amb la fórmula:

$$especificitat = \frac{NR}{NR + FP}$$

on NR són negatius reals (la tècnica de Genescan detecta els pacients wt tant en l'anàlisi del teixit inclòs en parafina com l'ADN de sang perifèrica) i FP falsos positius (la tècnica de Genescan detecta els pacients wt en l'anàlisi del teixit inclòs en parafina però els detecta delecionats en l'ADN de la sang perifèrica)

3.4 Tècnica de discriminació al·lèlica per analitzar mutacions puntuals: TaqMan

El resultat de la discriminació al·lèlica, tal com ja s'ha descrit, resulta de la comparació de la lectura de la fluorescència emesa per unes sondes que hibriden amb els al·lels wt o mutats, abans de l'amplificació i un cop s'han assolit tots els cicles. Es van dissenyar els encebadors i les sondes específiques per analitzar la mutació L858R, molt més freqüent que la L861Q. L'amplicó generat, de 68pb, també era adequat per aplicar aquesta tècnica en mostres de sang perifèrica on l'ADN està molt degradat.

Totes les discriminacions al·lèliques es van realitzar en els equips de PCR Quantitativa a Temps Real 7000 Sequence Detection System o 7900HT Sequence Detection System (ambdós d'Applied Biosystems).

3.4.1 Optimització de la tècnica per analitzar les mutacions L858R i T790M dels exons 21 i 20, per a mostres de teixit inclòs en parafina

Per detectar la mutació L858R de l'exó 21, es va analitzar l'ADN del limfòcit per duplicat i de la línia H1975, mutada en aquesta posició, per triplicat. Es va afegir un control anomenat Not Template Control (NTC) on no s'hi va posar mostra per tal de comprovar possibles contaminacions dels reactius. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció XIII). Es van utilitzar les condicions estàndard que recomana Applied Biosystems per analitzar les mostres de teixit inclòs en parafina. En totes les discriminacions al·lèliques es va afegir la línia H1975 com control positiu de mutació i el limfòcit com control wt.

Per una altra banda, la baixa freqüència i la alta heterogeneïtat de la mutació T790M de l'exó 20 van comportar que s'afegís la sonda PNA corresponent en totes les discriminacions al·lèliques per tal d'inhibir els al·lèls wt. Els amplicons generats van ser de 51pb. L'esquema dels encebadors, la sonda PNA i les sondes TaqMan es troben a continuació i, més detalladament, en l'Esquema II de l'annex I.

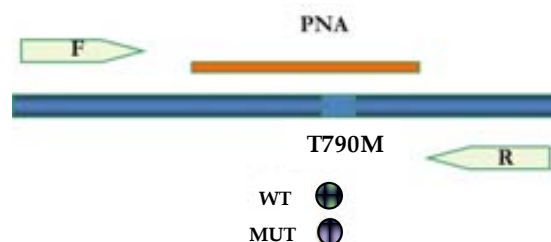


Fig. 28. Esquema dels diferents components de la reacció TaqMan per analitzar la mutació T790M de l'exó 20. Com es pot observar, la sonda PNA, en vermell, hibrida amb la zona de l'ADN on es troba la mutació inhibint l'amplificació wt. El cercle verd representa la sonda Taqman que s'uneix a l'al·lèl wt mentre que el cercle lila representa la sonda que s'uneix a l'al·lèl mutat. En verd els encebadors en sentit forward (F) i reverse (R).

Afegir la sonda PNA en la discriminació al·lèlica va comportar l'addició de nous controls. Es van analitzar dues reaccions paral·leles amb la sonda PNA i sense la sonda. Amb PNA es van afegir els següents controls: la línia H1975 mutada T790M (com control positiu de mutació i que s'esperava que es discriminés en la zona d'alta fluorescència de l'eix de les y), un limfòcit (com control wt i que apareixeria al costat del NTC indicant que la inhibició dels al·lèls wt havia estat correcta) i el NTC. Sense sonda, s'analitzava un limfòcit (com control wt i que apareixeria en la zona de màxima fluorescència de l'eix de les x, indicant que la reacció havia funcionat) i un altre NTC que servia de control de contaminació de la reacció. Com que la sonda inhibia l'amplificació dels al·lèls wt, va ser necessari incloure, paral·lelament a les mostres que s'analitzaven amb PNA, una rèplica

de mostra sense sonda. D'aquesta manera es podien diferenciar les mostres que no tenien suficient material tumoral per ser detectades de les que eren completament wt, ja que en ambdós casos no hi havia amplificació i apareixien al costat del NTC.

La tècnica es va posar a punt partint de les condicions optimitzades per detectar la mutació L858R de l'exó 21 en sang perifèrica, procés que s'explica en l'apartat 3.4.3. Afegint la sonda PNA en la mateixa concentració que per a l'exó 21, es van provar dos cicles d'amplificació de 40 i 50 cicles. A diferència de l'exó 21, no es va modificar la temperatura d'elongació que va ser, en totes les anàlisis, de 60 segons. Es va utilitzar la línia H1975 com control positiu mutat a 50ng/μl i el limfòcit com control wt. Per comprovar l'amplificació, es van analitzar tres rèpliques de la línia H1975 a 1ng/μl en l'equip ABIPRISM 7900HT (APPLIED-BIOSYSTEMS). La relació de controls utilitzats i la instrucció de treball detallada es troba adjunta en l'annex I (instrucció XV).

3.4.2 Avaluació de la tècnica

Es va realitzar la línia cel·lular H1975 mutada en la posició L858R i T790M. En l'avaluació de l'exó 20, es va afegir la sonda PNA en totes les reaccions.

3.4.2.1 Límit de detecció de la tècnica

Es va realitzar un banc de dilucions de l'ADN de la línia H1975 en aigua destil·lada. Es van analitzar 18 rèpliques de cada concentració (0,5ng/μL; 50pg/μL; 5pg/μL i 0,5pg/μL per a l'exó 21 i 0,5ng/μL; 50pg/μL; 10pg/μL; 5pg/μL i 1pg/μL per a l'exó 20), en un total de sis experiments, per tal de determinar la mínima concentració d'ADN mutat necessari per ser detectat.

Paral·lelament, es va fer la microdissecció d'una extensió cel·lular de la línia H1975 en nombre creixent de cèl·lules (d'una fins a 40 cèl·lules) utilitzant el tampó de PCR com solució de resuspensió. D'aquesta manera es va determinar la mínima quantitat tumoral necessària per detectar la mutació L858R. L'experiment es va repetir fins a sis vegades analitzant, per triplicat, les diferents quantitats cel·lulars.

3.4.2.2 Titulació de l'ADN mutat

Es va realitzar un banc de dilucions seriades de l'ADN de la línia H1975 diluït amb l'ADN wt de limfòcit en concentracions creixents (1:2; 1:10; 1:100 i 1:250) tal com queda resumit en la taula següent. Així es va comprovar la proporció mínima d'ADN mutat

3- PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

respecte a ADN wt que requereix aquesta tècnica per detectar la mutació i minimitzar el risc de considerar un pacient wt quan en realitat és mutat. Per triplicats, es van repetir les anàlisis en sis experiments.

Concentració d'ADN de H1975 (pg/ μ L)	Concentració d'ADN de limfòcit (pg/ μ L)	Factor de dilució d'ADN mutat
100	100	1:2
100	1000	1:10
100	10000	1:100
100	25000	1:250

Taula 13. Dilucions de l'ADN mutat per a la posició L858R de la línia cel·lular H1975 amb ADN wt de limfòcit per tal de comprovar la mínima concentració necessària per a que la tècnica TaqMan detecti la mutació.

Es va comprovar la capacitat de la tècnica per detectar la mutació T790M on la proporció d'ADN mutat respecte al wt és molt baixa. Aquesta alta proporció d'ADN wt pot interferir en l'anàlisi, comportant el risc de considerar un pacient wt quan en realitat és mutat.

Es va realitzar un banc de dilucions seriadades de l'ADN de la línia H1975 diluït en ADN wt de limfòcit en concentracions creixents (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:5.000 i 1:10.000). L'anàlisi es va realitzar amb triplicats de cada concentració en sis assajos independents.

Concentració d'ADN de H1975 (pg/ μ L)	Concentració d'ADN de limfòcit (pg/ μ L)	Factor de dilució d'ADN mutat
20	200	1:10
20	2000	1:100
20	20000	1:1000
20	100000	1:5000
20	200000	1:10000

Taula 14. Dilucions de l'ADN mutat T790M de la línia cel·lular H1975 amb ADN wt de limfòcit per tal de comprovar la mínima concentració necessària per a que la tècnica TaqMan detecti la mutació.

3.4.2.3 Repetibilitat i reproducibilitat

La repetibilitat es defineix com la capacitat de la tècnica TaqMan per obtenir el mateix resultat independentment de les vegades que es repeteixi l'anàlisi. Per a l'exó 21 es van utilitzar les línies H1975 (com control positiu de mutació) i PC9 (com control negatiu de mutació) i es va repetir l'anàlisi 25 cops al llarg de quatre mesos. Per a l'exó 20, es va

3- PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

utilitzar la línia H1975 (com control positiu de mutació) i el limfòcit (com control negatiu de mutació) i es va repetir l'anàlisi 20 vegades al llarg de tres mesos.

La reproducibilitat es defineix com la capacitat de la tècnica TaqMan per obtenir el mateix resultat per diferents individus, seguint el mateix protocol. Dues persones van analitzar, en paral·lel, l'ADN de 22 mostres de teixit inclòs en parafina, 6 d'elles mutades L858R i 16 wt de l'exó 21 i 20 mostres, 10 mutades i 10 wt de l'exó 20.

3.4.2.4 Sensibilitat i especificitat

La sensibilitat es defineix com la capacitat de la tècnica per detectar la mutació L858R en l'ADN de pacients que s'havien detectat mutats prèviament per seqüenciació Sanger. Es van analitzar 170 ADN de teixit inclòs en parafina per seqüenciació i TaqMan.

El càlcul de la sensibilitat es va realitzar mitjançant la fórmula:

$$\text{sensibilitat} = \frac{PR}{PR + FN}$$

on PR són positius reals (el pacient és mutat tant per seqüenciació Sanger com per la tècnica TaqMan) i FN falsos negatius (pacients que són mutats per seqüenciació Sanger però que la tècnica TaqMan els detecta wt)

Mentre que el càlcul de l'especificitat es va realitzar amb aquesta altra fórmula:

$$\text{especificitat} = \frac{NR}{NR + FP}$$

on NR són negatius reals (pacients wt tant per seqüenciació Sanger com per la tècnica TaqMan) i FP falsos positius (pacients que són wt per seqüenciació però que la tècnica TaqMan els detecta mutats)

Com que no hi ha mètode estàndard per analitzar la mutació T790M de l'exó 20, la sensibilitat es va determinar comparant els resultats obtinguts per la tècnica TaqMan respecte a un altre mètode anomenat TaqMan Mutation Detection Assay (TMMA) (APPLIED-BIOSYSTEMS). Aquest kit comercial d'anàlisi de mutacions d'EGFR es basa en la detecció de l'al·lel mutat per la hibridació d'un encebador mentre que un altre

encebador, unit a un bloquejador, inhibeix l'amplificació de l'al·lel wt. Es van comparar els resultats de la mutació T790M de 88 mostres, 22 d'elles detectades mutades amb el kit comercial, 50 mostres wt i 16 mostres d'individus sans.

En no poder-se aplicar les fórmules que s'havien utilitzat per calcular la sensibilitat dels altres exons, el grup d'Arcila (ARCILA *et al.* 2011) proposa aquesta altra fórmula per aconseguir una aproximació al valor real de sensibilitat:

$$\text{Sensibilitat} = \% \text{ de CN1} + (\% \text{ de CP1} \times \text{increment dels casos positius del nou mètode})$$

on CN1 són els casos negatius pel mètode d'anàlisi 1, CP1 són els casos positius pel mètode d'anàlisi 1.

El càlcul de l'especificitat recau en els falsos positius. Com que no hi ha mètode estàndard per determinar, amb un 100% de certesa, que la mostra era realment wt, no es van poder aplicar les fórmules utilitzades anteriorment. L'anàlisi dels 16 individus sans es va utilitzar com control d'especificitat.

3.4.2.5 Heterogeneïtat tumoral

Es van microdisseccionar diverses àrees tumorals (de 2 a 6 àrees) o bé diversos grups cel·lulars (de mostres amb poca cel·lularitat) de 36 mostres (21 mutades en la posició L858R i de 15 wt) i de 3 a 6 àrees de 25 mostres (14 mutades en la posició T790M i d'11 wt) i es va determinar si la mutació era homogènia en tot el tumor o bé no seguia un model de clonalitat inicial.

Un cop que aquesta tècnica es va considerar apta per detectar la mutació L858R de l'exó 21 en mostres de teixit inclòs en parafina, es van reanalitzar els 6 pacients mutats per seqüenciació Sanger dels estudis utilitzats en la validació clínica.

3.4.3 Optimització de la tècnica per analitzar la mutació L858R en mostres de sang perifèrica

Per tal d'enriquir la quantitat d'ADN mutat, es va afegir la sonda proteica PNA que s'uneix específicament als al·lells wt i n'impedeix la seva amplificació. Això va comportar la necessitat d'afegir nous controls en les discriminacions al·lèliques. Es van analitzar dues reaccions paral·leles amb sonda PNA i sense sonda PNA. Amb PNA es van posar els següents controls: la línia cel·lular H1975 mutada L858R, un limfòcit, una mostra d'ADN

3- PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

de sang perifèrica detectada mutada L858R i una altra detectada wt, i el NTC. Amb aquests controls s'esperava observar la línia cel·lular i la mostra de sang perifèrica mutada en la zona de màxima fluorescència de l'eix de les y, mentre que el limfòcit i la mostra de sang perifèrica wt s'esperaven al costat del NTC, ja que la sonda PNA hauria inhibit els al·lels wt. Sense sonda, els controls eren un limfòcit i un altre NTC. El primer s'esperava observar en la zona de màxima fluorescència de l'eix de les x, indicant que la reacció havia funcionat mentre que l'altre NTC apareixia en la intersecció dels eixos, ja que no tenia ADN i servia de control de contaminació de la reacció. Totes les mostres de sang perifèrica s'analitzaven paral·lelament amb PNA i sense, per tal d'assegurar que la no amplificació corresponia a la inhibició amb PNA i no a la manca d'ADN ja que en ambdós casos apareixien al costat del NTC. La relació dels controls utilitzats es troba adjunta en l'annex I (instrucció XVIII).

La naturalesa proteica del PNA comporta que no sigui gaire soluble en aigua destil·lada. El fabricant recomana que es resuspengui a 60°C i es mantingui a -20°C fins el seu ús.

Arran les condicions establertes per analitzar el teixit inclòs en parafina es va optimitzar aquest procés utilitzant, com material genètic, l'ADN extret del torrent sanguini del pacient.

Es va analitzar l'ADN de la sang perifèrica de cinc individus sans per comprovar el grau de discriminació al·lèlica en l'equip ABI PRISM 7900HT (APPLIED-BIOSYSTEMS) sense afegir la sonda PNA. Paral·lelament, es va analitzar la línia H1975 com control positiu mutat i del limfòcit com control wt. Malgrat que el programa d'amplificació és estàndard, es van modificar tant els cicles de PCR (de 40 a 50) com el temps d'elongació (de 60seg a 90seg) arran de la poca concentració d'ADN de les mostres.

L'esquema dels encebadors, la sonda PNA i les sondes TaqMan es troben en la figura següent i, amb més detall, en l'Esquema II de l'annex I.

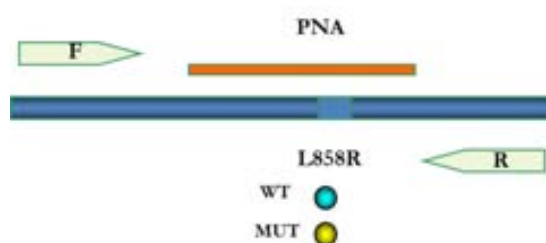


Fig. 29. Esquema dels diferents components de la reacció TaqMan. La sonda PNA, en vermell, hibrida amb la zona de l'ADN on es troba la mutació inhibint l'amplificació wt. El cercle blau representa la sonda Taqman que s'uneix a l'al·lel wt mentre que el cercle groc representa la sonda que s'uneix a l'al·lel mutat. En verd els encebadors en sentit forward (F) i en sentit reverse (R).

Es van provar les concentracions creixents de PNA (0,5 μ M; 1 μ M; 2 μ M; 3 μ M i 5 μ M) en duplicats de l'ADN circulant de sang perifèrica de tres pacients que s'havien detectat mutats L858R de l'exó 21 en teixit inclòs en parafina.

3.4.4 Avaluació de la tècnica

Es va afegir la sonda PNA en totes les reaccions.

3.4.4.1 Límit de detecció

Es va realitzar un banc de dilucions seriades de l'ADN de la línia H1975 en aigua destil·lada. Es van analitzar 10 rèpliques de cada concentració (0,5ng/ μ L; 50pg/ μ L; 5pg/ μ L i 1pg/ μ L) per determinar la mínima concentració d'ADN mutat de l'exó 21 necessari per ser detectat.

3.4.4.2 Titulació de l'ADN mutat

Es va comprovar la capacitat de la tècnica TaqMan per detectar la mutació L858R en aquest tipus de mostra on la proporció d'ADN mutat respecte al wt, és molt baixa. Aquesta alta proporció d'ADN wt pot interferir en l'anàlisi, comportant el risc de considerar un pacient wt quan en realitat és mutat.

Es va realitzar un banc de dilucions seriades de l'ADN de la línia H1975 diluït en l'ADN wt de limfòcit en concentracions creixents (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:5.000 i 1:10.000). Per triplicat, es van analitzar les diferents concentracions. Es va repetir l'experiment tres cops.

Concentració d'ADN de H1975 (pg/ μ L)	Concentració d'ADN de limfòcit (pg/ μ L)	Factor de dilució d'ADN mutat
20	200	1:10
20	2000	1:100
20	20000	1:1000
20	100000	1:5000
20	200000	1:10000

Taula 15. Dilucions de l'ADN de la línia cel·lular H1975, mutada L858R, amb ADN wt de limfòcit, per comprovar la mínima concentració necessària de material tumoral per a que la tècnica TaqMan detecti la mutació.

3.4.4.3 Repetibilitat i reproducibilitat

Es van analitzar les línies H1975 (com control positiu mutat) i PC9 (com control negatiu de la mutació) i es va repetir l'experiment 20 cops al llarg de tres mesos.

La reproducibilitat es defineix com la capacitat de la tècnica TaqMan per obtenir el mateix resultat seguint el mateix protocol per diferents individus. Dues persones diferents van analitzar en paral·lel l'ADN de 25 mostres de sang perifèrica: 14 mostres de pacients que havien estat detectats mutats i 9 mostres de pacients que havien estat detectats wt analitzats prèviament a partir del teixit inclòs en parafina.

3.4.4.4 Sensibilitat i especificitat

Es defineix com la capacitat de la tècnica per detectar la mutació L858R en l'ADN de sang perifèrica en pacients que se'ls havia detectat en el teixit inclòs en parafina. Per avaluar aquests paràmetres es va analitzar l'ADN circulant de la sang perifèrica de 16 individus sans, 49 pacients wt i 17 mutats.

El càlcul es realitzà mitjançant la fórmula:

$$\text{sensibilitat} = \frac{PR}{PR + FN}$$

on PR són positius reals (el pacient està mutat per la tècnica TaqMan tant en l'anàlisi del teixit inclòs en parafina com en l'ADN circulant) i FN falsos negatius (pacients que són mutats en l'anàlisi del teixit inclòs en parafina però que la tècnica TaqMan detecta wt l'ADN circulant)

L'especificitat es defineix com la capacitat de la tècnica TaqMan per no detectar la mutació en mostres d'ADN circulant de sang perifèrica en pacients wt analitzats prèviament a partir del teixit inclòs en parafina.

El càlcul es va realitzar amb la fórmula:

$$\text{especificitat} = \frac{NR}{NR + FP}$$

on NR són negatius reals (pacients que són detectats wt tant en teixit inclòs en parafina com en la sang perifèrica per la tècnica TaqMan) i FP falsos positius (pacients que són wt en l'anàlisi del teixit inclòs en parafina però que la tècnica TaqMan els detecta mutats en l'ADN circulant).

3.5 Validació clínica de les tècniques d'anàlisi en mostres de teixit inclòs en parafina

3.5.1 Validació clínica de la tècnica de seqüenciació Sanger

De forma independent, es va analitzar el gen EGFR en dues poblacions diferents de pacients per tal de comprovar que els resultats obtinguts per seqüenciació Sanger correlacionaven amb els resultats publicats en la bibliografia.

En el primer estudi es van analitzar les mutacions d'EGFR de 67 pacients avançats de CPCNP, 31 dels quals d'origen asiàtic (19 japonesos i 12 xinesos) i 36 d'origen caucàsic, que havien rebut gefitinib després de recaure al tractament amb quimioteràpia.

En el segon estudi es van analitzar les mutacions d'EGFR de 83 pacients avançats de CPCNP que havien rebut gefitinib com tractament d'ús compassiu després de diverses línies de tractament amb quimioteràpia.

3.5.2 Validació clínica de les tècniques de GeneScan i TaqMan dels pacients inclosos en l'SLADB

Es van analitzar 2105 pacients inclosos en l'SLADB des de l'abril del 2005 fins el novembre del 2008 provinents de 129 centres hospitalaris. Els pacients mutats van rebre erlotinib 150mg/dia com tractament de quimioteràpia en primera línia o posterior.

Els criteris d'inclusió requerien que el pacient fos diagnosticat de CPCNP en un estadi IIIB amb basament pleural o un estadi IV (respecte a la 6a edició de classificació TNM), la disponibilitat de suficient teixit tumoral per realitzar l'anàlisi mutacional del gen EGFR, un estat funcional (ECOG PS) de 0-2 i una adequada funció renal, hepàtica i hematològica. Els criteris d'exclusió pels quals no s'admitia un pacient en aquesta base de dades eren que presentés un càncer metacrònic actiu, fibrosi pulmonar, malaltia coronària severa o embaràs. Tots els pacients van firmar el consentiment informat.

L'objectiu d'aquesta base de dades era el cribatge dels pacients amb CPCNP d'acord amb les mutacions dels exons 19 i 21 del gen EGFR i comprovar la resposta, supervivència i PFS del tractament amb ITQ.

Tots els pacients amb resultat positiu, tant per la tècnica de GeneScan com per TaqMan, es van analitzar paral·lelament per seqüenciació Sanger.

3.6 Validació clínica de les tècniques d'anàlisi en mostres de sang perifèrica

Un cop comprovat que les tècniques de GeneScan i TaqMan eren adequades per detectar les mutacions d'EGFR de la sang perifèrica, es va procedir a la validació clínica amb les mostres d'ADN circulant dels pacients inclosos en l'SLADB. Totes les mostres eren anteriors a l'inici del tractament amb erlotinib.

3.6.1 Validació clínica de les tècniques de GeneScan i TaqMan dels pacients inclosos en l'SLADB

Es van analitzar l'ADN circulant de la sang perifèrica 164 pacients detectats mutats en teixit inclòs en parafina, dels quals 99 delecionats de l'exó 19 i 65 mutats L858R de l'exó 21. Es va determinar la resposta al tractament, la supervivència i la PFS. Es van comparar aquests resultats amb els obtinguts en la bibliografia per determinar si la detecció de les mutacions en sang perifèrica es podia aplicar en el diagnòstic dels pacients.

Prenent com a base totes les validacions analítiques, es va partir del supòsit que el resultat obtingut en l'anàlisi de les mutacions d'EGFR a partir del teixit inclòs en parafina era l'estat mutacional real del pacient.

3.7 Assaig EURTAC

3.7.1 Anàlisi de les mutacions d'EGFR per les tècniques de GeneScan i TaqMan de les mostres de teixit inclòs en parafina

Amb la informació obtinguda de la validació clínica de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR dels pacients de l'SLADB, el Grupo Español de Cáncer de Pulmón va impulsar l'assaig clínic obert, doble cec i multicèntric fase III EURTAC on els pacients avançats mutats d'EGFR es van aleatoritzar per rebre quimioteràpia convencional (docetaxel/cisplatí o gemcitabina/cisplatí o combinacions amb carboplatí en el cas que el pacient no fos candidat pel tractament amb cisplatí) o erlotinib en primera línia, 150 mg/dia. En el reclutament dels pacients van participar 42 hospitals de França, Itàlia i Espanya. Aquest assaig està registrat en *ClinicalTrials.gov* amb el número NCT00446225.

Els criteris d'inclusió requerien que el pacient fos diagnosticat de CPCNP en un estadi IIIB amb basament pleural o un estadi IV de CPCNP (respecte a la 6a edició de classificació TNM), que la malaltia fos mesurable o avaluable, que presentés deleció de l'exó 19 o bé mutació de l'exó 21, que el pacient fos major d'edat i que no hagués rebut cap règim de quimioteràpia previ per malaltia metastàsica (tot i que si la quimioteràpia adjuvant o neoadjuvant havia finalitzat feia més de 6 mesos abans de la inclusió a l'estudi, també era admès). La aleatorització dels pacients mutats la va realitzar una organització d'assaigs clínics externa al centre en una proporció 1:1.

L'objectiu principal era determinar la PFS, les respostes i supervivències comparant els dos règims de tractament. Es van analitzar 1227 pacients des del febrer del 2007 fins al gener del 2011 dels quals 173 eren mutats i es van reclutar en l'assaig.

Es van analitzar els exons 19 i 21 d'EGFR de les mostres del teixit tumoral inclòs en parafina previ al tractament del pacient amb quimioteràpia. Les anàlisis es van realitzar mitjançant les tècniques de GeneScan i TaqMan. Tots els pacients mutats es van reconfirmar per seqüenciació Sanger.

3.7.2 Validació clínica de l'anàlisi de la mutació T790M de les mostres de teixit inclòs en parafina

Es va realitzar la validació clínica de la detecció de la mutació T790M de l'exó 20 de 95 pacients mutats d'EGFR, dels 173 inclosos en l'EURTAC, tant delecionats de l'exó 19 com mutats L858R de l'exó 21. Es van analitzar els teixits inclosos en parafina abans de començar el tractament assignat i s'avaluà la resposta al tractament, la supervivència i la PFS.

3.7.3 Anàlisi de les mutacions d'EGFR per les tècniques de GeneScan i TaqMan de l'ADN circulant de sang perifèrica

Es van analitzar les mutacions d'EGFR de l'ADN circulant de la sang perifèrica prèvia al tractament de 106 pacients (64 delecionats de l'exó 19 i 42 mutats L858R de l'exó 21; 52 tractats amb quimioteràpia i 54 amb ITQ) dels 173 pacients de l'EURTAC. Amb les dades obtingudes s'avaluà la resposta al tractament, la supervivència i la PFS.

3.8 Tractament estadístic de les dades

Les correlacions entre les mutacions d'EGFR, les característiques clíniques dels pacients i les respostes al tractament van ser analitzades pel test de khi-quadrat (χ^2) i pel test exacte de Fisher.

La normalitat de les variables quantitatives es van analitzar per la prova Kolmogorov-Smirnov. L'avaluació de les associacions entre característiques genotípiques i clíniques dels pacients van ser analitzades mitjançant les proves Mann-Whitney-Wilcoxon i Kruskal-Wallis. Totes aquestes dades es van comparar utilitzant la prova de la *t* d'Student.

Les HR dels potencials factors de risc amb els CI del 95% es van calcular pel model de regressió de riscos proporcionals de Cox. Les PFS i les supervivències dels pacients es van estimar pel mètode de Kaplan-Meier i es van comparar per les proves log-rank i Tarone-Ware.

Per identificar variables d'influència rellevants, es va utilitzar un model de regressió logística multivariable i l'ajust del model es va avaluar amb la prova de raó de verosimilitut Hosmer-Lemeshow. La prova de Wald es va utilitzar per avaluar la significació estadística de cada variable.

Totes les anàlisis van ser de dues cues amb un nivell de significació del 5%. Per tant, les $P < 0,05$ es consideren estadísticament significatives. Tots els càlculs estadístics es van realitzar amb el programa SPSS, versió 17.0 i S-Plus, versió 6.1.

4 RESULTATS

*En un moment prens una decisió
que t'obliga a prendre'n una altra i,
en la suma, obtens aquest resultat
(Pep Guardiola)*

4.1 Validació analítica del mètode estàndard: seqüenciació Sanger

El mètode estàndard per analitzar mutacions és la seqüenciació Sanger. Per tant, el primer pas va ser optimitzar les amplificacions per PCR dels limfòcits i de les línies cel·lulars mutades per demostrar que les mutacions eren detectables. A continuació, es van optimitzar les amplificacions per PCR de l'ADN provinent de teixit tumoral inclòs en parafina, incloent mostres amb poca cel·lularitat tumoral, de pacients de CPCNP.

4.1.1 Optimització amb línies cel·lulars mutades

Per optimitzar l'amplificació dels exons 19 i 21 es van provar les temperatures d'*annealing* a 58°C, 60°C, 62°C i 64°C, paral·lelament a dues concentracions de MgCl₂ (l'esquema de treball es troba en la Taula 6). Mitjançant l'electroforesi en un gel d'agarosa (Fig. 30) es va observar que en les amplificacions realitzades a 58°C i 60°C apareixien bandes inespecífiques que desapareixien en augmentar la temperatura a 62°C o 64°C. Respecte a la concentració de MgCl₂, es va comprovar que a 1mM les bandes obtingudes eren més intenses que a 3mM. En els gels següents es poden veure les amplificacions obtingudes a diferents temperatures, a una concentració d'1mM de MgCl₂.

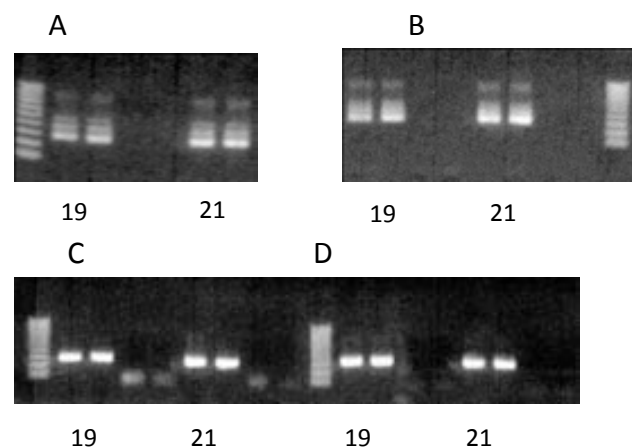


Fig. 30. Resultat de l'amplificació a diferents temperatures visualitzat per electroforesi en gel d'agarosa. Els gels A i B corresponen a l'amplificació de l'exó 19 i 21 (dues bandes per cada exó) a 58°C i 60°C, respectivament. Com es pot observar, apareixen bandes inespecífiques que desapareixen en augmentar la temperatura a 62°C i 64°C dels gels C i D, respectivament. Tots aquests gels corresponen a amplificacions fetes a una concentració de MgCl₂ d'1mM.

4- RESULTATS

Com que no hi havia diferència entre les amplificacions a 62°C o 64°C, es va optar per utilitzar la temperatura d'*annealing* de 62°C i la concentració de MgCl₂ d'1mM com condició òptima de treball.

A continuació, es van provar dos cicles d'amplificació diferents, 35 i 40 repeticions (veure Taula 6). Com que amb 35 cicles s'obtenien bandes amb intensitat similar que amb 40 repeticions, es van considerar 35 cicles com els òptims d'amplificació.

Finalment, es va comparar l'activitat de tres enzims polimerasa: Ecotaq (Ecogen), Platinum® Taq DNA Polymerase (INVITROGEN) i HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN).

Temperatura °C	Concentració MgCl ₂ (mM)	Nº de cicles	Polimerasa	Casa Comercial
62	1	35	Ecotaq	Ecogen
			Platinum®	Invitrogen
			HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen

Taula 16. Polimerases amb les respectives cases comercials que es van provar per optimitzar l'amplificació per PCR. La reacció es va realitzar a 62°C, a una concentració de MgCl₂ d'1mM i 35 cicles.

Es va comprovar que pel tipus de fragment que s'amplificava no hi havia diferència entre els tres enzims. Es va considerar que la Ecotaq polimerasa era apta per amplificar els exons 19 i 21 d'EGFR (Fig. 31).

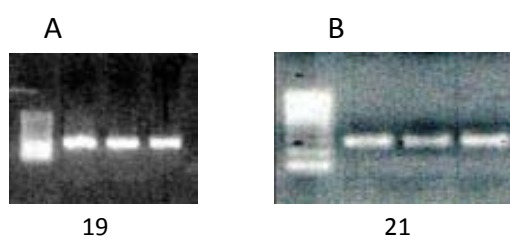
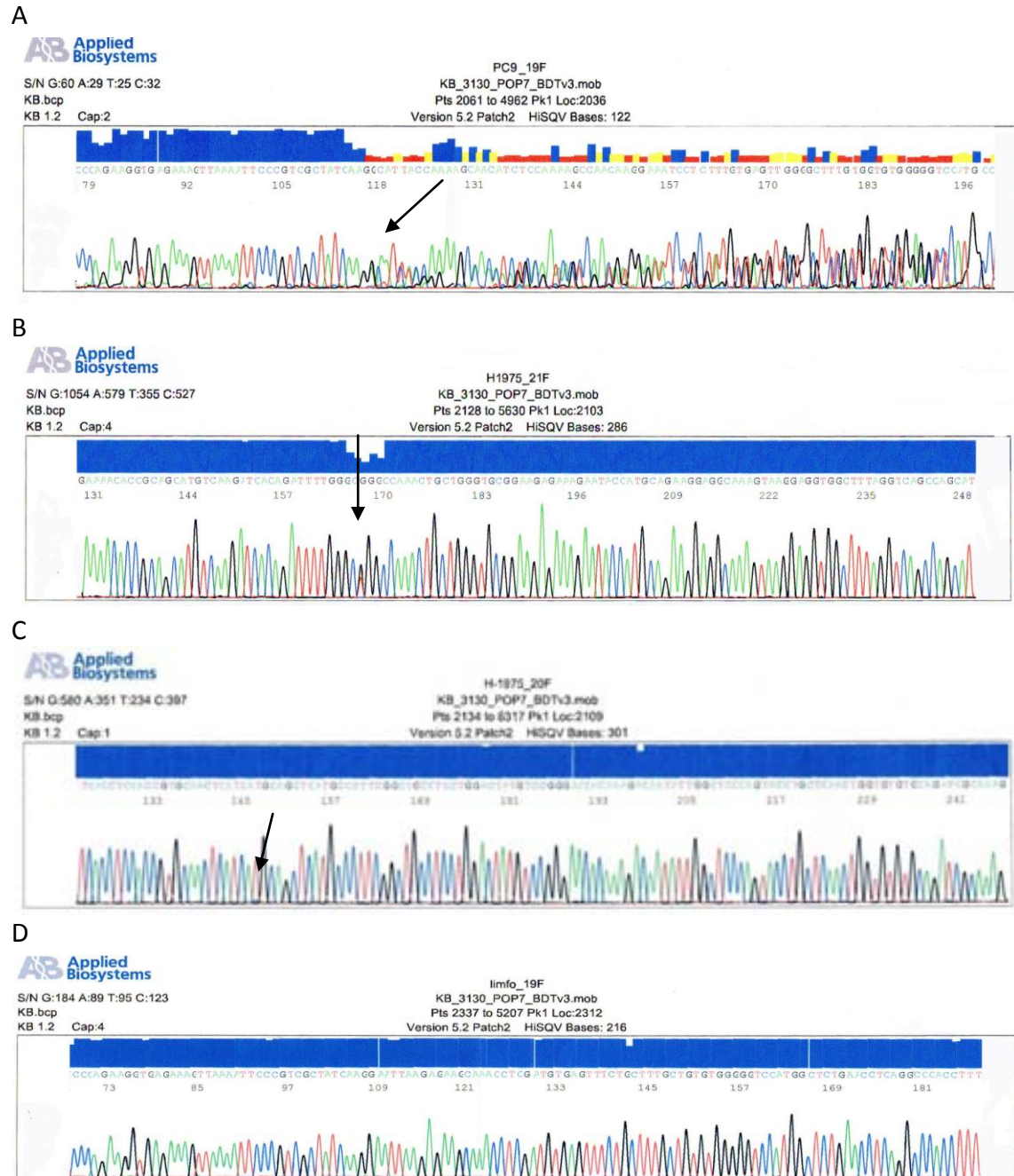


Fig. 31. Visualització de les bandes d'amplificació per electroforesi en gel d'agarosa. En els gels A i B es poden veure les bandes d'amplificació de l'exó 19 i 21, respectivament. Cada banda correspon a l'amplificació amb una polimerasa diferent (Ecotaq, Platinum i HotStart Taq DNA polimerase, respectivament).

Es va seqüenciar l'ADN del limfòcit per comprovar que, tant en sentit *forward* com en sentit *reverse*, la seqüència obtinguda era wt. Un cop revisat aquest punt, es van amplificar les línies cel·lulars PC9, delecionada 15pb de l'exó 19 i la línia cel·lular H1975 mutada L858R de l'exó 21. Les seqüències *forward* i *reverse* van confirmar l'existència de les alteracions corresponents. Un cop optimitzades les condicions de PCR es va analitzar

la mutació T790M de la línia H1975 tant en sentit *forward* com en *reverse*. Un exemple de seqüència wt de l'exó 19 i 21 del limfòcit, de la deleció de l'exó 19 de la línia PC9 i de la mutació L858R l'exó 21 i T790M de la línia H1975 es poden observar en la següent figura:



4- RESULTATS

E

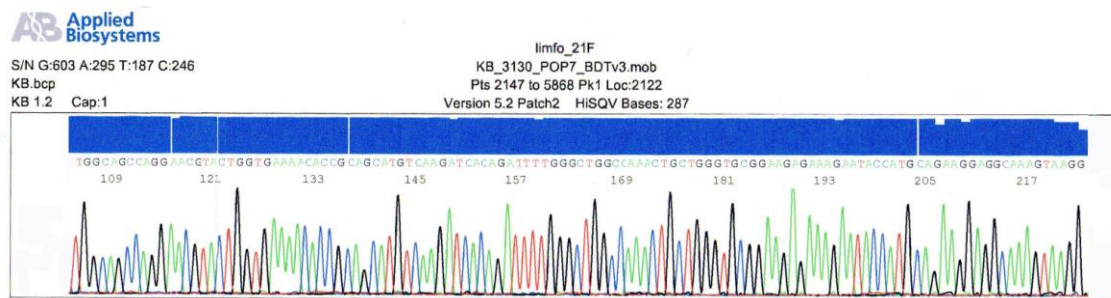


Fig. 32. Exemple de seqüències de l'exó 19, 21 i 20 obtingudes per seqüenciació Sanger. En A s'observa com en la posició 745 de la seqüència (marcat amb una fletxa negra) de la línia PC9 apareix un doble patró de pics que indica l'inici de la deleció. En B s'observa que en la posició 858 (marcat amb una fletxa negra) apareix un doble pic que indica la mutació puntual de la seqüència obtinguda de la línia H1975. La mutació T790M en homozigosi de l'exó 20 de la línia H1975 (C) està marcada amb una fletxa negra. En D i E es poden observar els exons 19 i 21 del limfòcit, on no apareix cap alteració.

La barra blava en la part superior de la seqüència correspon al Quality Value (QV). Aquest paràmetre, que genera el software del programa d'anàlisi de seqüències, indica la veracitat de la base que llegeix l'aparell en cada posició. En el cas de la seqüència de l'exó 19 de la línia PC9 (Fig. 32 A), el QV passa a vermell i groc pel fet que apareix més d'una base en cada posició a partir del punt on comença la deleció, marcat per una fletxa en negre. El mateix s'observa en la seqüència de l'exó 21 de la línia H1975, on el QV disminueix en la posició L858R (Fig. 32 B). En aquest cas, la mutació T790M en homozigosi de la línia H1975 fa que no hi hagi doble pic en aquesta posició (Fig. 32 C) malgrat que l'equip de Kuang descriu que aquesta mutació està present en un 55% dels al·lels d'aquesta línia (KUANG *et al.* 2009).

Exemples de les seqüències obtingudes en sentit *reverse* dels exons 19 i 21 del limfòcit, de la deleció de l'exó 19 de la línia PC9 i de la mutació L858R de l'exó 21 i T790M de la línia H1975 es troben adjuntes en l'annex II (FIG. I).

4.1.2 Optimització amb teixit inclòs en parafina

El bon resultat de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR de les línies cel·lulars va servir de base per analitzar les mostres de teixit tumoral inclòs en parafina de pacients amb CPCNP.

1- Teixit tumoral inclòs en parafina

Com que les condicions òptimes de PCR del limfòcit i de les línies cel·lulars no eren idònies per amplificar l'ADN de teixit inclòs en parafina, més fragmentat i de menys qualitat, es va realitzar una *nested* PCR. Amb aquesta reamplificació s'obtidria suficient

producte amplificat per seqüenciar-lo amb èxit. L'esquema de treball es pot veure en la Taula 7.

Mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa es va comprovar que no hi havia diferència d'intensitat de les bandes d'amplificació realitzant 20 o 25 cicles en la primera PCR amb combinació amb la *nested* PCR de 35 o 40 cicles. Tot i així, les bandes d'amplificació obtingudes a 64°C eren més intenses que a 62°C. No hi havia diferència en els cicles d'amplificació entre exons.

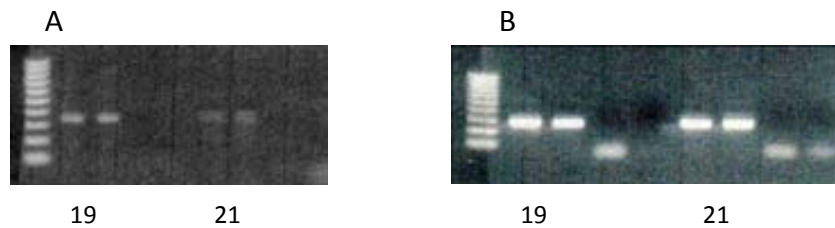


Fig. 33. Visualització de les bandes d'amplificació per electroforesi en gel d'agarosa de les *nested* PCR amb 35 cicles de repetició. La primera amplificació dels exons 19 i 21 es va realitzar utilitzant 20 cicles a 62°C. El gel A correspon a l'amplificació a 62°C en la *nested* PCR. El gel B correspon a l'amplificació a 64°C en la *nested* PCR. Com es pot apreciar en el gels, les bandes d'amplificació més intenses s'obtenen en la combinació de temperatures gel B.

Per tant, les condicions optimitzades d'amplificació es van establir en una primera PCR a 62°C i 20 cicles, seguida d'una *nested* PCR de 35 cicles a 64°C. Les condicions finals es troben adjuntes en l'annex I (instrucció VII).

2- Mostres amb poca cel·lularitat tumoral

Es van modificar les condicions de la primera PCR ja que l'amplificació no era prou eficient per a aquest tipus de mostra. Es va augmentar la concentració de MgCl₂ a 1,5mM i la temperatura d'*annealing* a 64°C. Per una altra banda es van afegir més unitats de polimerasa, es va augmentar la concentració del seu tampó i es van augmentar els cicles d'amplificació. Com en el cas de les mostres anteriors, es va fer una *nested* PCR on es van augmentar els cicles d'amplificació i la temperatura (Taula 8). Es va comprovar, per electroforesi en gel d'agarosa, que els cicles òptims de la *nested* PCR eren 35 per a l'exó 19 i 40 per a l'exó 21. Aquesta diferència entre exons també s'observà en la quantitat d'ADN necessari en la reamplificació: l'exó 21 requeria més quantitat per amplificar-se que l'exó 19.

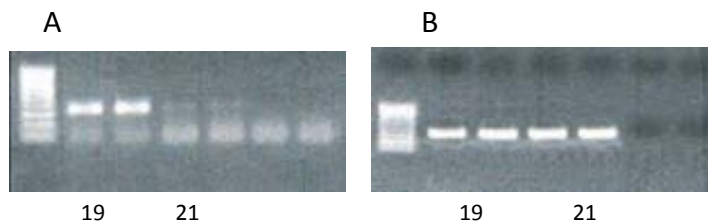


Fig. 34. Bandes d'amplificació de les mostres amb poca cel·lularitat tumoral. En A es demostra que 35 cicles d'amplificació no són suficients per obtenir una banda d'intensitat correcta per seqüenciar l'exó 21. En canvi, en B es pot veure que amb 40 cicles d'amplificació la intensitat de les bandes, per aquest exó, eren adequades.

Per tant, les condicions optimitzades d'amplificació es van establir en una primera PCR a 64°C i 25 cicles, seguida d'una *nested* PCR també a 64°C de 35 cicles per a l'exó 19 i 40 per a l'exó 21. Les condicions finals estan detallades en l'annex I (instrucció VIII).

4.2 Validació clínica de la tècnica de seqüenciació Sanger en mostres de teixit inclòs en parafina

En primer lloc, es van analitzar 67 pacients de CPCNP tractats amb gefitinib després de progressar al tractament previ amb quimioteràpia. Quasi meitat dels pacients eren d'origen asiàtic. En la Taula 17 es troben les seves característiques clínico-patològiques.

El percentatge de pacients mutats va ser del 24%, més freqüentment en pacients de sexe femení ($P=0,003$), d'histologia adenocarcinoma ($P=0,007$) i no fumadors ($P=0,0001$). Respecte a la freqüència de mutació per exons, 12 pacients eren delecionats de 15pb en l'exó 19 (65%) i 4 pacients eren mutats L858R de l'exó 21.

Respecte a les respostes al tractament, el 94% dels pacients amb mutacions d'EGFR presentaven resposta radiogràfica completa o parcial mentre que per als 51 pacients wt només es va poder observar aquest tipus de resposta en el 12% ($P<0,0001$). L'únic pacient amb resposta radiogràfica completa era delecionat de l'exó 19. La probabilitat de resposta al tractament era més elevada en pacients joves, d'origen asiàtic, no fumadors i en aquells pacients que havien rebut més règims de quimioteràpia.

	Mutats	Wild-type	P
Nº pacients	16	51	0,8
Edat (rang)	60 (34-84)	59 (39-86)	
Sexe (%)			0,003
homes	6 (35,3)	39 (76,5)	
dones	10 (62,5)	12 (23,5)	
Histologia (%)			0,007
adenocarcinoma	16 (100)	30 (58,8)	
cèl·lula gran	–	5 (9,8)	
carcinoma escamós	–	11 (21,6)	
altres	–	5 (9,8)	
Tabaquisme (%)			0,0001
fumadors	3 (17,6)	43 (84,3)	
no fumadors	13 (81,2)	8 (15,7)	
Nº línies prèvies (rang)	1 (0-3)	2 (0-6)	0,04
Resposta a gefitinib			<0,0001
resposta completa i parcial	15 (93,8)	6 (11,8)	
estabilització	1 (6,2)	8 (15,7)	
progressió	–	34 (66,7)	
no avaluable	–	3 (5,8)	
Tractament amb gefitinib (mesos)	9,4 (1,1-23,1)	4,2 (0,2-41,9)	0,07

Taula 17. Característiques clínico-patològiques dels 67 pacients de CPCNP respecte a les mutacions del gen EGFR del primer estudi.

En el segon estudi es van analitzar 83 pacients que havien rebut gefitinib com tractament d'ús compassiu després de diverses línies de tractament amb quimioteràpia. Les característiques clínico-patològiques es troben en la Taula 18.

El percentatge de pacients mutats va ser del 12%, més freqüentment en pacients de sexe femení ($P=0,007$), no fumadors ($P=0,01$) i d'histologia adenocarcinoma. Respecte a la freqüència de mutació per exons, 8 pacients eren delecionats de l'exó 19 (80%) (5 pacients de 15pb, 2 pacients de 9pb i 1 pacient de 18pb) i 2 pacients eren mutats L858R de l'exó 21.

Respecte a les respostes al tractament, el 60% dels pacients amb mutacions d'EGFR presentaven resposta radiogràfica objectiva (inclús una resposta completa) mentre que entre els 73 pacients wt només es va poder observar aquest tipus de resposta en el 8,8% ($P=0,001$). La resta de pacients mutats (el 40%) presentaven estabilització de la malaltia, tres dels quals eren delecionats i un era mutat de l'exó 21.

4- RESULTATS

	Mutats n (%)	Wild-type n (%)	P
N pacients	10	73	
Edat (rang)	59 (28-75)	64 (37-84)	0,2
Sexe			0,007
Homes	3 (30)	55 (75,3)	
Dones	7 (70)	18 (24,7)	
Histologia			
Adenocarcinoma	10 (100)	32 (44,4)	
Carcinoma de cèl·lula gran	-	7 (9,7)	
Carcinoma escamós	-	31 (43,1)	
Altres	-	2 (2,8)	
Tabaquisme			0,01
Fumadors	4 (40)	59 (80,8)	
No fumadors	6 (60)	14 (19,2)	
N línies prèvies (rang)	2 (0-2)	2 (0-5)	0,5
Resposta a gefitinib			0,001
Resposta completa i parcial	6 (60)	6 (8,3)	
Malaltia estable	4 (40)	34 (46,5)	
Progressió	-	28 (38,3)	
No avaluable	-	5 (6,9)	
Tractament amb gefitinib, mesos (rang)	8,5 (3,7-22,5)	3,1 (0,4-20,5)	0,00001
Resposta a quimioteràpia prèvia			0,9
Resposta completa i parcial	3 (37,5)	30 (44,1)	
Malaltia estable	4 (50)	27 (39,7)	
Progressió	1 (12,5)	11 (16,2)	
No avaluable	2	5	

Taula 18. Característiques clínico-patològiques dels 83 pacients de CPCNP del segon estudi, respecte a les mutacions del gen EGFR.

4.3 Validació analítica de les tècniques de GeneScan i TaqMan en mostres de teixit inclòs en parafina

Com ja s'ha comentat anteriorment, malgrat que el mètode de seqüenciació Sanger es considera el mètode estàndard per l'estudi de mutacions genètiques, és necessari el desenvolupament de noves tècniques de detecció més sensibles, donat que moltes de les mostres dels pacients de CPCNP tenen poca cel·lularitat tumoral. Aquests nous mètodes no només han de millorar la sensibilitat i el temps d'anàlisi sinó que també han de ser aptes per a la seva aplicació diagnòstica. És per totes aquestes raons que es va optimitzar la tècnica de GeneScan per a l'anàlisi de les delecions de l'exó 19 i de TaqMan per a la mutació L858R de l'exó 21 i T790M de l'exó 20.

4.3.1 Optimització de la tècnica de GeneScan

Per optimitzar la PCR es va utilitzar el limfòcit com control wt i la línia delecionada PC9. Es van combinar dues temperatures d'*annealing* amb dos cicles d'amplificació diferents (Taula 9). Com s'observa en la Fig. 35, l'amplificació era més intensa quan la temperatura d'*annealing* era de 58°C amb 40 cicles de repetició de PCR.



Fig. 35. Imatges de l'electroforesi en gel d'agarosa de les amplificacions realitzades a 58°C i 40 cicles (A) i a 60°C i 40 cicles (B). Com es pot apreciar, amb les primeres condicions s'obtenen bandes d'amplificació més clares que amb les segones on apareixen smears.

Com es pot observar en la Fig. 36, es va obtenir un *plot* amb un sol pic de 119-120pb per a l'ADN de limfòcit, que correspon a la longitud de l'amplicó de PCR sense delecíó (wt). En el cas de la línia delecionada PC9, es va obtenir un *plot* amb dos pics: un d'ells a 119-120pb, que correspon a l'al·lel wt i un altre pic a 104-105pb que correspon a l'al·lel delecionat, en aquest cas, de 15pb (119/120-104/105). Això confirmava que la delecíó de la línia PC9 era heterozigota: si els dos al·lells estiguessin delecionats el resultat obtingut haguera estat d'un sol pic a 104-105pb.

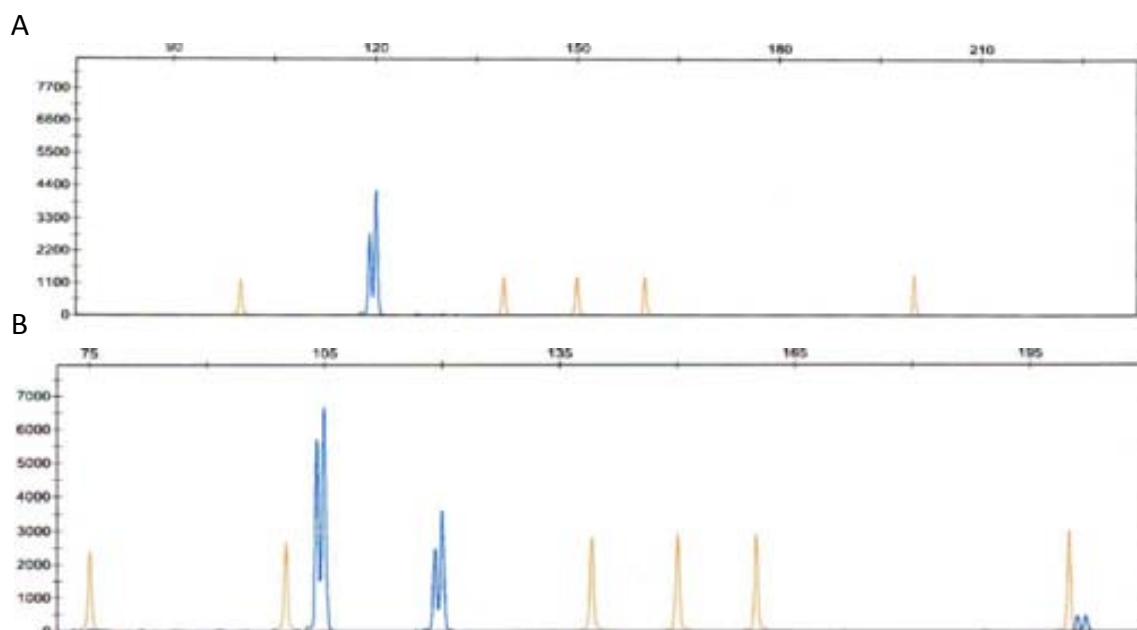


Fig. 36. Exemple dels plots obtinguts en l'anàlisi de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan. El pic obtingut de l'ADN wt a 119-120pb correspon a l'amplificació de l'al·lel wt (A). En el plot B s'observa que el pic a 104-105pb correspon a l'amplificació de l'al·lel delecionat, en aquest cas, de 15pb de la línia cel·lular PC9.

4- RESULTATS

Amb les condicions de PCR optimitzades per al limfòcit i la línia PC9, es van amplificar mostres de teixit inclòs en parafina i mostres amb poca cel·lularitat tumoral, comprovant que, per ambdós tipus de mostra, l'optimització era correcta i no calia reajustar cap dels components de la PCR. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció XII).

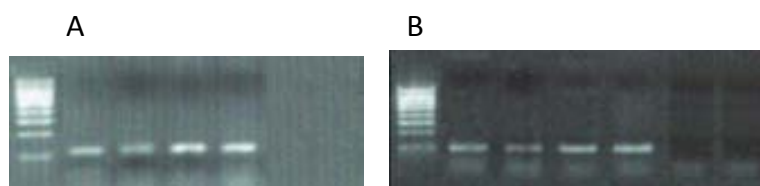


Fig. 37. Exemple de les bandes d'amplificació de la PCR de GeneScan. El gel A correspon a mostres de teixit inclòs en parafina i el gel B a mostres amb poca cel·lularitat tumoral. Com es pot veure, no va ser necessària l'optimització de les condicions de PCR.

4.3.2 Avaluació de la tècnica

4.3.2.1 Límit de detecció

De l'anàlisi de les dilucions seriades en aigua destil·lada de l'ADN de la línia PC9 es van obtenir els resultats següents:

Concentració d'ADN de PC9	Rèpliques	Resultat	% rèpliques amb resultat correcte
0,5 ng/ μ L	20	deleció 15pb	100%
50 pg/ μ L	20	deleció 15pb	100%
5 pg/ μ L	20	deleció 15pb	100%
0,5 pg/ μ L	20	no amplifica	

Taula 19. Resultat de l'anàlisi de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan de les 20 rèpliques de cada dilució de la línia cel·lular delecionada PC9.

Per a concentracions menors a 5pg/ μ l no es va detectar la deleció de 15pb en cap de les 20 rèpliques analitzades. Com que el volum per realitzar les dilucions va ser de 2 μ l d'ADN de la línia PC9, el límit de detecció estaria al voltant del 10pg d'ADN delecionat (un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II, FIG. II).

Els resultats de l'anàlisi de la microdissecció d'un nombre decreixent de cèl·lules de la línia PC9 es poden veure en la taula següent:

Nº de cèl·lules de PC9	Rèpliques	Resultat	% rèpliques amb resultat correcte
40	20	deleció 15pb	100%
20	20	deleció 15pb	100%
8	20	deleció 15pb	100%
4	20	deleció 15pb	100%
1	20	no amplifica	

Taula 20. Resultat de l'anàlisi de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan d'un nombre decreixent de cèl·lules microdisseccionades d'una extensió cel·lular de la línia delecionada PC9.

La deleció es va detectar fins a 4 cèl·lules tumorals microdisseccionades, mínim necessari per detectar les delecions d'EGFR de les mostres amb poca cel·lularitat tumoral (un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II, FIG. III).

4.3.2.2 Titulació de l'ADN delecionat

De l'anàlisi de les dilucions de la línia PC9 en ADN wt es van obtenir els següents resultats:

Factor de dilució de l'ADN delecionat	Resultat
1:10	deleció 15pb
1:100	wt
1:250	wt

Taula 21. Resultat de l'anàlisi per la tècnica de GeneScan de les dilucions de concentració decreixent d'ADN de la línia cel·lular delecionada PC9 diluïda en l'ADN wt del limfòcit.

Es va comprovar que es detectava una còpia d'ADN delecionat respecte a 10 còpies d'ADN wt. Per a proporcions més elevades d'ADN wt respecte a còpies delecionades, aquesta tècnica no va detectar la deleció. Un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II (FIG. IV).

4.3.2.3 Repetibilitat i reproducibilitat

En totes les repeticions que es van realitzar (Taula 22), el patró obtingut de la línia PC9 corresponia al d'una mostra delecionada de 15pb (un pic a 104-105pb i un altre a 119-120pb, al·l els delecionat i wt, respectivament) mentre que el de la línia H1975 corresponia al d'una mostra wt, amb un únic pic a 119-120pb. Un exemple dels resultats obtinguts es troba adjunt en l'annex II (FIG. V).

4- RESULTATS

Mes	Experiment	Resultat línia cel·lular PC9	Resultat línia cel·lular H1975
Febrer	1	del 15 pb	wt
	2	del 15 pb	wt
Març	3	del 15 pb	wt
	4	del 15 pb	wt
	5	del 15 pb	wt
	6	del 15 pb	wt
	7	del 15 pb	wt
	8	del 15 pb	wt
	9	del 15 pb	wt
	10	del 15 pb	wt
Abril	11	del 15 pb	wt
	12	del 15 pb	wt
	13	del 15 pb	wt
	14	del 15 pb	wt
	15	del 15 pb	wt
	16	del 15 pb	wt
	17	del 15 pb	wt
	18	del 15 pb	wt
	19	del 15 pb	wt
	20	del 15 pb	wt
	21	del 15 pb	wt
Maig	22	del 15 pb	wt
	23	del 15 pb	wt
	24	del 15 pb	wt
	25	del 15 pb	wt

Taula 22. Resultat de l'anàlisi de l'exó 19 de la línia PC9 i H1975 per la tècnica de GeneScan, realitzades durant quatre mesos. Es pot comprovar que el resultat de tots els experiments concordava amb l'obtingut per seqüenciació Sanger.

En la Taula 23 s'observa que els resultats obtinguts concordaven tant per a les mostres delecionades com per a les wt, independentment de la persona que realitzava l'anàlisi i de la delecio de la mostra.

Mostra	Resultat 1	Resultat 2
1	del 15pb	del 15pb
2	wt	wt
3	wt	wt
4	wt	wt
5	wt	wt
6	del 15pb	del 15pb
7	wt	wt
8	del 15pb	del 15pb
9	del 15pb	del 15pb
10	del 15pb	del 15pb
11	wt	wt
12	wt	wt
13	del 12pb	del 12pb
14	wt	wt
15	del 15pb	del 15pb
16	wt	wt
17	wt	wt
18	del 18pb	del 18pb
19	wt	wt
20	wt	wt
21	del 24pb	del 24pb
22	wt	wt

Taula 23. Resultats de l'anàlisi de reproducibilitat de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan. Es van analitzar 22 mostres (9 mostres delecionades de diferent longitud i 13 mostres wt) de manera independent per dues persones diferents i es va comparar el resultat obtingut. La columna de resultats 1 i 2 corresponen als resultats obtinguts per la persona 1 i 2, respectivament.

4.3.2.4 Sensibilitat i especificitat

Per avaluar la sensibilitat es van analitzar, per GeneScan i seqüenciació Sanger, 170 teixits inclosos en parafina. Els resultats es poden observar en la següent taula:

		Seqüenciació		
		wt	delecionat	
Genescan	wt	147	0	147
	delecionat	0	23	23
		147	23	170

Taula 24. La concordança entre les dues tècniques de detecció de deleccions de l'exó 19, del total de 170 mostres analitzades, és idèntica, tant pel que fa a les mostres delecionades com per a les mostres wt.

Per seqüenciació Sanger, es va detectar la delecció de l'exó 19 en 23 mostres mentre que les 147 restants van ser wt. A continuació es van analitzar per la tècnica de GeneScan. Com es pot observar en la taula, els resultats obtinguts per ambdues tècniques van

4- RESULTATS

concordar tant per a les mostres delectonades com per a les wt. Per tant, es pot fer el següent càlcul de sensibilitat:

$$\text{sensibilitat} = \frac{23}{23 + 0}$$

s'obté que, la sensibilitat de la tècnica de GeneScan en percentatge, va ser del 100%.

A continuació es va determinar l'especificitat. Partint de la Taula 24, es va realitzar el següent càlcul:

$$\text{especificitat} = \frac{147}{147 + 0}$$

s'obté que, l'especificitat de la tècnica de GeneScan, en percentatge, va ser del 100%.

4.3.2.5 Heterogeneïtat tumoral

Es van obtenir els resultats de la Taula 25 de l'anàlisi de les àrees microdisseccionades de 36 teixits inclosos en parafina. Es pot observar que no hi havia cap diferència entre zones tumorals de la mateixa mostra, demostrant que, per a l'exó 19, no existia heterogeneïtat cel·lular dins el tumor. Alguns exemples de *plots* es troben adjunts en l'annex II (FIG. VI). Paral·lelament es va comprovar que la longitud de la delectió no influïa en la seva detecció.

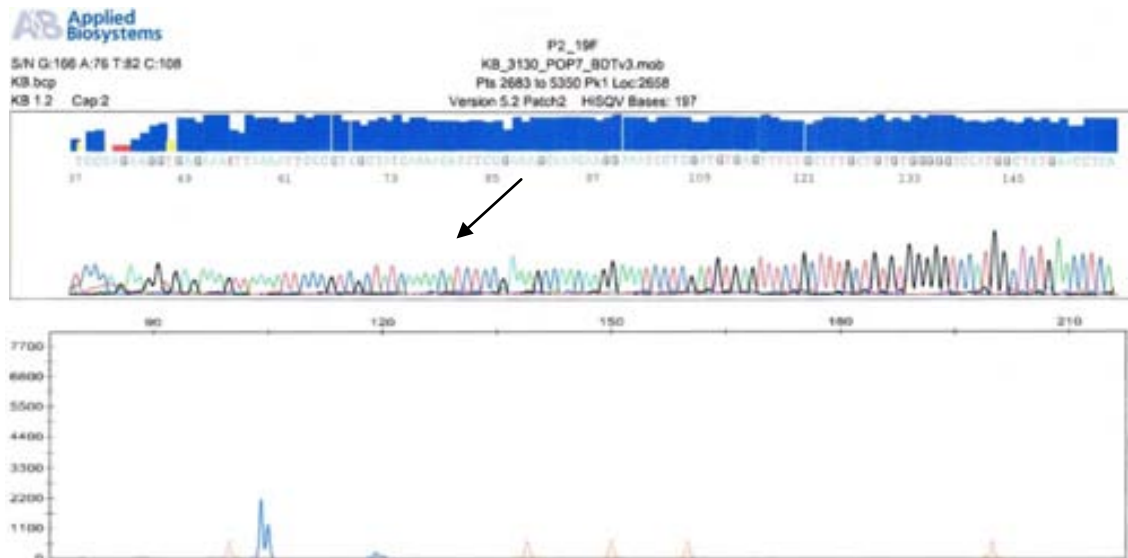
Mostra	Genotip	Grups de cèl·lules tumorals analitzades	Grups de cèl·lules tumorals amb genotip coincident
1	del 15pb	4	4
2	del 15pb	4	4
3	del 15pb	5	5
4	del 15pb	6	6
5	del 24pb	3	3
6	wt	3	3
7	wt	3	3
8	wt	3	3
9	wt	3	3
10	wt	3	3
11	wt	3	3
12	wt	3	3
13	del 18pb	3	3
14	del 15pb	3	3
15	del 18pb	3	3
16	wt	3	3
17	del 15pb	3	3
18	del 18pb	3	3
19	del 15pb	3	3
20	del 15pb	3	3
21	del 15pb	3	3
22	del 15pb	3	3
23	wt	3	3
24	wt	3	3
25	del 15pb	3	3
26	del 15pb	3	3
27	del 24pb	3	3
28	wt	2	2
29	wt	2	2
30	wt	2	2
31	wt	2	2
32	wt	2	2
33	del 15pb	2	2
34	del 15pb	2	2
35	del 15pb	2	2
36	del 15pb	2	2

Taula 25. Resultat de l'anàlisi d'heterogeneïtat tumoral de les delecions de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan. Es van microdisseccionar de 2 a 6 àrees diferents de la mateixa mostra tant de teixits wt com de delecionats de diverses longituds, analitzats prèviament. No es va detectar cap discordança de resultats entre les àrees analitzades.

Un cop que aquesta tècnica es va considerar adequada per detectar les delecions de l'exó 19, es van reanalitzar els pacients delecionats per seqüenciació Sanger dels estudis utilitzats en la validació clínica. En la figura següent es poden veure un parell de *plots* obtinguts amb les corresponents seqüències. Més exemples de la comparació es troben adjunts en l'annex II (FIG. VII).

4- RESULTATS

A



B

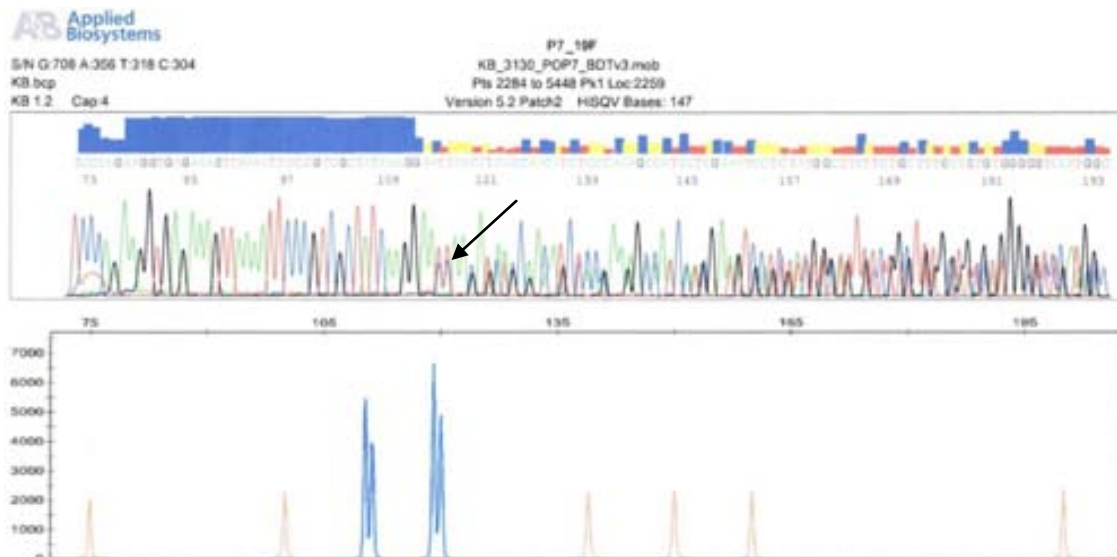


Fig. 38. Exemple dels plots obtinguts de l'anàlisi per GeneScan de dos pacients delecionats per seqüenciació Sanger. Com es pot observar en A, els resultats del pacient 2 per les dues tècniques concorden perfectament ja que, en ambdós casos, es pot apreciar una delecio de 15pb quasi en homozigosi. Igualment, en B es pot observar que el pacient 7 estava delecionat 9pb tant utilitzant la tècnica de seqüenciació Sanger com de GeneScan. L'inici de la delecio està marcat per una fletxa negra.

4.3.3 Optimització de la tècnica TaqMan per analitzar les mutacions L858R i T790M

Per analitzar l'exó 21, es van aplicar les condicions d'amplificació i les proporcions dels reactius que recomana Applied Biosystems. Després de 40 cicles d'amplificació i de que

l'aparell integrés les dades de fluorescència d'inici i final del procés, es va obtenir un *plot* com el que es mostra en la següent figura:

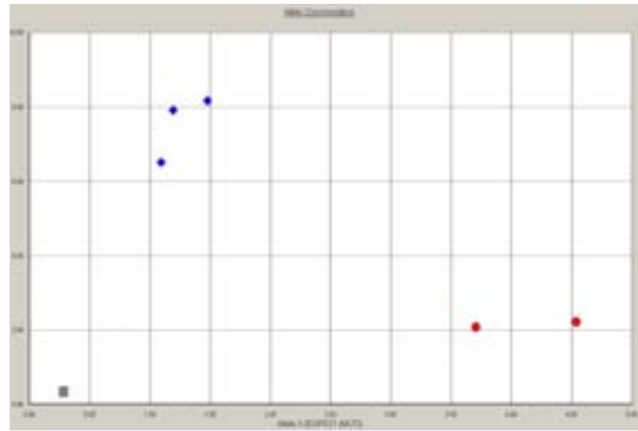


Fig. 39. Exemple de plot obtingut de l'anàlisi de la mutació L858R de l'exó 21 de l'ADN wt de limfòcit i de la línia cel·lular H1975, mutada per aquesta posició. En blau es poden veure tres rèpliques de la línia cel·lular i en vermell els duplicats del limfòcit. El quadrat gris, prop la intersecció dels eixos, el NTC.

Les mostres es van discriminar segons la fluorescència que emetien les sondes que havien hibridat amb l'ADN durant l'amplificació. Així, es pot observar que els triplicats de la línia cel·lular H1975, cercles blaus, s'agrupaven en la zona alta de l'eix de les y (màxima fluorescència de la sonda que detectava l'al·lel mutat) mentre que els duplicats del limfòcit, cercles vermells, s'agrupaven en la zona de màxima fluorescència de l'eix de les x (màxima fluorescència de la sonda que detectava l'al·lel wt). El quadrat en gris prop la intersecció dels eixos era el NTC què no se li havia afegit ADN, i per tant, no emetia fluorescència.

Amb les condicions que descriu Applied Biosystems, es van analitzar les mostres de teixit inclòs en parafina i les de poca cel·lularitat tumoral. Es va comprovar que no calia optimitzar ni els cicles d'amplificació ni la proporció dels reactius.

A continuació, afegint la sonda PNA en la discriminació al·lèlica, es va analitzar l'exó 20 de la línia H1975. En la Fig. 40A es pot apreciar com 40 cicles d'amplificació no eren suficients per a l'òptima discriminació. En canvi, en la Fig. 40B, amb 50 cicles, la discriminació era molt més clara ja que els triplicats de la línia apareixien en la zona d'alta fluorescència emesa per la sonda que detectava l'al·lel mutat (eix de les y) mentre que el limfòcit sense PNA apareixia en la zona de màxima fluorescència de l'eix de les x, corresponent a la sonda wt. Al costat del NTC, prop la intersecció dels eixos, es pot veure com el DNA del limfòcit, en ser wt, era totalment inhibit pel PNA i, per tant, no presentava amplificació.

4- RESULTATS

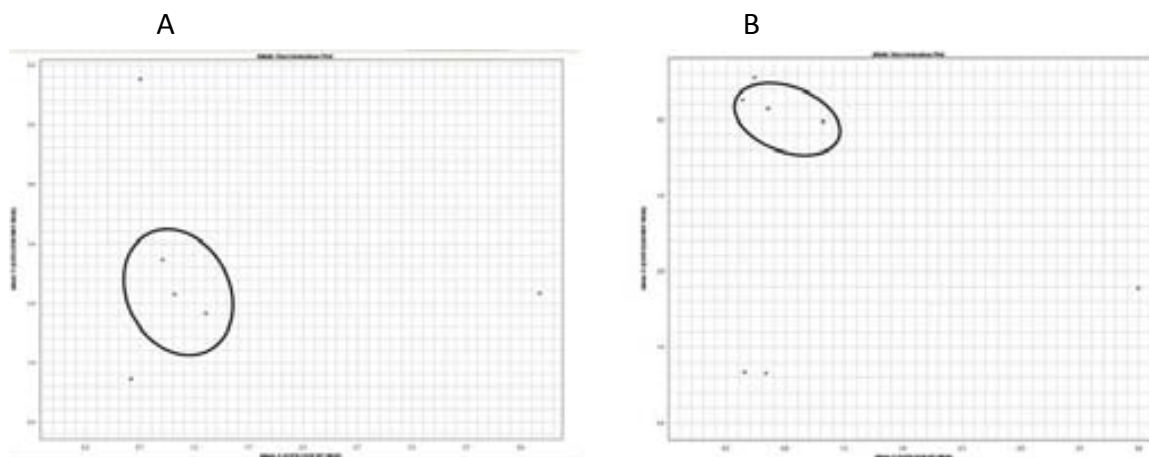


Fig. 40. Exemple de plots obtinguts de la discriminació al·lèlica de la línia cel·lular H1975 afegint la sonda PNA en la reacció. En A es pot veure la discriminació al·lèlica amb 40 cicles d'amplificació mentre que B representa el plot de la reacció TaqMan amb 50 cicles. Les rèpliques de la línia mutada estan encerclades.

4.3.4 Avaluació de la tècnica

4.3.4.1 Límit de detecció

Es van obtenir els resultats següents de l'anàlisi de l'exó 21 de les dilucions seriades en aigua destil·lada de l'ADN de la línia H1975:

Concentració d'ADN de H1975	Rèpliques	Resultat	% rèpliques amb resultat correcte
0,5 ng/ μ L	18	L858R	100%
50 pg/ μ L	18	L858R	100%
5 pg/ μ L	18	L858R	100%
0,5 pg/ μ L	18	no amplifica	

Taula 26. Resultat de l'anàlisi per la tècnica TaqMan de les 18 rèpliques de cada dilució de la línia cel·lular H1975 mutada L858R.

Per a l'exó 20, els resultats van ser els següents:

Concentració d'ADN de H1975	Rèpliques	Resultat	% rèpliques amb resultat correcte
0,5 ng/ μ L	18	T790M	100%
50 pg/ μ L	18	T790M	100%
10 pg/ μ L	18	T790M	100%
5 pg/ μ L	18	T790M	100%
0,5 pg/ μ L	18	no amplifica	

Taula 27. Resultat de l'anàlisi de les dilucions seriades de la línia cel·lular H1975 mutada en la posició T790M per la tècnica TaqMan.

Malgrat haver afegit la sonda PNA en la discriminació al·lèlica de l'exó 20, no es millorava el límit de detecció de 5pg/ μ l assolit per l'exó 21. Com que el volum per fer aquestes dilucions va ser de 2 μ l d'ADN de la línia H1975, el límit de detecció estaria al voltant de 10pg d'ADN mutat per ambdós exons (un exemple dels *plots* obtinguts de l'exó 21 i 20 es troben adjunts en l'annex II, FIG. VIII i IX, respectivament).

Els resultats de l'anàlisi de la microdissecció d'un nombre decreixent de cèl·lules de la línia H1975 es poden veure en la taula següent:

Nº de cèl·lules de H1975	Rèpliques	Resultat	% rèpliques amb resultat correcte
40	18	L858R	100%
20	18	L858R	100%
8	18	L858R	100%
4	18	L858R	100%
1	18	no amplifica	

Taula 28. Resultat de l'anàlisi per TaqMan de la mutació L858R de diferent nombre de cèl·lules microdisseccionades d'una extensió cel·lular de la línia H1975.

La mutació L858R es va detectar fins a 4 cèl·lules tumorals microdisseccionades, mínim necessari per detectar aquesta mutació en mostres amb poca cel·lularitat tumoral (un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II, FIG. X).

4.3.4.2 Titulació de l'ADN mutat

De l'anàlisi de les dilucions de la línia H1975 en ADN wt es van obtenir els següents resultats:

4- RESULTATS

Factor de dilució de l'ADN mutat	Resultat
1:2	mut L858R
1:10	mut L858R
1:100	wt
1:250	wt

Taula 29. Resultat de l'anàlisi per la tècnica TaqMan de les dilucions de concentració decreixent d'ADN de la línia H1975, mutada L858R, diluïda amb l'ADN wt del limfòcit.

Es va comprovar que es detectava una còpia d'ADN mutat respecte a 10 còpies d'ADN wt (les mostres es van discriminar al voltant de la línia cel·lular H1975, més concentrada, que s'utilitzava com control). Per a proporcions més elevades d'ADN wt respecte a còpies mutades, aquesta tècnica no va detectar la mutació (les mostres es van discriminar al voltant del limfòcit wt). Un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II (FIG. XI).

En canvi, l'anàlisi de l'exó 20 va donar els següents resultats:

Factor de dilució de l'ADN mutat	Resultat
1:10	T790M
1:100	T790M
1:1000	T790M
1:5000	T790M
1:10000	no amplifica

Taula 30. Resultat de l'anàlisi per la tècnica TaqMan de les dilucions de concentració decreixent d'ADN de la línia H1975, mutada en la posició T790M diluïda amb ADN wt de limfòcit.

El fet d'afegir la sonda PNA en la discriminació al·lèlica augmentava, considerablement, la capacitat de la tècnica per detectar els al·lèls mutats, detectant una còpia d'ADN mutat respecte a 5.000 còpies de wt. Per a proporcions més elevades d'ADN wt respecte als al·lèls mutats no es va detectar la mutació. Un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II (FIG. XII).

4.3.4.3 Repetibilitat i reproducibilitat

En totes les repeticions que es van realitzar dels exons 21 i 20 (Taula 31 i Taula 32, respectivament), el patró de discriminació al·lèlica de la línia H1975 corresponia al d'una mostra mutada L858R i T790M, respectivament, mentre que els controls wt mostraven el d'una mostra sense mutació. Un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II (FIG. XIII, exó 21 i FIG XIV, exó 20).

Mes	Experiment	Resultat línia cel·lular H1975	Resultat línia cel·lular PC9
Febrer	1	L858R	wt
	2	L858R	wt
Març	3	L858R	wt
	4	L858R	wt
	5	L858R	wt
	6	L858R	wt
	7	L858R	wt
	8	L858R	wt
	9	L858R	wt
	10	L858R	wt
Abril	11	L858R	wt
	12	L858R	wt
	13	L858R	wt
	14	L858R	wt
	15	L858R	wt
	16	L858R	wt
	17	L858R	wt
	18	L858R	wt
	19	L858R	wt
	20	L858R	wt
	21	L858R	wt
Maig	22	L858R	wt
	23	L858R	wt
	24	L858R	wt
	25	L858R	wt

Taula 31. Resultat dels experiments que es van dur a terme al llarg de quatre mesos on es va analitzar l'exó 21 de la línia cel·lular H1975 i PC9 per la tècnica TaqMan, obtenint el mateix resultat.

4- RESULTATS

Mes	Experiment	Resultat de la línia cel·lular H1975	Resultat de l'ADN de limfòcit
Desembre	1	T790M	wt
	2	T790M	wt
Gener	3	T790M	wt
	4	T790M	wt
	5	T790M	wt
	6	T790M	wt
	7	T790M	wt
	8	T790M	wt
	9	T790M	wt
	10	T790M	wt
Febrer	11	T790M	wt
	12	T790M	wt
	13	T790M	wt
	14	T790M	wt
	15	T790M	wt
	16	T790M	wt
	17	T790M	wt
	18	T790M	wt
	19	T790M	wt
	20	T790M	wt

Taula 32. Experiments d'anàlisi de l'exó 20 de la línia H1975 i del limfòcit durant tres mesos, obtenint els mateixos resultats.

Respecte a la reproductibilitat, s'observa que, independentment de l'exó analitzat (20 o 21) com de la persona que realitzi l'assaig, els resultats obtinguts concordaven.

A			B		
Mostra	Resultat 1	Resultat 2	Mostra	Resultat 1	Resultat 2
1	wt	wt	1	T790M	T790M
2	L858R	L858R	2	wt	wt
3	wt	wt	3	T790M	T790M
4	L858R	L858R	4	wt	wt
5	L858R	L858R	5	T790M	T790M
6	wt	wt	6	wt	wt
7	wt	wt	7	T790M	T790M
8	wt	wt	8	T790M	T790M
9	wt	wt	9	T790M	T790M
10	wt	wt	10	wt	wt
11	wt	wt	11	T790M	T790M
12	wt	wt	12	T790M	T790M
13	wt	wt	13	wt	wt
14	wt	wt	14	wt	wt
15	wt	wt	15	T790M	T790M
16	L858R	L858R	16	wt	wt
17	wt	wt	17	wt	wt
18	wt	wt	18	T790M	T790M
19	L858R	L858R	19	wt	wt
20	L858R	L858R	20	wt	wt
21	wt	wt			
22	wt	wt			

Taula 33. Resultat de l'anàlisi de reproductibilitat de la tècnica TaqMan. Es van analitzar 22 mostres (6 mutades L858R i 16 wt) i 20 mostres (10 mutades T790M i 10 wt) per als exons 21 i 20, respectivament, de manera independent per dues persones diferents i es va comparar el resultat obtingut. La columna de resultats 1 i 2 corresponen als resultats obtinguts per la persona 1 i 2 respectivament.

4.3.4.4 Sensibilitat i especificitat

Es van analitzar per TaqMan i seqüenciació Sanger 170 teixits inclosos en parafina. Els resultats es poden observar en la següent taula:

		Seqüenciació		
		wt	mutat	
TaqMan	wt	157	0	157
	mutat	0	13	13
		157	13	170

Taula 34. El resultat de les 170 mostres analitzades concordava, independentment de la tècnica utilitzada, tant pel que fa a les mostres mutades L858R com per a les wt.

Es van detectar 13 mostres mutades L858R de l'exó 21, mentre que les 157 restants van ser wt, per seqüenciació Sanger. A continuació, es va repetir l'anàlisi amb la tècnica TaqMan. Com es pot observar en la Taula 34, hi va haver concordança de resultats per ambdues tècniques tant per a les mostres mutades com per a les wt. Per tant, es pot fer el següent càlcul de sensibilitat:

$$\text{sensibilitat} = \frac{13}{13 + 0}$$

s'obté que la sensibilitat de la tècnica TaqMan, en percentatge, va ser del 100%.

A continuació es va determinar la seva especificitat. Partint de la Taula 34, es va realitzar el següent càlcul:

$$\text{especificitat} = \frac{157}{157 + 0}$$

s'obté que l'especificitat de la tècnica TaqMan, en percentatge, va ser del 100%.

Respecte a l'exó 20, es van comparar els resultats de l'anàlisi de la mutació T790M de 88 mostres, 22 d'elles detectades mutades amb el kit comercial TMDA (APPLIED-BIOSYSTEMS), 50 mostres wt i 16 mostres d'individus sans. Els resultats es poden observar en la següent taula:

4- RESULTATS

		Nº de mostres	Mostres analitzades per TaqMan i PNA	
			Mutats T790M	wt
Resultat de l'anàlisi amb el kit TMDA	controls sans	16	–	16
	wt	50	39	11
	mutats T790M	22	21	1

Taula 35. Comparació dels resultats de l'anàlisi de la mutació T790M per la tècnica TMDA i TaqMan, on se li ha afegit la sonda PNA, en mostres de teixit inclòs en parafina de controls sans i de pacients de CPCNP.

L'anàlisi de les mutacions dels individus sans va concordar al 100% en ser negatiu per qualsevol dels dos mètodes utilitzats. Es va comprovar que el mètode TaqMan amb la sonda PNA detectava força més casos mutats (un augment del 78%) que el kit TMDA. Respecte als pacients wt, el resultat concorda en un 95,5% amb l'obtingut per TaqMan.

Per calcular la sensibilitat de la tècnica TaqMan per detectar la mutació T790M es va aplicar la fórmula proposada pel grup d'Arcila (ARCILA *et al.* 2011), obtenint que:

$$\text{Sensibilitat} = 75\% \text{ casos negatius TMDA} + (25\% \text{ casos positius} \times 0,69)$$

la sensibilitat de la tècnica TaqMan introduïnt la sonda PNA en la discriminació al·lèlica era del 92,95%.

L'especificitat de la tècnica TaqMan per detectar la mutació T790M de l'exó 20 es deriva dels resultats obtinguts de l'anàlisi dels individus sans. Com que no es va detectar cap pacient mutat, es va considerar que l'especificitat era del 100%.

4.3.4.5 Heterogeneïtat tumoral

De l'anàlisi de les àrees microdisseccionades de 36 teixits inclosos en parafina es van obtenir els resultats de la Taula 36. No hi havia cap diferència entre zones tumorals de la mateixa mostra malgrat que una de les zones d'una de les mostres va resultar wt, quan en realitat era mutada. Malgrat aquesta discordança, es pot concloure que, com l'exó 19, per a l'exó 21 no existia heterogeneïtat cel·lular dins el tumor. Un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II (FIG. XV).

Mostra	Genotip	Grups de cèl·lules tumorals analitzades	Grups de cèl·lules tumorals amb genotip coincident
1	L858R	4	4
2	L858R	4	4
3	L858R	6	6
4	L858R	3	3
5	L858R	3	3
6	wt	3	3
7	wt	3	3
8	wt	3	3
9	wt	3	3
10	wt	3	3
11	wt	3	3
12	wt	3	3
13	L858R	3	3
14	L858R	3	3
15	L858R	3	3
16	L858R	3	3
17	L858R	3	3
18	wt	3	3
19	L858R	3	3
20	wt	3	3
21	wt	3	3
22	L858R	3	3
23	L858R	3	3
24	L858R	3	3
25	L858R	3	3
26	wt	2	2
27	wt	2	2
28	wt	2	2
29	wt	2	2
30	wt	2	2
31	L858R	2	1 (1 àrea wt)
32	L858R	2	2
33	L858R	2	2
34	L858R	2	2
35	L858R	2	2
36	L858R	2	2

Taula 36. Resultat de l'anàlisi d'heterogeneïtat tumoral de la mutació L858R de l'exó 21 per la tècnica TaqMan. Es van microdisseccionar de 2 a 6 àrees diferents de la mateixa mostra tant de teixits wt com de mutats.

Contràriament, l'exó 20 va presentar força heterogeneïtat tumoral tal com es pot observar en la Taula 37.

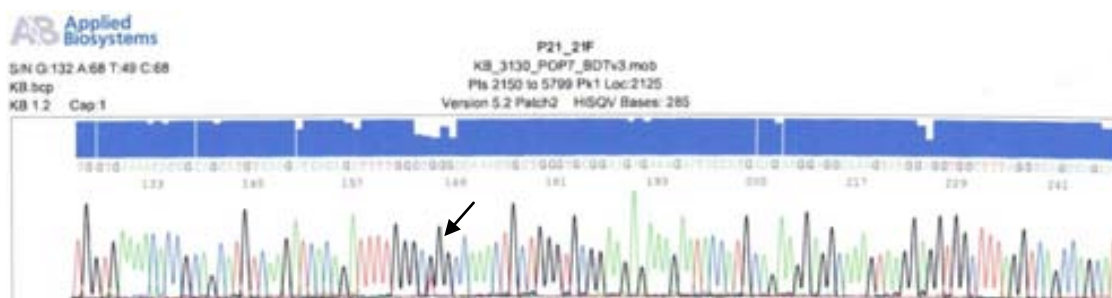
Per a les 11 mostres wt, els resultats de totes les zones microdisseccionades coincidien. En canvi, per a les mostres mutades hi havia heterogeneïtat de resultats: les mutacions es podien detectar des del 40% al 75% de les rèpliques, indicant que hi havia zones tumorals on la mutació T790M estava present en un nombre força elevat de les cèl·lules microdisseccionades mentre que hi havia zones on aquesta mutació era inexistent. Un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II (FIG. XVI).

4- RESULTATS

Mostra	Genotip	Rèpliques analitzades	Nº de rèpliques amb genotip mutat	% rèpliques mutades
1	T790M	4	3	75
2	T790M	4	2	50
3	wt	4	0	0
4	T790M	4	2	50
5	T790M	3	2	66,67
6	wt	3	0	0
7	wt	3	0	0
8	wt	4	0	0
9	T790M	5	3	60
10	wt	3	0	0
11	T790M	4	2	50
12	T790M	5	2	40
13	T790M	4	4	100
14	T790M	4	3	75
15	wt	4	0	0
16	wt	4	0	0
17	wt	4	0	0
18	T790M	4	2	50
19	wt	3	0	0
20	T790M	5	2	40
21	wt	5	0	0
22	T790M	6	4	66,67
23	T790M	3	3	100
24	T790M	4	4	100
25	wt	3	0	0

Taula 37. Resultat de l'anàlisi d'heterogeneïtat tumoral de la mutació T790M de l'exó 20 per la tècnica TaqMan. Es van microdisseccionar de 3 a 6 àrees diferents de la mateixa mostra tant de teixits wt com de mutats.

Un cop que aquesta tècnica es va considerar adequada per detectar la mutació L858R de l'exó 21, es van reanalitzar els pacients mutats per seqüenciació Sanger dels estudis utilitzats en la validació clínica. A continuació, es mostra un *plot* amb la respectiva seqüència. Dos exemples més són en l'annex II (FIG XVII).



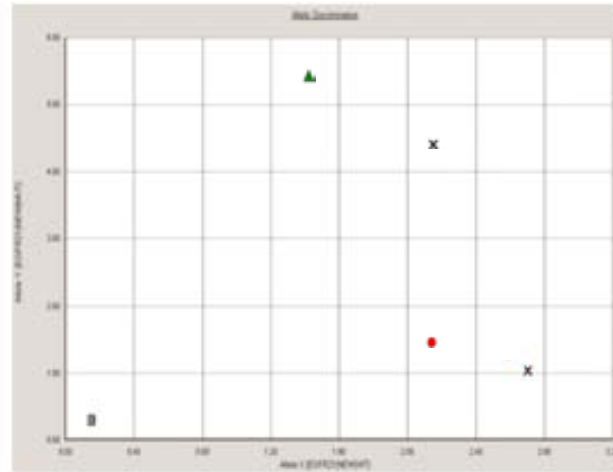


Fig. 41. Exemple dels resultats obtinguts per la tècnica TaqMan de la reanàlisi dels pacients mutats per seqüenciació Sanger. Com es pot veure, el pacient 21 va ser detectat mutats, resultat que corroborava el plot de TaqMan on la mostra apareixia prop la línia H1975 mutada (triangle verd). En la mateixa anàlisi es va afegir un pacient wt que apareixia prop el limfòcit (rodona vermella). En la intersecció dels eixos, el NTC.

4.4 Validació clínica de les tècniques de GeneScan i TaqMan dels pacients inclosos en l'SLADB

Per validar clínicament les tècniques de GeneScan i TaqMan es van analitzar 2105 pacients de CPCNP inclosos en l'SLADB des de l'abril del 2005 fins el novembre del 2008, provinents de 129 centres hospitalaris. En la taula 38 hi ha els resultats obtinguts de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR.

Es van detectar 350 pacients mutats que representaven un 16,6% del total. Malgrat que hi havia un nombre més elevat d'homes i ex fumadors, les mutacions es van trobar més freqüentment en dones (69,7%), no fumadors (66,6%) i amb histologia d'adenocarcinoma (80,9%), amb una significació estadística de $P < 0,001$ per a totes les comparacions. D'aquests 350 pacients mutats, 217 van ser tractats amb erlotinib, les característiques dels quals es troben en la taula 39.

4- RESULTATS

Variable	Total de pacients N=2105	Pacients mutats d'EGFR N=350	Freqüència de les mutacions	
			2105 pacients	350 pacients mutats
	<i>nº de pacients</i>		<i>percentatge (95% CI)</i>	
Sexe				
dona	814	244	30,0 (26,9-33,2)	69,7 (64,7-74,3)
home	1287	106	8,2 (6,8-9,9)	30,3 (25,7-35,3)
sense dada	4	0		
Edat				
<56,7 anys	638	89	13,9 (11,5-16,9)	27,1 (24,9-29,2)
56.7-69,1 anys	638	99	15,5 (12,9-18,6)	30,1 (27,8-32,4)
>69,1 anys	632	141	22,1 (19,1-25,6)	42,8 (40,2-45,5)
sense dada	197	21		
Tabaquisme				
ex-fumador	958	91	9,5 (7,8-11,6)	26,2 (24,2-28,2)
fumador	424	25	5,8 (4,0-8,6)	7,2 (6,5-7,9)
no fumador	612	231	37,7 (34,0-41,7)	66,6 (64,2-68,9)
sense dada	111	3		
Tipus de tumor				
adenocarcinoma	1634	283	17,3 (15,5-19,3)	80,9 (76,4-84,7)
adenocarcinoma broncoalveolar	147	34	23,1 (17,0-30,7)	9,7 (7,0-13,3)
carcinoma de cèl·lula gran	287	33	11,5 (8,3-15,8)	9,4 (6,8-13,0)
sense dada	37	0		

Taula 38. Característiques clínicopatològiques dels 2105 pacients de l'SLADB, segons els resultats de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR.

La característica més rellevant dels pacients mutats requeria en el sexe femení (72,8%) d'origen caucàsic (98,2%). Respecte al tabaquisme, els no fumadors presentaven un percentatge més elevat de mutacions que els ex fumadors o els fumadors actius (68,2%). En relació a l'ECOG PS es va comprovar que les mutacions eren més freqüents en pacients amb PS 1 (59%).

Per exons, les delecions de l'exó 19 es van detectar en 135 pacients (62,2%) mentre que la mutació L858R de l'exó 21 era present en 82 pacients (37,8%). Pràcticament la meitat dels pacients mutats (52,1%) va rebre tractament amb erlotinib en primera línia. Els 104 pacients restants van rebre erlotinib en línies posteriors.

Variable	Valor
Edat en anys	
mitjana	67
rang	22-88
Sexe n ^o (%)	
dona	158 (72,8)
home	59 (27,2)
Origen ètnic n ^o (%)	
africà	3 (1,4)
asiàtic	1 (0,5)
caucàsic	213 (98,2)
Tabaquisme	
exfumador	56 (25,8)
fumador	13 (6,0)
no-fumador	148 (68,2)
ECOG PS n ^o (%)	
0	51 (23,5)
1	128 (59,0)
≥2	38 (17,5)
Tipus de tumor n ^o (%)	
adenocarcinoma	176 (81,1)
adenocarcinoma broncoalveolar	22 (10,1)
carcinoma de cèl·lula gran	19 (8,8)
Estadiatge del tumor n ^o (%)	
IIIB	12 (5,5)
IV	205 (94,5)
Tractament amb Erlotinib	
1era línia	113 (52,1)
2ona o 3era línia	104 (47,9)
Mutació del gen EGFR	
deleció de l'exó 19	135 (62,2)
L858R	82 (37,8)
Resposta al tractament	
resposta completa	24 (12,2)
resposta parcial	115 (58,4)
Resposta completa o parcial	139 (70,6)
estabilització	38 (19,3)
progressió	20 (10,2)
estabilització o progressió	58 (29,4)

Taula 39. Característiques clínico-patològiques dels 217 pacients mutats d'EGFR, tractats amb erlotinib.

Es van avaluar les respostes al tractament amb erlotinib de 197 pacients dels 217 tractats. Com s'observa en la Taula 39, el 58,4% dels pacients va assolir una resposta parcial tot i que 24 pacients van aconseguir una resposta completa (12,2%). Respecte a les mutacions d'EGFR, es va observar una millor resposta associada a les deleccions de l'exó 19 (P=0,001) que no pas a la mutació de l'exó 21.

4- RESULTATS

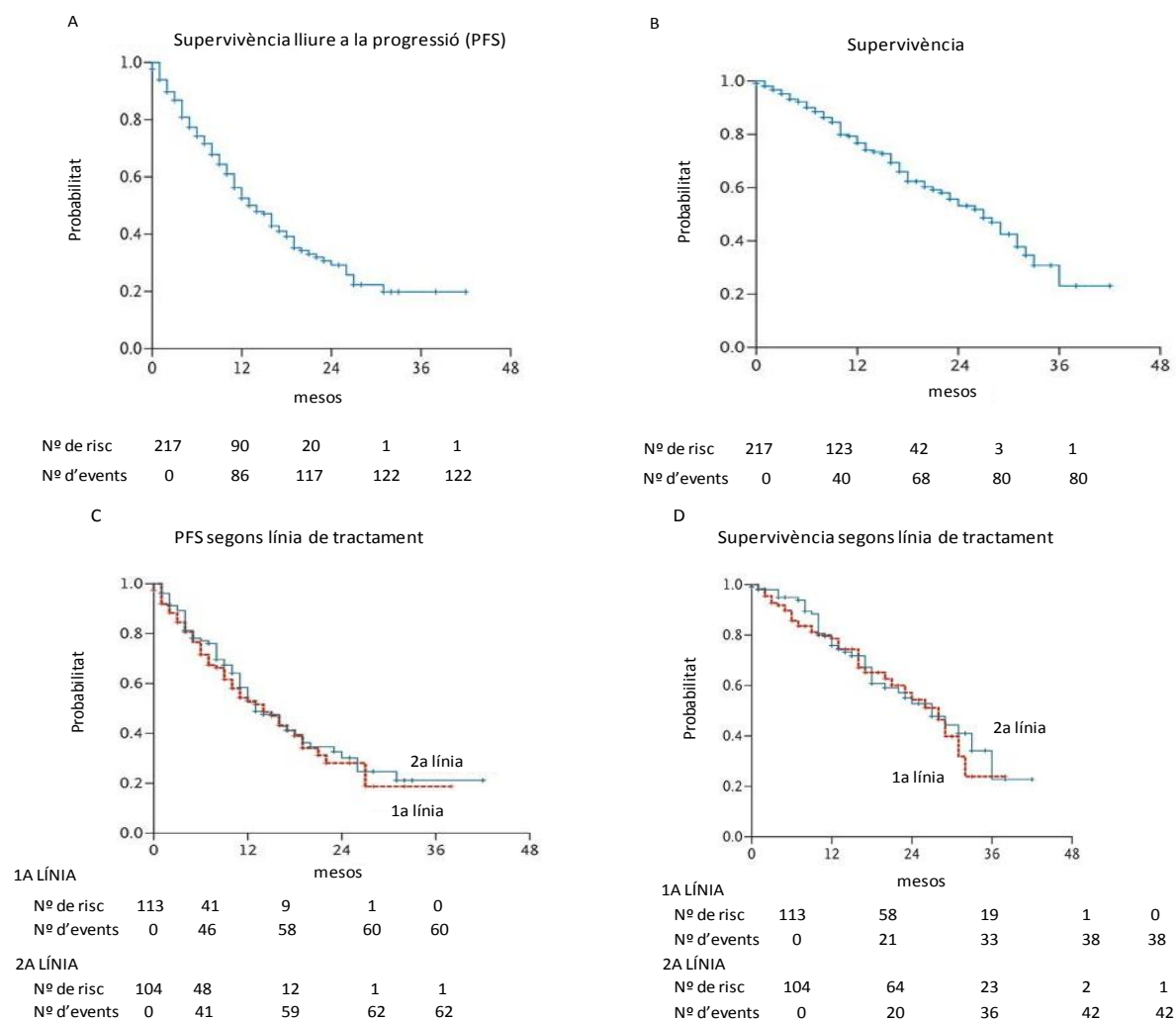


Fig. 42. Les corbes de Kaplan-Meier A i B representen l'avaluació de la PFS i la supervivència, respectivament, dels 217 pacients mutats tractats amb erlotinib. Les corbes C i D representen l'avaluació de la PFS i la supervivència respecte a la línia de tractament amb erlotinib.

La durada de les respostes al tractament amb erlotinib va ser similar entre els pacients tractats en primera línia (14 mesos; 95% CI, 9,7 a 18,3 mesos) i els que van rebre erlotinib en segona línia (13 mesos; 95% CI, 9,7 a 16,3 mesos) (Fig. 42C).

La mitjana de seguiment d'aquests pacients va ser de 14 mesos, amb un rang de 1 a 42 mesos, amb una PFS de 14 mesos (95% CI, 11,3 a 16,7 mesos) (Fig. 42A).

La mitjana de supervivència va ser de 27 mesos (95% CI, 22,7 a 31,3 mesos) (Fig. 42B). Tant per als pacients tractats en primera línia amb erlotinib com els tractats en segona línia, la mitjana de supervivència va ser similar (28 mesos per als de primera línia (95% CI, 22,7 a 33 mesos), 27 mesos per als de segona línia (95% CI, 19,9 a 34,1 mesos; P=0,67) (Fig. 42D). Els pacients amb millor ECOG PS assolien una millor supervivència. Així, els de PS 0 encara no havien assolit la mitjana de supervivència, mentre que per als

PS 1 i PS 2 era de 32 mesos (95% CI, 11,3 a 52,7 mesos) i 23 mesos (95% CI, 19,7 a 23,3 mesos), respectivament, $P=0,03$.

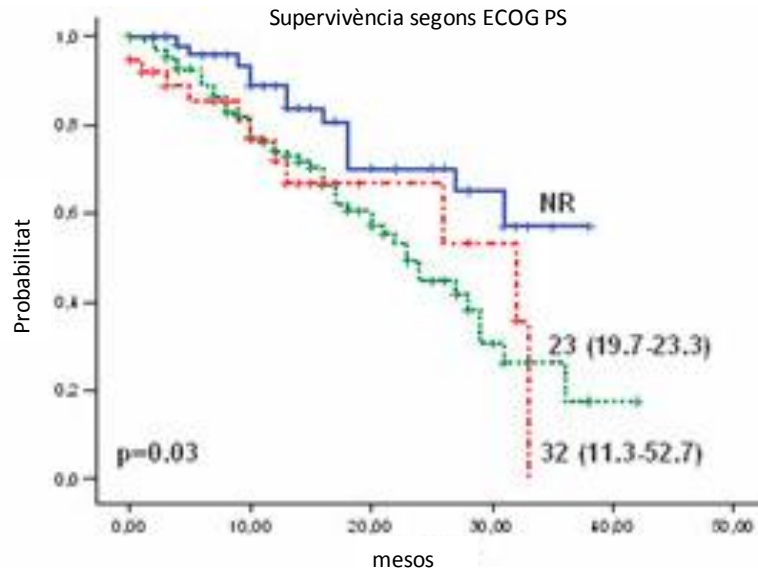


Fig. 43 Corba de Kaplan-Meier de la supervivència segons l'ECOG PS. Els pacients amb PS 0 (en blau) no havien assolit la mitjana mentre que per als PS 1 (en vermell) i PS 2 (en verd) la supervivència era de 32 i 23 mesos, respectivament.

Analitzant la mitjana de supervivència segons la resposta al tractament (Fig. 44), es va observar que els pacients amb resposta completa no havien assolit la mitjana, i la supervivència als tres anys es situava en el 58,7%. Per als pacients amb respostes parcials, la mitjana se situava als 28 mesos (95% CI, 21,7 a 34,3 mesos) amb una supervivència als tres anys del 32,5%. Malauradament, malgrat que la mitjana de supervivència en el grup de pacients amb estabilització de la malaltia va ser de 18 mesos (95% CI, 10,6 a 25,4 mesos) la supervivència als tres anys desapareix (0%). Pels pacients amb progressió la mitjana de supervivència va ser de 9 mesos (95% CI, 6,6 a 11,4 mesos) ($P < 0,001$).

4- RESULTATS

Supervivència global segons resposta al tractament

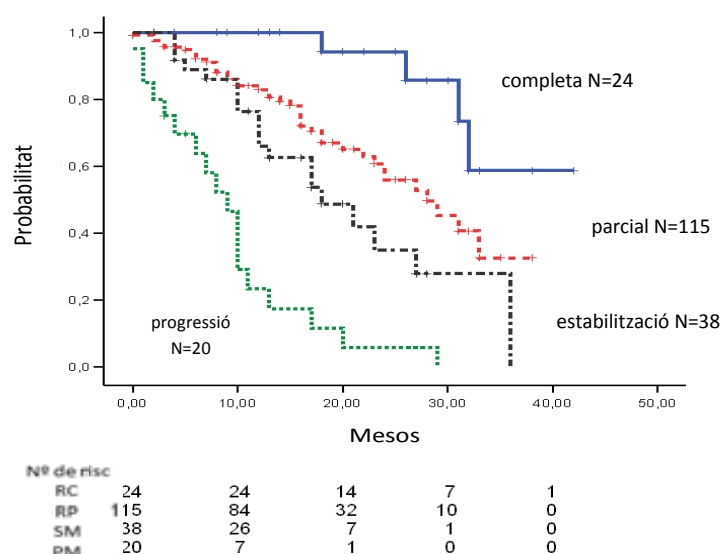


Fig. 44. Corba de Kaplan-Meier de la supervivència segons les respostes al tractament. La mitjana de supervivència encara no s'havia assolit per als pacients que havien respost al tractament (línia blava, RC). Aquesta supervivència passava a ser de 9 mesos per als que progressaven (línia verda, PM). Línia vermella: pacients amb resposta parcial (RP); línia negra, pacients amb estabilització de la malaltia (SM).

La mitjana de la PFS va ser de 14 mesos (95% CI, 11,3 a 16,7 mesos). Segons el sexe (Fig. 45), les dones van assolir una millor PFS (16 mesos; 95% CI, 12,7 a 19,2) i supervivència (29 mesos; 95% CI, 24,9 a 33,1) que els homes (PFS de 9 mesos; 95% CI, 6,1 a 11,9 mesos i supervivència de 18 mesos; 95% CI, 14,5 a 21,5 mesos); $P=0,003$ i $P=0,05$, respectivament.

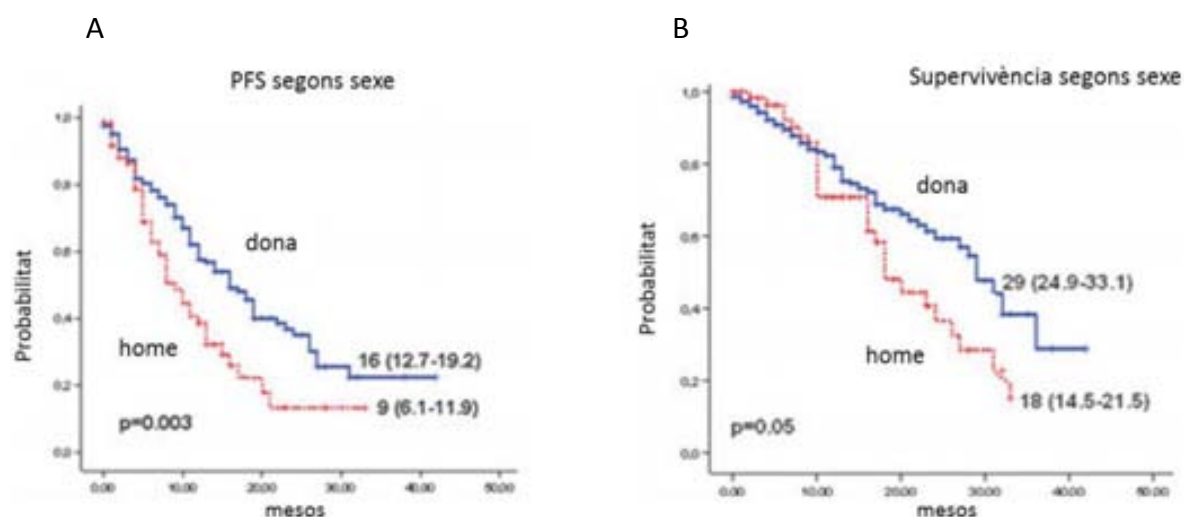


Fig. 45. Corbes de Kaplan-Meier corresponents a l'avaluació de la PFS (A) i la supervivència (B) segons el sexe. Com es pot observar, tant per a la PFS com per a la supervivència, les dones van assolir valors superiors que els homes. En ambdós casos la diferència és significativa.

Es va analitzar la PFS agrupant els pacients segons la resposta al tractament (Fig. 46). Es va comprovar que no s'havia assolit pels pacients amb resposta completa mentre que per als pacients amb resposta parcial o estabilització de la malaltia era de 15 mesos (95% CI, 12,2 a 17,8 mesos) i 9 mesos (95% CI, 5,9 a 12,1 mesos), respectivament. Malauradament, la PFS va ser de només 2 mesos (95% CI, 0 a 4,2 mesos) ($P < 0,001$) per als pacients sense resposta.

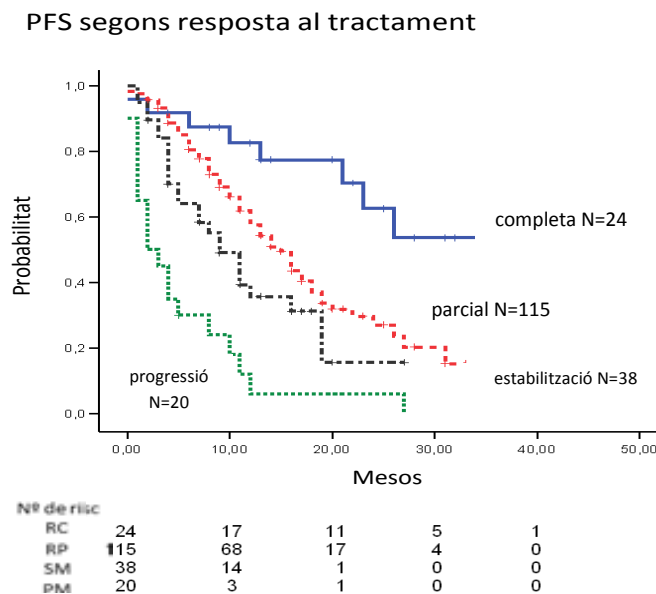


Fig. 46. Corba de Kaplan-Meier de la PFS segons la resposta al tractament. Com es pot observar, mentre que per al grup de pacients amb resposta completa (línia blava, RC) la PFS no s'havia assolit, va minvant fins als 2 mesos per als pacients amb progressió (línia verda, PM). Línia vermella: pacients amb resposta parcial (RP); línia negra: pacients amb estabilització de la malaltia (SM).

4.5 Validació analítica de les tècniques de GeneScan i TaqMan en mostres de sang perifèrica

4.5.1 Optimització de la tècnica de GeneScan

Amb les condicions òptimes d'amplificació de l'ADN de teixit inclòs en parafina es van analitzar cinc mostres d'ADN circulant d'individus sans. Com que les bandes obtingudes no eren massa intenses en visualitzar-les en un gel d'agarosa, es va realitzar una *nested* PCR amb 30 cicles de reamplificació. Mentre que la línia cel·lular PC9 mostrava el patró corresponent a una mostra delecionada de 15pb, les mostres d'individus sans oferien el corresponent al d'una mostra wt. En la següent figura hi ha un exemple dels resultats obtinguts:

4- RESULTATS

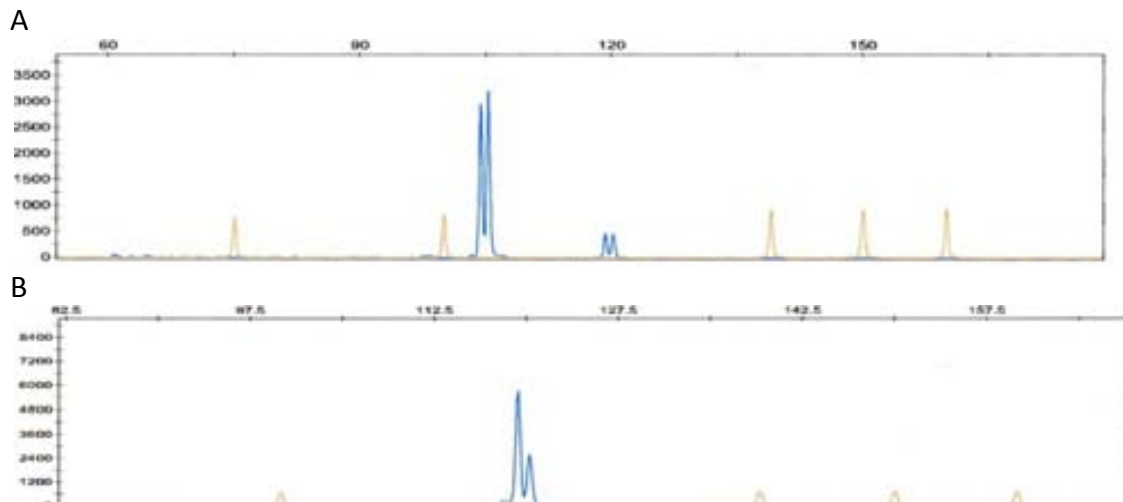


Fig. 47. Exemple dels plots obtinguts per la tècnica de GeneScan de l'anàlisi de l'exó 19 de la línia delecionada PC9 (A) on es pot observar la delecció de 15pb (pics a 104-105pb i 119-120pb). En B, l'ADN circulant de l'individu sa només presenta el pic a 119-120pb que correspon a l'al·lel wt.

A continuació es va extreure l'ADN de la sang perifèrica de pacients que se'ls havia detectat la delecció en teixit inclòs en parafina i es va amplificar afegint la sonda PNA a la reacció. Malgrat que la concentració de PNA era elevada, no es va poder prescindir de la *nested* PCR. Les combinacions de concentració de la sonda PNA utilitzades es troben en la Taula 11. La Fig. 48 mostra un exemple de les bandes d'amplificació. La millor combinació de concentracions de PNA corresponia a la que utilitzava 5mM en la primera PCR i 3mM o 4mM en la *nested*. Es va optar per 3mM en la *nested* PCR ja que no existien diferències entre l'ús d'una o altra concentració.

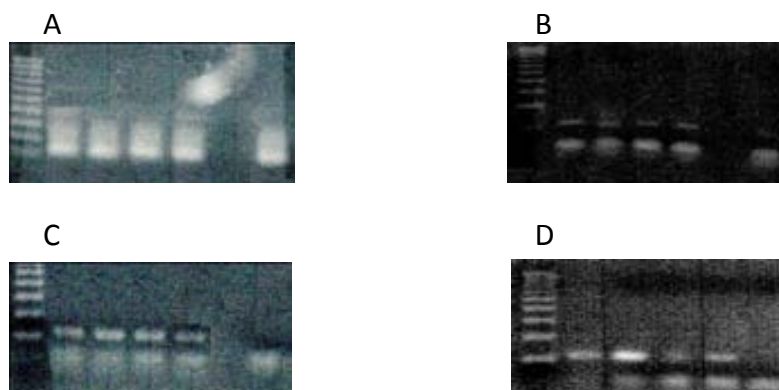


Fig. 48. Exemple de les bandes d'amplificació d'ADN de sang perifèrica en l'anàlisi de les delecions de l'exó 19 utilitzant diferents combinacions de concentracions de sonda PNA. En A es pot veure l'electroforesi del producte de l'amplificació utilitzant 2mM de PNA en la primera PCR i de 3mM en la *nested*. En B, es pot observar les mateixes mostres amplificades utilitzant 3mM en la primera PCR i 3mM en la *nested*. Les imatges C i D corresponen a una primera amplificació utilitzant 5mM de PNA en la primera PCR i 3mM i 4mM en la segona, respectivament.

Es van analitzar en l'equip 3130 Genetic Analyzer (APPLIED-BIOSYSTEMS) obtenint els resultats següents:

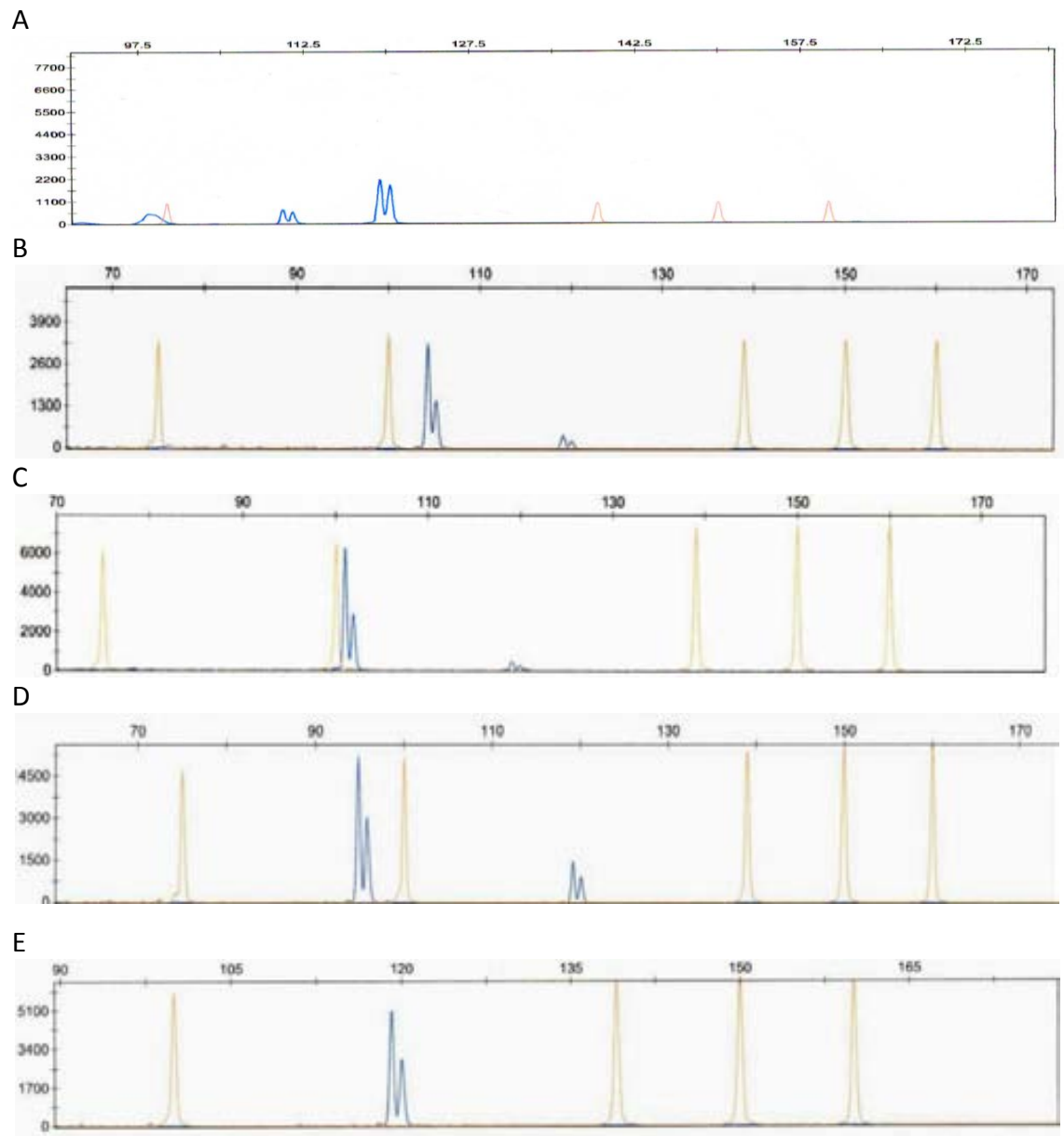


Fig. 49. Exemple dels plots obtinguts de l'anàlisi per la tècnica de GeneScan de l'ADN de sang perifèrica de pacients que ja havien estat detectats delecionats. Es va comprovar que aquesta tècnica permetia identificar diversos tipus de delecions (9pb (A), 15pb (B), 18pb (C) i 24pb (D)). En E es pot observar un plot de GeneScan d'un control wt.

Les condicions òptimes per amplificar l'ADN circulant de sang perifèrica es van basar en afegir la sonda PNA a una concentració de 5mM en una primera PCR de 40 cicles i una *nested* de 30 cicles, a una concentració de 3mM. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció XVII).

4.5.2 Avaluació de la tècnica

4.5.2.1 Límit de detecció

De l'anàlisi de les dilucions seriades en aigua destil·lada de l'ADN de la línia PC9 es van obtenir els resultats següents:

Concentració d'ADN de PC9	Rèpliques	Resultat	% rèpliques amb resultat correcte
0,5 ng/ μ L	10	deleció 15bp	100%
50 pg/ μ L	10	deleció 15bp	100%
5 pg/ μ L	10	deleció 15bp	100%
1 pg/ μ L	10	no amplifica	

Taula 40. Resultat de l'anàlisi de les dilucions de l'exó 19 de la línia cel·lular delecionada PC9 per la tècnica de GeneScan.

Malgrat haver afegit la sonda PNA en la PCR, no es detectava la deleció de 15pb en cap de les 10 rèpliques de concentració inferior a 5pg/ μ L. Com que el volum per realitzar aquestes dilucions va ser de 2 μ L d'ADN de la línia PC9, el límit de detecció estaria al voltant del 10pg d'ADN delecionat (un exemple dels *p/ots* obtinguts és en l'annex II) (FIG. XVIII).

4.5.2.2 Titulació de l'ADN delecionat

De l'anàlisi de les dilucions de la línia PC9 en ADN wt es van obtenir els següents resultats:

Factor de dilució de l'ADN delecionat	Resultat
1:10	deleció 15pb
1:100	deleció 15pb
1:1000	deleció 15pb
1:5000	deleció 15pb
1:10000	no amplifica

Taula 41. Resultat de l'anàlisi per la tècnica de GeneScan de les dilucions de concentració decreixent d'ADN de la línia delecionada PC9 diluïda en ADN wt de limfòcit.

Es va comprovar que es detectava una còpia d'ADN delecionat respecte a 5.000 còpies d'ADN wt. Per a proporcions més elevades d'ADN wt respecte a còpies delecionades, aquesta tècnica no detectava la deleció. Un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II (FIG. XIX).

4.5.2.3 Repetibilitat i reproducibilitat

En totes les repeticions que es van realitzar (Taula 42), el patró obtingut de la línia PC9 corresponia al d'una mostra delecionada de 15pb (un pic a 104-105pb i un altre a 119-120pb, al·lels delecionat i wt, respectivament) mentre que el de la línia H1975 corresponia al d'una mostra wt amb un únic pic a 119-120pb. Un exemple dels resultats obtinguts es troba adjunt en l'annex II (FIG. XX).

Mes	Experiment	Resultat línia cel·lular PC9	Resultat línia cel·lular H1975
Octubre	1	del 15 pb	wt
	2	del 15 pb	wt
Novembre	3	del 15 pb	wt
	4	del 15 pb	wt
	5	del 15 pb	wt
	6	del 15 pb	wt
	7	del 15 pb	wt
	8	del 15 pb	wt
	9	del 15 pb	wt
	10	del 15 pb	wt
Desembre	11	del 15 pb	wt
	12	del 15 pb	wt
	13	del 15 pb	wt
	14	del 15 pb	wt
	15	del 15 pb	wt
	16	del 15 pb	wt
	17	del 15 pb	wt
	18	del 15 pb	wt
	19	del 15 pb	wt
	20	del 15 pb	wt

Taula 42. Resultat de l'anàlisi de l'exó 19 de les línies PC9 i H1975 per la tècnica de GeneScan realitzades durant tres mesos.

En la Taula 43 s'observa que els resultats obtinguts concordaven tant per a les mostres delecionades com per a les nou mostres wt, independentment de la persona que realitzava l'anàlisi i de la deleció de la mostra.

4- RESULTATS

Mostra	Resultat 1	Resultat 2
1	wt	wt
2	9pb	9pb
3	15pb	15pb
4	wt	wt
5	15pb	15pb
6	15pb	15pb
7	18pb	18pb
8	wt	wt
9	wt	wt
10	wt	wt
11	15pb	15pb
12	9pb	9pb
13	wt	wt
14	wt	wt
15	wt	wt
16	wt	wt
17	15pb	15pb
18	18pb	18pb
19	15pb	15pb
20	wt	wt
21	9pb	9pb
22	15pb	15pb
23	15pb	15pb
24	wt	wt
25	15pb	15pb

Taula 43. Resultat de l'anàlisi de 25 mostres de sang perifèrica realitzada per dues persones diferents, per la tècnica de GeneScan. Totes les mostres delecionades (14 mostres amb diferents tipus de delecio) van ser detectades delecionades. El resultat 1 i 2 correspon a la persona 1 i 2, respectivament.

4.5.2.4 Sensibilitat i especificitat

En l'avaluació de la sensibilitat de la tècnica es van obtenir aquests resultats:

		Mostres d'ADN de sang perifèrica		
		Nº de mostres	delecionades exó 19	wt
Resultat de l'anàlisi d'ADN de teixit inclòs en parafina	controls sans	16	0	16
	wt	49	1	48
	delecionats	33	21	12

Taula 44. Resultats de l'anàlisi de les delecions de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan en mostres d'ADN de sang perifèrica de pacients ja analitzats en teixit inclòs en parafina.

L'anàlisi de les delecions dels individus sans va ser negatiu, tant en sang perifèrica com en teixit inclòs en parafina. Respecte als pacients detectats wt en teixit, es va detectar

una mostra delecionada (2%). Finalment, es van detectar 21 delecionades de les 33 mostres d'ADN circulant de pacients delecionats. A partir d'aquests resultats es va calcular la sensibilitat:

$$\text{sensibilitat} = \frac{21}{21 + 12}$$

s'obté que la sensibilitat de la tècnica de GeneScan per detectar les delecions de l'ADN circulant de sang perifèrica, en percentatge, va ser del 64%.

A continuació, es va determinar la seva especificitat. Partint de la Taula 41 es va realitzar el següent càlcul:

$$\text{especificitat} = \frac{(16 + 48)}{(16 + 48) + 1}$$

s'obté que l'especificitat de la tècnica de GeneScan per detectar les delecions de l'ADN circulant de sang perifèrica, en percentatge, va ser del 98,5%.

4.5.3 Optimització de la tècnica TaqMan

Es van utilitzar cinc mostres d'ADN circulant d'individus sans i es van analitzar per la tècnica TaqMan modificant tant els cicles d'amplificació com el temps d'elongació per afavorir la discriminació de les mostres. Els *plots* de la Fig. 50 representen la discriminació al·lèlica realitzada amb 90 segons d'elongació. No s'afegí la sonda PNA.

En A es pot veure que amb 40 cicles d'amplificació no era suficient per a que les mostres es discriminessin clarament. En canvi, amb 50 cicles (Fig. 50B), les mostres dels individus sans s'agrupaven al voltant del limfòcit, en la zona de màxima fluorescència de l'eix de les x que correspon a l'emesa per la sonda que s'uneix a l'al·lel wt. El control H1975, en ambdós casos, apareixia en la zona d'alta fluorescència de l'eix de les y que correspon a l'emesa per la sonda que s'uneix a l'al·lel mutat.

4- RESULTATS

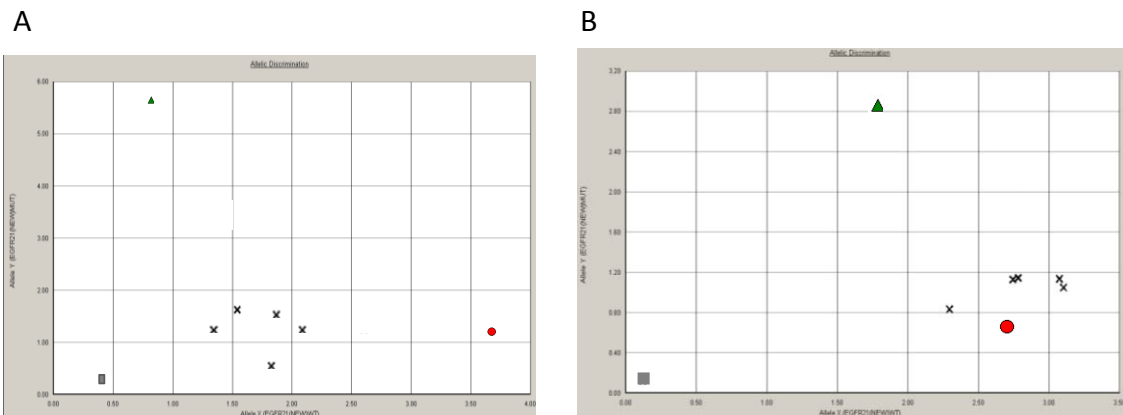


Fig. 50. Exemple d'un dels plots obtinguts de l'anàlisi per la tècnica TaqMan de la mutació L858R de l'exó 21 en mostres d'ADN circulant de sang perifèrica d'individus sans. En A, amb 40 cicles d'amplificació i en B amb 50 cicles. La línia mutada H1975 (triangle verd) actua com control mutat i el limfòcit (cercle vermell) actua com control wt. En la intersecció dels eixos, en forma de quadrat gris, el NTC.

Un cop comprovat que l'aplicació d'aquesta tècnica, en aquest tipus de mostra era adequada, es van analitzar els ADN de la sang perifèrica de tres pacients que s'havien detectat mutats L858R en el teixit inclòs en parafina. Per tal d'inhibir l'ADN wt i poder detectar la mutació, es van provar diferents concentracions de la sonda PNA. El resultat obtingut es pot veure en la següent figura:

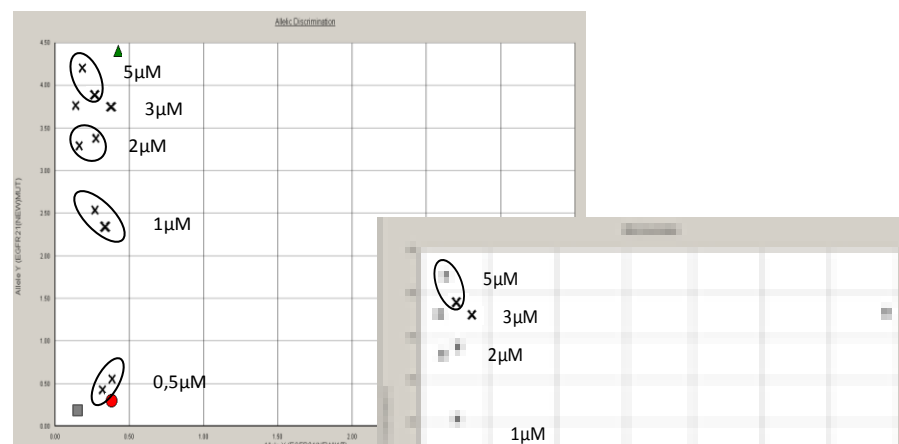


Fig. 51. Exemple de plot obtingut afegint la sonda PNA a la reacció de discriminació al·lèlica. Per duplicat, es van provar diferents concentracions de sonda (0,5μM; 1μM; 2μM; 3μM i 5μM) per inhibir l'ADN wt i poder detectar la mutació L858R. El triangle verd representa la línia cel·lular H1975 sense que se li hagi afegit en la reacció la sonda PNA que funciona com control positiu de mutació. El cercle vermell representa el limfòcit que funciona com control wt amb PNA mentre que la creu representa el limfòcit sense sonda. El quadrat gris és el NTC.

A mida que s'augmentava la concentració de la sonda PNA la discriminació de l'al·lel mutat era més clara. Com que la diferència de discriminació entre la concentració de la

sonda PNA a 3 μ M i 5 μ M era mínima, es va decidir que s'utilitzaria 3 μ M com concentració de treball. La instrucció de treball es troba adjunta en l'annex I (instrucció XVIII). Els *plots* dels altres dos pacients es poden veure adjunts en l'annex II (FIG. XXI).

4.5.4 Avaluació de la tècnica

4.5.4.1 Límit de detecció de la tècnica

Es van obtenir els resultats següents de l'anàlisi de l'exó 21 de les dilucions seriades en aigua destil·lada de l'ADN de la línia H1975:

Concentració d'ADN de H1975	Rèpliques	Resultat	% rèpliques amb resultat correcte
0,5 ng/ μ L	10	L858R	100%
50 pg/ μ L	10	L858R	100%
5 pg/ μ L	10	L858R	100%
1 pg/ μ L	10	no amplifica	

Taula 45. Resultat de l'anàlisi per la tècnica TaqMan de les 10 rèpliques de cada dilució de la línia H1975 mutada L858R

Malgrat haver afegit la sonda PNA en la discriminació al·lèlica, no es detectava la mutació L858R per a concentracions inferiors a 5pg/ μ L, en cap de les 10 rèpliques analitzades. Com que el volum per fer aquestes dilucions va ser de 2 μ L d'ADN de la línia H1975, el límit de detecció estaria al voltant del 10pg d'ADN mutat (un exemple dels *plots* obtinguts es troba adjunt en l'annex II, FIG. XXII).

4.5.4.2 Titulació de l'ADN mutat

De l'anàlisi de les dilucions de la línia H1975 en ADN wt es van obtenir els següents resultats:

Factor de dilució de l'ADN mutat	Resultat
1:10	L858R
1:100	L858R
1:1000	L858R
1:5000	L858R
1:10000	no amplifica

Taula 46. Resultat de l'anàlisi de les dilucions de concentració decreixent d'ADN de la línia cel·lular H1975 mutada L858R diluïda en l'ADN wt de limfòcit.

4- RESULTATS

Es va comprovar que es detectava una còpia d'ADN mutat respecte a 5.000 còpies de wt. Per a proporcions més elevades d'ADN wt respecte a còpies mutades no es detectava la mutació L858R. Un exemple dels *plots* obtinguts és en l'annex II (FIG. XXIII).

4.5.4.3 Repetibilitat i reproducibilitat

En totes les repeticions que es van realitzar, el patró de discriminació al·lèlica de la línia H1975 corresponia al d'una mostra mutada L858R, mentre que el de la línia PC9 corresponia al d'una mostra wt. Un exemple dels *plots* obtinguts és en l'annex II (FIG. XXIV).

Mes	Experiment	Resultat línia cel·lular H1975	Resultat línia cel·lular PC9
Octubre	1	L858R	wt
	2	L858R	wt
Novembre	3	L858R	wt
	4	L858R	wt
	5	L858R	wt
	6	L858R	wt
	7	L858R	wt
	8	L858R	wt
	9	L858R	wt
	10	L858R	wt
Desembre	11	L858R	wt
	12	L858R	wt
	13	L858R	wt
	14	L858R	wt
	15	L858R	wt
	16	L858R	wt
	17	L858R	wt
	18	L858R	wt
	19	L858R	wt
	20	L858R	wt

Taula 47. Resultat de l'anàlisi de l'exó 21 de la línia H1975 i PC9 realitzat durant tres mesos.

Respecte a la reproductibilitat, independentment de la persona que realitzés l'anàlisi, els resultats obtinguts, tant de les mostres mutades com les wt, concordaven.

Mostra	Resultat 1	Resultat 2
1	wt	wt
2	L858R	L858R
3	L858R	L858R
4	wt	wt
5	L858R	L858R
6	L858R	L858R
7	L858R	L858R
8	wt	wt
9	wt	wt
10	wt	wt
11	L858R	L858R
12	L858R	L858R
13	wt	wt
14	wt	wt
15	wt	wt
16	wt	wt
17	L858R	L858R
18	L858R	L858R
19	L858R	L858R
20	wt	wt
21	L858R	L858R
22	L858R	L858R
23	L858R	L858R
24	wt	wt
25	L858R	L858R

Taula 48. Anàlisi de l'ADN de la sang perifèrica de 14 pacients mutats, prèviament analitzats en teixit inclòs en parafina. Els resultats, tant de les mostres mutades com wt, es mantenen, independentment de la persona que realitzava l'assaig.

4.5.4.4 Sensibilitat i especificitat

En l'avaluació de la sensibilitat de la tècnica es van obtenir aquests resultats:

		Mostres d'ADN de sang perifèrica		
		Nº de mostres	Mutats L858R	wt
Resultat de l'anàlisi d'ADN de teixit inclòs en parafina	controls sans	16	0	16
	wt	49	1	48
	mutats L858R	17	9	8

Taula 49. Resultats de l'anàlisi de la mutació L858R de l'exó 21 en mostres d'ADN de sang perifèrica de pacients ja analitzats en teixit inclòs en parafina.

4- RESULTATS

L'anàlisi de les mutacions dels individus sans va ser, igual que en teixit inclòs en parafina, negatiu per a la mutació L858R. Respecte als pacients detectats wt en teixit, es va detectar una mostra mutada (2%). Finalment, es van detectar 9 casos mutats de l'anàlisi de les 17 mostres d'ADN circulant de pacients mutats L858R. A partir d'aquests resultats es va calcular la sensibilitat:

$$\text{sensibilitat} = \frac{9}{9 + 8}$$

s'obté que la sensibilitat de la tècnica TaqMan per detectar la mutació L858R de l'ADN circulant de sang perifèrica, en percentatge, va ser del 53%.

A continuació s'avaluà l'especificitat. Partint de la Taula 46, es va realitzar el següent càlcul:

$$\text{especificitat} = \frac{(16 + 48)}{(16 + 48) + 1}$$

s'obté que l'especificitat de la tècnica TaqMan per detectar la mutació L858R de l'ADN circulant de sang perifèrica, en percentatge, va ser del 98,5%.

4.6 Validació clínica de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR de l'ADN circulant de sang perifèrica dels pacients inclosos en l'SLADB

Es van analitzar les mutacions d'EGFR de la sang perifèrica extreta abans del tractament amb erlotinib, dels pacients mutats en teixit inclòs en parafina inclosos en l'SLADB. Els resultats es poden observar en la Taula 50.

Es van detectar mutacions en 97 pacients (59,1%), dels quals 64 eren delecionats de l'exó 19 (65,9%) i 33 eren mutats L858R de l'exó 21 (34%). La detecció de les mutacions en sang perifèrica va ser més freqüent en dones (76,3%), pacients no fumadors (67%) i amb histologia d'adenocarcinoma (81,4%) malgrat que no s'assolís significació estadística. Els pacients no fumadors presentaven un percentatge més elevat de mutacions que els ex fumadors o els fumadors actius (67% respecte 33%) malgrat no s'assolís significació estadística. En relació a l'ECOG PS, les mutacions eren més freqüents en pacients amb PS 1.

Es va avaluar la relació entre la detecció de les mutacions en sang perifèrica i la resposta al tractament. Les mutacions detectades en els pacients amb resposta o estabilització de la malaltia representaven el 66% del total: un 62% dels pacients amb respostes parcials i un 50% dels pacients amb respostes completes. Dels pacients que van progressar, el 66% eren mutats.

Mutacions de l'ADN circulant de la sang perifèrica			
	Detectades N=97	No detectades N=67	P
Edat	68 (30-88)	72 (22-86)	0,34
Sexe			0,28
home (%)	23 (23,7)	21 (31,3)	
dona (%)	74 (76,3)	46 (68,7)	
Tabaquisme			0,56
ex fumador (%)	24 (24,7)	15 (22,4)	
fumador (%)	8 (8,2)	3 (4,5)	
no fumador (%)	65 (67,0)	49 (73,1)	
ECOG			0,02
0 (%)	15 (16)	19 (28,4)	
1 (%)	58 (61,7)	43 (64,2)	
≥2 (%)	21 (22,3)	5 (7,5)	
Histologia			0,64
adenocarcinoma (%)	79 (81,4)	53 (79,1)	
adenocarcinoma broncoalveolar (%)	8 (8,2)	9 (13,4)	
no definit (%)	9 (9,3)	4 (6)	
altres (%)	1 (1)	1 (1,5)	
Resposta			0,68
completa (%)	9 (9,8)	9 (14,3)	
parcial (%)	57 (62)	35 (55,6)	
completa + parcial (%)	66 (71,7)	44 (69,8)	
estabilització (%)	18 (19,6)	15 (23,8)	
progressió (%)	8 (8,7)	4 (6,3)	
sense dades	5	4	

Taula 50. Característiques clínico-patològiques dels 164 pacients inclosos en l'SLADB que es va analitzar l'ADN de la sang perifèrica abans de començar el tractament. Aquests pacients eren mutats en l'anàlisi del teixit inclòs en parafina.

Quan s'analitzà la supervivència, es va comprovar que no hi havia diferència significativa entre detectar o no les mutacions en sang perifèrica (31 mesos enfront 28 mesos; P=0,21), malgrat que els pacients que se'ls havien detectat les mutacions presentaven una lleugera menor supervivència que els pacients que no se'ls havia detectat. Per exons, els pacients delecionats tenien una major supervivència que els mutats L858R, arribant a la significació estadística (Fig. 52).

4- RESULTATS

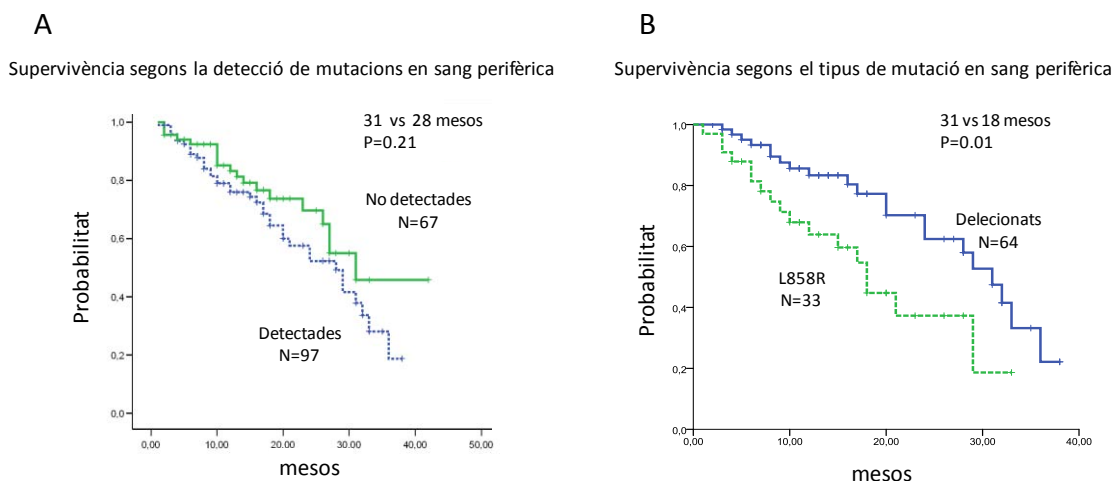


Fig. 52. Corba de Kaplan-Meier d'avaluació de la supervivència dels 164 pacients mutats que es va analitzar EGFR en sang perifèrica. En A, la supervivència dels pacients amb mutacions en l'ADN circulant era menor que la dels pacients que no se'ls havien detectat. En B, els pacients delecionats assolien una millor supervivència que els mutats L858R de l'exó 21 (31 mesos enfront 18; $P=0,01$).

En l'avaluació de la PFS, es va comprovar que els pacients sense mutació en sang perifèrica va ser de 19 mesos respecte als 12 mesos dels que se'ls havia detectat alguna mutació (HR 1,63; 95% CI, 1,05 a 2,55; $P=0,03$), (Fig. 53A). Per exons, els delecionats assolien una millor PFS que els mutats L858R (13 mesos respecte a 11 mesos, respectivament; HR 0,55; 95% CI, 0,36 a 0,85; $P=0,008$). Segons el sexe, les dones tenien una millor PFS que els homes (HR 2,39; 95% CI, 0,39 a 0,93; $P=0,001$).

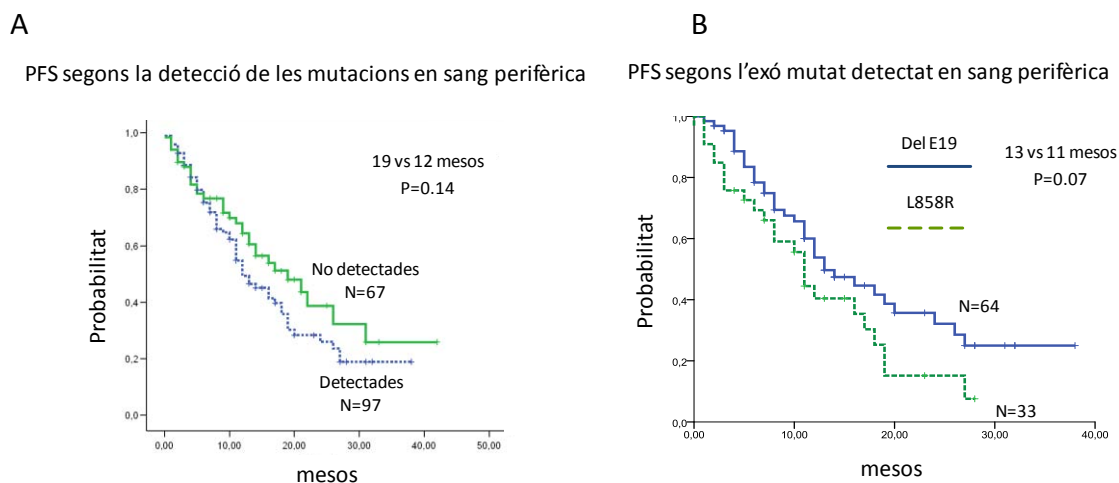


Fig. 53. Corba de Kaplan-Meier d'avaluació de la PFS dels 164 pacients mutats que s'analitzà la sang perifèrica. En A, la PFS dels pacients amb mutacions en l'ADN circulant era menor que la dels pacients que no se'ls havien detectat (12 mesos enfront 19 mesos). En B, la PFS era millor per als pacients delecionats que per als mutats L858R de l'exó 21.

4.7 Assaig EURTAC

4.7.1 Anàlisi de les mutacions per les tècniques de GeneScan i TaqMan

Basant-se en la informació obtinguda de l'anàlisi de les mutacions dels pacients de l'SLADB, el Grupo Español de Cáncer de Pulmón va impulsar l'assaig EURTAC on els pacients avançats mutats d'EGFR es van aleatoritzar per rebre quimioteràpia convencional o erlotinib en primera línia. En el reclutament van participar 42 hospitals de França, Itàlia i Espanya. Es van analitzar 1227 pacients des del febrer del 2007 fins al gener del 2011 dels quals 173 eren mutats. La Taula 51 mostra les seves característiques clínicopatològiques. Tret de dos pacients, la resta són d'origen caucàsic.

	Tractament	
	erlotinib N=86	quimioteràpia estàndard N=87
Sexe, dona	58 (67%)	68 (78%)
Edat en anys		
mitjana (DS)	63-44 (10-95)	64-15 (9-3)
mediana (rang)	65 (24-82)	65 (29-82)
Tabaquisme		
no fumador	57 (66%)	63 (72%)
ex fumador	22 (26%)	12 (14%)
fumador	7 (8%)	12 (14%)
ECOG estat funcional		
0	27 (31%)	30 (34%)
1	47 (55%)	45 (52%)
2	12 (14%)	12 (14%)
Histologia		
adenocarcinoma	82 (95%)	78 (90%)
adenocarcinoma broncoalveolar	0	2 (2%)
carcinoma de cèl·lula gran	3 (3%)	1 (1%)
carcinoma escamós	1 (1%)	0
altres	0	6 (7%)
Estadi		
N3 (no candidat a radio toràcica)	1 (1%)	0
IIIA	1 (1%)	0
IIIB (basament pleural maligne)	6 (7%)	5 (6%)
IV	78 (91%)	82 (94%)
Tipus de mutació del gen EGFR		
deleció de l'exó19	57 (66%)	58 (67%)
mutació L858R de l'exó 21	29 (34%)	29 (33%)

Taula 51. Característiques clínicopatològiques dels 173 pacients mutats de l'estudi EURTAC. En aquesta taula estan representades les característiques dels pacients de sexe femení. L'apartat "altres" en les histologies es refereix a 4 carcinomes indiferenciats, 1 carcinoma pleomòrfic i un carcinoma adenoescatós.

4- RESULTATS

Com es pot observar, el percentatge de dones va ser una mica superior al d'homes i l'adenocarcinoma va ser la histologia predominant, tant en el grup de pacients que va rebre erlotinib com el que va ser tractat amb quimioteràpia estàndard (95% i 90%, respectivament).

Segons l'estadiatge de la malaltia, predomina l'estadi IV, representat pel 91% dels pacients tractats amb ITQ i pel 94% dels tractats amb quimioteràpia convencional. Els pacients no fumadors són també predominants en les dues branques de tractament (66% i 72%, respectivament).

La mitjana de seguiment dels pacients fins el gener del 2013 va ser de 40,7 mesos (de 10,7 a 29,0 mesos) per al grup tractat amb erlotinib i de 35,5 mesos (de 7,1 a 24,8 mesos) per al grup tractat amb quimioteràpia. La mitjana de duració del tractament amb ITQ va ser superior a la del tractament amb quimioteràpia estàndard (8,2 mesos; rang 0,3 a 32,9 mesos; IQR 3,1 a 12,0 mesos per al grup tractat amb erlotinib; 2,8 mesos, rang 0,7 a 5,1; IQR 1,0 a 2,6 mesos per al grup tractat amb quimioteràpia).

A continuació, es van analitzar les respostes al tractament comparant erlotinib amb quimioteràpia convencional. En la taula següent, es poden observar els resultats obtinguts:

Respostes	Erlotinib n=86 (%)	Quimioteràpia n=87 (%)	valor de p
resposta completa	2 (2,3)	0	<0,0001
resposta parcial	48 (55,8)	13 (14,9)	
estabilització de la malaltia	18 (20,9)	11 (12,6)	
progressió	6 (7,0)	11 (12,6)	
resposta no avaluada	12 (14,0)	19 (21,8)	

Taula 52. Respostes al tractament (erlotinib o quimioteràpia estàndard) obtinguts dels 173 pacients mutats.

Els pacients tractats amb erlotinib tenien una millor resposta ja sigui completa (2,3%) com parcial (55,8%) respecte als pacients que havien rebut quimioteràpia, amb una significació estadística de $p < 0,0001$, al mateix temps que s'assolien més estabilitzacions. Per una altra banda, es podien observar més progressions en el grup de malalts tractats amb quimioteràpia.

En avaluar la supervivència (Fig. 54), es va comprovar que no hi havia diferència significativa entre les dues branques de tractament, assolint-se els 22,9 mesos (95% CI, 17,0 a 28,3 mesos) per als pacients tractats amb erlotinib i els 22,1 mesos (95% CI, 16,5 a 28,4 mesos) per als pacients tractats amb quimioteràpia (HR 1,04; 95% CI, 0,65 a 1,68;

P=0,87). Així doncs, al gener del 2011, un 44% dels pacients tractats amb erlotinib havien mort mentre que aquesta xifra va ser del 36% pels pacients que havien rebut quimioteràpia estàndard.

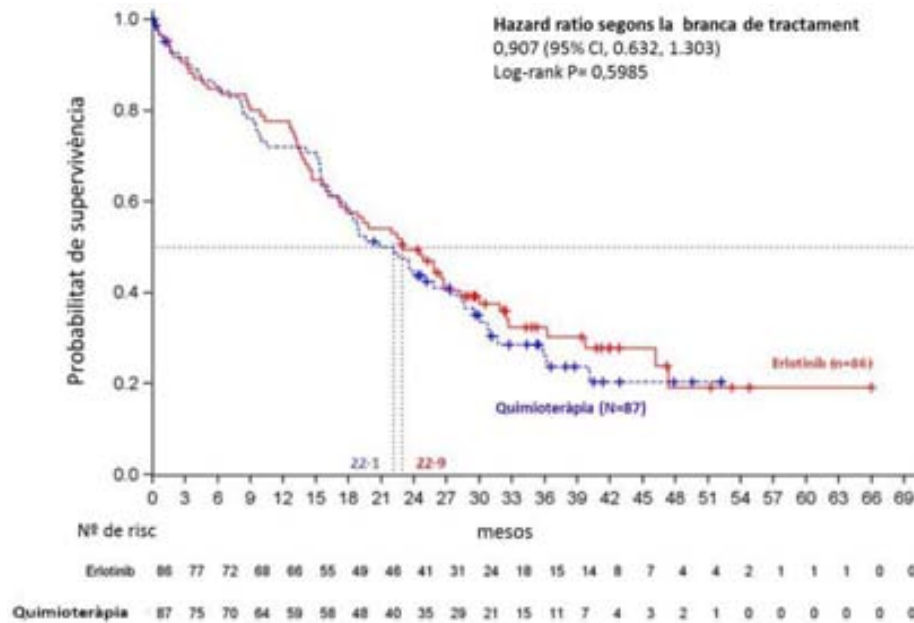


Fig. 54. Corba de Kaplan-Meier de l'avaluació de la supervivència dels pacients segons la branca de tractament. No hi va haver diferència significativa entre els dos tractaments en relació a les mutacions d'EGFR.

L'avaluació de la PFS segons el tipus de tractament posa de manifest que aquest paràmetre va ser superior, amb significació estadística, per al grup tractat amb erlotinib (10,4 mesos; 95% CI, 8,4 a 12, 9 mesos) en relació amb el grup tractat amb quimioteràpia estàndard (5,1 mesos; 95% CI, 4,5 a 5,8 mesos) (HR 0,33; 95% CI, 0,23 a 0,49; $P < 0,0001$). Totes aquestes dades queden reflectides en la Fig. 55.

4- RESULTATS

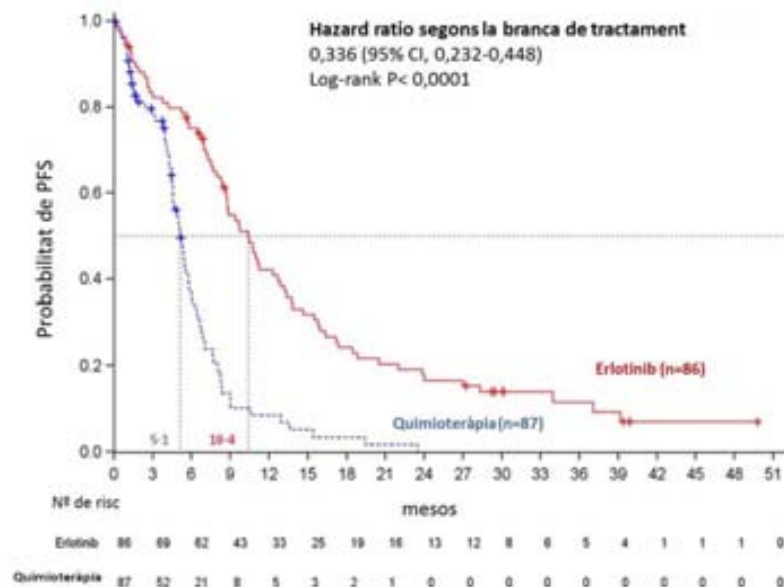


Fig. 55. Corba de Kaplan-Meier de l'avaluació de la PFS segons la branca de tractament. En vermell es pot apreciar que per al grup de pacients tractats amb erlotinib va ser de 9,7 mesos (95% CI, 8,4 a 12,3) mentre que per als tractats amb quimioteràpia estàndard, en blau, va ser de només de 5,2 mesos (95% CI, 4,5 a 5,8), amb una significació estadística de $p < 0,0001$.

La PFS a l'any de tractament va ser del 40% per al grup tractat amb erlotinib (95% CI, 28 a 52 mesos) mentre que per al grup tractat amb quimioteràpia va ser de tan sols el 10% (95% CI, 4 a 20 mesos). Als 2 anys va ser del 0% per a aquest darrer grup.

Segons els tipus de mutació d'EGFR, la PFS dels pacients delecionats va ser d'11 mesos (95% CI, 8,8 a 16,4 mesos) en la branca de tractament amb erlotinib respecte als 4,6 mesos (95% CI, 4,1 a 5,6 mesos) dels tractats amb quimioteràpia estàndard, amb una significació estadística de $p < 0,0001$. Respecte a la mutació L858R de l'exó 21, malgrat que no hi havia diferència significativa ($p = 0,0539$), es va veure una tendència a favor dels pacients tractats amb erlotinib de 8,4 mesos (95% CI, 5,2 a 10,8 mesos) respecte als 6 mesos dels pacients tractats amb quimioteràpia (95% CI, 4,9 a 6,8 mesos). Aquestes dades es veuen reflectides en les corbes Kaplan-Meier de les Fig. 56 i Fig. 57.

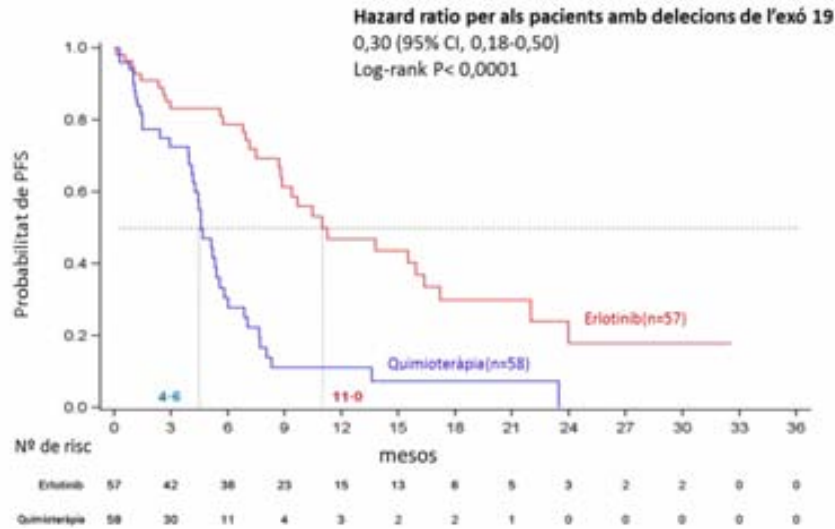


Fig. 56. Corba de Kaplan-Meier de l'avaluació de la PFS respecte a les delecions de l'exó 19. Com es pot observar en vermell, la mitjana de PFS dels pacients tractats amb erlotinib va ser superior, 11,0 mesos (95% CI, 8,8 a 10,8) respecte als 4,6 mesos (95% CI, 4,1 a 5,6), dels tractats amb quimioteràpia estàndard, en blau, amb una significació estadística de $p < 0,0001$; HR 0,3 (95% CI, 0,18 a 0,50).

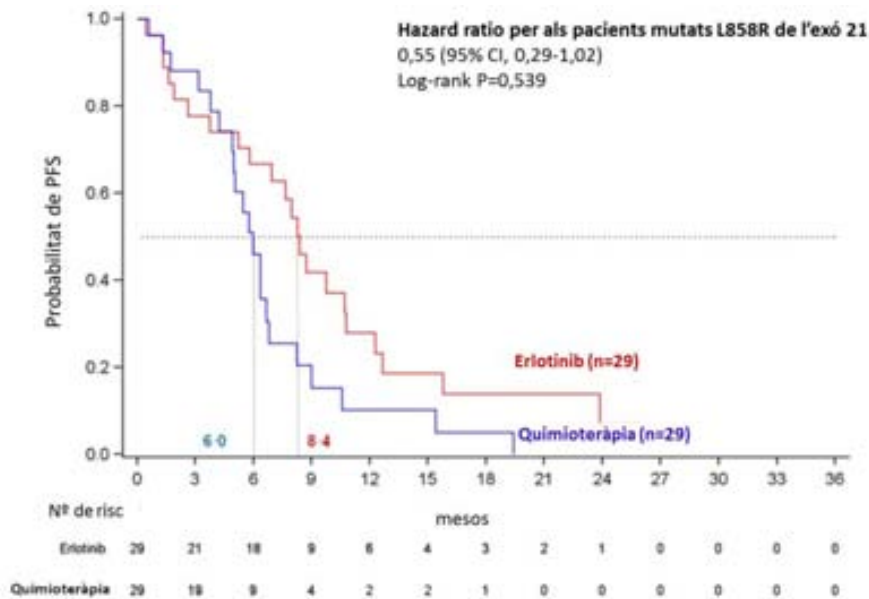


Fig. 57. Corba de Kaplan-Meier de l'avaluació de la PFS respecte a la mutació de l'exó 21 L858R. Com es pot observar en vermell, la mitjana de PFS dels pacients tractats amb erlotinib va ser de 8,4 mesos (95% CI, 5,2 a 10,8) respecte als 6,0 mesos (95% CI, 4,9 a 6,8), dels tractats amb quimioteràpia estàndard, en blau. Malgrat que no arriba a la significació estadística, es pot apreciar una tendència en favor dels pacients tractats amb erlotinib; HR 0,55 (95% CI, 0,29 a 1,02; $p = 0,0539$).

Independentment de l'ECOG PS, els pacients tractats amb erlotinib tenien una millor PFS que els pacients tractats amb quimioteràpia convencional. Així doncs, per als tractats

4- RESULTATS

amb ITQ amb PS 0, la PFS va ser de 23,9 mesos (95% CI, 9,7 a no assolit) respecte als 6 mesos (95% CI, 4,3 a 8,0 mesos) dels tractats amb quimioteràpia, $p=0,0006$. Per als pacients amb PS 1, la PFS va ser de 8,8 mesos (95% CI, 7,5 a 10,8 mesos) per als de la branca ITQ respecte als 5 mesos (95% CI, 4,1 a 5,5 mesos) dels de la branca de quimioteràpia, $p<0,0001$. Finalment per a PS 2, la PFS va ser de 8,3 mesos (95% CI, 1,0 a 16,4 mesos) per als pacients tractats amb ITQ respecte als 4,4 mesos (95% CI, 0,3 a 6,0 mesos) dels pacients tractats amb quimioteràpia, $p=0,191$. La corba de Kaplan-Meier corresponent al PS 0 es troba en la següent figura. Les corbes per a PS 1 i PS 2 es troben adjuntes en l'annex II (FIG. XXV).

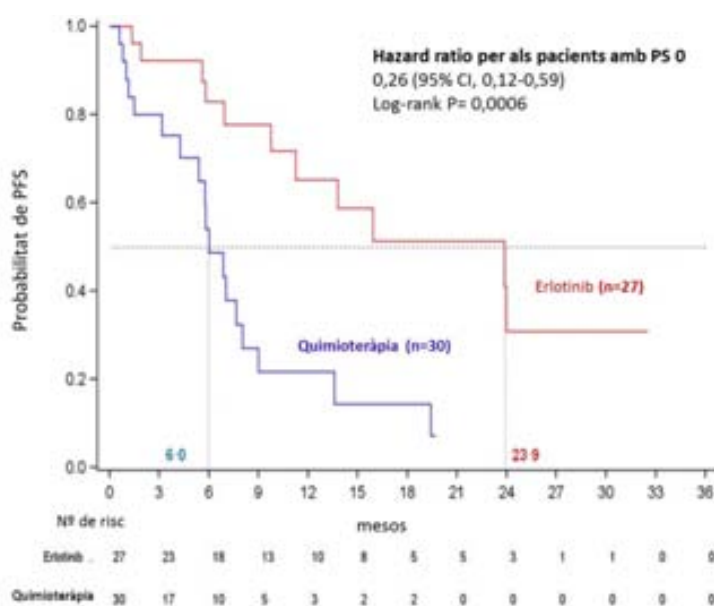


Fig. 58. Corba de Kaplan-Meier de l'avaluació de la PFS respecte a l'ECOG PS 0. Com es pot observar en vermell, la mitjana dels pacients tractats amb erlotinib va ser molt superior, 23,9 mesos (95% CI, 9,7 a no assolit) respecte als 6,0 mesos (95% CI, 4,3 a 8,0) dels tractats amb quimioteràpia estàndard, en blau, amb una significació estadística de $p=0,0006$.

Segons el tabaquisme, la PFS va ser superior per al grup de pacients tractats amb erlotinib respecte als tractats amb quimioteràpia. Així, els pacients no fumadors van assolir una PFS de 9,7 mesos (95% CI, 8,3 a 15,5 mesos) respecte als 5,1 mesos (95% CI, 4,4 a 5,6 mesos); per als fumadors la PFS va ser de 8,7 mesos (95% CI, 5,7 a 15,8 mesos) respecte als 4,2 mesos (95% CI, 1,0 a 15,4 mesos) i per als ex fumadors va ser de 10,7 mesos (95% CI, 2,7 a 13,8 mesos) respecte als 8,0 mesos (95% CI, 1,2 a no assolit), respectivament.

4.7.2 Validació clínica de l'anàlisi de la mutació T790M de l'exó 20

Es va analitzar la mutació T790M de l'exó 20 del teixit inclòs en parafina, abans de començar el tractament, de 95 pacients dels 173 inclosos en l'EURTAC. La mutació es va detectar en 62 pacients (65,2%), dels quals 34 pertanyien a la branca de tractament amb erlotinib (68%). La resta de pacients mutats van ser tractats amb quimioteràpia convencional. Les característiques clínico-patològiques es troben en la següent taula:

	Erlotinib N=50 (%)	Quimioteràpia N=45 (%)	P
Sexe			0,111
dona	34 (68,0)	37 (82,22)	
home	16 (32,0)	8 (17,78)	
Edat			0,948
<65	23 (46,0)	21 (46,67)	
≥65	27 (54,0)	24 (53,3)	
Tabaquisme			0,312
no fumador	32 (64,0)	32 (71,1)	
ex fumador	15 (30,0)	8 (17,78)	
fumador	3 (6,0)	5 (11,11)	
ECOG PS			0,726
0	15 (30,0)	16 (35,56)	
1	27 (54,0)	24 (53,33)	
2	8 (16,0)	5 (11,11)	
Histologia			0,019
adenocarcinoma	47 (94,0)	40 (88,89)	
broncoalveolar	0	1 (2,22)	
carcinoma decèl·lula gran	2 (4,0)	0	
carcinoma escamós	1 (2,0)	0	
altres	0	4 (8,89)	
Estadiatge			0,438
IIIB (amb vessament pleural)	5 (10,0)	2 (4,44)	
IV	44 (88,0)	43 (95,56)	
desconegut	1 (2,0)	0	
Típus de mutació del gen EGFR			0,764
deleció exó 19	33 (66,0)	31 (68,89)	
mutació exó 21	17 (34,0)	14 (31,11)	
Mutació T790M			0,555
detectada	34 (68,0)	28 (62,22)	
no detectada	16 (32,0)	17 (37,78)	
Resposta al tractament			<0,0001
completa	1 (2,0)	0	
parcial	27 (54,0)	5 (11,11)	
estabilització de la malaltia	12 (24,0)	22 (48,89)	
progressió	6 (12,0)	8 (17,78)	
sense dades	4 (8,0)	10 (22,22)	

Taula 53. Característiques clínico-patològiques dels 95 pacients inclosos en l'EURTAC que es va analitzar la mutació T790M. Els pacients estan dividits segons la branca de tractament.

4- RESULTATS

La mitjana de seguiment dels pacients tractats amb erlotinib va ser de 39,4 mesos (95% CI, 30,5 a 42,8 mesos) i de 37,9 mesos per als pacients de la branca de tractament amb quimioteràpia (95% CI, 29,6 a 40,5 mesos).

Com es pot observar, hi havia més pacients de sexe femení (75%), no fumador (67,3%) i d'histologia d'adenocarcinoma (91,5%). La majoria eren d'estadi IV (91,5%) i l'ECOG PS 0 i 1 representava el 86% dels pacients analitzats. Per exons, aproximadament el 63,5% eren delecionats de l'exó 19. El nombre de pacients mutats en una i altra branca va ser molt semblant (66% delecionats i 34% mutats L858R en la branca d'erlotinib respecte al 69% de delecionats i 31% de mutats L585R de la branca de quimioteràpia).

Els pacients tractats amb erlotinib van assolir una resposta del 56%, molt superior a l'11% aconseguit pels pacients de la branca de quimioteràpia convencional ($p < 0,0001$). Així, les respostes completes i parcials aconseguides en el grup d'erlotinib van ser del 29,4% mentre que només eren del 5% amb el tractament amb quimioteràpia. Malgrat tot, la branca de tractament convencional assolí quasi el doble d'estabilitzacions de la malaltia (23%) comparat amb els pacients tractats amb ITQ (12%). En referència a les progressions, en ambdues branques es van observar uns resultats semblants (6% i 8% erlotinib i quimioteràpia, respectivament).

En la següent taula hi ha els resultats de les respostes al tractament segons la presència o absència de la mutació T790M.

Respostes	Tractament								Total	
	Erlotinib				Quimioteràpia					
	T790M present		T790M absent		T790M present		T790M absent		N	%
completa	0		1	6.25	0	0.00	0	0.00	1	1.05
parcial	16	47.06	11	68.75	4	14.29	1	5.88	32	33.68
estabilització	10	29.41	2	12.50	15	53.57	7	41.18	34	35.79
progressió	4	11.76	2	12.50	4	14.29	4	23.53	14	14.74
sense dades	4	11.76	.	.	5	17.86	5	29.41	14	14.74

Taula 54. Respostes al tractament segons la presència o absència de la mutació T790M, dels 95 pacients analitzats.

Els pacients sense mutació de la branca d'erlotinib assolien més respostes (75% incloent una resposta completa) que els pacients de la mateixa branca amb la mutació (47%). Respecte als no mutats, les progressions i estabilitzacions eren més freqüents. Per una altra banda, els pacients mutats de la branca de quimioteràpia convencional assolien més respostes (14%) que entre els no mutats amb el mateix tractament (6%).

Es va analitzar la supervivència dels pacients per branques de tractament. En la següent figura es pot veure la corba de Kaplan-Meier de la branca de tractament amb erlotinib segons la presència o l'absència de la mutació T790M.

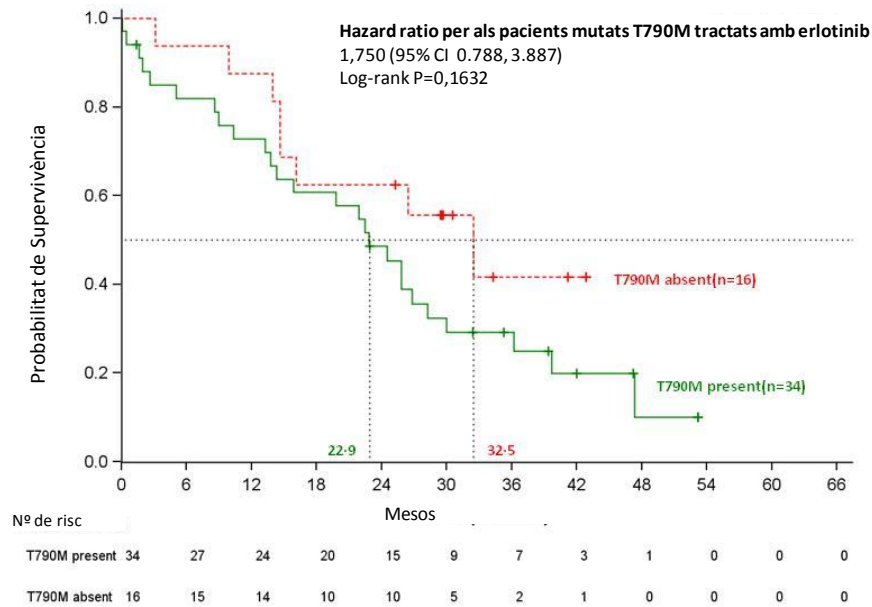


Fig. 59. Corba de Kaplan-Meier de la supervivència dels pacients de la branca de tractament amb erlotinib. Com es pot apreciar no hi havia diferència significativa entre detectar o no la mutació T790M

No es va assolir la significació estadística malgrat que els pacients que no se'ls havia detectat la mutació T790M tenien tendència a una millor supervivència, 32,5 mesos (95% CI, 14,6 a no assolit) respecte als pacients amb mutació, 22,9 mesos (95% CI, 13,7 a 28,3 mesos) P=0,1692.

La corba Kaplan-Meier de la branca de tractament amb quimioteràpia convencional es pot veure en la Fig. 60. Tampoc es va assolir la significació estadística malgrat que els pacients que se'ls havia detectat la mutació T790M tenien tendència a una lleugera millor supervivència, 28,5 mesos (95% CI, 15,5 a 40,1 mesos) respecte als pacients sense mutació de 23,5 mesos (95% CI, 1,6 a 30,0 mesos) P=0,1581.

4- RESULTATS

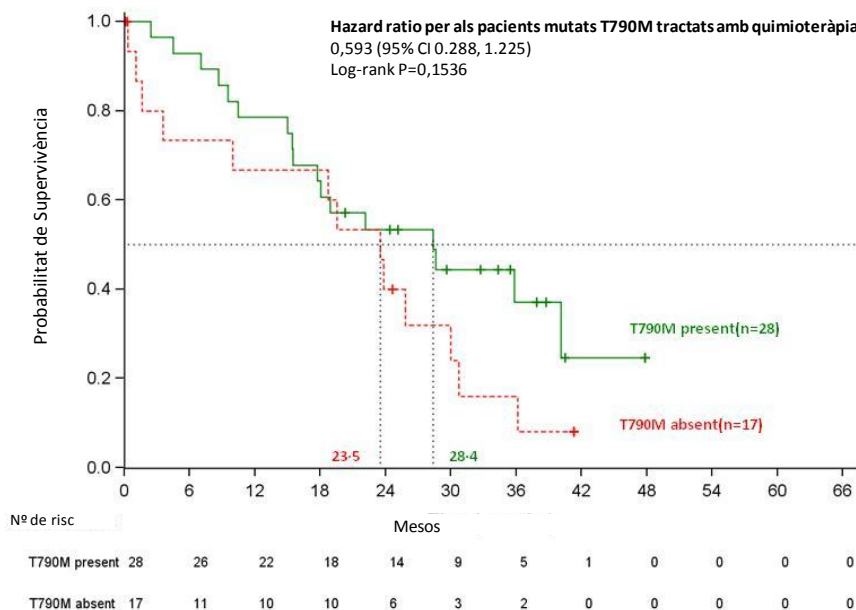


Fig. 60. Corba de Kaplan-Meier de la supervivència dels pacients de la branca de tractament amb quimioteràpia convencional. Com es pot apreciar no hi havia diferència significativa entre detectar o no la mutació T790M.

L'avaluació de la PFS es pot veure en la corba de Kaplan-Meier de la Fig. 61. Els 95 pacients estan dividits per branca de tractament i per presència o absència de la mutació T790M. Els pacients tractats amb ITQ sense mutació assolien una millor PFS (15,8 mesos, 95% CI, 8,8 a no assolit) que els que tenien la mutació T790M (9,7 mesos, 95% CI, 6,9 a 12,9 mesos) $P=0,0223$. Per als pacients de la branca de quimioteràpia convencional no hi va haver significació estadística entre detectar-se o no la mutació T790M. En ambdós casos les PFS van ser molt similars, 6 mesos (95% CI, 4,1 a 7,7 mesos) i 5,1 mesos (95% CI, 1,1 a 6,7 mesos), respectivament, $P=0,2504$.

Comparant les HR entre els quatre grups es va confirmar que la presència o absència de la mutació T790M no influïa en la PFS dels pacients tractats amb quimioteràpia estàndard (HR G3 vs G4: 0,616 (0,302, 1,254)). Per una altra banda, per al grup de pacients tractats amb erlotinib que se'ls havia detectat la mutació T790M tenien una PFS millor que els tractats amb quimioteràpia sense la mutació (HR G1 vs G4: 0,293 (0,145, 0,589)).

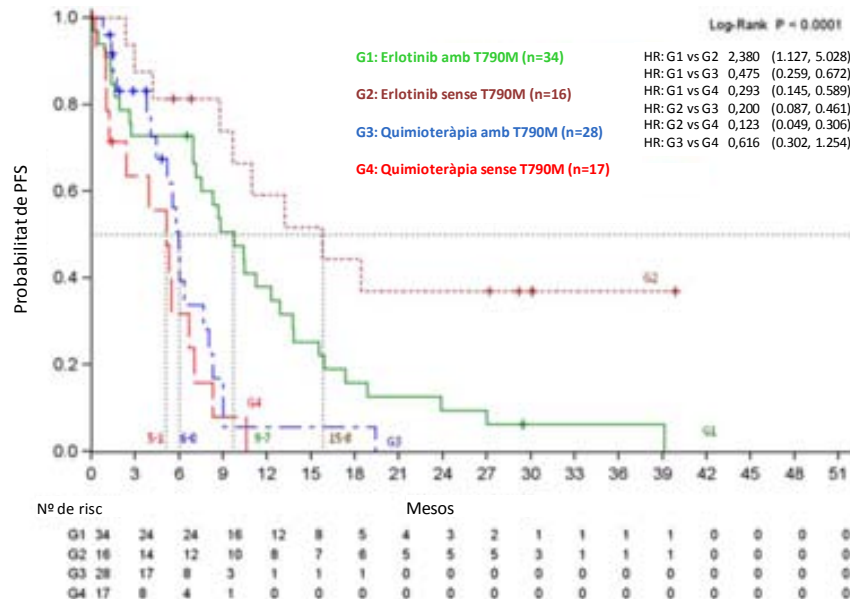


Fig. 61. Corba de Kaplan-Meier d'avaluació de la PFS on els pacients s'han estratificat segons la branca de tractament i absència o presència de la mutació T790M. Les HR dels quatre grups comparats entre ells es poden veure en la part superior del gràfic.

4.7.3 Anàlisi de les mutacions d'EGFR de l'ADN circulant de sang perifèrica

Es van analitzar les mutacions d'EGFR de l'ADN circulant de la sang perifèrica de 106 pacients dels 173 inclosos en l'EURTAC, abans de començar el tractament. Amb les dades obtingudes es va avaluar la resposta, la supervivència i la PFS (Taula 55).

Es van detectar les mutacions en 59 pacients (55,66%) dels quals 35 eren delecionats de l'exó 19 (59,32%) i 24 eren mutats L858R (40,67%). No hi va haver diferències de detecció de les mutacions entre branques de tractament (50,85% i 49,15%, erlotinib i quimioteràpia, respectivament). Malgrat que les característiques que aglutinaven més pacients amb mutacions eren sexe femení (64,4%) i no fumador (72,8%), no s'assolí la significació estadística respecte al global de tots els pacients analitzats ($p=0,38$ i $p=0,21$, respectivament). Com es pot apreciar, les característiques d'ambdós grups eren semblants tot i que semblava que les mutacions en sang perifèrica es detectaven més freqüentment en pacients amb PS 1 (63% respecte el 45% dels pacients sense mutacions) malgrat no assolir la significació estadística ($p=0,17$).

4- RESULTATS

	Amb mutacions en la sang perifèrica N=59 (%)	Sense mutacions en la sang perifèrica N=47 (%)	P
Tractament			0,98
erlotinib	30 (50,85)	24 (51,06)	
quimioteràpia	29 (49,15)	23 (48,94)	
Sexe			0,38
dona	38 (64,41)	34 (72,34)	
home	21 (35,59)	13 (27,66)	
Edat			0,95
<65	28 (47,46)	22 (46,81)	
≥65	31 (52,54)	25 (53,19)	
Tabaquisme			0,21
no fumador	43 (72,88)	35 (74,47)	
ex fumador	13 (22,03)	6 (12,77)	
fumador	3 (5,08)	6 (12,77)	
ECOG PS			0,17
0	15 (25,42)	19 (40,43)	
1	37 (62,71)	21 (44,68)	
2	7 (11,86)	7 (14,89)	
Mutació en sang			
del 19	35 (59,32)	---	
L858R	24 (40,68)	---	

Taula 55. Característiques clínico-patològiques dels 106 pacients de l'EURTAC segons la presència o absència de les mutacions en l'ADN circulant de la sang perifèrica.

En general amb el tractament amb erlotinib s'assolien més respostes que amb quimioteràpia estàndard, que presentava més estabilitzacions, independentment de la presència o absència de les mutacions en sang perifèrica (65,1% respecte al 17,31%; $p < 0,001$). Es van assolir respostes completes entre els pacients de la branca d'erlotinib sense mutacions, malgrat no assolir-se la significació estadística. Els pacients mutats en sang perifèrica presentaven més progressions de la malaltia, independentment de la branca de tractament (88,8%).

Resposta	TRACTAMENT N=106			
	Erlotinib N=54		Quimioteràpia N=52	
	amb mutacions en sang N= 30 (%)	sense mutacions en sang N= 24 (%)	amb mutacions en sang N= 29 (%)	sense mutacions en sang N=23 (%)
completa		3 (12,5)		
parcial	19 (63,33)	13 (54,17)	5 (17,24)	4 (17,39)
estabilització	5 (16,67)	6 (25,0)	13 (44,83)	13 (56,52)
progressió	3 (10,0)		5 (17,24)	1 (4,35)
sense dada	3 (10,0)	2 (8,33)	6 (20,69)	5 (21,74)

Taula 56. Respostes al tractament segons la presència o absència de les mutacions en sang perifèrica. Es pot observar que amb el tractament amb ITQ s'assolien més respostes que amb quimioteràpia. Les millors respostes es van assolir entre els pacients que no se'ls havien detectat les mutacions en sang perifèrica.

En l'avaluació de la supervivència, la diferència era significativa entre els pacients que no se'ls detectaven les mutacions (25,8 mesos; 95% CI, 17,7 a 36,2 mesos) respecte als que se'ls havien detectat (17,9 mesos; 95% CI, 14,3 a 23,5 mesos); $p=0,03$ (Fig. 62).

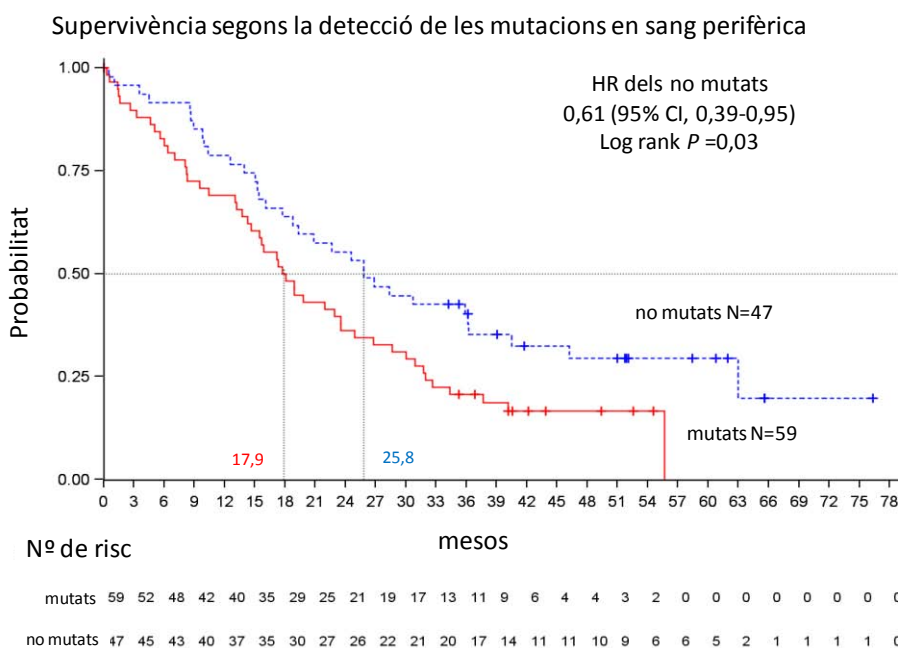


Fig. 62. Corba de Kaplan-Meier d'avaluació de la supervivència segons la detecció o no de mutacions d'EGFR en sang perifèrica. Com es pot observar, aquesta diferència era estadísticament significativa.

Per exons, s'observà que els pacients amb deleccions detectades en sang perifèrica assolien una millor supervivència que els pacients mutats L858R malgrat que els pacients sense mutacions assolien una supervivència millor (21,3 mesos; 95% CI, 14,6 a 34,4; 14,8

4- RESULTATS

mesos; 95% CI, 7,1 a 21,9 i 25,8 mesos; 95% CI, 17,7 a 36,2, respectivament). Així doncs, independentment de la branca de tractament assignada, els pacients que se'ls havien detectat les mutacions en sang perifèrica assolien una menor supervivència, especialment els pacients mutats L858R que eren els que presentaven una supervivència menor (HR 2,33; P=0,01).

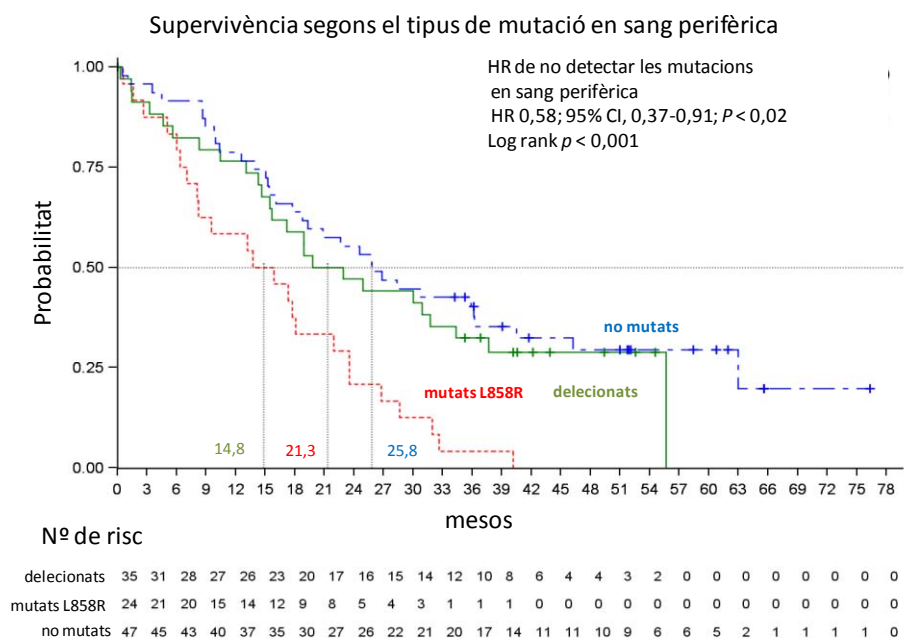


Fig. 63. Corba de Kaplan-Meier d'avaluació de la supervivència segons detectar o no les mutacions en sang perifèrica i el tipus de mutació detectada. Com es pot apreciar, els pacients que no se'ls havia detectat cap mutació assolien una millor supervivència que els que se'ls havia detectat. Els pacients amb mutacions L858R detectades assolien una pitjor supervivència (HR 2,25; P=0,006).

En l'avaluació de la PFS, hi havia una diferència significativa entre els pacients amb mutacions en sang perifèrica (6,8 mesos, 95% CI, 5,1 a 8,3 mesos) respecte als que no se'ls havien detectat (9 mesos, 95% CI, 6,7 a 13,2 mesos, P=0,01) (Fig. 64).

Tot i així, aquesta diferència desapareixia quan s'avaluava la PFS respecte a la branca de tractament (Fig. 65). Els pacients tractats amb erlotinib amb mutacions en sang perifèrica assolien una PFS de 10,7 mesos (95% CI, 6,5 a 14,7 mesos) respecte als 12,9 mesos (95% CI, 8,7 a 24,0 mesos) dels pacients sense mutacions (p=0,07). Paral·lelament, els pacients tractats amb quimioteràpia convencional amb mutacions i sense mutacions assolien una PFS semblant (5,1 mesos, 95% CI, 3,2 a 6,8 mesos i 6 mesos 95% CI, 4,9 a 7,7 mesos, respectivament; P=0,06).

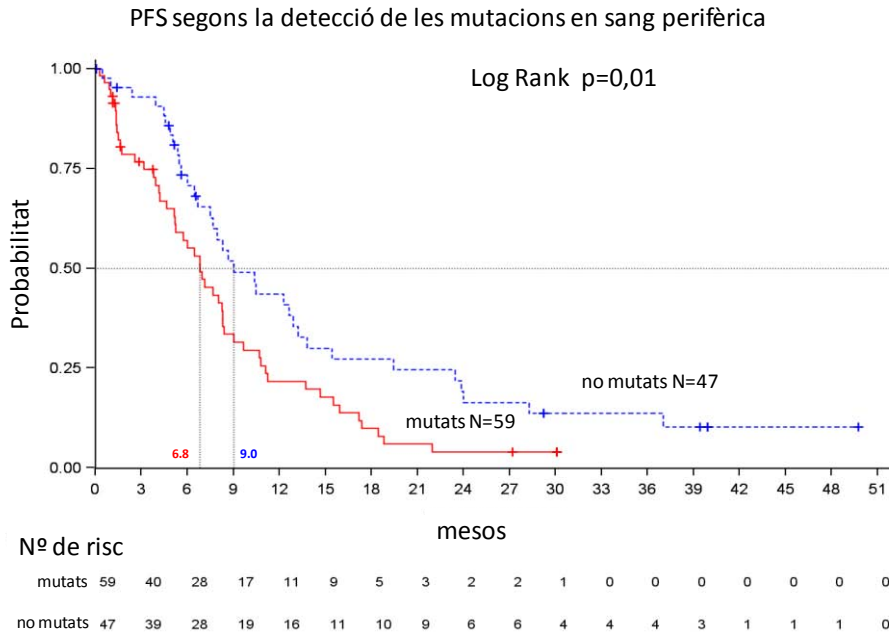
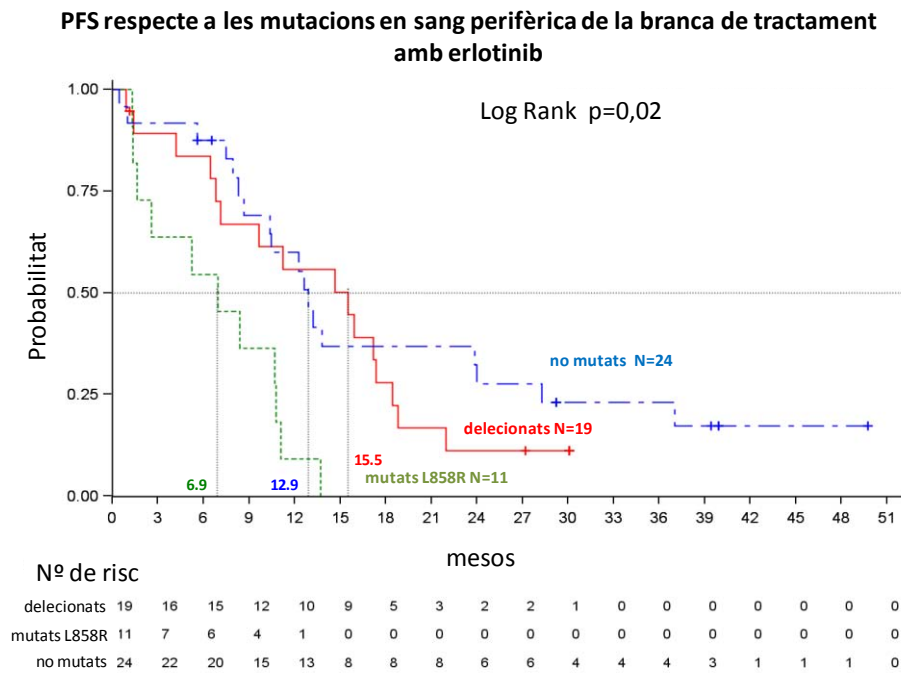


Fig. 64. Corba de Kaplan-Meier d'avaluació de la PFS segons la detecció o no de mutacions en sang perifèrica. La diferència entre els pacients amb mutacions respecte als no mutats va ser estadísticament significativa (6,8 mesos enfront 9,0 mesos, respectivament).

Només s'assolí la significació estadística en el grup de pacients tractats amb erlotinib quan s'analitzava la PFS per exons. Així, els delecionats presentaven una PFS de 15,5 mesos (95% CI, 6,8 a 17,3 mesos) mentre que els mutats L858R només era de 6,9 mesos (95% CI, 1,3 a 10,8 mesos); $P=0,002$ (Fig. 65).



4- RESULTATS

Fig. 65. Corba de Kaplan-Meier d'avaluació de la PFS per a la branca de tractament amb erlotinib. La diferència entre els pacients amb mutació detectada i no detectada en sang perifèrica no va ser significativa ($p=0,07$). Si s'avaluava la PFS per exons es podia observar que els pacients sense mutacions assolien millor PFS seguits pels pacients delecionats i mutats L858R.

La corba de Kaplan-Meier corresponent a la branca de tractament amb quimioteràpia convencional segons la detecció o no de les mutacions en sang perifèrica es troba en l'annex II (FIG XXVII).

5 DISCUSSIÓ

Quan ens pensàvem que teníem totes les respostes,

de sobte van canviar les preguntes

(Mario Benedetti)

5.1 Validació analítica de la tècnica de seqüenciació Sanger

Des que l'any 1975 l'equip de Carpenter va descriure per primer cop la interacció d'EGF amb un receptor de membrana (CARPENTER *et al.* 1975), el gen EGFR ha estat relacionat amb multitud de processos cel·lulars com ara la proliferació, migració, adhesió i diferenciació. Al mateix temps la seva desregulació, ja sigui per amplifacació o per alteracions genètiques com mutacions o delecions s'ha relacionat, directament, amb l'aparició de neoplàsies. Una de les primeres alteracions en ser estudiada va ser la delecio del domini extracel·lular d'EGFR que comporta l'aparició de la proteïna truncada EGFRvIII, molt usual en tumors cerebrals.

L'any 2004 tres grups de recerca van descriure simultàniament unes alteracions en el domini tirosina quinasa que activaven constitutivament el receptor i el feien sensible a la seva inhibició amb ITQ. S'han descrit moltes mutacions en els 28 exons del gen però el 90% de les que confereixen sensibilitat a aquest tractament són les delecions de l'exó 19, de diversa longitud, i les mutacions puntuals de l'exó 21 (KEAM *et al.* 2013; LYNCH *et al.* 2004; PAEZ *et al.* 2004; PAO *et al.* 2004). Com que la resta de mutacions tenen un percentatge força inferior i la seva influència respecte al tractament és incerta, només s'han analitzat aquests dos exons.

Històricament, el mètode estàndard per analitzar mutacions ha estat la seqüenciació directa de l'ADN pel mètode Sanger que ha permès, entre d'altres fites, l'obtenció del codi genètic humà. Amb aquest sistema no només es detecten les alteracions en posicions conegudes sinó que també permet identificar-ne de noves. Per tant, es va posar a punt aquest mètode per detectar les delecions de l'exó 19 i la mutació L858R de l'exó 21.

Es van optimitzar les amplificacions per PCR d'aquests exons amb limfòcits i línies cel·lulars mutades. Malgrat que hi ha treballs que presenten casos clínics de càncer de pulmó on descriuen l'existència de mutacions germinals d'EGFR en famílies amb alta incidència neoplàsica (CENTENO *et al.* 2011; IKEDA *et al.* 2008) les mutacions activadores de l'exó 19 i 21 es consideren somàtiques (KOSAKA *et al.* 2004; LYNCH *et al.* 2004; PAEZ *et al.* 2004; SHIGEMATSU *et al.* 2005). Per tant, es va utilitzar el limfòcit com control wt (DUFORT *et al.* 2011).

Les línies cel·lulars mutades utilitzades com control positiu van ser la PC9 delecionada de 15pb en l'exó 19 (ARAO *et al.* 2004), descrita com una de les més sensibles al tractament amb gefitinib (ONO *et al.* 2004) i l'H1975, doblement mutada en la posició L858R de l'exó 21 i la posició T790M de l'exó 20. La mutació L858R d'aquesta línia cel·lular la va caracteritzar el grup de Sordella quan comparaven l'activitat de diverses línies cel·lulars mutades respecte a l'activació de les vies anti-apoptòtiques (SORDELLA *et al.* 2004),

mentre que la mutació T790M va ser descoberta per l'equip de Pao en l'anàlisi mutacional de diverses línies cel·lulars (PAO *et al.* 2005). En ambdós casos, es van confirmar les alteracions pertinents per seqüenciació Sanger.

L'optimització de les amplificacions es va basar en el control de l'astringència (concentració de $MgCl_2$ i temperatura d'*annealing*) i el nombre de cicles d'amplificació. Per experiència prèvia en l'amplificació d'altres gens, es va considerar que les concentracions de treball dels altres components de la PCR (encebadors, dNTP i polimerasa) eren adequades. Una concentració massa baixa de $MgCl_2$ impedeix l'activitat de l'enzim polimerasa, mentre que un excés comporta l'aparició de fragments inespecífics. Per una altra banda, la temperatura d'*annealing*, que és específica per a cada parella d'encebadors i que ve determinada pel seu contingut de C (citosina) i G (guanina), es pot determinar en el moment del seu disseny restringint tant la zona del gen on s'hibriden com la seva longitud. En el procés de PCR, una temperatura d'*annealing* massa baixa afavoreix la unió inespecífica dels encebadors a l'ADN, mentre que una de massa elevada provoca una unió parcial dels encebadors de manera que la polimerasa no pot iniciar l'amplificació (KRAMER and COEN 2001).

Tant la mida del fragment d'ADN que es vol amplificar com la seva integritat són cabdals per aconseguir una amplificació òptima: com que la fixació amb formaldehid malmet la integritat de l'ADN, un amplicó massa llarg complica l'obtenció d'amplicat suficient per seqüenciar-lo adequadament (GOLEBERG *et al.* 1996; GREER *et al.* 1991). A més, durant el procés de seqüenciació hi ha pèrdua de lectura d'un fragment d'ADN d'aproximadament 20-30pb abans de la lectura de la seqüència sencera. Tenint en compte aquest fet, un amplicó massa petit pot comportar la pèrdua de la zona on es troba la mutació. Es van dissenyar encebadors que amplificaven menys de 350pb, on les alteracions quedaven en una posició central dins l'amplicó i amb una temperatura d'*annealing* al voltant dels 60°C (l'esquema dels exons amb tots els encebadors utilitzats en les PCR són en l'annex I).

Paral·lelament, ha d'haver un equilibri entre el nombre de cicles de la PCR i la quantitat d'ADN que s'amplifica: un nombre massa petit de cicles implica poca amplificació mentre que un nombre superior a 40 cicles comporta l'aparició de productes intermedis inespecífics, en detriment de l'amplificació del fragment correcte (INNIS 1990). En aquest cas, es va realitzar una primera PCR de pocs cicles (20 i 25 per a mostres amb poca cel·lularitat tumoral) seguida d'una *nested* PCR per tal d'augmentar els cicles d'amplificació totals (35-40 cicles) sense saturar la reacció.

Hi ha dos factors que van influir en gran manera en el procés d'optimització de les PCR: per una banda, la microdissecció làser de les mostres i per una altra, la quantitat tumoral del teixit inclòs en parafina. La microdissecció làser permet seleccionar només les zones tumorals d'una mostra heterogènia on hi ha d'altres components, com ara limfòcits,

cèl·lules inflammatòries, estroma, etc. que poden emascarar els resultats de posteriors anàlisis (WILD *et al.* 2000). En mostres amb poca cel·lularitat tumoral, la microdissecció permet enriquir el tipus cel·lular d'estudi sense contaminació per manipulació (EMMERT-BUCK *et al.* 1996). Per exemple, hi ha treballs on s'han pogut realitzar diverses anàlisis de la microdissecció de menys de 150 cèl·lules tumorals de mostres citològiques (CHOWDHURI *et al.* 2012; MOLINA-VILA *et al.* 2008). Malgrat que hi ha altres mètodes per seleccionar aquestes cèl·lules neoplàsiques, la microdissecció làser permet, en tot moment i mitjançant un microscopi, la selecció visual de les zones escollides (ESPINA *et al.* 2007).

La fidelitat de l'enzim polimerasa és cabdal per evitar errors en les còpies d'ADN que es generen durant l'amplificació i que poden conduir a resultats erronis en el procés de seqüenciació. La taxa d'error d'aquest enzim, altament relacionada amb factors de la PCR com la concentració de MgCl₂, dNTP, pH, temperatura, etc. és al voltant de 10⁻⁴ a 10⁻⁵ per nucleòtid (NOLLAU and WAGENER 1997). Per optimitzar l'amplificació del gen EGFR es van provar, a part de l'Ecotaq polimerasa, dos enzims del tipus *hotstart*, recomanats en la bibliografia per amplificar petites quantitats d'ADN. Aquest tipus de polimerases estan especialment dissenyades per activar-se a temperatures superiors als 90°C, minimitzant el risc d'amplificar regions errònies quan els encebadors s'uneixen a l'ADN a temperatures subòptimes a la d'*annealing*. Comparant tant l'eficiència d'amplificació com la fidelitat de replicació, els resultats de les seqüències obtingudes amb els tres enzims van ser idèntics. Com que les mutacions d'EGFR es troben en posicions molt concretes (anomenades *hotspots*), es va pensar en utilitzar l'Ecotaq, ja usada anteriorment per amplificar altres gens, malgrat que no sigui del tipus *hotstart*.

Els productes de PCR amplificats requereixen una purificació dels components remanents que no s'han utilitzat durant l'amplificació i que poden interferir en la reacció de seqüència. Malgrat que hi ha diverses estratègies per remoure aquests components sobrants (purificació per columnes, utilització de partícules magnètiques, precipitació per polietilenglicol o etanol, etc.), les característiques dels amplicons generats, impliquen que el mètode més indicat sigui el basat en la digestió enzimàtica conjunta de l'exonucleasa I i la *shrimp alkaline*. Mentre el primer enzim digereix els encebadors que no s'han hibridat en l'amplificació, el segon enzim elimina els dNTP que no s'han incorporat en la reacció de PCR, respectant les còpies més curtes d'ADN.

5.2 Validació clínica de la tècnica de seqüenciació Sanger

Els dos treballs realitzats l'any 2004 es van basar en l'anàlisi de les mutacions d'EGFR per seqüenciació Sanger de dues poblacions independents de pacients avançats de CPCNP tractats amb gefitinib després de la progressió al tractament amb quimioteràpia. Diversos estudis han reportat que la població asiàtica té un percentatge superior de mutacions d'EGFR (HAN *et al.* 2005; MITSUDOMI *et al.* 2005; SHIGEMATSU *et al.* 2005). En l'estudi PIONEER, el grup de Shi analitza les mutacions de 1.482 pacients de diferents zones d'Àsia (Xina continental, Hong Kong, Índia, Filipines, Taiwan, Tailandia i Vietnam) demostrant que, mentre que el percentatge de la població de l'est asiàtic es situa al voltant del 50%, aquest cau als nivells descrits per a la població caucàsica (PAEZ *et al.* 2004; PAO *et al.* 2004; SHIGEMATSU *et al.* 2005) en els pacients de l'Índia (del 22%) (SHI *et al.* 2014). Per comprovar aquest fet, en el primer estudi es van analitzar les mutacions d'un grup de pacients on la meitat eren d'origen asiàtic. A continuació, s'analitzaren 83 pacients íntegrament caucàsics i es van comparar els resultats dels dos estudis, comprovant que els resultats de la seqüenciació Sanger i la relació de la freqüència de les mutacions amb les característiques clínico-patològiques dels pacients eren comparables amb els descrits en la literatura.

Com es pot observar en les Taula 18, el percentatge de mutacions del primer treball és el doble del percentatge de pacients mutats detectats en el segon. Aquesta diferència entre poblacions ha estat estudiada per l'equip de Shigematsu i va comprovar que aquest percentatge més elevat en la població asiàtica depenia més de característiques ètniques que de factors ambientals (SHIGEMATSU *et al.* 2005). Els resultats obtinguts, doncs, concorden amb els descrits en la bibliografia.

S'observà que les mutacions eren més freqüents en pacients de sexe femení (per sobre del 60% en ambdós casos), amb histologia d'adenocarcinoma i no fumadors (també per sobre del 60% en ambdós casos) tal com descriuen altres treballs (MARCHETTI *et al.* 2005; SEQUIST *et al.* 2006; SHI *et al.* 2014; SHIGEMATSU and GAZDAR 2006). Aquestes característiques coincideixen amb les que s'havien descrit per aquells malalts que responien als ITQ en estudis amb pacients no seleccionats per les mutacions d'EGFR, quan encara no es coneixia la relació entre les mutacions del domini TQ i la sensibilitat al fàrmac (KIM *et al.* 2005; KRIS *et al.* 2003; PAEZ *et al.* 2004; THATCHER *et al.* 2005).

Per exons, la freqüència de les delecions de l'exó 19 va ser superior a la de la mutació L858R de l'exó 21. Així com les dades obtingudes de l'anàlisi dels 67 pacients de diferents procedències s'ajusten als resultats que es troben en la literatura (al voltant del 60% per a les delecions de l'exó 19 enfront el 40% per a les mutacions de l'exó 21) (MARCHETTI *et al.* 2005; PAO *et al.* 2004; RIELY *et al.* 2006), l'estudi dels 83 pacients

caucàsics presenta freqüències més descompensades. Això es pot explicar pel baix percentatge de pacients mutats trobats en aquesta població.

Respecte a les respostes assolides pels pacients mutats d'EGFR, es pot veure que són similars als descrits en la bibliografia (INOUE *et al.* 2006; MITSUDOMI *et al.* 2005; PAO *et al.* 2004; TAKANO *et al.* 2005; YOSHIDA *et al.* 2007). A més, els pacients wt tractats amb inhibidors d'EGFR presentaven més progressions en comparació amb els pacients mutats. Això concorda amb els resultats publicats de diferents assajos en què s'administrava un ITQ en primera línia en pacients no seleccionats (aproximadament el 85% dels pacients eren wt), on els wt no es beneficiaven del tractament (GATZEMEIER *et al.* 2007; GIACCONE *et al.* 2004; HERBST *et al.* 2004; HERBST *et al.* 2005; MOK *et al.* 2009). Corroborant aquest fet, l'estudi TAILOR (TArceva Italian Lung Optimization tRial) demostra que en segona línia, el tractament amb docetaxel és millor, respecte a la supervivència i la PFS, que el tractament amb erlotinib (HR 0,73; 95% CI, 0,53 a 1,00; p=0,05 i HR 0,71; 95% CI, 0,53 a 0,95; p=0,02, respectivament) (GARASSINO *et al.* 2013). De totes maneres, l'estudi TITAN (TArceva In Treatment of Advanced NSCLC) que tenia com a objectiu principal l'avaluació de la supervivència, descriu la no diferència entre els pacients tractats en segona línia amb docetaxel o pemetrexed i els tractats amb erlotinib (HR 0,96; 95% CI, 0,78 a 1,19; p=0,73) (CIULEANU *et al.* 2012).

El fet que hi hagi pacients que responen al tractament amb gefitinib sense mutacions d'EGFR també s'ha reportat en d'altres treballs, amb percentatges de resposta força inferiors. Per exemple, el tractament amb erlotinib aconsegueix respostes d'entre el 9% i el 3% (JANNE *et al.* 2012; YOSHIOKA *et al.* 2010; GARASSINO *et al.* 2013) mentre que amb gefitinib s'assoleix un 1% (GARASSINO *et al.* 2013; MOK *et al.* 2009).

Malgrat que els resultats obtinguts concorden amb els descrits en la bibliografia, hi ha treballs que esmenten que la sensibilitat de la tècnica de seqüenciació Sanger no és suficient per detectar les mutacions i que per tant, hi ha pacients mutats que s'han considerat wt. (LYNCH *et al.* 2004; PAO *et al.* 2004; TAKANO *et al.* 2007). Per solucionar aquest fet, es van optimitzar altres mètodes de detecció més sensibles.

5.3 Validació analítica de les tècniques de GeneScan i TaqMan

Com ja s'ha exposat en la introducció, la recerca d'un nou mètode per detectar les mutacions d'EGFR comporta, o bé optar per un mètode amb què s'obtinguin totes les alteracions existents en el gen, o bé optimitzar un mètode dirigit de detecció

5- DISCUSSIÓ

d'alteracions en llocs coneguts, sense fer un cribatge exhaustiu. Els avantatges i inconvenients d'aquests dos tipus d'estratègies es troben en la següent taula:

Mentre que els mètodes de cribatge permeten obtenir informació de totes les alteracions presents en el gen, la seva sensibilitat és menor que les tècniques de detecció d'alteracions en posicions conegudes. La seqüenciació Sanger, que pertany al primer grup, té una sensibilitat al voltant del 20%-30%. Això comporta que no detecta les mutacions presents en freqüències inferiors al seu límit de detecció (QUERINGS *et al.* 2011). Aquest, juntament amb el risc de contaminació en els passos intermedis d'amplificació i seqüenciació i a la durada de tot el procés, fa que en molts casos s'hagin desenvolupat altres mètodes d'anàlisi més sensibles i ràpids.

	Mètode de cribatge exhaustiu	Mètode de detecció d'alteracions en posicions conegudes
Avantatges	Es detecten totes les alteracions existents La seqüenciació directa es considera el mètode estàndard amb resultats àmpliament contrastats	Normalment més eficient i ràpid La sensibilitat (límit de detecció) acostuma a ser superior a la de la seqüenciació
Inconvenients	La sensibilitat acostuma a ser inferior degut a l'amplitud del cribatge Normalment requereix d'enriquiment de la mostra mitjançant la microdissecció Acostuma a ser un mètode més lent que els mètodes dirigits	Alteracions no descrites o no dissenyades per aquest assaig queden fora de la detecció Alguns cops els reactius poden ser més cars que els de seqüenciació Normalment s'han d'acabar contrastant els resultats amb la seqüenciació

Taula 57. Comparació de les característiques principals dels mètodes de cribatge o basats en posicions conegudes de detecció d'alteracions genètiques.

Tenint en compte, com ja s'ha explicat anteriorment, que les mutacions que confereixen sensibilitat als ITQ representen el 90% del total de les mutacions descrites i que es troben en *hotspots*, es van utilitzar uns mètodes d'anàlisi de posicions conegudes per detectar les deleccions de l'exó 19 i les mutacions L858R de l'exó 21 i T790M de l'exó 20: l'anàlisi de fragments (GeneScan) i la discriminació al·lèlica (TaqMan), respectivament.

5.3.1 Optimització de les tècniques de GeneScan i TaqMan en mostres de teixit inclòs en parafina

En la bibliografia es descriuen diversos mètodes per analitzar les deleccions de l'exó 19. Per exemple, hi ha autors que utilitzen la IHQ per identificar-les sense utilitzar tècniques de biologia molecular (BREVET *et al.* 2010; KATO *et al.* 2010; KOZU *et al.* 2011). Tal com s'ha comentat anteriorment, l'especificitat de les sondes i la interpretació dels resultats són

uns dels problemes d'aquest tipus de tècnica. Per una altra banda, hi ha treballs basats en mètodes d'anàlisi dels canvis de conformació provocats per mutacions o delecions en el gen (MARCHETTI *et al.* 2005) o bé per la digestió amb un enzim de restricció de l'ADN wt per tal d'enriquir la quantitat d'al·lels delecionats (ASANO *et al.* 2006). La tècnica de GeneScan és molt utilitzada per analitzar microsatèl·lits (YAMADA *et al.* 2010) i reorganitzacions gèniques (ASSAF *et al.* 2000). A més, ofereix la suficient sensibilitat com per discriminar dos fragments d'ADN que difereixen d'una sola base.

Per una altra banda, hi ha molts mètodes per detectar mutacions puntuals. Per exemple, i com ja s'ha comentat en la introducció, aquestes alteracions poden crear dianes de restricció que s'utilitzen per digerir l'ADN amb un enzim, prèviament a la PCR. Si hi ha la mutació es produeix la digestió i es generen fragments d'ADN, durant l'amplificació, de mida més curta que el wt que no s'ha digerit (INUKAI *et al.* 2006; PAO *et al.* 2005). Els enzims de restricció també es poden aplicar abans de l'anàlisi per la tècnica d'HPLC (JANNE *et al.* 2006). Aquesta estratègia, que és compatible amb l'ús d'encebadors fluorescents, és utilitzada per diversos autors (ASANO *et al.* 2006; BREVET *et al.* 2010; RIELY *et al.* 2006).

La resistència adquirida als fàrmacs que s'utilitzen en el tractament dels pacients amb mutacions de sensibilitat d'EGFR depèn, entre d'altres, a l'aparició de la mutació T790M de l'exó 20, fenomen ja descrit l'any 2005 (KOBAYASHI *et al.* 2005; PAO *et al.* 2005). És de màxima importància el desenvolupament de mètodes d'anàlisi capaços de detectar aquesta mutació a l'inici de la malaltia per planificar l'estratègia de tractament més adequada un cop es produeixi la progressió. Com ja s'ha comentat anteriorment, aquesta alteració no es troba de manera homogènia en el tumor sinó que apareix en un petit grup cel·lular que, al llarg del tractament, acostuma a proliferar arran d'aquesta resistència als ITQ. Aquest fet complica la detecció d'aquesta mutació i acosta la problemàtica al descrit per a les mostres de sang perifèrica, ja que encara que es tracti d'una mostra de teixit inclòs en parafina, la proporció dels al·lels mutats de l'exó 20 respecte als al·lels wt és molt baixa. Per detectar mutacions de baixa freqüència s'han desenvolupat diferents estratègies per augmentar la sensibilitat de detecció com ara l'ús de sondes semblants a les escorpió per disminuir les inespecificitats d'unió amb l'ADN (OH *et al.* 2010), utilitzar les sondes PNA per enriquir la població d'al·lels mutats (ARCILA *et al.* 2011; GUHA *et al.* 2013), o l'aplicació de tècniques específiques com el BEAMing, breument explicat en la introducció, per analitzar la T790M en mostres de sang perifèrica (TANIGUCHI *et al.* 2011). Per una altra banda, i repassant els treballs de la bibliografia, es va pensar en utilitzar la discriminació al·lèlica, usada per detectar polimorfismes, per analitzar l'exó 20 i 21 (LIVAK 1999). Hi ha descrites dues mutacions puntuals en aquest darrer exó: la que es troba en la posició L858R, amb una freqüència aproximada del 40% i àmpliament relacionada amb la resposta al tractament amb ITQ (LYNCH *et al.* 2004; PAEZ *et al.* 2004; PAO *et al.* 2004) i la L861Q molt menys freqüent que

l'anterior, al voltant del 2%, (MITSUDOMI and YATABE 2010) amb un paper molt menys actiu respecte a la resposta (KANCHA *et al.* 2011). Aquest fet va determinar que la tècnica TaqMan només s'optimitzés per analitzar la mutació L858R.

En tots els casos, el resultat es va corroborar per seqüenciació bidireccional (*forward* i *reverse*) per assegurar que cap de les alteracions trobades en un sol sentit era provocada per un error durant el procés de seqüenciació. Aquesta confirmació per seqüència era necessària per comparar els resultats obtinguts per aquests nous mètodes d'anàlisi respecte al mètode existent de detecció (BORRAS *et al.* 2011; SAUNDERS G. 1999).

5.3.2 Avaluació de les tècniques

La manca de mètode estàndard per analitzar la mutació T790M comporta que l'avaluació de la tècnica depengui, en gran mesura, de la seva sensibilitat. El nou repte que presentava la detecció d'aquesta mutació, tant heterogènia i en tan baixa freqüència, va implicar l'optimització del mètode de discriminació al·lèlica, incrementant el temps d'elongació de la reacció i afegint la sonda PNA en les amplificacions.

5.3.2.1 Límit de detecció

El banc de dilucions de les línies PC9 i H1975 va servir per determinar la concentració mínima d'ADN delecionat/mutat que detectava la tècnica de GeneScan i TaqMan, tenint en compte que la concentració d'ADN obtingut de mostres de teixit inclòs en parafina, especialment les de poca cel·lularitat tumoral, oscil·lava entre els 5 i 300ng/μl. Tal com ja s'ha exposat en l'apartat de resultats, la mínima concentració d'ADN mutat detectada per aquestes tècniques va ser de 5pg/μl (inclús per a l'exó 20 al què s'havia afegit la sonda PNA en les discriminacions al·lèliques) que representa 10pg d'ADN. Aquest mateix rang de detecció el reporta l'equip de Molina-Vila també utilitzant l'anàlisi de fragments com a mètode d'anàlisi de delecions (MOLINA-VILA *et al.* 2008). Tot i així, el grup de Nakamura detecta les delecions de l'exó 19 i la mutació L858R de l'exó 21 en una concentració mínima de 5pg i de 40pg d'ADN genòmic, respectivament, utilitzant una variació de la tècnica de PCR clampling (NAKAMURA *et al.* 2012). En contrapartida, hi ha tècniques, com l'HRM que no detecten les mutacions per sota de 5ng-1ng d'ADN (BORRAS *et al.* 2011; Do *et al.* 2008).

En realitzar el mateix experiment amb cèl·lules tumorals microdisseccionades d'una extensió de PC9 i H1975, es va comprovar que la mínima quantitat cel·lular per detectar les mutacions era de 4 cèl·lules. En la bibliografia existeixen diversos estudis, basats en

l'anàlisi de mostres citològiques, rentats broncoalveolars, etc. que confirmen la possibilitat de detectar alteracions genètiques a partir d'un nombre cel·lular petit. Per exemple, l'equip de van Eijk, determina mutacions del gen K-ras de mostres obtingudes per EBUS (endobronchial ultrasound bronchoscopy) partint de 32pg d'ADN, l'equivalent a 4-6 cèl·lules, mitjançant PCR quantitativa (VAN EIJK *et al.* 2011). El grup de Sun recomana analitzar més de 30 cèl·lules per detectar les mutacions d'EGFR (SUN *et al.* 2013b) mentre que el grup de Ran analitza les mutacions d'EGFR d'una sola cèl·lula circulant microdisseccionada a partir d'una mostra de sang del pacient, basant-se en l'amplificació de tot el genoma amb un kit comercial (RAN *et al.* 2013).

Així, els resultats d'aquestes tècniques concorden amb els obtinguts per altres treballs de la literatura i per tant, el límit de detecció de les tècniques GeneScan i TaqMan són adequades per analitzar les mutacions d'EGFR.

5.3.2.2 Titulació de l'ADN mutat

Per a proporcions inferiors al 10%, la tècnica de GeneScan no va detectar la deleció de 15pb de la PC9, resultat lleugerament superior al descrit en el treball de Pan, on el percentatge mínim de detecció d'ADN delecionat de la línia H1650, per GeneScan, era del 6,25%. Aquesta diferència pot dependre de la diferent ploïdia (nombre de còpies delecionades) entre línies cel·lulars estudiades (PAN *et al.* 2005). Per una altra banda, tant el grup de Yatabe com el de Young detecten la deleció en una proporció al voltant del 5% per GeneScan, si bé és cert, que el pic corresponent a l'al·lel delecionat té baixa fluorescència en el primer treball (YATABE *et al.* 2006) mentre que Young i els seus col·laboradors obtenen la mateixa detecció amb tècniques tant diferents com ara la seqüenciació Sanger, GeneScan i PCR a temps real (YOUNG *et al.* 2013).

S'han descrit percentatges semblants als d'aquest treball, al voltant del 10%, utilitzant altres mètodes d'anàlisi com l'HRM i la RFLP (ASANO *et al.* 2006; NOMOTO *et al.* 2006; SRIRAM *et al.* 2011).

Per una altra banda, hi ha mètodes amb una detecció superior a la del GeneScan. Per exemple, utilitzant kits comercials, el grup d'Angulo, amb Therascreen i el grup d'O'Donnell amb Cobas, detecten la deleció en un rang del 5 a l'1% (ANGULO *et al.* 2012; O'DONNELL *et al.* 2013). L'equip de Kimura detecta una còpia delecionada d'un control intern d'un kit comercial per cada 1.000 de wt utilitzant sondes escorpion (KIMURA *et al.* 2006b). Altres treballs, basant-se en la tècnica de piroseqüenciació, descriuen un rang de detecció del 5 al 10% (DUFORT *et al.* 2011; TSIATIS *et al.* 2010; QUERINGS *et al.* 2011). Finalment, per la tècnica ME-PCR basada en la digestió dels al·lels wt per enzims de restricció, es detecten les delecions de l'exó 19 per sota de l'1% (SRIRAM *et al.* 2011).

En referència a l'exó 21, la detecció d'una copia mutada respecte a 10 de wt és el descrit en d'altres treballs basats en la tècnica TaqMan (ENDO *et al.* 2005). Utilitzant altres mètodes, com el DHPLC, s'assoleixen deteccions als voltants del 6,5%-5% (COHEN *et al.* 2006; CHIN *et al.* 2007); amb kits comercials, com Therascreen o Cobas, la detecció es situa entre el 5-3% (ANGULO *et al.* 2012; O'DONNELL *et al.* 2013), de la mateixa manera que amb la tècnica PCR-RFLP, amb digestió enzimàtica dels al·lels mutats s'aconsegueix una detecció del 3% (PAN *et al.* 2005). Per HRM, la detecció també es situa al voltant del 5%-10% (BORRAS *et al.* 2011; DO *et al.* 2008; SRIRAM *et al.* 2011).

El fet d'afegir la sonda PNA en la discriminació al·lèlica de l'exó 20 va permetre detectar un al·lel mutat respecte 5.000 al·lels wt, que representa un 0,02%, demostrant que utilitzar aquesta sonda incrementa de forma ostensible la detecció dels al·lels mutats que es troben en proporcions molt baixes respecte als wt. Aquest resultat millora el descrit per l'equip de Miyazawa, que també introdueix la sonda PNA en la discriminació al·lèlica, i que aconsegueixen deteccions d'un al·lel mutat per cada 1.000 wt (0,1%) (MIYAZAWA *et al.* 2008). En la literatura existeixen diverses estratègies per a mutacions de baixa freqüència. Així, Milbury considera que hi ha tècniques de sensibilitat mitjana-alta, que detecten un al·lel mutat respecte a 1.000 de wt, com la PCR-PNA clamping, l'ARMS, l'amplificació específica d'al·lel (ASA) que consisteix en l'amplificació de només un al·lel segons l'encebador que s'hi hagi unit (el que hibrida amb l'al·lel wt o mutat), o una combinació de COLD PCR i TaqMan entre d'altres. Per una altra banda, les tècniques d'alta sensibilitat entre les quals hi ha que enriqueixen els al·lels mutats com la PCR digital o l'APRIL-ATM, que consisteix en la digestió dels al·lels mutats i la posterior lligació dels encebadors durant el procés de PCR de manera que només s'amplifiquen els al·lels mutats. Aquestes tècniques tindrien una sensibilitat d'un al·lel mutat en 10.000 o més al·lels wt (MILBURY *et al.* 2009).

Diversos grups utilitzen la sonda PNA per analitzar la mutació de l'exó 20. Per exemple, l'equip de Guha afegeix PNA en un sistema d'amplificació amb sondes conjugades a partícules magnètiques i compara els resultats amb els obtinguts amb l'anàlisi per la tècnica d'HRM també amb sonda PNA. Aquesta combinació de tècniques anomenada DISSECT (Differential Strand Separation at Critical Temperature) els permet detectar fins a un 0,01% d'al·lels mutats, malgrat que requereix una pre-amplificació prèvia i una posterior sèrie de rentats de les partícules magnètiques que no agilitzen el procés (GUHA *et al.* 2013). Per una altra banda, hi ha treballs que analitzen la mutació T790M amb altres mètodes que seleccionen els al·lels mutats sense utilitzar la sonda PNA. La detecció que aconsegueixen depèn de la tècnica utilitzada: per exemple, el grup de Yatabe, amb la cycleable PCR, detecten un mínim del 5% d'al·lels mutats (YATABE *et al.* 2006) mentre que l'equip de Li, amb una combinació de COLD-PCR i TaqMan, aconsegueix detectar la mutació en una proporció del 0,8% (LI *et al.* 2009).

En un altre rang de detecció i utilitzant la tècnica de MALDI-TOF basada en l'espectrometria de masses, sense cap tipus d'enriquiment dels al·lells mutats, el límit de detecció es situa entre el 0,4 i el 2,2% (Su *et al.* 2012).

La seqüenciació Sanger és una tècnica que, per la seva baixa sensibilitat, no és aplicable per analitzar aquest tipus de mutació. Tot i que s'ha demostrat que el mètode de PCR-PNA clamping és molt més sensible que no pas la seqüenciació convencional (MIYAZAWA *et al.* 2008), s'ha aconseguit un 0,1% de detecció quan s'afegeix la sonda PNA a la reacció (ARCILA *et al.* 2011). Malgrat el desavantatge de la seqüenciació Sanger, els nous avenços en aquest camp han augmentat la capacitat per detectar mutacions de baixa proporció. Així, el grup de Darwato va presentar en l'AACR del 2013 el seu treball referent a la detecció de la mutació T790M mitjançant la plataforma de next generation sequence Ion Torrent amb una detecció del 0,2% (DARWANTO A. 2013). Per una altra banda, i utilitzant la metodologia de deep sequencing, s'aconsegueix una alta sensibilitat detectant un al·lel mutat respecte a 5.000 wt (0,02%) (NARAYAN *et al.* 2012). La piroseqüenciació sembla que presenta la detecció de mutació més baixa, situant-se al voltant del 0,5-1%. Malgrat que aquesta tècnica descriu totes les alteracions del gen, la interpretació dels resultats pot comportar la confusió entre el soroll de fons i les mutacions reals de molt baixa freqüència. Per evitar aquest possible error, el grup de Moskalev introdueix una amplificació intermèdia (nested) per tal de minimitzar aquest soroll de fons respecte a la seqüència real del gen (MOSKALEV *et al.* 2013). Malgrat que els kits comercials de detecció de mutacions són més sensibles que la resta de mètodes d'anàlisi, el seu cost és més elevat i requereixen d'un equipament específic que necessita d'una inversió inicial per tal d'utilitzar-los com a eina diagnòstica.

5.3.2.3 Repetibilitat i reproducibilitat

Tant la repetibilitat com la reproducibilitat d'una tècnica són paràmetres bàsics en la validació d'un mètode analític. Els resultats cal que siguin consistents al llarg del temps, independentment dels lots dels reactius, de les vegades que es repeteixi l'anàlisi i de la persona que realitzi l'experiment (MATTOCKS *et al.* 2010; SAUNDERS G. 1999).

L'equip d'O'Donnell realitza aquestes mateixes comprovacions amb el kit Cobas. Dos operaris analitzen una mostra delecionada de teixit inclòs en parafina de CPCNP utilitzant 2 lots de reactius diferents per duplicat, durant 4 dies, aconseguint 32 rèpliques de la mateixa mostra. Malgrat que una rèplica no va donar un resultat vàlid, en repetir-la de nou es va corregir el resultat (O'DONNELL *et al.* 2013). El grup de Lee, també amb el kit Cobas però aplicat al gen K-ras, va comprovar la repetibilitat mitjançant l'anàlisi de 2 mostres wt i 4 mutades, per part de dos operaris diferents, utilitzant 2 lots diferents de reactius durant 4 dies. Cap de les rèpliques va donar un resultat no esperat (LEE *et al.* 2012).

Respecte a l'exó 20, el grup de Choi utilitza la tècnica de TaqMan associada a la sonda PNA i comprova que, utilitzant tres lots diferents de reactius i realitzant l'anàlisi per triplicat obtenint nou rèpliques per mostra, aquest sistema és totalment reproducible i suficientment robust per aplicar-lo en la detecció de la mutació T790M (CHOI J. 2010).

El fet que al llarg del temps, s'obtinguessin resultats idèntics dels experiments realitzats per persones diferents i amb lots de reactius diferents, avala la idea que tant la tècnica de GeneScan com TaqMan, inclús afegint la sonda PNA en la reacció, són adequades per realitzar aquesta anàlisi ja que petites fluctuacions en el procediment no van influir en els resultats esperats (EDERVEEN 2010). Tenint en compte que tant la reproductibilitat com la repetibilitat van ser del 100%, independentment de la mida de la deleció de la mostra, aquestes noves tècniques es van considerar adequades per analitzar les delecions i mutacions d'EGFR.

5.3.2.4 Sensibilitat i especificitat

Tant la sensibilitat com l'especificitat són també paràmetres clau per avaluar una nova tècnica ja que donen informació dels falsos negatius i falsos positius, respectivament, en comparació amb el mètode estàndard (CHARLTON S. 2000). És primordial que la sensibilitat i l'especificitat del nou mètode estigui al voltant del 100%.

Per avaluar la tècnica de GeneScan i TaqMan, s'analitzaren 170 teixits inclosos en parafina de pacients de CPCNP, comprovant que la comparació dels resultats entre tècniques (GeneScan-Sanger/ TaqMan-Sanger) va coincidir al 100%.

En diversos estudis on s'han provat altres mètodes per detectar les delecions de l'exó 19, com l'HRM, es descriuen sensibilitats al voltant del 80-100% (ELLISON *et al.* 2013; FUKUI *et al.* 2008; PAN *et al.* 2005). D'entre les tècniques descrites, la que presenta més heterogeneïtat a l'hora de determinar la sensibilitat és la IHQ. Diversos treballs posen de manifest que la sensibilitat de detecció és inferior quan s'analitzen les delecions diferents a les més comunes de 15pb (ANGULO *et al.* 2012; COOPER *et al.* 2013; SIMONETTI *et al.* 2010). Aquesta sensibilitat depèn, en gran manera, de la intensitat de positivitat dels immunomarcats. El grup de Brevet exposa que les mostres amb positivitat més elevada (3+) presenten sensibilitats de detecció més alta (al voltant del 100%) que les mostres amb immunomarcats més baixos (del 70%) (BREVET *et al.* 2010; JIANG *et al.* 2013).

La sensibilitat de la tècnica TaqMan per detectar la mutació L858R de l'exó 21 va ser del 100%, que concorda amb el descrit pel grup d'Endo, d'aproximadament el 96,5%, corroborant la idoneïtat d'aquest mètode per analitzar aquesta mutació (ENDO *et al.* 2005). Paral·lelament, hi ha diversos treballs en la bibliografia amb sensibilitats properes al 100% que utilitzen altres mètodes de detecció com l'HRM (DO *et al.* 2008; TAKANO *et*

al. 2007), una combinació de digestió enzimàtica comercial (SURVEYOR) i HPLC (JANNE *et al.* 2006) o la piroseqüenciació (DUFORT *et al.* 2011). Per una altra banda, la tècnica de IHQ, com per a l'exó 19, és la que presenta més variabilitat: mentre que el grup de Kato descriu sensibilitats al voltant del 75%, l'equip de Simonetti assoleix el 100% (KATO *et al.* 2010; SIMONETTI *et al.* 2010).

L'especificitat de les tècniques de GeneScan i TaqMan va ser del 100%. Aquest resultat concorda amb el del treball de l'equip de Yatabe i el de Molina-Vila, ambdós utilitzant la tècnica de GeneScan per detectar delecions (MOLINA-VILA *et al.* 2008; YATABE *et al.* 2006). Respecte als altres mètodes descrits en la bibliografia, les especificitats obtingudes són molt semblants (99%-100% IHQ) (ANGULO *et al.* 2012; BREVET *et al.* 2010), 90%-100% HRM (Do *et al.* 2008; NOMOTO *et al.* 2006), 98% per piroseqüenciació (DUFORT *et al.* 2011). De la mateixa manera, s'assoleixen especificitats semblants a la tècnica TaqMan amb altres mètodes de cribatge com la piroseqüenciació (MOSKALEV *et al.* 2013) o la NGS (BUTTITTA *et al.* 2013), com en mètodes de detecció dirigida com la IHQ (KITAMURA *et al.* 2010; SIMONETTI *et al.* 2010), l'HRM (Do *et al.* 2008) o el kit Cobas (LOPEZ-RIOS *et al.* 2013).

Aquests resultats tan favorables de sensibilitat i especificitat respecte a la seqüenciació Sanger són el reflex de la importància de la microdissecció de les zones tumorals de les mostres. Així, només s'analitzen les cèl·lules neoplàsiques, sense la interferència d'altres tipus cel·lulars que poden comprometre la detecció de les alteracions genètiques si es troben en una proporció inferior al límit de detecció del mètode d'anàlisi. Aquest aspecte és cabdal en el cas d'analitzar mostres de teixit congelat que preserva la integritat del material genètic però no permet la selecció tumoral per microdissecció d'una manera senzilla. En aquests casos, la sensibilitat de la tècnica utilitzada és primordial per detectar les mutacions pròpies de les cèl·lules tumorals que es troben en proporcions més baixes que les wt.

Diversos autors han desenvolupat sistemes d'avaluació de la sensibilitat i especificitat sense basar-se en els resultats de la seqüenciació quan aquest mètode, com en el cas de l'anàlisi de la mutació T790M de l'exó 20, no és aplicable. En aquest treball es va fer la comparació amb el kit TMDA, una modificació del mètode TaqMan, que detectava un al·lel mutat respecte a 100 wt (1%). Malgrat que millorava el percentatge de detecció de la seqüenciació Sanger, aquest límit era inferior a l'obtingut incorporant la sonda PNA a la reacció TaqMan, que era del 0,02%. En aquest cas, es van detectar més mutacions T790M amb la discriminació al·lèlica amb PNA que amb el kit comercial. Es va aplicar la fórmula proposada pel grup d'Arcila on es comparaven els resultats obtinguts per seqüenciació Sanger (mètode de referència) amb els obtinguts per la mateixa tècnica afegint una sonda LNA-PNA, amb la que es detectaven molts més mutats T790M (0,1% enfront 12,5%, respectivament) (ARCILA *et al.* 2011). Així, s'obtingué una sensibilitat de la tècnica TaqMan associada a la sonda PNA del 93%, molt semblant a la descrita en la bibliografia, de pràcticament el 100% (MIYAZAWA *et al.* 2008). Aquest resultat també és

comparable amb els descrits per Tanaka i Yeo que, basant-se en la PCR-PNA clamping i analitzant mostres de diferent origen (teixits inclosos en parafina, líquids pleurals, esputs, etc.), assoleixen sensibilitats del 97% i 89%, respectivament (TANAKA *et al.* 2007; YEO *et al.* 2013). Per una altra banda, i enriquint els al·lels mutats mitjançant una digestió enzimàtica i la posterior anàlisi per la tècnica d'HPLC, s'ha descrit una sensibilitat del 100% en l'anàlisi de mostres de CPCNP (JANNE *et al.* 2006).

En diversos treballs es calcula l'especificitat, relacionada amb els falsos positius, a través de la repetició de l'anàlisi d'individus sans o de pacients sense càncer de pulmó (HE *et al.* 2013; MIYAZAWA *et al.* 2008) o bé mitjançant la validació clínica dels resultats de la determinació de la mutació T790M (YATABE *et al.* 2006). Els resultats de l'anàlisi dels individus sans demostren que l'especificitat de la tècnica va ser del 100% ja que no es va detectar cap mutació T790M. Aquest resultat concorda amb el publicat en d'altres treballs que utilitzen la sonda PNA (MIYAZAWA *et al.* 2008; YEO *et al.* 2013), mentre que la descrita pel grup de Jänne és lleugerament inferior (JANNE *et al.* 2006).

Per una altra banda, per tal de discernir els pacients mutats dels que no ho són, hi ha autors que, basant-se en la tècnica de TaqMan (i per defecte la TMDA) utilitzen el cycle threshold (Ct) d'amplificació dels al·lels wt i mutat per fer la següent comparació: si la diferència de Ct entre l'al·lel mutat i l'al·lel wt (ΔCt) és menor o igual al *cutt-off* (determinat experimentalment) la mostra es considera mutada; si la ΔCt és superior al *cutt-off*, la mostra és wt (DIDELOT *et al.* 2012; ROMA *et al.* 2013). Aquest mètode l'utilitza el grup de Costa comparant el Ct de les mostres amb la sonda PNA respecte al de les que no se'ls ha afegit en la discriminació al·lèlica (COSTA *et al.* 2014).

5.3.2.5 Heterogeneïtat tumoral

L'heterogeneïtat és un fenomen molt freqüent en els tumors humans que comporta, en força ocasions, canvis respecte al fenotip original, metabolisme, mobilitat o proliferació de les cèl·lules (GERLINGER *et al.* 2012). Aquests canvis poden explicar-se pel fet que les cèl·lules tumorals segueixen un patró de divisions cel·lulars molt més actiu que la resta de cèl·lules de l'organisme, incrementant-se així la possibilitat d'errors en la replicació. L'existència de diverses clonalitats dins el mateix tumor provoca una sèrie de canvis que poden arribar inclús a modular, per exemple, la resposta al tractament tal com ja s'ha observat en la leucèmia mieloide crònica (FISHER *et al.* 2013; MARUSYK and POLYAK 2010). En aquest aspecte, una biòpsia puntual potser no és prou representativa del conjunt del tumor ja que pot tenir clones cel·lulars que, malgrat l'origen comú de tot el tumor, poden haver evolucionat independentment de la resta (YAP *et al.* 2012). Per tant, és important conèixer l'heterogeneïtat del tumor per administrar al pacient el tractament més adient (CROCKFORD *et al.* 2014; TANIGUCHI *et al.* 2008).

Es van microdisseccionar diverses zones tumorals de la mateixa mostra i es van analitzar les mutacions d'EGFR. No es va trobar heterogeneïtat tumoral per als exons 19 i 21 malgrat que en la bibliografia hi ha resultats contradictoris. El grup de Bai, analitzant l'heterogeneïtat de 85 pacients (2669 àrees tumorals) de CPCNP, va trobar, mitjançant les tècniques de HPLC i ARMS, una heterogeneïtat d'aproximadament un 30% (BAI *et al.* 2013). Aquest resultat és totalment contradictori al descrit en el treball de Yatabe on concorden els resultats de totes les àrees tumorals, analitzades per GeneScan i cycleave PCR (modificació de la PCR on hi ha una sonda híbrida ADN-ARN que s'uneix a l'ADN amplificat i que emet fluorescència per digestió enzimàtica), de 2781 tumors de CPCNP (YATABE *et al.* 2011).

Un dels problemes limitants, respecte a la detecció de l'exó 20, és l'alta heterogeneïtat d'aquesta alteració dins el tumor. Segons el grup de Kobayashi, l'aparició de la mutació es dona només en algunes de les cèl·lules tumorals i és durant el tractament amb ITQ, que desapareixen les cèl·lules sensibles i la resistència al fàrmac es fa evident (KOBAYASHI *et al.* 2005). Aquest fet comporta que l'heterogeneïtat d'aquesta mutació sigui més elevada respecte a les anteriors. Malgrat que hi ha diversos treballs sobre l'heterogeneïtat de les mutacions de l'exó 19 i 21, hi ha pocs grups que analitzin la de l'exó 20 per la dificultat de detecció. Es va comprovar que la mutació T790M no es detectava en cap de les diferents àrees analitzades de teixit wt. Per contra, hi havia àrees tumorals de la mateixa mostra mutada T790M que presentaven la mutació mentre que hi havia àrees que eren wt. Aquest fenomen també el descriu el treball de Jiang on van analitzar, per seqüenciació Sanger, diversos clusters cel·lulars microdisseccionats del teixit inclòs en parafina de 3 pacients després d'haver rebut tractament amb ITQ (JIANG *et al.* 2008). Per tant, el que s'hagi detectat o no la mutació potser depèn de la tècnica utilitzada. Per una altra banda, el grup de Yatabe comenta una teoria desenvolupada per l'equip de Gazdar arran d'un estudi realitzat en línies cel·lulars en què es va comprovar el desequilibri entre els al·lels mutats i wt (GANDHI *et al.* 2009). Aquest desequilibri, anomenat MASI (Mutant Al·lel-Specific Imbalance) on només els al·lels mutats pateixen una amplificació (augment del nombre de còpies) comportaria una descompensació de proporcions entre els al·lels wt-mutat provocant una mena de *pseudoheterogeneïtat*. Una altra explicació rauria en el fet que l'amplificació del nombre de còpies d'un gen es produeix, sobretot, en les cèl·lules de la zona tumoral més invasiva. Si el mètode de detecció no és prou sensible, les zones perifèriques del tumor es detectarien wt mentre que les més internes apareixerien mutades, donant la falsa sensació d'heterogeneïtat tumoral real (YATABE *et al.* 2011).

Tal com ja s'ha descrit anteriorment, tant per analitzar les mutacions de les mostres de teixit inclòs en parafina com les de poca cel·lularitat tumoral es van microdisseccionar diferents àrees dins de la mateixa mostra de tumor fins assolir, aproximadament 0,7mm² i 0,12mm² de teixit, respectivament. D'aquesta manera, el resultat wt de les

mostres no només es refereix a una sola zona tumoral evitant l'esbiaix respecte a l'heterogeneïtat del tumor.

Molt diferent és l'heterogeneïtat entre el tumor primari i les metàstasis o els nòduls limfàtics afectes, tema àmpliament estudiat per diferents grups. Així com els resultats són semblants en l'anàlisi publicat pel grup de Chen (amb diferència del 14%) (CHEN *et al.* 2012b) i el de Park (al voltant d'un 17%) utilitzant dues tècniques de detecció diferents, seqüenciació Sanger i anàlisi d'heterodúplex (PARK *et al.* 2009), les discordances arriben al 30% (BAI *et al.* 2013). Hi ha autors que consideren que part d'aquesta diferència entre els tumors primaris i les matàstasis recau en el mètode d'anàlisi: si s'utilitza una tècnica de detecció de baixa sensibilitat no es detectaran les mutacions de baixa freqüència per quedar emmascarades per la resta de cèl·lules wt (CHEN *et al.* 2012b). S'ha de tenir en compte que, les noves tecnologies associades a la seqüenciació massiva o NGS amb una sensibilitat més alta, comporten la possibilitat de detectar noves mutacions no descrites en tumors ja tipificats com, per exemple, el càncer de mama (SHAH *et al.* 2009). Des d'un punt de vista més histològic, hi ha autors que expliquen el fenomen de l'heterogeneïtat a través de la coexistència de diversos tipus histològics en la mateixa massa tumoral (NAKANO *et al.* 2008) o bé a l'existència de més d'un tumor primari (MA *et al.* 2010).

De totes maneres, hi ha força controvèrsia respecte a aquest tema ja que hi ha autors que no troben pràcticament diferències entre els tumors primaris i les metàstasis (YATABE *et al.* 2011) mentre que hi ha d'altres que descriuen concordances del 98% (ARCILA *et al.* 2011).

5.4 Validació analítica de les tècniques de GeneScan i TaqMan en mostres d'ADN circulant de sang perifèrica

El teixit inclòs en parafina és el tipus de mostra més utilitzada per realitzar l'anàlisi genètic dels pacients ja que no només preserva l'estructura del teixit, permetent aplicar tècniques basades en característiques morfològiques, sinó que a més, és el format bàsic d'emmagatzematge de les mostres biològiques.

En els pacients avançats, l'obtenció d'una biòpsia és, en molts casos, inviable. La necessitat d'analitzar les mutacions d'EGFR ha comportat la recerca d'altres tipus de mostra que poguessin substituir la manca de teixit, que fossin fàcils d'adquirir i que s'obtinguessin d'una forma no invasiva per al pacient. En la bibliografia hi ha qui aposta per analitzar fluids corporals com ara el líquid cefaloraquídi (KAWAHARA *et al.* 2011) o el pleural (KIMURA *et al.* 2006a; LIU *et al.* 2011b) malgrat que les tècniques utilitzades, IHQ,

ARMS i seqüenciació Sanger, respectivament, no són les més sensibles per a aquest tipus de mostra. També s'han descrit les mutacions d'EGFR en mostres citològiques d'esputs (HUBERS *et al.* 2013).

Tal com ja s'ha comentat en la introducció, l'ADN circulant de la sang perifèrica ha estat àmpliament estudiat des que l'any 1948 va ser descrit per primer cop per Mandel i Métais (MANDEL and MÉTAIS 1948). De totes maneres, no va ser fins 30 anys més tard que es descobrí l'origen tumoral de part d'aquest ADN quan es correlacionaren les alteracions detectades en el teixit tumoral i en la sang perifèrica del mateix pacient oncològic (LEON *et al.* 1977). A partir d'aquell moment es van focalitzar els esforços per utilitzar aquest material genètic en l'anàlisi de les alteracions tumorals. Malauradament, en molts treballs s'ha publicat que aquest ADN circulant, a part de trobar-se en pacients de diverses patologies, també es pot detectar en individus sans tot i que en concentracions més baixes. S'ha de tenir present que hi ha processos que no estan estrictament relacionats amb la malaltia oncològica, com ara inflamacions, infeccions o inclús esforços intensos, que alliberaren ADN al torrent sanguini. Aquest fet, juntament amb els processos naturals com l'apoptosi o la necrosi, i més concretament en pacients oncològics, l'alliberament actiu d'ADN per les cèl·lules tumorals, la lisi de micrometàstasis en llocs distants o l'increment d'ADN circulant per l'acció del tractament amb quimioteràpia, provoca que els al·lels mutats que puguin haver estat alliberats pel tumor quedin diluïts davant d'aquests al·lels wt provinents de fonts diverses (JUNG *et al.* 2012; MITTRA *et al.* 2012; SCHWARZENBACH *et al.* 2011).

Hi ha tres punts clau que influeixen, en gran manera, en la detecció de les mutacions en l'ADN circulant: els factors preanalítics, la quantitat d'ADN obtingut durant l'extracció i la sensibilitat de la tècnica utilitzada per analitzar-les.

Una part molt important de la degradació de l'ADN circulant recau en els processos preanalítics com ara el tipus de tub utilitzat en l'extracció de la sang perifèrica, el tipus d'anticoagulant del tub, el temps entre l'extracció de la sang i el seu processament, la temperatura d'emmagatzematge, etc. Per exemple, l'heparina utilitzada com anticoagulant inhibeix les amplificacions per PCR (BEUTLER *et al.* 1990) mentre que l'EDTA és el que menys influeix en posteriors anàlisis (LAM *et al.* 2004). Paral·lelament, es recomana que la sang es centrifugui a baixes velocitats i durant les dues hores posteriors a l'extracció per evitar la lisi de les cèl·lules nucleades presents en el torrent sanguini que, en lisar-se, contaminen la mostra d'ADN wt (UMETANI *et al.* 2006; XUE *et al.* 2009). La manca d'estandarització en tots aquests processos inicials malmeten la integritat de l'ADN que dificulta la posterior anàlisi.

El mètode d'extracció d'ADN, el nombre de processos de congelació-descongelació, el temps i la temperatura d'emmagatzematge, etc. també condicionen la quantitat i qualitat de l'ADN circulant (BENESOVA *et al.* 2013; EL MESSAOUDI *et al.* 2013). En la

bibliografia, malgrat que es recomana utilitzar el mètode d'extracció basat en el fenol-cloroform-àlcohol isoamílic per recuperar els fragments més llargs (YUAN *et al.* 2012), en la majoria de treballs s'utilitza el kit comercial de Qiagen, que segons l'estudi de Hufnagl, és dels que més quantitat d'ADN recupera d'entre els kits comercials estudiats (HUFNAGL C. 2013), a més de ser fàcil i ràpid d'utilitzar (BENESOVA *et al.* 2013). La concentració mitjana d'ADN circulant recuperat és, aproximadament, de 180ng/ml (GORMALLY *et al.* 2007; SCHWARZENBACH *et al.* 2011).

Per últim, malgrat que l'ADN circulant compleix les característiques necessàries per utilitzar-se com alternativa al teixit inclòs en parafina, la baixa concentració dels al·lells mutats i la seva alta fragmentació comporta l'ús de metodologies amb elevada sensibilitat. Cal tenir present que la baixa freqüència d'algunes mutacions en el mateix tumor determinen la baixa concentració d'al·lells mutats alliberats al torrent sanguini, dificultant, encara més, la seva detecció. Malgrat que el grup de Kimura analitza les mutacions d'EGFR del sèrum de 27 pacients per seqüenciació Sanger (KIMURA *et al.* 2006), la sensibilitat d'aquesta tècnica no és l'adequada per detectar les mutacions en aquest tipus de mostra tal com demostren els treballs publicats que comparen la seqüenciació directa respecte a la PNA-PCR clamping (HAN *et al.* 2012; KIM *et al.* 2012a). Per detectar les mutacions d'EGFR en sang perifèrica altres grups han aplicat l'HPLC (BAI *et al.* 2009), l'espectrometria de masses associada a una amplificació posterior de l'ADN circulant (BREVET *et al.* 2011) o la plataforma d'Illumina (MURTAZA *et al.* 2013). Paral·lelament, s'ha utilitzat la tècnica de deep sequencing adaptada a la recerca de mutacions en proporcions baixes en ADN molt fragmentats en el plasma dels pacients de càncer d'ovari (FORSHEW *et al.* 2012) o mitjançant el kit DxS que combina la tècnica ARMS i les sondes escorpions en l'anàlisi dels sèrums dels pacients de l'IPASS (GOTO *et al.* 2012).

Una altra estratègia ha estat la incorporació de la sonda proteica PNA en les amplificacions per PCR (CHEN *et al.* 2012a; SUTANI *et al.* 2006; KIM, LEE *et al.* 2013; YEO, KIM *et al.* 2013). Aquesta tècnica és coneguda com PNA-PCR clamping i inhibeix l'amplificació d'un dels al·lells, en aquest cas els wt tal com ja s'ha explicat anteriorment. La sonda PNA és àmpliament utilitzada en la literatura no només en l'estudi de mutacions (JANG *et al.* 2010) sinó també per a la regulació gènica mitjançant el silenciament de l'expressió (KAIHATSU *et al.* 2004); detecció de gens, ja sigui com a sonda o en microarrays (METAFERIA *et al.* 2013; SHAKEEL 2006); combinades amb fluorocroms, s'utilitzen com sondes amb alta especificitat d'unió en proves citogenètiques (CANELA *et al.* 2007; PAULASOVA and PELLESTOR 2004) o per detectar polimorfismes (GAYLORD *et al.* 2005), entre d'altres aplicacions. Hi ha d'altres sistemes de PCR clamping com el QClamp (DiaCarta) per detectar mutacions en sang perifèrica que el grup de Powell encoratja a utilitzar arran els bons resultats obtinguts en la detecció de les mutacions de JACK-2 amb una sensibilitat al voltant del 0,01% (POWELL M. 2014).

Quan en aquest treball es parla de sang perifèrica es fa referència tant al sèrum com al plasma del pacient. En la literatura hi ha divergència d'opinions respecte a quina de les dues fonts d'ADN circulant és la més adequada per analitzar alteracions genètiques. Hi ha diversos treballs que comproven que la concentració d'ADN circulant és més elevada en mostres de sèrum que en les de plasma (LEE *et al.* 2001). Aquesta més alta concentració d'ADN del sèrum prové de la contaminació de l'ADN dels limfòcits que l'alliberen quan es forma el coàgul en el tub d'extracció sanguínia, incrementant els al·lels wt de la mostra (UMETANI *et al.* 2006). Respecte a la determinació de les mutacions d'EGFR, en aquest treball s'ha comprovat que no hi ha diferència en detectar les mutacions en un o altre tipus de mostra: hi ha mutacions detectades en sèrum i no en plasma i *viceversa*, malgrat que en la literatura hi ha autors que es decanten per una o altra mostra. Així doncs, hi ha treballs que només analitzen les mutacions d'EGFR en el plasma (BAI *et al.* 2009; DOUILLARD *et al.* 2014; KIM *et al.* 2013; MACK *et al.* 2009) o només en el sèrum (HU *et al.* 2012; JIANG *et al.* 2011; KIM ST 2013; YEO *et al.* 2013).

Com que les tècniques de GeneScan i TaqMan ja s'havien utilitzat per detectar les mutacions d'EGFR, inclús en mostres de teixit amb poca cel·lularitat tumoral, es va pensar en aplicar-les en l'anàlisi de la sang perifèrica.

5.4.1 Optimització de les tècniques de GeneScan i TaqMan

Per posar a punt aquestes tècniques es va partir de les condicions d'amplificació que ja s'havien optimitzat en l'anàlisi de l'ADN de teixit inclòs en parafina, afegint la sonda PNA a la reacció. Així com amb una sola PCR va ser suficient per analitzar les mostres de teixit inclòs en parafina, per amplificar l'ADN circulant va ser necessària una *nested* PCR. Paral·lelament, l'anàlisi per discriminació al·lèlica de la mutació L858R va requerir un augment del número de cicles d'amplificació i del temps d'elongació respecte al protocol establert per a mostres de teixit. Això es deu, sens dubte, a la baixa concentració d'ADN circulant obtingut de l'extracció malgrat que s'havia modificat el protocol respecte a les indicacions del fabricant, per augmentar la concentració final. Aquestes modificacions van consistir en fer l'extracció de dues rèpliques de sèrum i plasma independentment, per ajuntar al final els eluïts en només 50µl de tampó AE.

El rang de concentració de treball de la sonda PNA que recomana el fabricant és de 0,05 a 10µM. Es van provar diferents concentracions de sonda tant en les amplificacions per PCR de l'exó 19 com en la reacció TaqMan de l'exó 21. Com que aquesta sonda inhibeix l'al·lel wt, es van haver de modificar els controls que s'utilitzaven fins al moment ja que la no amplificació d'una mostra no només podia significar absència ADN: va ser necessari afegir controls wt i mutats, amb i sense la sonda PNA en la reacció, per tal d'assegurar la

correcta interpretació dels resultats, tal com s'ha explicat en l'apartat de pacients, materials i mètodes.

5.4.2 Avaluació de les tècniques

Tot i que aquestes dues tècniques ja s'havien avaluat per analitzar les mutacions en mostres de teixit inclòs en parafina, calia determinar si detectaven aquestes alteracions en l'ADN circulant de la sang perifèrica dels pacients. Segons diversos treballs, la mida dels fragments més curts de l'ADN circulant oscil·len entre els 70 i 200pb (FORSHEW *et al.* 2012; SCHWARZENBACH *et al.* 2011) i és en aquests fragments on hi ha més possibilitat de trobar les alteracions genètiques (DIEHL *et al.* 2008). Es van utilitzar els mateixos encebadors i sondes que ja s'havien emprat en les amplificacions de teixit inclòs en parafina per què els amplicons generats eren suficientment curts com per utilitzar-se en aquest tipus de mostra.

5.4.2.1 Límit de detecció

El límit de detecció d'ambdues tècniques va ser de 5ng/ μ l que representen 10pg d'ADN mutat, resultat que concorda perfectament amb l'obtingut de l'anàlisi de teixit inclòs en parafina. Aquests resultats són molt semblants als descrits pel grup de Sanders que utilitza una digestió enzimàtica per enriquir la població d'al·lels wt i una posterior amplificació amb els encebadors marcats amb fluorocroms en mostres de plasma. Per detectar la mutació de l'exó 21 afegeixen en la reacció una sonda LNA, de característiques molt similars a les sondes PNA (SANDERS 2008). Per una altra banda, el grup de Kimura, que analitza les mutacions del sèrum extret abans del tractament amb gefitinib mitjançant el kit DxS, detecta fins a 1pg d'ADN mutat (KIMURA *et al.* 2006c). De la mateixa manera, el grup de Nakamura, utilitzant una tècnica basada en la inhibició dels al·lels wt i en la detecció per dissociació de gradient de temperatura de sondes marcades amb fluorocroms, detecta les delecions i la mutació L858R de 5pg i 40pg, respectivament (NAKAMURA *et al.* 2012).

Segons aquests resultats la utilització de la sonda PNA és vàlida per detectar alteracions genètiques en baixes freqüències.

5.4.2.2 Titulació de l'ADN mutat

La proporció mínima d'al·lel mutat respecte a wt per ser detectat per ambdues tècniques va ser, tal com es descriu en resultats, d'un 0,02%, que representa un al·lel mutat respecte 5.000 al·lells wt. Aquest resultat és més favorable que el descrit pel grup de Yung, que analitza les mutacions d'EGFR per PCR digital, que combina la tecnologia TaqMan amb un sistema de captació de fluorescència que permet quantificar l'ADN amplificat. En aquest treball detecten un al·lel mutat respecte a 1.000 wt, un 0,1%, en mostres de plasma de pacients abans del tractament amb ITQ (YUNG *et al.* 2009). Un dels inconvenients que presenta aquesta tècnica respecte al GeneScan és que per detectar les delecions de l'exó 19, el grup de Yung utilitza unes sondes dissenyades només per detectar les delecions de 15pb que, tot i ser les més freqüents, no són les úniques descrites en aquest exó. En el mateix rang de detecció i utilitzant el kit DxS, es descriuen percentatges del 0,1% per a l'exó 19 (KIMURA *et al.* 2007; MACK *et al.* 2009) mentre que Kimura detecta un al·lel mutat respecte 10.000 wt (0,01%) per a l'exó 21. Per una altra banda, no utilitzar d'estratègies específiques per analitzar aquest tipus de mostra comporta pitjors percentatges de detecció tal com demostra l'equip de Bai que, basant-se en la tècnica d'HPLC, detecta l'al·lel mutat només si es troba en una proporció superior al 3% respecte els wt (BAI *et al.* 2009).

En d'altres treballs que s'utilitza la sonda PNA per analitzar mutacions, es descriuen proporcions de detecció inferiors. Per exemple, els grups de Nagai, Tanaka i Sutani obtenen un 0,1% de detecció en línies cel·lulars i en mostres de diferent origen (teixit inclòs en parafina, rentats broncoalveolars, esputs, líquids pleurals...), respectivament (NAGAI *et al.* 2005; SUTANI *et al.* 2006; TANAKA *et al.* 2007). Per una altra banda, afegint la sonda PNA en reaccions de PCR quantitativa a temps real i amb la tècnica PNA-PCR-clamplig s'assoleixen deteccions de l'1% tant per a l'exó 19 com pel 21 en línies cel·lulars (CHOI J. 2010; HAN *et al.* 2012).

5.4.2.3 Repetibilitat i reproducibilitat

Es va avaluar tant la repetibilitat com la reproducibilitat de les tècniques de GeneScan i TaqMan aplicades a l'anàlisi de les mostres de sang perifèrica per tal d'assegurar que els resultats que s'obtenien eren constants al llarg del temps, independentment dels lots dels reactius, de les vegades que es repetia l'anàlisi i de la persona que realitzava l'experiment (EDERVEEN 2010). Els resultats obtinguts van ser del 100% per ambdues tècniques i, en el cas de l'exó 19, independentment de la delecio de la mostra.

La repetibilitat i reproducibilitat de les PCR en què s'ha afegit la sonda PNA també ha estat estudiat en el treball de Choi, on van analitzar les mutacions dels exons 19 i 21 utilitzant tres lots diferents de reactius, per triplicat, obtenint nou rèpliques per mostra.

La conclusió que n'extreu és que aquest sistema d'inhibició amb sonda PNA és totalment reproducible i suficientment robust per a la seva aplicació en la detecció de mutacions (CHOI J. 2010).

5.4.2.4 Sensibilitat i especificitat

La manca de mètode estàndard per analitzar les mutacions d'EGFR en l'ADN de sang perifèrica comporta que les úniques eines disponibles d'avaluació siguin o bé la comparació dels resultats amb els obtinguts de l'anàlisi de les mutacions del teixit inclòs en parafina, o bé la corroboració dels resultats obtinguts amb les característiques clínicopatològiques esperades dels pacients mutats i la seva influència en la resposta al tractament, la supervivència i la PFS. La comparació amb els resultats obtinguts del corresponent teixit inclòs en parafina dona una idea força exacta de la seva sensibilitat abans de realitzar la correlació amb les característiques dels pacients. Una sensibilitat o una especificitat molt baixa ja indicaria que no seria adequada per a la seva utilització.

Les sensibilitats obtingudes per aquestes dues tècniques, afegint la sonda PNA en tots els experiments, van ser del 64% i 53% respectivament, amb una especificitat per ambdues del 98,5%. Aquest paràmetre indica que hi ha una sèrie de casos que, malgrat ser positius en teixit, aquestes tècniques no els detecten mutats. Tot i així, pràcticament no s'obté cap resultat positiu en l'anàlisi de la sang perifèrica que fos negatiu en teixit (especificitat aproximada del 100%). S'observa força disparitat de resultats quan es comparen amb els de la literatura. Brevet i el seu equip, en analitzar les mutacions en les parelles de teixit inclòs en parafina i la seva corresponent mostra de plasma, van obtenir una sensibilitat per espectrometria de masses del 36% per a l'exó 19 i del 75% per a l'exó 21, amb un 80% d'especificitat (BREVET *et al.* 2011). Paral·lelament, i sense separar per exons, l'equip de Goto, utilitzant el kit DxS en els pacients de l'IPASS i el grup de Douillard, utilitzant el kit Therascreen, aconseguen una sensibilitat del 43% i 66% i una especificitat del 100%, respectivament, (DOUILLARD *et al.* 2014; GOTO *et al.* 2012). Per una altra banda, la tècnica de PCR digital dona uns resultats de sensibilitat i especificitat del 100% (YUNG *et al.* 2009).

Utilitzant la sonda PNA per detectar mutacions, l'equip de Kim publica uns resultats molt semblants als que s'han obtingut en aquest treball, en quant a sensibilitat de l'exó 19 i especificitat en general, en analitzar l'ADN de sang perifèrica abans del tractament i dos mesos després d'haver-lo començat (sensibilitat del 70% per a l'exó 19 i d'un 30% per al 21) amb una especificitat del 100% (KIM *et al.* 2013). Amb una sensibilitat de la tècnica una mica més elevada, el grup de Choi, sense separar els resultats per exons obté una sensibilitat del 83,3% amb una especificitat del 100% (CHOI J. 2010). Per una altra banda, en analitzar les mutacions en líquid pleural, el grup de Yeo obté una sensibilitat del 89% i una especificitat del 100% sense separar per exons (YEO *et al.* 2013).

5.5 Validació clínica de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR en teixit inclòs en parafina dels pacients de l'SLADB i l'EURTAC

Els resultats de la reanàlisi pels mètodes de GeneScan i TaqMan dels pacients mutats detectats per seqüenciació Sanger en la validació clínica d'aquesta tècnica, van concordar perfectament. Per tant, i un cop comprovat per comparació amb altres estudis que les tècniques de GeneScan i TaqMan eren adequades per detectar les mutacions d'EGFR, es van aplicar en l'anàlisi de mostres de pacients per validar, des d'un punt de vista clínic, els resultats de l'anàlisi de les mutacions.

Malgrat que l'anàlisi es realitzà independentment i que l'objectiu de l'SLADB i EURTAC responia a plantejaments molt diferents, la discussió dels resultats es farà de manera conjunta, si bé la conclusió que se n'extreu d'un i altre serà diferent, d'acord amb el respectiu objectiu.

S'analitzaren les mutacions d'EGFR dels 2105 pacients inclosos en l'SLADB per comparar els resultats amb els descrits en la literatura en referència a les característiques clínico-patològiques dels pacients mutats, el percentatge de mutacions, la resposta al tractament, la supervivència i el temps a la progressió.

Posteriorment, i basant-se en la informació obtinguda de l'anàlisi dels pacients de l'SLADB, el Grupo Español de Cáncer de Pulmón va impulsar l'assaig clínic obert i multicèntric fase III EURTAC on els pacients avançats, mutats del gen EGFR, es van aleatoritzar per rebre quimioteràpia convencional o erlotinib en primera línia. En el reclutament dels pacients van participar 42 hospitals de França, Itàlia i Espanya. Es van analitzar 1227 pacients des del febrer del 2007 fins al gener del 2011 dels quals 173 se'ls van detectar mutacions en el gen EGFR i van ser inclosos en l'estudi.

El percentatge de pacients mutats va ser del 16,6% en l'SLADB i del 14% en l'EURTAC que concorda perfectament amb la descrita en la bibliografia per a la població caucàsica (DOUILLARD *et al.* 2014; PAO *et al.* 2004). Respecte a la freqüència per exons, les delecions de l'exó 19 es van detectar en el 62,2% i 66,5%, respectivament, mentre que les mutacions L858R de l'exó 21 van ser del 41,5% i 33,5%, respectivament. Aquesta dada també concorda perfectament amb la descrita en la bibliografia (60% de delecions enfront el 40% de la mutació de l'exó 21) (EBERHARD *et al.* 2005; MITSUDOMI *et al.* 2005).

Es va comprovar que els pacients mutats complien amb les característiques clínico-patològiques tipus (SLADB i EURTAC, respectivament): sexe femení (69,7% i 73%), no fumador (66,6% i 69,3%) i amb histologia d'adenocarcinoma (80,9% i 92,4%). S'han realitzat diversos estudis per explicar la freqüència més alta de mutacions d'EGFR en pacients de sexe femení. Per exemple, el treball de Bell analitza els enzims relacionats en la biosíntesi i metabolisme dels estrogens tant en individus wt com mutats d'ambdós

sexes sense trobar cap relació (BELL *et al.* 2008), o el treball de Tanaka que posa de manifest que aquesta freqüència més alta de mutacions no depèn del gènere sinó que simplement és el reflex de l'alta incidència de l'adenocarcinoma en el sexe femení (TANAKA *et al.* 2010). Tot i així s'ha de tenir present que les delecions de l'exó 19 són més freqüents que la mutació L858R i en canvi és el sexe femení el que s'ha relacionat amb aquesta darrera mutació (TANAKA *et al.* 2010; TOKUMO *et al.* 2005). Es van detectar mutacions en pacients amb carcinoma de cèl·lules grans amb un percentatge inferior al 10%. En els treballs de Yanagisawa o Sasaki es descriuen percentatges de mutació similars en aquest tipus histològic (SAKAI *et al.* 2013; YANAGISAWA *et al.* 2012). Finalment, el treball de Maemondo descriu percentatges al voltant del 34% en pacients fumadors amb mutacions d'EGFR (MAEMONDO *et al.* 2010).

La resposta assolida pels pacients de l'SLADB tractats en primera línia amb erlotinib va ser del 73,5%, resultat que concorda amb d'altres treballs com l'IPASS, el NEJSG002 o el WJTOG3405 (MAEMONDO *et al.* 2010; MOK *et al.* 2009). Els pacients tractats amb aquest fàrmac en línies posteriors va ser del 67,4%, resultat semblant al que descriu Sutani en el seu treball on avalua la resposta de 27 pacients mutats d'EGFR, tractats amb gefitinib en segona línia (78%) (SUTANI *et al.* 2006).

En estudis amb pacients no seleccionats per les mutacions d'EGFR, s'han descrit respostes al tractament similars quan s'administra ITQ en segona línia o posteriors. Per exemple, el grup de Ahn analitza 120 pacients coreans que van assolir respostes a erlotinib en primera i segona línia del 32% i 25% ($p=0,533$). De la mateixa manera, el grup de Fukuoka, en l'IDEAL-1, o el grup de Shepherd en l'estudi BR.21 no troben cap diferència en la resposta dels pacients tractats en segona o tercera línia amb gefitinib, situant-se, en l'IDEAL-1, al voltant del 20% (FUKUOKA *et al.* 2003; SHEPHERD *et al.* 2005). Aquesta manca de diferència entre respostes contradiu els resultats obtinguts per altres estudis com l'ISEL, on es van assolir respostes molt menors en pacients tractats en segona línia respecte als de primera línia (KRIS M. 2009) o el treball de Massarelli que descriu com la resposta va disminuint a mida que s'augmenten el nombre de tractaments previs (20.9%, 16.3%, 2.3% i 0%; 1ra, 2na, 3ra, 4ta línia, respectivament (MASSARELLI *et al.* 2003).

Tampoc hi havia diferència en les supervivències dels pacients de l'SLADB segons la línia de tractament (28 mesos per als pacients de primera línia i 27 mesos per a línies posteriors). Hi ha diverses metanàlisis que comparen les respostes, supervivències i PFS entre els estudis de primera línia i línies posteriors amb ITQ arribant a la conclusió que no existeixen diferències (PAZ-ARES *et al.* 2010; PETRELLI *et al.* 2012), malgrat que hi ha publicat un recull de set estudis japonesos on es descriu una millor PFS i supervivència dels pacients tractats amb ITQ en primera línia (HR 0,57; 95% CI, 0,38 a 0,86, $p=0,007$ i HR 0,60; 95% CI, 0,37 a 0,95, $p=0,031$, respectivament) (MORITA *et al.* 2009). Tenint en compte que tant les respostes com les supervivències dels pacients de primera línia i

posteriors van ser molt similars, s'han considerat com un grup homogeni a l'hora de comparar els resultats d'aquests pacients amb els de l'EURTAC.

Tenint present aquesta consideració, les respostes al tractament amb erlotinib (primera i segona línia) van ser del 70,5% en l'SLADB i del 65% en l'EURTAC, resultats molt similars als descrits en l'IPASS i en l'estudi NEJSG002, on els pacients tractats amb ITQ en primera línia van assolir una resposta del 71,2%, i del 73,7%, respectivament (Mok *et al.* 2009; MAEMONDO *et al.* 2010). Respostes més elevades, del 82,5%, s'obtenen amb el tractament amb erlotinib dels pacients de l'estudi OPTIMAL (ZHOU *et al.* 2011). Independentment del tipus d'ITQ, erlotinib o gefitinib, administrat en segona línia, no hi ha diferència respecte a les respostes assolides (KIM *et al.* 2012b; SEQUIST *et al.* 2008; WU WS 2012).

Les respostes obtingudes dels pacients mutats tractats amb quimioteràpia convencional van ser del 15%, resultat inferior al que es pot trobar en la bibliografia. Per exemple, en el NEJSG002 o el WJTOG3405, les respostes van ser al voltant del 30% (30,7% i 32,2%, respectivament), en l'OPTIMAL es situà al voltant del 36%, mentre que era del 25% en el treball de Kim (KIM *et al.* 2012b; MAEMONDO *et al.* 2010; MITSUDOMI *et al.* 2010). Respostes més elevades (al voltant del 47%) es descriuen en el grup de pacients amb mutacions de l'IPASS (Mok *et al.* 2009).

Observant les respostes dels pacients de l'EURTAC la branca de tractament amb quimioteràpia convencional presenta més progressions que els pacients tractats amb erlotinib (12,6% respecte al 7%). Aquesta diferència és estadísticament significativa en tots els estudis que comparen una branca de tractament amb ITQ amb una de quimioteràpia convencional en pacients de CPCNP amb mutacions d'EGFR. En la Taula 58 hi ha un resum dels principals estudis.

La mitjana de supervivència assolida amb erlotinib, de 27 i 22,9 mesos pels pacients de l'SLADB i l'EURTAC, respectivament, és similar a la descrita en d'altres estudis en primera línia com l'IPASS (21,6 mesos), el NEJSG002 (30,5 mesos) o el NEJ002 (27,7 mesos) (INOUE A. 2013). Per una altra banda, la mitjana de supervivència dels tractats amb quimioteràpia convencional de l'EURTAC va ser de 22,1 mesos, molt semblant a l'assolida amb erlotinib. Aquest mateix resultat l'obté tant el grup de Mok com el de Maemondo on la diferència de la supervivència entre ambdues branques no és estadísticament significativa (MOK *et al.* 2009; MAEMONDO *et al.* 2010). Aquest fet, descrit en diversos estudis, podria explicar-se pel rescat amb gefitinib dels pacients que han progressat al tractament amb quimioteràpia convencional (INOUE A. 2013; Mok *et al.* 2013). S'ha de tenir present que la mitjana de supervivència que s'assoleix en el tractament amb quimioteràpia convencional dels pacients de CPCNP sense mutacions d'EGFR es situa, malauradament, al voltant dels 10 mesos (KELLY *et al.* 2001; SCAGLIOTTI *et al.* 2002).

5- DISCUSSIÓ

Autor	Estudi-nº de pacients	Branques de tractament	Nº de pacients	Respostes		PFS		OS	
				%	p	mesos	p	mesos	p
Mok et al.	IPASS (Iressa Pan-Asia Study) 1217	gefitinib	132	71,2	<0,001	9,5	<0,001	21,6	0,99 / HR 1.002
		quimioteràpia	129	47,3		6,3		21,9	
Maemondo et al.	NEJSG002 (Phase III trial comparing gefitinib to carboplatin plus paclitaxel as 1st line treatment for advanced NSCLC with EGFR mutations) 229	gefitinib	114	73,7	<0,001	10,8	<0,001	30,5	0,3 / HR na
		quimioteràpia	110	30,7		5,4		23,6	
Lee et al.	First-SIGNAL (1st-line single-agent iressa vs gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung) 313	gefitinib	22	84,6	0,002	8,4	0,084	30,6	0,648 / HR na
		quimioteràpia	6	37,5		6,7		26,5	
Mitsudomi et al.	WJTOG3405 (West Japan Thoracic Oncology Group 3405; Randomized phase III trial comparing gefitinib with cisplatin plus docetaxel as the 1st-line treatment for patients with NSCLC harbouring mutations of the EGFR Growth Factor Receptor) 172	gefitinib	86	62,1	<0,001	9,2	<0,0001	35,5	0,44 / HR na
		quimioteràpia	86	32,2		6,3		38,8	
Zhou et al.	OPTIMAL 165	erlotinib	82	83	<0,001	13,1	<0,001	na	
		quimioteràpia	72	36		4,6		na	

Taula 58. Resultats de cinc estudis prospectius i aleatoritzats fase III on es comparava el tractament en primera línia d'inhibidors de TQ respecte a quimioteràpia convencional basada en compostos del platí en pacients avançats de CPCNP amb mutacions d'EGFR.

Per exons, es va observar una millor supervivència, PFS i resposta associada a les delecions de l'exó 19 que no pas a la mutació L858R de l'exó 21, tal com es descriu en la bibliografia (GOTO *et al.* 2013; JACKMAN *et al.* 2006; MITSUDOMI *et al.* 2010; RIELY *et al.* 2006; ZHU *et al.* 2008b) malgrat que en relació a la PFS, no s'assoleix la significació estadística en el treball de Maemondo o en el de Sequist (MAEMONDO *et al.* 2010; SEQUIST *et al.* 2008). Aquesta diferència entre les mutacions d'EGFR al tractament amb ITQ podria explicar-se pels resultats de diversos treballs basats en models cel·lulars. El grup de Carey va demostrar que la dosi necessària d'ITQ per inhibir el creixement de les línies cel·lulars transformades amb la variant delecionada era menor que per a les mutades L858R (CAREY *et al.* 2006). En la mateixa línia, el grup de Zhu va transformar cèl·lules wt i va comprovar que les línies L858R creixien millor en presència de gefitinib que les línies delecionades de l'exó 19. A més, per citometria va comprovar que les cèl·lules delecionades bloquejaven més el cicle cel·lular que no les línies cel·lulars mutades L858R quan eren tractades amb ITQ (ZHU *et al.* 2008b). Això demostraria que la sensibilitat que confereix la mutació L858R és menor que la de la delecio i que per tant els pacients delecionats es beneficien més del tractament amb ITQ que els mutats L858R.

La PFS assolida pels pacients de l'SLADB i l'EURTAC tractats amb erlotinib va ser de 14 i 10,4 mesos, respectivament, mentre que per als de l'EURTAC tractats amb quimioteràpia convencional va ser d'aproximadament 5 mesos. Molts altres estudis assoleixen PFS semblants, tal com recull la metanàlisi de Paz-Ares (PAZ-ARES *et al.* 2010)

on hi ha, entre d'altres, els resultats de l'OPTIMAL o el NEJ002, de 13,1 i 10,8 mesos pels pacients tractats amb ITQ enfront dels 4,6 i 5,4 mesos dels tractats amb quimioteràpia convencional, respectivament; el treball de Mitsudomi, on les PFS dels pacients tractats amb gefitinib va ser de 9,2 mesos, (el mateix resultat que reporta Sequist) respecte als 6,3 mesos de la branca de quimioteràpia convencional (INOUE A. 2013; MITSUDOMI *et al.* 2010; PAZ-ARES *et al.* 2010; SEQUIST *et al.* 2008; ZHOU *et al.* 2011).

En ambdós estudis es va comprovar que els pacients amb un ECOG PS superior a 1 assolien una pitjor PFS, independentment de la branca de tractament. En la bibliografia s'ha descrit, en termes generals, que els pacients amb PS 0 o 1 tenen millor pronòstic que els pacients amb PS superiors ($p=0,001$) (YANG *et al.* 2008), malgrat que hi ha treballs que no troben relació entre aquests paràmetres (MAEMONDO *et al.* 2010). Per una altra banda, el grup d'Inoue descriu l'efecte del tractament amb ITQ en la reducció del PS quan el 68% dels pacients tractats amb gefitinib del seu estudi van passar de PS 3-4 a PS 0-1 (INOUE *et al.* 2009). Aquesta millora, tant en l'estat del pacient com la seva qualitat de vida és el que es coneix com efecte Llätzer.

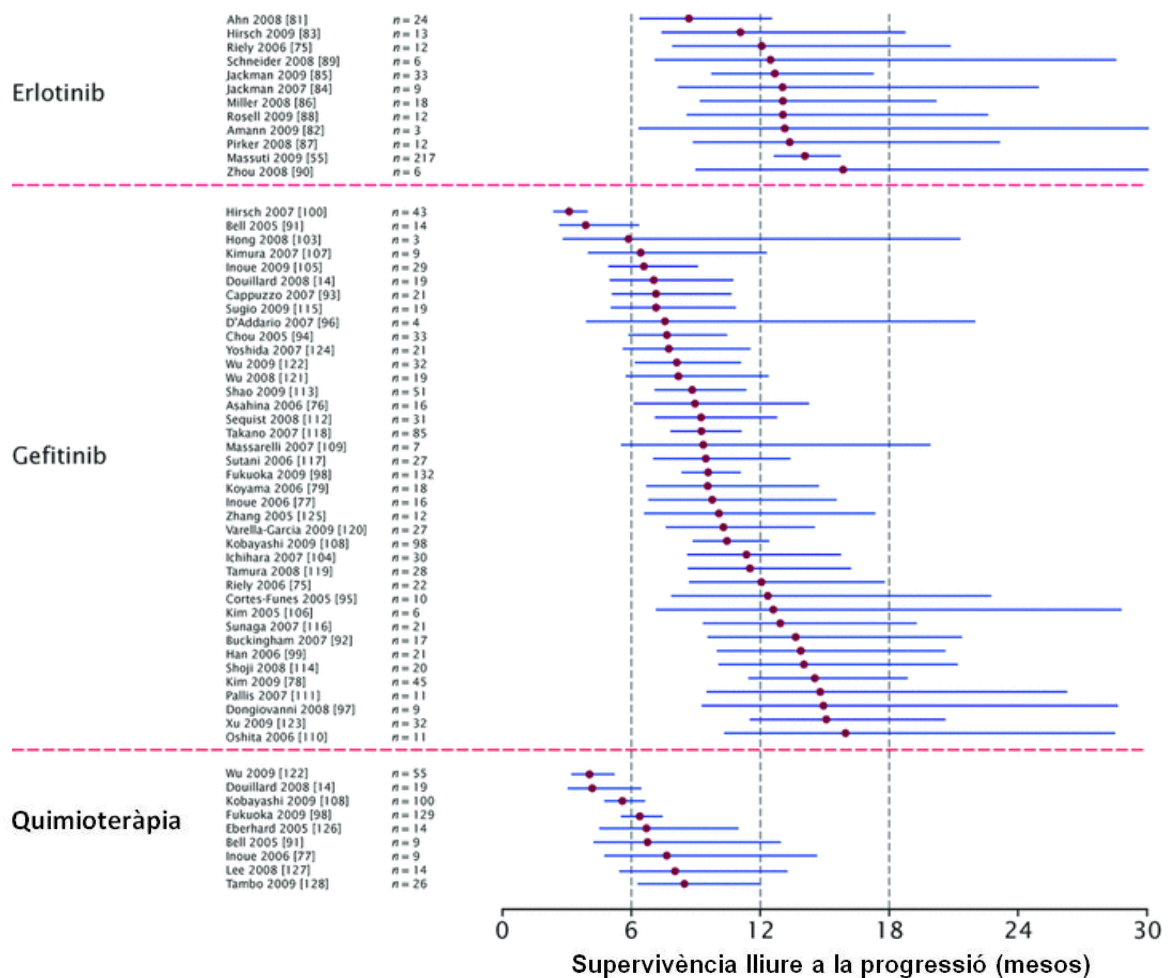


Fig. 66. Forest plot de la mitjana de la PFS dels estudis inclosos en la matanàlisi realitzada pel grup de Paz-Ares, amb un interval de confiança del 90%, durant el tractament amb erlotinib o gefitinib en monoteràpia o quimioteràpia, en pacients de CPCNP mutats d'EGFR.

Es va comprovar, en l'anàlisi dels pacients de l'SLADB, que tant la supervivència com la PFS eren més favorables en els pacients de sexe femení. Aquest resultat concorda a mitges amb el reportat de l'estudi NEJSG002 que descriu la relació entre el gènere i la PFS (HR 0,68; 95% CI, 0,51 a 0,92; $p=0,01$) mentre que no existeix respecte a la supervivència (MAEMONDO *et al.* 2010). Per una altra banda, el grup de Kimura reporta una millor supervivència en els pacients de sexe femení ($p=0,04$) (KIMURA *et al.* 2006d) i d'altres treballs descriuen una certa tendència a favor dels pacients de sexe femení malgrat que no s'assoleixi la significació estadística (YANG *et al.* 2008).

Tot i que diversos estudis descriuen que els pacients no fumadors són els més beneficiats amb el tractament amb ITQ es va observar una PFS al voltant de 11 mesos dels pacients ex fumadors, independentment de la branca de tractament. Aquest fet també ha estat reportat pel grup de Sugio, arribant a la significació estadística ($P=0,0063$) (SUGIO *et al.* 2009). Els treballs de Zhou (OPTIMAL) i de Mitsudomi (WJTOG 3405) descriuen un benefici del tractament amb ITQ dels pacients fumadors i ex fumadors malgrat que no sigui tant clar com per als no fumadors (ZHOU *et al.* 2011; MITSUDOMI *et al.* 2010). Així, malgrat tractar-se de pacients atípics per a les mutacions d'EGFR, el grup de D'Angelo va analitzar les mutacions de 1562 pacients fumadors i ex fumadors caucàsics amb adenocarcinoma. Les mutacions es van detectar en un 13%, proporció que concorda perfectament amb la freqüència descrita en població caucàsica (D'ANGELO *et al.* 2011). Històricament, s'havia atribuït al tabaquisme una pitjor incidència en la malaltia respecte a ser no fumador. Avalant aquesta idea, l'equip de Filosto comenta que el fum del tabac provoca un canvi de conformació d'EGFR que comporta una dimerització aberrant i, per tant, una resistència al tractament amb ITQ malgrat que estigui mutat (FILOSTO *et al.* 2012). En relació al metabolisme d'erlotinib, s'ha descrit que la concentració del fàrmac en plasma és menor en fumadors respecte als no fumadors per l'activitat més alta de CYP1A1 i CYP1A2 en aquest grup de pacients (HAMILTON *et al.* 2006).

Finalment, la PFS a l'any, dels pacients inclosos en l'EURTAC va ser del 40% en la branca de tractament amb erlotinib i del 10% en la de quimioteràpia. Aquest resultat s'ajusta totalment al ja descrit pels grups de Sequist (32% pels tractats amb ITQ) i Maemondo (42,1% i 3,2%, respectivament) (SEQUIST *et al.* 2008; MAEMONDO *et al.* 2010), i en pacients mutats d'EGFR tractats amb quimioteràpia convencional al voltant del 7% (MOK *et al.* 2009).

Es pot afirmar, d'aquesta manera, que l'SLADB confirma les expectatives, des d'un punt de vista clínic, de la importància de la determinació de les mutacions del gen EGFR. S'ha comprovat que els mètodes de detecció de les mutacions són adequats per aplicar-los en l'anàlisi dels pacients, obtenint resultats comparables als que han estat publicats en la bibliografia. S'ha confirmat el fet que no existeixen diferències entre línies de

tractament amb erlotinib i s'han assolit respostes, supervivències i PFS molt semblants a les descrites per a aquest tipus de pacient.

Per una altra banda, l'estudi EURTAC, el primer que es basa íntegrament en pacients caucàsics, confirma la superioritat del tractament amb erlotinib respecte la quimioteràpia convencional per als pacients mutats d'EGFR, tal com ja s'havia reportat en d'altres estudis. Com en el cas de l'SLADB, es corroboren tots els resultats obtinguts amb els que es descriuen en la bibliografia.

5.6 Validació clínica de l'anàlisi de les mutacions d'EGFR en l'ADN circulant de sang perifèrica dels pacients de l'SLADB i l'EURTAC

En els darrers anys, diversos grups han desenvolupant diferents tècniques per analitzar les mutacions d'EGFR de la sang perifèrica. Així, els resultats de l'SLADB i EURTAC (59% i 56%, respectivament) són molt semblants al descrit per l'equip de Brevet (61%) quan analitza el plasma de 31 pacients per la tècnica d'espectrometria de masses (BREVET *et al.* 2011). Per una altra banda, hi ha treballs que mostren percentatges de detecció inferiors com el de l'equip de Goto sobre l'IPASS, on només detecta un 23,7% de mutacions en 194 mostres de plasma analitzades amb el kit DxS (GOTO *et al.* 2012). Bai i col·laboradors descriuen un 34,3% en l'anàlisi del plasma de pacients mitjançant la tècnica d'HPLC (BAI *et al.* 2009) i finalment, el grup de Chen publica un 46,3% en l'anàlisi de 54 pacients afegint PNA en les amplificacions per PCR (CHEN *et al.* 2012a). Paral·lelament, hi ha publicats percentatges de detecció de mutacions en sang perifèrica molt superiors, com el descrit pel grup de Kimura, que reporta un 93% de mutacions de 42 pacients analitzats per la tècnica ARMS (KIMURA *et al.* 2007), malgrat que el mateix equip l'any anterior, havia publicat un treball on el percentatge era del 48,1% utilitzant la mateixa tècnica (KIMURA *et al.* 2006c). Aquesta diferència en la detecció de les mutacions, com ja s'ha explicat anteriorment, pot explicar-se per diferents factors, des dels preanalítics (passos anteriors a l'extracció de l'ADN circulant) fins als tècnics (incloent tant el mètode d'extracció d'ADN com les tècniques d'anàlisi).

La proporció per exons de les mutacions d'EGFR descrita per a les mostres de teixit és vàlida per a les mostres de sang perifèrica (BAI *et al.* 2009; KIM *et al.* 2013; ZHAO *et al.* 2013). Com que la proporció detectada de les deleccions de l'exó 19 (66% i 59,3% en l'SLADB i l'EURTAC, respectivament) i de la mutació L858R de l'exó 21 (34% i 41%, respectivament) concorda amb la descrita en la bibliografia (MARCHETTI *et al.* 2005; PAO *et al.* 2004; RIELY *et al.* 2006), les tècniques d'anàlisi són adequades i no hi ha esbiaix dels resultats per la seva especificitat. En referència al percentatge de mutacions entre

exons, es postula que és més fàcil detectar delecions en l'ADN circulant per que les cèl·lules delecionades són més sensibles al tractament amb ITQ i alliberen més ADN que les mutades L858R (NAKAMURA *et al.* 2012).

Les mutacions van ser més freqüents en pacients de sexe femení, no fumadors i histologia d'adenocarcinoma, característiques tipus dels pacients amb mutacions d'EGFR (JIAN *et al.* 2010; KIM *et al.* 2013). Com en el cas de les mostres de teixit, hi ha un 26% de pacients fumadors o ex fumadors mutats en sang perifèrica. Aquest fenomen també ha estat reportat en altres treballs on el percentatge d'ex fumadors i fumadors amb mutacions es situa en el 39,6% i 32,9% (BAI *et al.* 2009; HE *et al.* 2009) mentre que el grup de Kim només les detecta un 12% (KIM *et al.* 2013).

S'avaluà la relació entre les mutacions en sang perifèrica i la resposta al tractament. Es va comprovar que els pacients de la branca d'erlotinib responien millor, independentment de detectar o no les mutacions en sang perifèrica. Tot i així, en l'EURTAC es va poder observar que els pacients sense mutacions detectades en sang perifèrica assolien respostes completes, inexistents en el grup de pacients mutats. En contradicció amb aquests resultats, hi ha diversos equips que descriuen una millor resposta dels pacients amb mutacions en sang perifèrica que els que no se'ls han detectat (CHEN *et al.* 2012a; GOTO *et al.* 2012; KIMURA *et al.* 2006c). En aquets treball s'ha comprovat que els pacients amb mutacions en la sang perifèrica presentaven més progressions de la malaltia.

La supervivència assolida pels pacients què se'ls havien detectat les mutacions d'EGFR en sang perifèrica, tant de l'SLADB com de l'EURTAC, era menor que la dels pacients detectats wt. Aquest fet contradiu els treballs de Jian i de Kimura, on descriuen una millor supervivència en el pacients amb mutacions en sang perifèrica respecte als no mutats ($p=0,003$), malgrat que la diferència no és estadísticament significativa en l'article de Kimura i de Mack (JIAN *et al.* 2010; KIMURA *et al.* 2007; MACK *et al.* 2009). Una possible explicació vindria donada per la concentració d'ADN circulant. Tal com ja s'ha explicat anteriorment, un dels orígens d'aquest ADN és la lisi de micrometàstasis i cèl·lules tumorals circulants, utilitzades com a factor pronòstic de l'evolució de la malaltia. Així, el grup de Krebs, demostra que és més freqüent trobar CTC en la sang perifèrica de pacients d'estadis IV que d'estadis IIIA o IIIB i que el seu nombre està considerat com un factor predictiu de supervivència (KREBS *et al.* 2011). El fet que es puguin detectar les mutacions d'EGFR en la sang del pacient podria estar relacionat amb un augment de les metàstasis i per tant amb un pitjor pronòstic i supervivència. Hi ha treballs que demostren que és més fàcil detectar les mutacions d'EGFR en sang perifèrica de pacients que tenen afectats diversos òrgans per metàstasis que no els que només en tenen un d'afectat (NAKAMURA *et al.* 2012) i que aquesta concentració d'ADN circulant és més alta en pacients amb més d'una metàstasi i amb tumors amb els nòduls locoregionals afectats (LEE *et al.* 2011). Finalment s'ha comprovat que els pacients

tractats amb quimioteràpia convencional amb concentracions elevades d'ADN presentaven una pitjor supervivència (GAUTSCHI *et al.* 2004). En un estudi amb pacients de càncer colorectal es va observar que la quantitat d'ADN mutat, detectat amb la tècnica de BEAMing, disminuïa després de la cirurgia o la quimioteràpia, postulant que la quantitat d'ADN mutat alliberat al torrent sanguini correlaciona amb el volum total tumoral (DIELH *et al.* 2008). Totes aquestes descobertes podrien explicar la pobra resposta dels pacients amb mutacions en sang perifèrica.

Per una altra banda, el grup de Perkins, analitzant ADN circulant per confirmar la seva implicació predictiva en l'evolució de diversos tipus de tumor, va trobar que l'ECOG PS era un factor independent de la supervivència en una anàlisi multivariable (PERKINS *et al.* 2012). En aquest aspecte, es van detectar més freqüentment les mutacions en sang perifèrica dels pacients amb ECOG PS \geq 1 tant en els pacients de l'SLADB com de l'EURTAC. En la mateixa línia, el treball de Moran, presentat en l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) l'any 2007 apuntava que el 93,8% dels pacients amb mutacions detectades en l'ADN circulant corresponien a PS 2 (MORAN 2007).

Com en el cas de la supervivència, la PFS també va ser menor en els pacients que se'ls havia detectat les mutacions respecte als wt malgrat contradir el treball de Bai i de Mack que descriuen una PFS superior en els pacients mutats en sang perifèrica ($p=0,044$ i $p=0,012$, respectivament) (BAI *et al.* 2009; MACK *et al.* 2009). Hi ha articles que comparen la PFS dels pacients mutats en sang perifèrica respecte als no detectats on troben diferències significatives a favor dels pacients mutats. De totes maneres, aquests treballs es basen en l'anàlisi tant de pacients wt com mutats en teixit inclòs en parafina mentre que l'SLADB i l'EURTAC es basen només en les mostres de sang perifèrica de pacients mutats. Com que aquestes mutacions s'han detectat en el grup de pacients amb pitjor ECOG PS, que presenten una menor supervivència, es podria concloure que la detecció de les mutacions en sang perifèrica seria un reflex d'una progressió de la malaltia més ràpida.

Analitzant la supervivència i la PFS per exons, els pacients delecionats assolien una supervivència i PFS superiors als pacients mutats L858R de l'exó 21. Aquest fenomen concorda amb l'observat en l'anàlisi de les mutacions en teixit inclòs en parafina (GOTO *et al.* 2013; JACKMAN *et al.* 2006; RIELY *et al.* 2006).

Segons la branca de tractament dels pacients inclosos en l'EURTAC, es va comprovar que els detectats mutats, tractats amb erlotinib, assolien una millor PFS respecte als tractats amb quimioteràpia convencional ($P<0,001$). Aquest resultat concorda perfectament amb el treball publicat de l'estudi IPASS, (GOTO *et al.* 2012). S'ha de tenir present que, com que aquests pacients són mutats, el tractament amb erlotinib els és més favorable que el de quimioteràpia convencional, tal com s'ha demostrat en l'anàlisi de les mostres de teixit inclòs en parafina.

Els bons resultats obtinguts de l'ADN circulant, malgrat les dificultats inherents a la seva naturalesa, confirmen la sang perifèrica com una bona font de material genètic dels pacients dels quals és inviable l'obtenció d'una biòpsia, de la mateixa manera que permet fer un seguiment de l'evolució de la malaltia. En aquesta línia hi ha diversos treballs que monitoritzen l'evolució de les mutacions d'EGFR a través de l'anàlisi de la sang perifèrica del pacient. D'aquesta manera es fa el seguiment de l'eficàcia del tractament i se'n preveu l'evolució (FORSEW *et al.* 2012; NAKAMURA *et al.* 2012; SUN J.M. 2013).

5.7 Validació clínica de la detecció de la mutació T790M de l'exó 20 dels pacients inclosos en l'EURTAC

La mutació T790M es va detectar en un 65% dels casos. En la bibliografia hi ha força disparitat de resultats de detecció depenent del mètode i del moment de realitzar l'anàlisi (abans del tractament o quan es produeix la progressió de la malaltia). Així, dos grups diferents utilitzant el kit DxS en pacients no tractats descriuen freqüències de detecció d'aquesta mutació de l'exó 20 del 38%, en pacients amb mutacions de sensibilitat d'EGFR, i del 4,2% en els pacients de l'IPASS, no seleccionats per les mutacions d'EGFR, pròpiament dit (MAHESWARAN *et al.* 2008; MOK *et al.* 2009). En la taula 59 hi ha representats els principals treballs publicats referents a la mutació T790M amb els percentatges de detecció, la tècnica utilitzada i la seva sensibilitat. En tots ells, els pacients eren mutats d'EGFR i l'anàlisi s'ha realitzat en teixit inclòs en parafina. Com es pot observar, el tipus de tècnica d'anàlisi és primordial en la detecció de la mutació, demostrant que la seqüenciació és, de lluny, la menys sensible. Així, el grup de Su, compara la seqüenciació Sanger (només de 3 pacients), l'espectrometria de masses MALDI-TOF i la NGS, en pacients no tractats prèviament amb quimioteràpia, obtenint una freqüència de detecció del 2,8%, 31,5% i 34,2%, respectivament (Su *et al.* 2012). Els resultats per seqüenciació Sanger són idèntics als dels treballs de Sequist i de Wu, on assoleixen una detecció del 7% i l'1%, respectivament, en pacients no tractats amb ITQ, tot i que en el primer treball, els pacients eren mutats d'EGFR (SEQUIST *et al.* 2008; WU *et al.* 2011). Per una altra banda, amb la tècnica de ME-PCR s'ha descrit un 3,6% de pacients mutats T790M (INUKAI *et al.* 2006). Finalment, amb la tècnica de colony hybridization, que consisteix en transfectar en *Escherichia coli* els fragments de PCR del gen d'estudi, fer créixer les colònies i hibridar-les amb les sondes corresponents, es detecta un 79% de pacients mutats T790M (FUJITA *et al.* 2012).

El percentatge de detecció de la mutació T790M és més elevat en pacients que han progressat al tractament amb ITQ ja que les cèl·lules sensibles han estat eliminades,

quedant les resistents, molts cops portadores d'aquesta mutació. Hi ha diversos treballs que analitzen aquesta mutació en les rebiòpsies dels malalts que han progressat al tractament. Per exemple, el grup de Sun descriu que el 51% dels pacients que han progressat a afatinib presenten la mutació T790M, analitzats per seqüenciació i afegint la sonda PNA en les PCR (SUN *et al.* 2013a) o els equips d'Arcila i d'Oxnard, que descriuen percentatges de detecció del 68% i 62%, respectivament, utilitzant com mètode d'anàlisi la LNA PCR clamping i posterior seqüenciació (ARCILA *et al.* 2011; OXNARD *et al.* 2011). Aquests resultats són molt semblants al 60% descrit amb la tècnica d'espectrometria de masses (OXNARD *et al.* 2011; YU *et al.* 2013). Percentatges més elevats s'han descrit utilitzant les tècniques de NGS (83%) i MALDI-TOF (86%) i seqüenciació (80%) (COSTA *et al.* 2008a; SU *et al.* 2012; SUGIO *et al.* 2009).

Autor	N de pacients	% T790M segons la tècnica	PFS amb i sense T790M	Sensibilitat de la tècnica
Su et al	73	MALDI-TOF MS: 31.5% Seqüenciació: 2.7%	6,7 vs 10,2m; p< 0.05	1:1000
Lee et al	124	MALDI-TOF MS: 25%	6,3 vs 11,5m; p<0.001	--
Rosell et al	129	TaqMan amb-PNA: 35%	12 vs 18m; p = 0.05	1:5000
Inukai et al	280	Mutant-enriched PCR: 3.6%	sense resposta a gefitinib	1:1000
Costa et al	95	TaqMan amb PNA: 65.26% TMDA: 24.2%		1:5000
Maheswaran et al	26	SARMS: 38%	7,7 vs 16.5m; p<0.001	1:500
Ye et al	36	Mutant-enriched PCR: 41,7%	--	1:1000
Querings et al	24	Seqüenciació /piroseqüenciació: 0% Massively parallel sequencing: 27%	--	--
Fujita et al	38	SARMS: 0% Colony Hybridization: 79%	--	1:1000
Oh et al	147	Seqüenciació: 0%, PNA-clamping PCR: 8,2%	--	1:10000
Fukuoka et al	261	Seqüenciació: 0% Multithreaded electronic polymerase chain reaction Seqüenciació: 0% SARMS: 4.2%	no s'associa a resistència a TKI	--

Taula 59. Resum dels principals treballs on s'analitza la mutació T790M en pacients mutats d'EGFR. En els que s'avalua la PFS entre els pacients amb T790M i sense aquesta mutació, la diferència és significativa, tret del grup de Fukuoka. Adaptació de Costa, 2014.

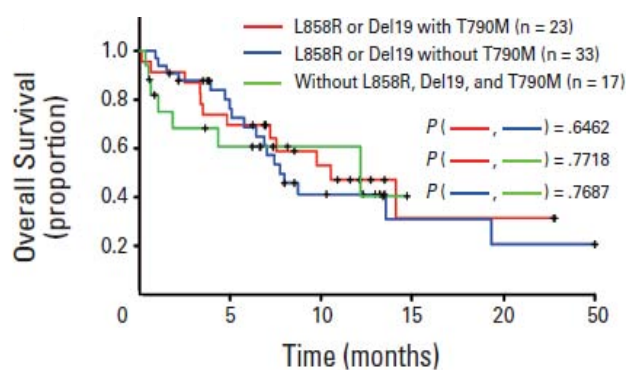
Així com les mutacions de l'exó 19 i 21 correlacionen amb certes característiques clínico-patològiques dels pacients (sexe femení, histologia d'adenocarcinoma i no fumador), la mutació de l'exó 20 no està associada a cap d'aquests paràmetres (Yu *et al.* 2014). L'únic

5- DISCUSSIÓ

factor amb el que sembla relacionat és l'estadiatge i l'ECOG PS (INUKAI *et al.* 2006; OXNARD *et al.* 2011). Respecte a l'estadiatge, s'ha postulat que la mutació es detecta més freqüentment en estadis avançats ja que hi ha més inestabilitat genètica (INUKAI *et al.* 2006; MA *et al.* 2011).

En l'avaluació de les respostes al tractament, es comprovà que, malgrat que la mutació T790M està relacionada amb la resistència als ITQ, no hi havia diferència significativa entre els pacients detectats mutats i els no mutats en cap de les dues branques de tractament. Aquest fet també l'ha descrit el grup de Su i de Maheswaran (MAHESWARAN *et al.* 2008; Su *et al.* 2012). L'explicació que exposa aquest darrer autor és que possiblement la presència de la mutació T790M abans del tractament amb ITQ no és suficientment freqüent com per influir a curt termini en la resposta al tractament. A mida que el tumor és eliminat per l'acció de l'ITQ i la proporció de cèl·lules amb la mutació de resistència augmenta, el seu efecte va assolint més importància fins que al final aconsegueix modular la PFS, tal com s'exposa més endavant (MAHESWARAN *et al.* 2008). La manca de diferències entre branques de tractament confirma que la mutació T790M tampoc influeix en la resposta del pacients mutats tractats amb quimioteràpia estàndard com demostra el cas reportat pel grup de Yamane (YAMANE *et al.* 2013).

En l'avaluació de la supervivència es va comprovar que la presència o absència de la mutació T790M no té cap influència, independentment del tractament. El grup de Su descriu resultats semblants en avaluar la supervivència de 73 pacients mutats d'EGFR, dels quals 17 eren mutats T790M. En la corba Kaplan-Meier es comprova que aquesta mutació no té influència en els pacients tractats amb erlotinib (Su *et al.* 2012).



Cox Regression Model			
Variable	Hazard Ratio	95% CI	P
L858R or Del19 without T790M	1.000		
L858R or Del19 with T790M	0.864	0.416 to 1.797	.697
Without L858R, Del19, and T790M	1.105	0.459 to 2.657	.824

Fig. 67. Corba de Kaplan-Meier del treball de Su on corrobora que la mutació T790M no té influència sobre la supervivència dels pacients tractats amb erlotinib.

Malgrat que la mutació T790M no influïa ni en la resposta ni en la supervivència, es va observar que els pacients tractats amb erlotinib sense la mutació T790M tenien una millor PFS que els pacients amb mutació. Aquest fet també el descriu l'equip de Su, de Rosell i de Maheswaran, i per una altra banda la metanàlisi del grup de Ding, on la diferència entre detectar la mutació o no en el grup de pacients tractats amb ITQ assoleix significació estadística a favor dels pacients sense mutació ($p < 0,05$, $p = 0,05$ i $p < 0,001$, respectivament) (SU *et al.* 2012; ROSELL *et al.* 2011; MAHESWARAN *et al.* 2008; DING *et al.* 2014; GAZDAR 2009).

Hi ha diversos treballs que atribueixen l'evolució de la malaltia a la distribució de la mutació T790M en el tumor: no evolucionaria igual si la mutació T790M i la de sensibilitat estiguessin ubicades en *cis* en el mateix al·lel; si estiguessin en *trans* en diferents al·lells, o bé que estiguessin en diferents clones cel·lulars (LEONE 2013). En el primer cas, amb el tractament amb ITQ es seleccionarien les cèl·lules amb les dues mutacions en el mateix al·lel (s'ha descrit que aquest tipus de cèl·lules tenen una fosforilació més acusada respecte a les mutades només per sensibilitat) i es produiria un creixement cel·lular ràpid (MIYAZAWA *et al.* 2008; MULLOY *et al.* 2007). En línies cel·lulars s'ha comprovat que aquest constructe en *cis* provoca una ràpida aparició de la resistència. En el segon cas, segons l'al·lel que estigués actiu, es donarien diferents respostes: si l'al·lel actiu és el portador de la mutació de sensibilitat, les cèl·lules s'eliminarien amb el tractament amb ITQ propiciant la proliferació de les doble mutants i aconseguint un escenari semblant al primer cas, malgrat que l'evolució d'aquest sistema és desconeguda (KOBAYASHI *et al.* 2005). En models cel·lulars, s'ha comprovat que aquest constructe en *trans* provoca una resistència als ITQ més feble (ENGELMAN *et al.* 2006). La darrera possibilitat està relacionada amb el que diversos autors descriuen com el fenomen de creixement indolent dels tumors amb la mutació T790M, per explicar aquesta manca de diferència respecte a les respostes i la supervivència. La teoria, comprovada en models cel·lulars, postula que els tumors amb cèl·lules mutades T790M, per sota d'un 10% del total cel·lular, tenen un creixement molt més lent que els que tenen mutacions de sensibilitat (CHMIELECKI *et al.* 2011; REGALES *et al.* 2007). D'aquesta manera, els pacients que se'ls ha detectat aquesta mutació abans del tractament poden presentar millor pronòstic que els no mutats (CHMIELECKI *et al.* 2011; OXNARD *et al.* 2011). Quan el percentatge de cèl·lules mutades T790M excedeix del 25%, aproximadament, apareix la resistència al tractament (MAHESWARAN *et al.* 2008; MOK 2010).

Aquest percentatge de cèl·lules mutades ha servit al grup de Lee per classificar les supervivències i PFS. Així, els pacients amb més freqüència de mutació T790M presenten supervivències i PFS menors, que els pacients amb una freqüència menor de mutació (2,4 mesos respecte a 6,7 mesos; $p = 0,009$ de supervivència i 9,1 mesos respecte a 18,7 mesos; $p = 0,018$ de PFS, respectivament) (LEE 2014). Resultats semblants els ha reportat el grup de Costa (PFS dels pacients amb baix nivell de mutació 10,4 mesos respecte als 8,7 mesos dels de nivells més alts $p = 0,058$) (COSTA *et al.* 2014).

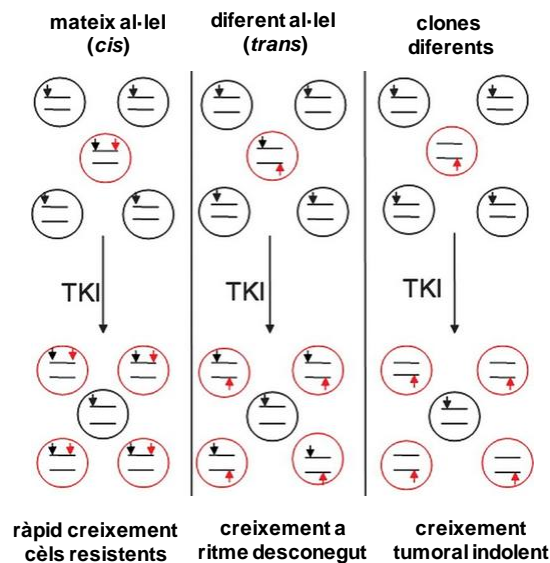


Fig. 68. Diferents possibilitats del tractament amb ITQ en tumors mutats T790M. Els cercles negres, les cèl·lules amb mutació de sensibilitat. Els cercles vermells, cèl·lules amb mutació de resistència o sensibilitat. Les línies negres són els al·lels. Les fletxes negres són la mutació de sensibilitat mentre que les vermelles representen la mutació T790M. Adaptació de Leone, 2013.

Un cop apareix la resistència als ITQ i per tant, la progressió de la malaltia, cal decidir el millor tractament per a aquests pacients. Malgrat que hi ha diversos assajos que estan avaluant l'administració d'inhibidors irreversibles per superar la resistència provocada per la mutació T790M, sembla que els resultats preliminars no són gaire encoratjadors. S'ha comprovat que les concentracions necessàries per revertir la resistència en pacients no són necessàriament les mateixes que les efectives en estudis preclínics pels efectes secundaris que provoquen (JANNE *et al.* 2011; SEQUIST *et al.* 2010). Una altra estratègia és la combinació d'aquests ITQ amb fàrmacs que bloquegen els gens de les vies de transducció de senyal relacionades amb EGFR. Així doncs, *in vitro* s'han provat combinacions d'afatinib amb un inhibidor de MEK i amb un inhibidor de Src, aconseguint induir més apoptosi que amb afatinib en monoteràpia (Sos *et al.* 2010). Des d'un punt de vista clínic, després de demostrar-se que amb afatinib en combinació amb rapamicina (un inhibidor de PI3K i mTOR) s'assolia quasi la completa regressió del tumor en models animals, s'està duent a terme un estudi fase I on s'avalua la combinació de l'ITQ nerafenib amb temsirolimus (inhibidor d'mTOR) (GANDHI *et al.* 2014). Hi ha estudis que avaluen l'activitat combinada dels inhibidors irreversibles amb anticossos antiEGFR com el cetuximab (JANJIGIAN Y. 2011), o bé que combinen un ITQ (erlotinib o gefitinib) amb inhibidors de l'angiogènesi o amb inhibidors de MET, HDAC o HSP90 (JANNE P. 2008; MILLER V. 2008; REGUART *et al.* 2014; SHIMAMURA *et al.* 2008).

S'han publicat diversos treballs on es demostra que l'expressió gènica pot modular la resistència de la mutació T790M. Per exemple, el grup de Rosell demostra que la baixa expressió de BRCA1, juntament amb la mutació T790M en pacients avançats de CPCNP i

mutats d'EGFR, modula aquesta resistència i promou una millors PFS respecte als pacients amb alts nivells d'expressió d'aquest gen (la HR dels pacients amb T790M i nivells de BRCA1 intermedis i elevats, respectivament, va ser de 8,19; $p < 0,0001$ i 8,46; $p < 0,0001$) (ROSELL *et al.* 2011).

S'ha pensat en administrar un ITQ diferent per al què s'ha desenvolupat la resistència. Els resultats publicats són contradictoris. Per una banda, l'equip de Wu descriu una disminució de la mida del tumor després del tractament amb erlotinib posterior a la progressió amb gefitinib (Wu *et al.* 2008), mentre que el grup de Costa demostra que tractar amb erlotinib els pacients que han progressat a gefitinib no dona resultats favorables (COSTA *et al.* 2008a; COSTA *et al.* 2008b). ja que la baixa efectivitat d'erlotinib, en les dosis clíniques segures no pot revertir la resistència que confereix la mutació T790M (KURATA *et al.* 2004). Paral·lelament, el grup de Costa postula que l'expressió gènica pot modular tant la supervivència com la PFS dels pacients amb mutacions de sensibilitat d'EGFR tractats amb ITQ. En el seu treball comprova que l'expressió de BIM està relacionada amb una millor supervivència i PFS (HR 0,53; $p = 0,032$ i HR 0,49; $p = 0,012$, respectivament) de manera que obre la possibilitat d'utilitzar aquest gen com a diana terapèutica concomitant a les mutacions d'EGFR (COSTA *et al.* 2014).

Hi ha ocasions que el tractament que s'administra després de la progressió als ITQ és la quimioteràpia convencional. Recolzant aquesta estratègia el grup de Maemondo descriu respostes del 29% en pacients que han progressat als ITQ i que han estat tractats en segona línia amb carboplatí/paclitaxel (MAEMONDO *et al.* 2010). De totes maneres, experiments *in vitro* han demostrat que el tractament amb erlotinib no afavoreix el tractament concomitant o *a posteriori* amb quimioteràpia convencional. A través de línies cel·lulars s'ha comprovat que els ITQ afavoreixen l'extrusió dels components derivats del platí de l'interior cel·lular evitant la seva activitat i reduint el dany a l'ADN que provoquen aquests fàrmacs, de manera que les segones línies basades amb derivats del platí no són una bona opció a l'hora de tractar els pacients que han progressat als ITQ (TSAI *et al.* 2011).

L'anàlisi de la mutació T790M dona informació, si es detecta abans de començar el tractament, sobre el temps de resposta als ITQ i si es detecta a la progressió, sobre les possibles alternatives terapèutiques en segona línia, tenint en compte aquesta resistència adquirida. Com en el cas de les mutacions de sensibilitat, per analitzar aquesta mutació en condicions òptimes caldria una mostra amb suficient teixit tumoral que permetés detectar la baixa proporció de cèl·lules mutades i, per una altra banda, que conservés l'ADN en les millors condicions per tal d'analitzar diferents àrees i evitar la seva alta heterogeneïtat. Obtenir mostra de teixit és un dels limitants més importants a l'hora de realitzar l'anàlisi, per tant, diversos grups han optat per determinar aquesta mutació de la sang perifèrica del pacient. Per exemple, els equips de Kuang, amb el kit de DxS i, paral·lelament, per la tècnica de WAVE/Surveyor basada en una digestió

enzimàtica, i el de Nakamura amb un sistema de sondes fluorescents, detecten un 53% i un 54% de pacients mutats, respectivament quan analitzen el plasma de pacients ja tractats amb ITQ. Malgrat aquest resultat, Mack i col·laboradors només detecten un 8% de mutacions utilitzant el mateix kit de DxS. Per una altra banda i amb el mateix tipus de pacient, es corrobora la baixa sensibilitat del mètode de seqüenciació Sanger en el treball de He on analitza la T790M en el plasma dels pacients per ME-PCR i seqüenciació Sanger, detectant la mutació en un 36,4% i un 6% respectivament (HE *et al.* 2013; KUANG *et al.* 2009; MACK *et al.* 2009; NAKAMURA *et al.* 2011).

Finalment, s'ha comprovat que la tècnica TaqMan, associada a la sonda PNA, té una sensibilitat de detecció al voltant del 93%. Malgrat que aquest resultat és del tot favorable, es va fer la comparació amb una tècnica amb un límit de detecció inferior. Això comporta que, si bé s'aconsegueixen detectar molts més pacients mutats, és possible una sobreestimació. Aquest aspecte es comenta en el treball de Ye on qüestiona les altes taxes de detecció d'aquestes mutacions. Postula que potser la imbibició en parafina dels teixits (on es poden produir canvis de citosina a timina o de guanina a adenina en les bases que conformen l'ADN) seria el causant d'aquests percentatges tan elevats en pacients que no han rebut tractament (YE *et al.* 2013). Rebatent aquesta idea, el grup de Fujita analitzant teixit congelat, detecta aquesta mutació en un 79% de les mostres mitjançant una tècnica de sensibilitat del 0,01% (FUJITA *et al.* 2012). Cal remarcar que, en el treball aquí exposat, malgrat que la mutació T790M s'ha analitzat en mostres prèvies al tractament, tots els pacients eren portadors de les mutacions de sensibilitat d'EGFR.

6 CONCLUSIONS

-Elemental, estimat Watson

(El cas de la vídua roja- Conan Doyle)

Tenint presents totes les dades que s'han obtingut, tant dels experiments realitzats com de les validacions analítiques i clíniques, es poden extreure les següents conclusions:

6.1- Encara que la sensibilitat i especificitat de la tècnica de seqüenciació Sanger no és l'òptima, és possible detectar les mutacions del gen EGFR en mostres de teixit inclòs en parafina. Aquesta tècnica ha resultat adequada quan s'utilitza la microdissecció de les mostres per incrementar el nombre de cèl·lules tumorals.

6.2- Malgrat que la seqüenciació Sanger és considerat el mètode estàndard per detectar mutacions, les tècniques d'anàlisi de fragments (GeneScan) o de discriminació al·lèlica (TaqMan) són adequades per l'estudi de les mutacions més freqüents de l'exó 19, 20 i 21 del gen EGFR en mostres incloses en parafina.

6.3- En aplicar aquestes tècniques per analitzar les mutacions d'EGFR en mostres de teixit incloses en parafina, s'ha corroborat la concordança entre les dades de les respostes, les supervivències i les PFS amb les publicades en la bibliografia. Es pot concloure que aquestes tècniques són adequades per utilitzar-les en l'anàlisi de les mutacions d'EGFR per tal d'administrar el tractament adient per als pacients.

6.4- Els resultats de la validació clínica de l'anàlisi de les mutacions del gen EGFR posa de manifest que si bé hi ha un benefici respecte a respostes i PFS, no s'ha assolit diferències significatives respecte a la supervivència entre els pacients mutats tractats amb ITQ o quimioteràpia convencional. Aquest fet pot explicar-se pel rescat amb ITQ dels pacients que havien progressat a la quimioteràpia convencional, tal com també recull la bibliografia per a assajos semblants a aquest treball. Per tant, es pot concloure que l'administració en primera línia d'ITQ és la més adequada en pacients portadors de mutacions del gen EGFR.

6.5- Ha estat possible detectar les mutacions del gen EGFR en mostres de sang perifèrica, quan s'ha afegit la sonda PNA en les reaccions de GeneScan i TaqMan, aconseguint uns valors en la seva validació analítica semblants als que es descriuen en la bibliografia. D'aquesta manera es posa de manifest que aquest tipus de mostra és vàlida per analitzar les mutacions d'aquest gen en absència de teixit inclòs en parafina, tan difícil d'aconseguir en pacients avançats.

6.6- La validació clínica de l'anàlisi de les mutacions del gen EGFR en mostres de sang perifèrica dels pacients ha demostrat que és possible detectar-les tal com alguns autors descriuen en la bibliografia. De la mateixa manera, les característiques clínico-patològiques, respostes, supervivències i PFS obtingudes, són comparables a les que s'han publicat dels estudis realitzats amb pacients de les mateixes característiques que

6- CONCLUSIONS

els que s'han analitzat en aquest treball. Aquest tipus de mostra, per tant, es pot considerar com a font de material genètic adequat pel diagnòstic del pacient, a manca de teixit inclòs en parafina.

6.7- És possible la detecció de les mutacions de la posició T790M de l'exó 20 mitjançant la tècnica TaqMan on s'ha afegit la sonda PNA malgrat la elevada heterogeneïtat d'aquesta mutació en els tumors. La sensibilitat i especificitat que s'han assolit de la tècnica TaqMan és semblant a la descrita en la bibliografia i per tant es considera adequada per analitzar aquesta mutació.

6.8- S'ha aconseguit detectar la mutació T790M en les mostres dels pacients abans de començar el tractament amb ITQ. Malgrat que no s'ha pogut comprovar el seu efecte de resistència al tractament, s'ha observat que la PFS és superior en pacients que no se'ls ha detectat la mutació. Aquest fet dóna informació prèvia del pronòstic del pacient.

7 BIBLIOGRAFIA

*Els llibres no s'han fet
per a que creguem el que diuen
sinó per a que els analitzem
(El nom de la Rosa- Umberto Eco)*

- 2008 Oncoguia de pulmó, pp., edited by D. D. S. I. S. SOCIAL. Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques. CatSalut, Barcelona.
- ALBERG, A. J., J. G. FORD and J. M. SAMET, 2007 Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* **132**: 29S-55S.
- AMADOR, M. L., D. OPPENHEIMER, S. PEREA, A. MAITRA, G. CUSATIS *et al.*, 2004 An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res* **64**: 9139-9143.
- ANGULO, B., E. CONDE, A. SUAREZ-GAUTHIER, C. PLAZA, R. MARTINEZ *et al.*, 2012 A comparison of EGFR mutation testing methods in lung carcinoma: direct sequencing, real-time PCR and immunohistochemistry. *PLoS One* **7**: e43842.
- ANKER, P., H. MULCAHY, X. Q. CHEN and M. STROUN, 1999 Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* **18**: 65-73.
- APPLIED-BIOSYSTEMS, 2012 Users Guide: DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis, pp., edited by A. BIOSYSTEMS.
- ARAKI, T., K. SHIMIZU, T. NAKAMURA, M. BABA, Y. KAWAI *et al.*, 2011 Clinical screening assay for EGFR exon 19 mutations using PNA-clamp smart amplification process version 2 in lung adenocarcinoma. *Oncol Rep* **26**: 1213-1219.
- ARAO, T., H. FUKUMOTO, M. TAKEDA, T. TAMURA, N. SAIJO *et al.*, 2004 Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. *Cancer Res* **64**: 9101-9104.
- ARAUJO, A., R. RIBEIRO, I. AZEVEDO, A. COELHO, M. SOARES *et al.*, 2007 Genetic polymorphisms of the epidermal growth factor and related receptor in non-small cell lung cancer--a review of the literature. *Oncologist* **12**: 201-210.
- ARCILA, M. E., K. NAFA, J. E. CHAFT, N. REKHTMAN, C. LAU *et al.*, 2013 EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol Cancer Ther* **12**: 220-229.
- ARCILA, M. E., G. R. OXNARD, K. NAFA, G. J. RIELY, S. B. SOLOMON *et al.*, 2011 Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res* **17**: 1169-1180.
- ARRIAGADA, R., B. BERGMAN, A. DUNANT, T. LE CHEVALIER, J. P. PIGNON *et al.*, 2004 Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **350**: 351-360.
- ASANO, H., S. TOYOOKA, M. TOKUMO, K. ICHIMURA, K. AOE *et al.*, 2006 Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* **12**: 43-48.
- ASSAF, C., M. HUMMEL, E. DIPPEL, S. GOERDT, H. H. MULLER *et al.*, 2000 High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood* **96**: 640-646.
- BAGGSTROM, M. Q., T. E. STINCHCOMBE, D. B. FRIED, C. POOLE, T. A. HENSING *et al.*, 2007 Third-generation chemotherapy agents in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Oncol* **2**: 845-853.
- BAI, H., L. MAO, H. S. WANG, J. ZHAO, L. YANG *et al.*, 2009 Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **27**: 2653-2659.
- BAI, H., Z. WANG, Y. WANG, M. ZHUO, Q. ZHOU *et al.*, 2013 Detection and clinical significance of intratumoral EGFR mutational heterogeneity in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. *PLoS One* **8**: e54170.
- BALAK, M. N., Y. GONG, G. J. RIELY, R. SOMWAR, A. R. LI *et al.*, 2006 Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* **12**: 6494-6501.

- BALDUCCI, L., and C. BEGHE, 2001 Cancer and age in the USA. *Crit Rev Oncol Hematol* **37**: 137-145.
- BANDRES, E., R. BARRICARTE, C. CANTERO, B. HONORATO, R. MALUMBRES *et al.*, 2007 Epidermal growth factor receptor (EGFR) polymorphisms and survival in head and neck cancer patients. *Oral Oncol* **43**: 713-719.
- BASELGA, J., D. RISCHIN, M. RANSON, H. CALVERT, E. RAYMOND *et al.*, 2002 Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Oncol* **20**: 4292-4302.
- BASTIDE, K., N. UGOLIN, C. LEVALOIS, J. F. BERNAUDIN and S. CHEVILLARD, 2010 Are adenosquamous lung carcinomas a simple mix of adenocarcinomas and squamous cell carcinomas, or more complex at the molecular level? *Lung Cancer* **68**: 1-9.
- BEAN, J., C. BRENNAN, J. Y. SHIH, G. RIELY, A. VIALE *et al.*, 2007 MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20932-20937.
- BEAN, J., G. J. RIELY, M. BALAK, J. L. MARKS, M. LADANYI *et al.*, 2008 Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **14**: 7519-7525.
- BELL, D. W., B. W. BRANNIGAN, K. MATSUO, D. M. FINKELSTEIN, R. SORDELLA *et al.*, 2008 Increased prevalence of EGFR-mutant lung cancer in women and in East Asian populations: analysis of estrogen-related polymorphisms. *Clin Cancer Res* **14**: 4079-4084.
- BENESOVA, L., B. BELSANOVA, S. SUCHANEK, M. KOPECKOVA, P. MINARIKOVA *et al.*, 2013 Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Anal Biochem* **433**: 227-234.
- BEUTLER, E., T. GELBART and W. KUHL, 1990 Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **9**: 166.
- BIVONA, T. G., H. HIERONYMUS, J. PARKER, K. CHANG, M. TARON *et al.*, 2011 FAS and NF-kappaB signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR. *Nature* **471**: 523-526.
- BLUME-JENSEN, P., and T. HUNTER, 2001 Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**: 355-365.
- BOLAND, W., and G. BEBB, 2009 The emerging role of nimotuzumab in the treatment of non-small cell lung cancer. *Biologics* **4**: 289-298.
- BORRAS, E., I. JURADO, I. HERNAN, M. J. GAMUNDI, M. DIAS *et al.*, 2011 Clinical pharmacogenomic testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *BMC Cancer* **11**: 406.
- BORRÀS JM., P. J., IZQUIERDO A., BORRÀS J, 2008 Análisis de la incidencia, la supervivencia y la mortalidad según las principales localizaciones tumorales, 1985-2019: cáncer de pulmón. *Medicina Clínica* **131**: 53-57.
- BOS M., G. M., SCHILDHAUS H., BUETTNER R., WOLF J., 2013 Activated RET and ROS: two new driver mutations in lung adenocarcinoma. *Transl Lung Cancer Res* **2**: 112-121.
- BRENNAN, P., P. HAINAUT and P. BOFFETTA, 2011 Genetics of lung-cancer susceptibility. *Lancet Oncol* **12**: 399-408.
- BREVET, M., M. ARCILA and M. LADANYI, 2010 Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *J Mol Diagn* **12**: 169-176.
- BREVET, M., M. L. JOHNSON, C. G. AZZOLI and M. LADANYI, 2011 Detection of EGFR mutations in plasma DNA from lung cancer patients by mass spectrometry genotyping is predictive of tumor EGFR status and response to EGFR inhibitors. *Lung Cancer* **73**: 96-102.
- BURSTEIN, H. J., Y. SUN, L. Y. DIRIX, Z. JIANG, R. PARIDAENS *et al.*, 2010 Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* **28**: 1301-1307.

- BUTTITTA, F., L. FELICIONI, M. DEL GRAMMASTRO, G. FILICE, A. DI LORITO *et al.*, 2013 Effective Assessment of egfr Mutation Status in Bronchoalveolar Lavage and Pleural Fluids by Next-Generation Sequencing. *Clin Cancer Res* **19**: 691-698.
- CANELA, A., E. VERA, P. KLATT and M. A. BLASCO, 2007 High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5300-5305.
- CAPPUZZO, F., F. R. HIRSCH, E. ROSSI, S. BARTOLINI, G. L. CERESOLI *et al.*, 2005 Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **97**: 643-655.
- CAPPUZZO, F., P. A. JANNE, M. SKOKAN, G. FINOCCHIARO, E. ROSSI *et al.*, 2009 MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* **20**: 298-304.
- CAREY, K. D., A. J. GARTON, M. S. ROMERO, J. KAHLER, S. THOMSON *et al.*, 2006 Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res* **66**: 8163-8171.
- CARPENTER, G., K. J. LEMBACH, M. M. MORRISON and S. COHEN, 1975 Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem* **250**: 4297-4304.
- CASSELL, A., and J. R. GRANDIS, 2010 Investigational EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* **19**: 709-722.
- CENTENO, I., P. BLAY, I. SANTAMARIA, A. ASTUDILLO, A. S. PITIOT *et al.*, 2011 Germ-line mutations in epidermal growth factor receptor (EGFR) are rare but may contribute to oncogenesis: a novel germ-line mutation in EGFR detected in a patient with lung adenocarcinoma. *BMC Cancer* **11**: 172.
- CIULEANU, T., L. STELMAKH, S. CICENAS, S. MILIAUSKAS, A. C. GRIGORESCU *et al.*, 2012 Efficacy and safety of erlotinib versus chemotherapy in second-line treatment of patients with advanced, non-small-cell lung cancer with poor prognosis (TITAN): a randomised multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol* **13**: 300-308.
- COHEN, V., J. S. AGULNIK, J. JARRY, G. BATIST, D. SMALL *et al.*, 2006 Evaluation of denaturing high-performance liquid chromatography as a rapid detection method for identification of epidermal growth factor receptor mutations in nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* **107**: 2858-2865.
- COOPER, W. A., B. YU, P. Y. YIP, C. C. NG, T. LUM *et al.*, 2013 EGFR mutant-specific immunohistochemistry has high specificity and sensitivity for detecting targeted activating EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol*.
- CORTES-FUNES, H., C. GOMEZ, R. ROSELL, P. VALERO, C. GARCIA-GIRON *et al.*, 2005 Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* **16**: 1081-1086.
- COSTA, C., M. A. MOLINA, A. DROZDOWSKYJ, A. GIMENEZ-CAPITAN, J. BERTRAN-ALAMILLO *et al.*, 2014 The Impact of EGFR T790M Mutations and BIM mRNA Expression on Outcome in Patients with EGFR-Mutant NSCLC Treated with Erlotinib or Chemotherapy in the Randomized Phase III EURTAC Trial. *Clin Cancer Res* **20**: 2001-2010.
- COSTA, D. B., K. S. NGUYEN, B. C. CHO, L. V. SEQUIST, D. M. JACKMAN *et al.*, 2008a Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res* **14**: 7060-7067.
- COSTA, D. B., S. T. SCHUMER, D. G. TENEN and S. KOBAYASHI, 2008b Differential responses to erlotinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung cancers with acquired resistance to gefitinib carrying the L747S or T790M secondary mutations. *J Clin Oncol* **26**: 1182-1184; author reply 1184-1186.

7- BIBLIOGRAFIA

- CRINO, L., W. WEDER, J. VAN MEERBEECK and E. FELIP, 2010 Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **21 Suppl 5**: v103-115.
- CROCKFORD, A., M. JAMAL-HANJANI, J. HICKS and C. SWANTON, 2014 Implications of intratumour heterogeneity for treatment stratification. *J Pathol* **232**: 264-273.
- CROWLEY, E., F. DI NICOLANTONIO, F. LOUPAKIS and A. BARDELLI, 2013 Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* **10**: 472-484.
- CULLEN, M. H., L. J. BILLINGHAM, C. M. WOODROFFE, A. D. CHETIYAWARDANA, N. H. GOWER *et al.*, 1999 Mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in unresectable non-small-cell lung cancer: effects on survival and quality of life. *J Clin Oncol* **17**: 3188-3194.
- CHANG, A., P. PARIKH, S. THONGPRASERT, E. H. TAN, R. P. PERNG *et al.*, 2006 Gefitinib (IRESSA) in patients of Asian origin with refractory advanced non-small cell lung cancer: subset analysis from the ISEL study. *J Thorac Oncol* **1**: 847-855.
- CHARLTON S., G. R., HONDRED D., LIPTON C., WORDENK. , 2000 PCR Validation and Performance Characteristics - AEIC Biotech Consensus Paper, pp. The Analytical Environmental Immunochemical Consortium(AEIC) Secretariat, Dow AgroSciences, Indianapolis.
- CHEN, Y. M., W. C. FAN, P. C. TSENG, C. M. TSAI, T. Y. CHOU *et al.*, 2012a Plasma epidermal growth factor receptor mutation analysis and possible clinical applications in pulmonary adenocarcinoma patients treated with erlotinib. *Oncol Lett* **3**: 713-717.
- CHEN, Y. R., Y. N. FU, C. H. LIN, S. T. YANG, S. F. HU *et al.*, 2006 Distinctive activation patterns in constitutively active and gefitinib-sensitive EGFR mutants. *Oncogene* **25**: 1205-1215.
- CHEN, Z. Y., W. Z. ZHONG, X. C. ZHANG, J. SU, X. N. YANG *et al.*, 2012b EGFR mutation heterogeneity and the mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas. *Oncologist* **17**: 978-985.
- CHIN, T. M., D. ANUAR, R. SOO, M. SALTO-TELLEZ, W. Q. LI *et al.*, 2007 Detection of epidermal growth factor receptor variations by partially denaturing HPLC. *Clin Chem* **53**: 62-70.
- CHMIELECKI, J., J. FOO, G. R. OXNARD, K. HUTCHINSON, K. OHASHI *et al.*, 2011 Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. *Sci Transl Med* **3**: 90ra59.
- CHOI J., C. M., OH M., KIM H., KIL M., PARK H., 2010 PNA-mediated Real-Time PCR Clamping for Detection of EGFR Mutations. *Bull. Korean Chem. Soc* **31**: 3525-3529.
- CHONG, C. R., and P. A. JANNE, 2013 The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med* **19**: 1389-1400.
- CHOWDHURI, S. R., L. XI, T. H. PHAM, J. HANSON, J. RODRIGUEZ-CANALES *et al.*, 2012 EGFR and KRAS mutation analysis in cytologic samples of lung adenocarcinoma enabled by laser capture microdissection. *Mod Pathol* **25**: 548-555.
- CHU, C. T., K. D. EVERISS, C. J. WIKSTRAND, S. K. BATRA, H. J. KUNG *et al.*, 1997 Receptor dimerization is not a factor in the signalling activity of a transforming variant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII). *Biochem J* **324 (Pt 3)**: 855-861.
- CHUNG, K. P., S. G. WU, J. Y. WU, J. C. YANG, C. J. YU *et al.*, 2012 Clinical outcomes in non-small cell lung cancers harboring different exon 19 deletions in EGFR. *Clin Cancer Res* **18**: 3470-3477.
- D'ADDARIO, G., M. PINTILIE, N. B. LEIGHL, R. FELD, T. CERNY *et al.*, 2005 Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of the published literature. *J Clin Oncol* **23**: 2926-2936.
- D'ANGELO, S. P., and M. C. PIETANZA, 2010 The molecular pathogenesis of small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther* **10**: 1-10.
- D'ANGELO, S. P., M. C. PIETANZA, M. L. JOHNSON, G. J. RIELY, V. A. MILLER *et al.*, 2011 Incidence of EGFR exon 19 deletions and L858R in tumor specimens from men and cigarette smokers with lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol* **29**: 2066-2070.

- DACIC, S., M. FLANAGAN, K. CIEPLY, S. RAMALINGAM, J. LUKETICH *et al.*, 2006 Significance of EGFR protein expression and gene amplification in non-small cell lung carcinoma. *Am J Clin Pathol* **125**: 860-865.
- DAHABREH, I. J., H. LINARDOU, P. KOSMIDIS, D. BAFALOUKOS and S. MURRAY, 2010 EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* **22**: 545-552.
- DARWANTO A., F. P., YAN Z., LIU W., PELAK K., KRISTOF J., SANKAR S., SPITTLE C., GALDERISI C., LI J., 2013 Highly sensitive detection of EGFR T790M on Ion Torrent PGM n^o3490pp. in AACR, Walter E. Washington Convention Center
- DE GUNST, M. M., M. I. GALLEGOS-RUIZ, G. GIACCONE and J. A. RODRIGUEZ, 2007 Functional analysis of cancer-associated EGFR mutants using a cellular assay with YFP-tagged EGFR intracellular domain. *Mol Cancer* **6**: 56.
- DEPIERRE, A., B. MILLERON, D. MORO-SIBILOT, S. CHEVRET, E. QUOIX *et al.*, 2002 Preoperative chemotherapy followed by surgery compared with primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIa non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **20**: 247-253.
- DEVITA V., H. S., ROSENBERG S., 2011 Non-Small Cell Lung Cancer in *Cancer. Principles and practice of oncology 7th edition*, edited by L. W. A. WILKINS, Philadelphia.
- DIDELOT, A., D. LE CORRE, A. LUSCAN, A. CAZES, K. PALLIER *et al.*, 2012 Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples. *Exp Mol Pathol* **92**: 275-280.
- DIEHL, F., M. LI, D. DRESSMAN, Y. HE, D. SHEN *et al.*, 2005 Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16368-16373.
- DIEHL, F., K. SCHMIDT, M. A. CHOTI, K. ROMANS, S. GOODMAN *et al.*, 2008 Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* **14**: 985-990.
- DIENSTMANN, R., P. MARTINEZ and E. FELIP, 2011 Personalizing therapy with targeted agents in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2**: 165-177.
- DING, D., Y. YU, Z. LI, X. NIU and S. LU, 2014 The predictive role of pretreatment epidermal growth factor receptor T790M mutation on the progression-free survival of tyrosine-kinase inhibitor-treated non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* **7**: 387-393.
- DO, H., and A. DOBROVIC, 2009 Limited copy number-high resolution melting (LCN-HRM) enables the detection and identification by sequencing of low level mutations in cancer biopsies. *Mol Cancer* **8**: 82.
- DO, H., M. KRYPUY, P. L. MITCHELL, S. B. FOX and A. DOBROVIC, 2008 High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* **8**: 142.
- DOMIN, J., 2008 Phosphoinositide 3-Kinase Enzymes as Downstream Targets of the EGFR Receptor, pp. in *EGFR Signaling Networks in Cancer Therapy*, edited by W. J. G. JOHN D. HALEY. Humana Press, USA.
- DOUILLARD, J. Y., G. OSTOROS, M. COBO, T. CIULEANU, R. MCCORMACK *et al.*, 2014 First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* **110**: 55-62.
- DOUILLARD, J. Y., F. A. SHEPHERD, V. HIRSH, T. MOK, M. A. SOCINSKI *et al.*, 2010 Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer: data from the randomized phase III INTEREST trial. *J Clin Oncol* **28**: 744-752.
- DRILON, A., N. REKHTMAN, M. LADANYI and P. PAIK, 2012 Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *Lancet Oncol* **13**: e418-426.

- DUFORT, S., M. J. RICHARD, S. LANTUEJOUL and F. DE FRAIPONT, 2011 Pyrosequencing, a method approved to detect the two major EGFR mutations for anti EGFR therapy in NSCLC. *J Exp Clin Cancer Res* **30**: 57.
- EBERHARD, D. A., B. E. JOHNSON, L. C. AMLER, A. D. GODDARD, S. L. HELDENS *et al.*, 2005 Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* **23**: 5900-5909.
- ECK, M. J., and C. H. YUN, 2010 Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta* **1804**: 559-566.
- EDERVEEN, J. C., 2010 A practical approach to biological assay validation, pp. Dutch Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment (VROM).
- EKSTROM, P. O., J. BJORHEIM and W. G. THILLY, 2007 Technology to accelerate pangenomic scanning for unknown point mutations in exonic sequences: cycling temperature capillary electrophoresis (CTCE). *BMC Genet* **8**: 54.
- EL MESSAOUDI, S., F. ROLET, F. MOULIERE and A. R. THIERRY, 2013 Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* **424**: 222-230.
- ELLISON, G., E. DONALD, G. MCWALTER, L. KNIGHT, L. FLETCHER *et al.*, 2010 A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples. *J Exp Clin Cancer Res* **29**: 132.
- ELLISON, G., G. ZHU, A. MOULIS, S. DEARDEN, G. SPEAKE *et al.*, 2013 EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J Clin Pathol* **66**: 79-89.
- EMMERT-BUCK, M. R., R. F. BONNER, P. D. SMITH, R. F. CHUAQUI, Z. ZHUANG *et al.*, 1996 Laser capture microdissection. *Science* **274**: 998-1001.
- ENDO, K., A. KONISHI, H. SASAKI, M. TAKADA, H. TANAKA *et al.*, 2005 Epidermal growth factor receptor gene mutation in non-small cell lung cancer using highly sensitive and fast TaqMan PCR assay. *Lung Cancer* **50**: 375-384.
- ENGELMAN, J. A., and P. A. JANNE, 2008 Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **14**: 2895-2899.
- ENGELMAN, J. A., T. MUKOHARA, K. ZEJNULLAHU, E. LIFSHITS, A. M. BORRAS *et al.*, 2006 Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest* **116**: 2695-2706.
- ENGELMAN, J. A., K. ZEJNULLAHU, C. M. GALE, E. LIFSHITS, A. J. GONZALES *et al.*, 2007 PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res* **67**: 11924-11932.
- ESPINA, V., M. HEIBY, M. PIEROBON and L. A. LIOTTA, 2007 Laser capture microdissection technology. *Expert Rev Mol Diagn* **7**: 647-657.
- FELIP, E., R. ROSELL, J. A. MAESTRE, J. M. RODRIGUEZ-PANIAGUA, T. MORAN *et al.*, 2010 Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **28**: 3138-3145.
- FERGUSON, K. M., M. B. BERGER, J. M. MENDROLA, H. S. CHO, D. J. LEAHY *et al.*, 2003 EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* **11**: 507-517.
- FILOSTO, S., C. R. BECKER and T. GOLDKORN, 2012 Cigarette smoke induces aberrant EGF receptor activation that mediates lung cancer development and resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Mol Cancer Ther* **11**: 795-804.
- FISHER, R., L. PUSZTAI and C. SWANTON, 2013 Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer* **108**: 479-485.

- FLEISCHHACKER, M., and B. SCHMIDT, 2007 Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* **1775**: 181-232.
- FLEISCHHACKER, M., B. SCHMIDT, S. WEICKMANN, D. M. FERSCHING, G. S. LESZINSKI *et al.*, 2011 Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta* **412**: 2085-2088.
- FORSHEW, T., M. MURTAZA, C. PARKINSON, D. GALE, D. W. TSUI *et al.*, 2012 Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* **4**: 136ra168.
- FUJITA, Y., K. SUDA, H. KIMURA, K. MATSUMOTO, T. ARAO *et al.*, 2012 Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation. *J Thorac Oncol* **7**: 1640-1644.
- FUKUI, T., Y. OHE, K. TSUTA, K. FURUTA, H. SAKAMOTO *et al.*, 2008 Prospective study of the accuracy of EGFR mutational analysis by high-resolution melting analysis in small samples obtained from patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **14**: 4751-4757.
- FUKUOKA, M., S. YANO, G. GIACCONE, T. TAMURA, K. NAKAGAWA *et al.*, 2003 Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* **21**: 2237-2246.
- GAHAN, P. B., P. ANKER and M. STROUN, 2008 Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci* **1137**: 7-17.
- GANDHI, J., J. ZHANG, Y. XIE, J. SOH, H. SHIGEMATSU *et al.*, 2009 Alterations in genes of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines. *PLoS One* **4**: e4576.
- GANDHI, L., R. BAHLEDA, S. M. TOLANEY, E. L. KWAK, J. M. CLEARY *et al.*, 2014 Phase I study of neratinib in combination with temsirolimus in patients with human epidermal growth factor receptor 2-dependent and other solid tumors. *J Clin Oncol* **32**: 68-75.
- GARASSINO, M. C., K. BORGONOVO, A. ROSSI, A. MANCUSO, O. MARTELLI *et al.*, 2009 Biological and clinical features in predicting efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res* **29**: 2691-2701.
- GARASSINO, M. C., O. MARTELLI, M. BROGGINI, G. FARINA, S. VERONESE *et al.*, 2013 Erlotinib versus docetaxel as second-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer and wild-type EGFR tumours (TAILOR): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* **14**: 981-988.
- GARCIA-OLIVE, I., E. MONSO, F. ANDREO, J. SANZ-SANTOS, M. TARON *et al.*, 2010 Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for identifying EGFR mutations. *Eur Respir J* **35**: 391-395.
- GARCIA-OLMO, D. C., C. DOMINGUEZ, M. GARCIA-ARRANZ, P. ANKER, M. STROUN *et al.*, 2010 Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* **70**: 560-567.
- GARRIDO-CASTRO AC., F. E., 2013 HER2 driven non-small cell lung cancer (NSCLC): potential therapeutic approaches. *Translational Lung Cancer Research* **2**: 122-127.
- GATZEMEIER, U., A. PLUZANSKA, A. SZCZESNA, E. KAUKEL, J. ROUBEC *et al.*, 2007 Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol* **25**: 1545-1552.
- GAUTSCHI, O., C. BIGOSCH, B. HUEGLI, M. JERMANN, A. MARX *et al.*, 2004 Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* **22**: 4157-4164.
- GAYLORD, B. S., M. R. MASSIE, S. C. FEINSTEIN and G. C. BAZAN, 2005 SNP detection using peptide nucleic acid probes and conjugated polymers: applications in neurodegenerative disease identification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 34-39.

7- BIBLIOGRAFIA

- GAZDAR, A. F., 2009 Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* **28 Suppl 1**: S24-31.
- GAZDAR, A. F., 2010 Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: the evolving role of individualized therapy. *Cancer Metastasis Rev* **29**: 37-48.
- GAZDAR, A. F., H. SHIGEMATSU, J. HERZ and J. D. MINNA, 2004 Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heal' of lung cancers? *Trends Mol Med* **10**: 481-486.
- GEBHARDT, F., K. S. ZANKER and B. BRANDT, 1999 Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* **274**: 13176-13180.
- GERLINGER, M., A. J. ROWAN, S. HORSWELL, J. LARKIN, D. ENDESFELDER *et al.*, 2012 Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* **366**: 883-892.
- GIACCONE, G., R. S. HERBST, C. MANEGOLD, G. SCAGLIOTTI, R. ROSELL *et al.*, 2004 Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* **22**: 777-784.
- GILBERT, M. T., T. HASELKORN, M. BUNCE, J. J. SANCHEZ, S. B. LUCAS *et al.*, 2007 The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One* **2**: e537.
- GILLIGAN, D., M. NICOLSON, I. SMITH, H. GROEN, O. DALESIO *et al.*, 2007 Preoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of the MRC LU22/NVALT 2/EORTC 08012 multicentre randomised trial and update of systematic review. *Lancet* **369**: 1929-1937.
- GOLENBERG, E. M., A. BICKEL and P. WEIHS, 1996 Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res* **24**: 5026-5033.
- GOLLARD, R., S. JHATAKIA, M. ELLIOTT and M. KOSTY, 2010 Large cell/neuroendocrine carcinoma. *Lung Cancer* **69**: 13-18.
- GONG, Y., R. SOMWAR, K. POLITI, M. BALAK, J. CHMIELECKI *et al.*, 2007 Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med* **4**: e294.
- GORMALLY, E., E. CABOUX, P. VINEIS and P. HAINAUT, 2007 Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res* **635**: 105-117.
- GOTO, K., Y. ICHINOSE, Y. OHE, N. YAMAMOTO, S. NEGORO *et al.*, 2012 Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **7**: 115-121.
- GOTO, K., M. NISHIO, N. YAMAMOTO, K. CHIKAMORI, T. HIDA *et al.*, 2013 A prospective, phase II, open-label study (JO22903) of first-line erlotinib in Japanese patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*.
- GRAUS-PORTA, D., R. R. BEERLI, J. M. DALY and N. E. HYNES, 1997 ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* **16**: 1647-1655.
- GRAY, J., E. SOMMERS, M. ALVELO-RIVERA, L. ROBINSON and G. BEPLER, 2009 Neoadjuvant chemotherapy for resectable non-small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)* **23**: 879-886.
- GREER, C. E., S. L. PETERSON, N. B. KIVIAT and M. M. MANOS, 1991 PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* **95**: 117-124.
- GREULICH, H., 2010 The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies. *Genes Cancer* **1**: 1200-1210.

- GREULICH, H., T. H. CHEN, W. FENG, P. A. JANNE, J. V. ALVAREZ *et al.*, 2005 Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med* **2**: e313.
- GUHA, M., E. CASTELLANOS-RIZALDOS and G. M. MAKRIGIORGOS, 2013 DISSECT Method Using PNA-LNA Clamp Improves Detection of T790m Mutation. *PLoS One* **8**: e67782.
- HAMILTON, M., J. L. WOLF, J. RUSK, S. E. BEARD, G. M. CLARK *et al.*, 2006 Effects of smoking on the pharmacokinetics of erlotinib. *Clin Cancer Res* **12**: 2166-2171.
- HAN, H. S., S. N. LIM, J. Y. AN, K. M. LEE, K. H. CHOE *et al.*, 2012 Detection of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma specimens with different proportions of tumor cells using two methods of differential sensitivity. *J Thorac Oncol* **7**: 355-364.
- HAN, S. W., T. Y. KIM, P. G. HWANG, S. JEONG, J. KIM *et al.*, 2005 Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol* **23**: 2493-2501.
- HAYAKAWA, K., 2003 [Radiation therapy in the treatment of lung cancer]. *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* **63**: 533-538.
- HE, C., M. LIU, C. ZHOU, J. ZHANG, M. OUYANG *et al.*, 2009 Detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by mutant-enriched PCR assay for prediction of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* **125**: 2393-2399.
- HE, C., L. ZHENG, Y. XU, M. LIU, Y. LI *et al.*, 2013 Highly sensitive and noninvasive detection of epidermal growth factor receptor T790M mutation in non-small cell lung cancer. *Clin Chim Acta* **425**: 119-124.
- HE, M., M. CAPELLETTI, K. NAFA, C. H. YUN, M. E. ARCILA *et al.*, 2012 EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **18**: 1790-1797.
- HERBST, R. S., G. GIACCONE, J. H. SCHILLER, R. B. NATALE, V. MILLER *et al.*, 2004 Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* **22**: 785-794.
- HERBST, R. S., A. M. MADDOX, M. L. ROTHENBERG, E. J. SMALL, E. H. RUBIN *et al.*, 2002 Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* **20**: 3815-3825.
- HERBST, R. S., D. PRAGER, R. HERMANN, L. FEHRENBACHER, B. E. JOHNSON *et al.*, 2005 TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **23**: 5892-5899.
- HIRSCH, F. R., G. V. SCAGLIOTTI, C. J. LANGER, M. VARELLA-GARCIA and W. A. FRANKLIN, 2003a Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer* **41 Suppl 1**: S29-42.
- HIRSCH, F. R., M. VARELLA-GARCIA, P. A. BUNN, JR., M. V. DI MARIA, R. VEVE *et al.*, 2003b Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* **21**: 3798-3807.
- HIRSCH, F. R., M. VARELLA-GARCIA, P. A. BUNN, JR., W. A. FRANKLIN, R. DZIADZIUSZKO *et al.*, 2006 Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **24**: 5034-5042.
- HOSHI, K., H. TAKAKURA, Y. MITANI, K. TATSUMI, N. MOMIYAMA *et al.*, 2007 Rapid detection of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer by the SMart-Amplification Process. *Clin Cancer Res* **13**: 4974-4983.
- HSIA, A. P., T. J. WEN, H. D. CHEN, Z. LIU, M. D. YANDEAU-NELSON *et al.*, 2005 Temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE)--a tool for the high-throughput discovery and mapping of SNPs and IDPs. *Theor Appl Genet* **111**: 218-225.

7- BIBLIOGRAFIA

- HU, C., X. LIU, Y. CHEN, X. SUN, Y. GONG *et al.*, 2012 Direct serum and tissue assay for EGFR mutation in non-small cell lung cancer by high-resolution melting analysis. *Oncol Rep* **28**: 1815-1821.
- HUBBARD, S. R., and J. H. TILL, 2000 Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* **69**: 373-398.
- HUBERS, A. J., D. A. HEIDEMAN, Y. YATABE, M. D. WOOD, J. TULL *et al.*, 2013 EGFR mutation analysis in sputum of lung cancer patients: A multitechnique study. *Lung Cancer*.
- HUFNAGL C., S. C. M., MOIK M., GEISBERGER R., GREIL R., 2013 A modified Phenol-chloroform extraction method for isolating circulating cell free DNA of tumor patients. *The Journal of Nucleic Acids Investigation* **4**: 1-3.
- HUSSAIN, S. P., and C. C. HARRIS, 1998 Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* **58**: 4023-4037.
- HYNES, N. E., 2005 Receptor tyrosine kinases as therapeutic targets in cancer. *Discov Med* **5**: 483-488.
- IKEDA, K., H. NOMORI, T. MORI, J. SASAKI and T. KOBAYASHI, 2008 Novel germline mutation: EGFR V843I in patient with multiple lung adenocarcinomas and family members with lung cancer. *Ann Thorac Surg* **85**: 1430-1432.
- INNIS, M. A. G., D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J., 1990 *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc.
- INOUE, A., K. KOBAYASHI, K. USUI, M. MAEMONDO, S. OKINAGA *et al.*, 2009 First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol* **27**: 1394-1400.
- INOUE, A., T. SUZUKI, T. FUKUHARA, M. MAEMONDO, Y. KIMURA *et al.*, 2006 Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J Clin Oncol* **24**: 3340-3346.
- INOUE A., K. K., MAEMONDO M., SUGAWARA S., OIZUMI S., ISOBE H., GEMMA A., HARADA M., YOSHIZAWA H., KINOSHITA I., FUJITA Y., OKINAGA S., HIRANO H., YOSHIMORI K., HARADA T., SAIJO Y., HAGIWARA K., MORITA S., NUKIWA T., 2013 Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Annals of oncology* **24**: 54-59.
- INOUE, T., K. NABESHIMA, H. KATAOKA and M. KOONO, 1996 Feasibility of archival non-buffered formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for PCR amplification: an analysis of resected gastric carcinoma. *Pathol Int.* **46**: 997-1004.
- INUKAI, M., S. TOYOOKA, S. ITO, H. ASANO, S. ICHIHARA *et al.*, 2006 Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **66**: 7854-7858.
- INVITROGEN, 2010 Platinum® Taq DNA Polymerase, pp. 4, edited by INVITROGEN.
- JACKMAN, D. M., B. Y. YEAP, L. V. SEQUIST, N. LINDEMAN, A. J. HOLMES *et al.*, 2006 Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* **12**: 3908-3914.
- JANG, H., J. KIM, J. J. CHOI, Y. SON and H. PARK, 2010 Peptide nucleic acid array for detection of point mutations in hepatitis B virus associated with antiviral resistance. *J Clin Microbiol* **48**: 3127-3131.
- JANJIGIAN Y., G. H., HORN L., SMIT E., FU Y., WANG F., SHAHIDI M., DENIS L., PAO W., MILLER V., 2011 Activity and tolerability of afatinib (BIBW 2992) and cetuximab in NSCLC patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib, pp. (15S):7525 in *ASCO*. *J Clin Oncol*.
- JANNE P., W. M., LEACH J., ENGELMAN J., 2008 Targeting MET with XL184 to reverse EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) resistance in NSCLC: impact of preclinical studies on clinical trial design, pp. 174. *European Journal of Cancer*.

- JANNE, P. A., A. M. BORRAS, Y. KUANG, A. M. ROGERS, V. A. JOSHI *et al.*, 2006 A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clin Cancer Res* **12**: 751-758.
- JANNE, P. A., D. S. BOSS, D. R. CAMIDGE, C. D. BRITTEN, J. A. ENGELMAN *et al.*, 2011 Phase I dose-escalation study of the pan-HER inhibitor, PF299804, in patients with advanced malignant solid tumors. *Clin Cancer Res* **17**: 1131-1139.
- JANNE, P. A., X. WANG, M. A. SOCINSKI, J. CRAWFORD, T. E. STINCHCOMBE *et al.*, 2012 Randomized phase II trial of erlotinib alone or with carboplatin and paclitaxel in patients who were never or light former smokers with advanced lung adenocarcinoma: CALGB 30406 trial. *J Clin Oncol* **30**: 2063-2069.
- JEMAL, A., F. BRAY, M. M. CENTER, J. FERLAY, E. WARD *et al.*, 2011 Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**: 69-90.
- Ji, H., D. LI, L. CHEN, T. SHIMAMURA, S. KOBAYASHI *et al.*, 2006 The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell* **9**: 485-495.
- JIAN, G., Z. SONGWEN, Z. LING, D. QINFANG, Z. JIE *et al.*, 2010 Prediction of epidermal growth factor receptor mutations in the plasma/pleural effusion to efficacy of gefitinib treatment in advanced non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**: 1341-1347.
- JIANG, B., F. LIU, L. YANG, W. ZHANG, H. YUAN *et al.*, 2011 Serum detection of epidermal growth factor receptor gene mutations using mutant-enriched sequencing in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Int Med Res* **39**: 1392-1401.
- JIANG, G., C. FAN, X. ZHANG, Q. DONG, L. WANG *et al.*, 2013 Ascertaining an appropriate diagnostic algorithm using EGFR mutation-specific antibodies to detect EGFR status in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* **8**: e59183.
- JIANG, S. X., K. YAMASHITA, M. YAMAMOTO, C. J. PIAO, A. UMEZAWA *et al.*, 2008 EGFR genetic heterogeneity of nonsmall cell lung cancers contributing to acquired gefitinib resistance. *Int J Cancer* **123**: 2480-2486.
- JORISSEN, R. N., F. WALKER, N. POULIOT, T. P. GARRETT, C. W. WARD *et al.*, 2003 Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* **284**: 31-53.
- JUNG, M., B. C. CHO, C. H. LEE, H. S. PARK, Y. A. KANG *et al.*, 2012 EGFR polymorphism as a predictor of clinical outcome in advanced lung cancer patients treated with EGFR-TKI. *Yonsei Med J* **53**: 1128-1135.
- JURA, N., N. F. ENDRES, K. ENGEL, S. DEINDL, R. DAS *et al.*, 2009 Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* **137**: 1293-1307.
- KAIHATSU, K., K. E. HUFFMAN and D. R. COREY, 2004 Intracellular uptake and inhibition of gene expression by PNAs and PNA-peptide conjugates. *Biochemistry* **43**: 14340-14347.
- KANCHA, R. K., C. PESCHEL and J. DUYSER, 2011 The epidermal growth factor receptor-L861Q mutation increases kinase activity without leading to enhanced sensitivity toward epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *J Thorac Oncol* **6**: 387-392.
- KAPABIOSYSTEMS, Introduction to High Resolution Melt Analysis v1.10, pp. 17, edited by KAPABIOSYSTEMS.
- KARNOFSKY, D. A., W. H. ABELMANN, L. F. CRAVER and J. H. BURCHENAL, 1948 The use of the nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. With particular reference to bronchogenic carcinoma. *Cancer* **1**: 634-656.
- KATO, Y., N. PELED, M. W. WYNES, K. YOSHIDA, M. PARDO *et al.*, 2010 Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for non-small cell lung cancer: immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth factor receptor mutations. *J Thorac Oncol* **5**: 1551-1558.
- KAWADA, I., K. SOEJIMA, H. WATANABE, I. NAKACHI, H. YASUDA *et al.*, 2008 An alternative method for screening EGFR mutation using RFLP in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* **3**: 1096-1103.

- KAWAHARA, A., K. AZUMA, A. SUMI, T. TAIRA, K. NAKASHIMA *et al.*, 2011 Identification of non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations in malignant effusion and cerebrospinal fluid: rapid and sensitive detection of exon 19 deletion E746-A750 and exon 21 L858R mutation by immunocytochemistry. *Lung Cancer* **74**: 35-40.
- KAWANO, O., H. SASAKI, K. ENDO, E. SUZUKI, H. HANEDA *et al.*, 2006 PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer* **54**: 209-215.
- KEAM, B., D. W. KIM, J. H. PARK, J. O. LEE, T. M. KIM *et al.*, 2013 Rare and complex mutations of epidermal growth factor receptor, and efficacy of tyrosine kinase inhibitor in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*.
- KELLY, K., J. CROWLEY, P. A. BUNN, JR., C. A. PRESANT, P. K. GREVSTAD *et al.*, 2001 Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non--small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol* **19**: 3210-3218.
- KHODE, R., D. A. LARSEN, B. C. CULBREATH, S. PARRISH, K. L. WALKER *et al.*, 2013 Comparative study of epidermal growth factor receptor mutation analysis on cytology smears and surgical pathology specimens from primary and metastatic lung carcinomas. *Cancer Cytopathol*.
- KIM, E. S., V. HIRSH, T. MOK, M. A. SOCINSKI, R. GERVAIS *et al.*, 2008 Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet* **372**: 1809-1818.
- KIM, H. J., K. Y. LEE, Y. C. KIM, K. S. KIM, S. Y. LEE *et al.*, 2012a Detection and comparison of peptide nucleic acid-mediated real-time polymerase chain reaction clamping and direct gene sequencing for epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **75**: 321-325.
- KIM, H. R., S. Y. LEE, D. S. HYUN, M. K. LEE, H. K. LEE *et al.*, 2013 Detection of EGFR mutations in circulating free DNA by PNA-mediated PCR clamping. *J Exp Clin Cancer Res* **32**: 50.
- KIM, K. S., J. Y. JEONG, Y. C. KIM, K. J. NA, Y. H. KIM *et al.*, 2005 Predictors of the response to gefitinib in refractory non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 2244-2251.
- KIM ST, J. H., SUNG JS, JO UH, TANAKA T, HAGIWARA K, PARK KH, SHIN SW, KIM JS, KIM YH., 2013 Can serum be used for analyzing the EGFR mutation status in patients with advanced non-small cell lung cancer? *American Journal of Clinical Oncology* **36**: 57-63.
- KIM, S. T., J. E. UHM, J. LEE, J. M. SUN, I. SOHN *et al.*, 2012b Randomized phase II study of gefitinib versus erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer who failed previous chemotherapy. *Lung Cancer* **75**: 82-88.
- KIMURA, H., Y. FUJIWARA, T. SONE, H. KUNITOH, T. TAMURA *et al.*, 2006a EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib. *Br J Cancer* **95**: 1390-1395.
- KIMURA, H., Y. FUJIWARA, T. SONE, H. KUNITOH, T. TAMURA *et al.*, 2006b High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci* **97**: 642-648.
- KIMURA, H., K. KASAHARA, M. KAWAISHI, H. KUNITOH, T. TAMURA *et al.*, 2006c Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 3915-3921.
- KIMURA, H., K. KASAHARA, K. SHIBATA, T. SONE, A. YOSHIMOTO *et al.*, 2006d EGFR mutation of tumor and serum in gefitinib-treated patients with chemotherapy-naive non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **1**: 260-267.
- KIMURA, H., M. SUMINOE, K. KASAHARA, T. SONE, T. ARAYA *et al.*, 2007 Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer* **97**: 778-784.
- KITAMURA, A., W. HOSODA, E. SASAKI, T. MITSUDOMI and Y. YATABE, 2010 Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer. *Clin Cancer Res* **16**: 3349-3355.

- KOBAYASHI, S., T. J. BOGGON, T. DAYARAM, P. A. JANNE, O. KOCHER *et al.*, 2005 EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **352**: 786-792.
- KOSAKA, T., Y. YATABE, H. ENDOH, H. KUWANO, T. TAKAHASHI *et al.*, 2004 Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* **64**: 8919-8923.
- KOZU, Y., K. TSUTA, T. KOHNO, I. SEKINE, A. YOSHIDA *et al.*, 2011 The usefulness of mutation-specific antibodies in detecting epidermal growth factor receptor mutations and in predicting response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* **73**: 45-50.
- KRAMER, M. F., and D. M. COEN, 2001 Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 10**: Unit 10 20.
- KREBS, M. G., R. SLOANE, L. PRIEST, L. LANCASHIRE, J. M. HOU *et al.*, 2011 Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **29**: 1556-1563.
- KRIS M., M. T., KIM E., DOUILLARD J.Y., FUKUOKA M., THATCHER N. , 2009 Response and progression-free survival in 1006 patients with known EGFR mutation status in phase III randomized trials of gefitinib in individuals with non-small cell lung cancer. *EJC Supplements* **7**: 505-506.
- KRIS, M. G., R. B. NATALE, R. S. HERBST, T. J. LYNCH, JR., D. PRAGER *et al.*, 2003 Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *Jama* **290**: 2149-2158.
- KUAN, C. T., C. J. WIKSTRAND and D. D. BIGNER, 2001 EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* **8**: 83-96.
- KUANG, Y., A. ROGERS, B. Y. YEAP, L. WANG, M. MAKRIGIORGOS *et al.*, 2009 Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 2630-2636.
- KUMAR, A., E. T. PETRI, B. HALMOS and T. J. BOGGON, 2008 Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* **26**: 1742-1751.
- KURATA, T., K. TAMURA, H. KANEDA, T. NOGAMI, H. UEJIMA *et al.*, 2004 Effect of re-treatment with gefitinib ('Iressa', ZD1839) after acquisition of resistance. *Ann Oncol* **15**: 173-174.
- KWAK, E., 2011 The role of irreversible HER family inhibition in the treatment of patients with non-small cell lung cancer. *Oncologist* **16**: 1498-1507.
- LAM, N. Y., T. H. RAINER, R. W. CHIU and Y. M. LO, 2004 EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clin Chem* **50**: 256-257.
- LEAHY, 2004 Structure and function of the epidermal growth factor (egf/erbB) family of receptors. *Advances in Protein Chemistry* **68**.
- LEE, H. J., X. XU, G. CHOE, D. H. CHUNG, J. W. SEO *et al.*, 2010 Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: Comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study. *Lung Cancer* **68**: 375-382.
- LEE, S., V. H. BROPHY, J. CAO, M. VELEZ, C. HOEPPNER *et al.*, 2012 Analytical performance of a PCR assay for the detection of KRAS mutations (codons 12/13 and 61) in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* **460**: 141-149.
- LEE, T. H., L. MONTALVO, V. CHREBLOW and M. P. BUSCH, 2001 Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* **41**: 276-282.
- LEE, Y., LEE, G. K., LEE, Y.-S., ZHANG, W., HWANG, J.-A., NAM, B.-H., KIM, S. H., KIM, J.-H., YUN, T., HAN, J.-Y., KIM, H. T., LEE, J. S., 2014 Clinical outcome according to the level of preexisting epidermal growth factor receptor T790M mutation in patients with lung cancer harboring sensitive epidermal growth factor receptor mutations. *Cancer*.

7- BIBLIOGRAFIA

- LEE, Y. J., K. A. YOON, J. Y. HAN, H. T. KIM, T. YUN *et al.*, 2011 Circulating cell-free DNA in plasma of never smokers with advanced lung adenocarcinoma receiving gefitinib or standard chemotherapy as first-line therapy. *Clin Cancer Res* **17**: 5179-5187.
- LEON, S. A., B. SHAPIRO, D. M. SKLAROFF and M. J. YAROS, 1977 Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* **37**: 646-650.
- LEONE, A., 2013 Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation in pre-TKI specimens of EGFR-mutated NSCLC: in cis, in trans, or a different clone? *J Thorac Oncol* **8**: e26-27.
- LEVY, D. E., and J. E. DARNELL, JR., 2002 Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 651-662.
- LI-SUCHOLEIKI, X. C., and W. G. THILLY, 2000 A sensitive scanning technology for low frequency nuclear point mutations in human genomic DNA. *Nucleic Acids Res* **28**: E44.
- LI, D., L. AMBROGIO, T. SHIMAMURA, S. KUBO, M. TAKAHASHI *et al.*, 2008a BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **27**: 4702-4711.
- LI, J., L. WANG, P. A. JANNE and G. M. MAKRIGIORGOS, 2009 Coamplification at lower denaturation temperature-PCR increases mutation-detection selectivity of TaqMan-based real-time PCR. *Clin Chem* **55**: 748-756.
- LI, J., L. WANG, H. MAMON, M. H. KULKE, R. BERBECO *et al.*, 2008b Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med* **14**: 579-584.
- LI, S., P. KUSSIE and K. M. FERGUSON, 2008c Structural basis for EGF receptor inhibition by the therapeutic antibody IMC-11F8. *Structure* **16**: 216-227.
- LI, S., K. R. SCHMITZ, P. D. JEFFREY, J. J. WILTZIUS, P. KUSSIE *et al.*, 2005 Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**: 301-311.
- LIANG, Z., J. ZHANG, X. ZENG, J. GAO, S. WU *et al.*, 2010 Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas. *BMC Cancer* **10**: 376.
- LINARDOU, H., I. J. DAHABREH, D. KANALOUPITI, F. SIANNIS, D. BAFALOUKOS *et al.*, 2008 Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* **9**: 962-972.
- LIU, G., S. GURUBHAGAVATULA, W. ZHOU, Z. WANG, B. Y. YEAP *et al.*, 2008 Epidermal growth factor receptor polymorphisms and clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Pharmacogenomics J* **8**: 129-138.
- LIU, L., Y. LI, S. LI, N. HU, Y. HE *et al.*, 2012 Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* **2012**: 251364.
- LIU, W., L. HE, J. RAMIREZ, S. KRISHNASWAMY, R. KANTETI *et al.*, 2011a Functional EGFR germline polymorphisms may confer risk for EGFR somatic mutations in non-small cell lung cancer, with a predominant effect on exon 19 microdeletions. *Cancer Res* **71**: 2423-2427.
- LIU, Y., B. LIU, X. Y. LI, J. J. LI, H. F. QIN *et al.*, 2011b A comparison of ARMS and direct sequencing for EGFR mutation analysis and tyrosine kinase inhibitors treatment prediction in body fluid samples of non-small-cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* **30**: 111.
- LIVAK, K. J., 1999 Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* **14**: 143-149.
- LOPEZ-RIOS, F., B. ANGULO, B. GOMEZ, D. MAIR, R. MARTINEZ *et al.*, 2013 Comparison of molecular testing methods for the detection of EGFR mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*.
- LYNCH, T. J., D. W. BELL, R. SORDELLA, S. GURUBHAGAVATULA, R. A. OKIMOTO *et al.*, 2004 Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **350**: 2129-2139.

- MA, C., S. WEI and Y. SONG, 2011 T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *J Thorac Dis* **3**: 10-18.
- MA, E. S., P. N. CHENG, C. L. WONG and A. P. YIM, 2010 Synchronous primary lung cancer and epidermal growth factor receptor mutation. *Ann Thorac Surg* **90**: e38-39.
- MA, F., T. SUN, Y. SHI, D. YU, W. TAN *et al.*, 2009 Polymorphisms of EGFR predict clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with Gefitinib. *Lung Cancer* **66**: 114-119.
- MACCHIARINI, P., A. R. CHAPELIER, I. MONNET, J. M. VANNETZEL, J. L. REBISCHUNG *et al.*, 1994 Extended operations after induction therapy for stage IIIB (T4) non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* **57**: 966-973.
- MACK, P. C., W. S. HOLLAND, R. A. BURICH, R. SANGHA, L. J. SOLIS *et al.*, 2009 EGFR mutations detected in plasma are associated with patient outcomes in erlotinib plus docetaxel-treated non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **4**: 1466-1472.
- MAEMONDO, M., A. INOUE, K. KOBAYASHI, S. SUGAWARA, S. OIZUMI *et al.*, 2010 Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* **362**: 2380-2388.
- MAHESWARAN, S., L. V. SEQUIST, S. NAGRATH, L. ULKUS, B. BRANNIGAN *et al.*, 2008 Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* **359**: 366-377.
- MANDEL, P., and P. MÉTAIS, 1948 Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Acad. Sci. Paris* **142**: 241-243.
- MARCHETTI, A., C. MARTELLA, L. FELICIONI, F. BARASSI, S. SALVATORE *et al.*, 2005 EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* **23**: 857-865.
- MARUSYK, A., and K. POLYAK, 2010 Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* **1805**: 105-117.
- MARUYAMA, R., Y. NISHIWAKI, T. TAMURA, N. YAMAMOTO, M. TSUBOI *et al.*, 2008 Phase III study, V-15-32, of gefitinib versus docetaxel in previously treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **26**: 4244-4252.
- MASCAUX, C., M. W. WYNES, Y. KATO, C. TRAN, B. R. ASUNCION *et al.*, 2011 EGFR protein expression in non-small cell lung cancer predicts response to an EGFR tyrosine kinase inhibitor--a novel antibody for immunohistochemistry or AQUA technology. *Clin Cancer Res* **17**: 7796-7807.
- MASSARELLI, E., F. ANDRE, D. D. LIU, J. J. LEE, M. WOLF *et al.*, 2003 A retrospective analysis of the outcome of patients who have received two prior chemotherapy regimens including platinum and docetaxel for recurrent non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **39**: 55-61.
- MASSION, P. P., P. M. TAFLAN, S. M. JAMSHEDUR RAHMAN, P. YILDIZ, Y. SHYR *et al.*, 2003 Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res* **63**: 7113-7121.
- MATTOCKS, C. J., M. A. MORRIS, G. MATTHIJS, E. SWINNEN, A. CORVELEYN *et al.*, 2010 A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet* **18**: 1276-1288.
- MELLINGHOFF, I. K., M. Y. WANG, I. VIVANCO, D. A. HAAS-KOGAN, S. ZHU *et al.*, 2005 Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* **353**: 2012-2024.
- MENDELSON, J., and J. BASELGA, 2006 Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* **33**: 369-385.
- METAFERIA, B., J. S. WEI, Y. K. SONG, J. EVANGELISTA, K. ASCHENBACH *et al.*, 2013 Development of peptide nucleic acid probes for detection of the HER2 oncogene. *PLoS One* **8**: e58870.
- MILBURY, C. A., J. LI and G. M. MAKRIGIORGOS, 2009 PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. *Clin Chem* **55**: 632-640.

- MILLER V., W. H., LARA ., CHO J., CHOWHAN N., COSTA D., VRINDAVANAM N., YANAGIHARA R., PENNELL N., LYNCH T., 2008 Activity and tolerance of XL647 in NSCLC patients with acquired resistance to EGFR-TKIs: Preliminary results of a phase II trial, pp. in *ASCO. Journal of Clinical Oncology*.
- MILLER, V. A., V. HIRSH, J. CADRANEL, Y. M. CHEN, K. PARK *et al.*, 2012 Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* **13**: 528-538.
- MILLER, V. A., M. G. KRIS, N. SHAH, J. PATEL, C. AZZOLI *et al.*, 2004 Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **22**: 1103-1109.
- MINARIK, M., BELSANOVA B., MINARIKOVA P., LIPSKA L., LEVY L., VEPREKOVA G., VISOKAI V., ZAVORAL M., BENESOVA L., 2011 Circulating free tumor DNA in patient plasma is a near-perfect marker for metastatic spread of colorectal cancer: a study on 165 patients undergoing surgical treatment, pp. in *Gastroenterology*.
- MINARIK, M., L. MINARIKOVA, J. BJORHEIM and P. O. EKSTROM, 2003 Cycling gradient capillary electrophoresis: a low-cost tool for high-throughput analysis of genetic variations. *Electrophoresis* **24**: 1716-1722.
- MIRSADRAEE, S., D. OSWAL, Y. ALIZADEH, A. CAULO and E. VAN BEEK, JR., 2012 The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol* **4**: 128-134.
- MITSUDOMI, T., T. KOSAKA, H. ENDOH, Y. HORIO, T. HIDA *et al.*, 2005 Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol* **23**: 2513-2520.
- MITSUDOMI, T., S. MORITA, Y. YATABE, S. NEGORO, I. OKAMOTO *et al.*, 2010 Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **11**: 121-128.
- MITSUDOMI, T., and Y. YATABE, 2010 Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *Febs J* **277**: 301-308.
- MITTRA, I., N. K. NAIR and P. K. MISHRA, 2012 Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *J Biosci* **37**: 301-312.
- MIYAZAWA, H., T. TANAKA, Y. NAGAI, M. MATSUOKA, A. SUTANI *et al.*, 2008 Peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based detection test for gefitinib-refractory T790M epidermal growth factor receptor mutation. *Cancer Sci* **99**: 595-600.
- MOK, T., J. J. YANG and K. C. LAM, 2013 Treating patients with EGFR-sensitizing mutations: first line or second line--is there a difference? *J Clin Oncol* **31**: 1081-1088.
- MOK, T. S., 2010 Living with imperfection. *J Clin Oncol* **28**: 191-192.
- MOK, T. S., Y. L. WU, S. THONGPRASERT, C. H. YANG, D. T. CHU *et al.*, 2009 Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* **361**: 947-957.
- MOLINA-VILA, M. A., J. BERTRAN-ALAMILLO, N. REGUART, M. TARON, E. CASTELLA *et al.*, 2008 A sensitive method for detecting EGFR mutations in non-small cell lung cancer samples with few tumor cells. *J Thorac Oncol* **3**: 1224-1235.
- MONTES, A., M. PÉREZ and J. GESTAL, 2004 Adicciones in *Monografía Tabaco* edited by E. BECOÑA. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.
- MONTESINOS, J., M. BARE, E. DALMAU, E. SAIGI, P. VILLACE *et al.*, 2011 The changing pattern of non-small cell lung cancer between the 90 and 2000 decades. *Open Respir Med J* **5**: 24-30.
- MORAN, T. S., J.; ISLA, D.; COBO, M.; PAZ-ARES, L.; CATOT, S.; JIMÉNEZ, U.; DIZ, P.; TARON, M.; ROSELL, R., 2007 High correspondence between EGFR mutations in tissue and in circulating DNA

- form non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with poor performance status (PS), pp. S444 in *ASCO. Journal of Thoracic Oncology*.
- MORITA, S., I. OKAMOTO, K. KOBAYASHI, K. YAMAZAKI, H. ASAHINA *et al.*, 2009 Combined survival analysis of prospective clinical trials of gefitinib for non-small cell lung cancer with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* **15**: 4493-4498.
- MOSKALEV, E. A., R. STOHR, R. RIEKER, S. HEBELE, F. FUCHS *et al.*, 2013 Increased detection rates of EGFR and KRAS mutations in NSCLC specimens with low tumour cell content by 454 deep sequencing. *Virchows Arch* **462**: 409-419.
- MU, X. L., L. Y. LI, X. T. ZHANG, M. Z. WANG, R. E. FENG *et al.*, 2005 Gefitinib-sensitive mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain in chinese patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 4289-4294.
- MULLOY, R., A. FERRAND, Y. KIM, R. SORDELLA, D. W. BELL *et al.*, 2007 Epidermal growth factor receptor mutants from human lung cancers exhibit enhanced catalytic activity and increased sensitivity to gefitinib. *Cancer Res* **67**: 2325-2330.
- MURTAZA, M., S. J. DAWSON, D. W. TSUI, D. GALE, T. FORSHEW *et al.*, 2013 Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* **497**: 108-112.
- NAGAI, Y., H. MIYAZAWA, HUQUN, T. TANAKA, K. UDAGAWA *et al.*, 2005 Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res* **65**: 7276-7282.
- NAKAMURA, H., N. KAWASAKI, M. TAGUCHI and K. KABASAWA, 2006 Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax* **61**: 140-145.
- NAKAMURA, T., N. SUEOKA-ARAGANE, K. IWANAGA, A. SATO, K. KOMIYA *et al.*, 2011 A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol* **6**: 1639-1648.
- NAKAMURA, T., N. SUEOKA-ARAGANE, K. IWANAGA, A. SATO, K. KOMIYA *et al.*, 2012 Application of a highly sensitive detection system for epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA. *J Thorac Oncol* **7**: 1369-1381.
- NAKANO, H., H. SODA, M. TAKASU, N. TOMONAGA, H. YAMAGUCHI *et al.*, 2008 Heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations within a mixed adenocarcinoma lung nodule. *Lung Cancer* **60**: 136-140.
- NARAYAN, A., N. J. CARRIERO, S. N. GETTINGER, J. KLUYTENAAR, K. R. KOZAK *et al.*, 2012 Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer Res* **72**: 3492-3498.
- NIE, Q., X. N. YANG, S. J. AN, X. C. ZHANG, J. J. YANG *et al.*, 2011 CYP1A1*2A polymorphism as a predictor of clinical outcome in advanced lung cancer patients treated with EGFR-TKI and its combined effects with EGFR intron 1 (CA)n polymorphism. *Eur J Cancer* **47**: 1962-1970.
- NIEDERST, M. J., and J. A. ENGELMAN, 2013 Bypass mechanisms of resistance to receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer. *Sci Signal* **6**: re6.
- NOLLAU, P., and C. WAGENER, 1997 Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem* **43**: 1114-1128.
- NOMOTO, K., K. TSUTA, T. TAKANO, T. FUKUI, K. YOKOZAWA *et al.*, 2006 Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high-resolution melting analysis. *Am J Clin Pathol* **126**: 608-615.
- NOMURA, M., H. SHIGEMATSU, L. LI, M. SUZUKI, T. TAKAHASHI *et al.*, 2007 Polymorphisms, mutations, and amplification of the EGFR gene in non-small cell lung cancers. *PLoS Med* **4**: e125.

7- BIBLIOGRAFIA

- NONAKA, M., M. KADOKURA, S. YAMAMOTO, D. KATAOKA, T. KUNIMURA *et al.*, 2003 Tumor dimension and prognosis in surgically treated lung cancer: for intentional limited resection. *Am J Clin Oncol* **26**: 499-503.
- O'DONNELL, P., J. FERGUSON, J. SHYU, R. CURRENT, T. REHAGE *et al.*, 2013 Analytic performance studies and clinical reproducibility of a real-time PCR assay for the detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **13**: 210.
- OH, Y. H., Y. KIM, Y. P. KIM, S. W. SEO, T. MITSUDOMI *et al.*, 2010 Rapid detection of the epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer for analysis of acquired resistance using molecular beacons. *J Mol Diagn* **12**: 644-652.
- OLIVA, R., F. BALLESTA, J. ORIOLA and J. CLÀRIA, 2004 *Genética Médica*. Publicacions de la Universitat de Barcelona, Barcelona.
- ONO, M., A. HIRATA, T. KOMETANI, M. MIYAGAWA, S. UEDA *et al.*, 2004 Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Mol Cancer Ther* **3**: 465-472.
- OXNARD, G. R., M. E. ARCILA, C. S. SIMA, G. J. RIELY, J. CHMIELECKI *et al.*, 2011 Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res* **17**: 1616-1622.
- PAEZ, J. G., P. A. JANNE, J. C. LEE, S. TRACY, H. GREULICH *et al.*, 2004 EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**: 1497-1500.
- PAN, Q., W. PAO and M. LADANYI, 2005 Rapid polymerase chain reaction-based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas. *J Mol Diagn* **7**: 396-403.
- PAO, W., and N. GIRARD, 2011 New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* **12**: 175-180.
- PAO, W., and K. E. HUTCHINSON, 2012 Chipping away at the lung cancer genome. *Nat Med* **18**: 349-351.
- PAO, W., V. MILLER, M. ZAKOWSKI, J. DOHERTY, K. POLITI *et al.*, 2004 EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13306-13311.
- PAO, W., V. A. MILLER, K. A. POLITI, G. J. RIELY, R. SOMWAR *et al.*, 2005 Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* **2**: e73.
- PARK, S., A. J. HOLMES-TISCH, E. Y. CHO, Y. M. SHIM, J. KIM *et al.*, 2009 Discordance of molecular biomarkers associated with epidermal growth factor receptor pathway between primary tumors and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **4**: 809-815.
- PASS, H. I., D. P. CARBONE, JOHNSON D. H., MINNA J. D., SCAGLIOTTI G. V. *et al.*, 2010 Principles and Practice of Lung Cancer: The Official Reference Text of the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), pp. 1011, edited by J. W. J. PINE. Lippincott Williams & Wilkins.
- PAULASOVA, P., and F. PELLESTOR, 2004 The peptide nucleic acids (PNAs): a new generation of probes for genetic and cytogenetic analyses. *Ann Genet* **47**: 349-358.
- PAZ-ARES, L., D. SOULIERES, I. MELEZINEK, J. MOECKS, L. KEIL *et al.*, 2010 Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med* **14**: 51-69.
- PEDERSEN, M. W., M. MELTORN, L. DAMSTRUP and H. S. POULSEN, 2001 The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol* **12**: 745-760.

- PELLESTOR, F., and P. PAULASOVA, 2004 The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. *Eur J Hum Genet* **12**: 694-700.
- PEREZ-MORENO, P., E. BRAMBILLA, R. THOMAS and J. C. SORIA, 2012 Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* **18**: 2443-2451.
- PERKINS, G., T. A. YAP, L. POPE, A. M. CASSIDY, J. P. DUKES *et al.*, 2012 Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS One* **7**: e47020.
- PETRELLI, F., K. BORGONOVO, M. CABIDDU and S. BARNI, 2012 Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 13 randomized trials. *Clin Lung Cancer* **13**: 107-114.
- PFISTER, D. G., D. H. JOHNSON, C. G. AZZOLI, W. SAUSE, T. J. SMITH *et al.*, 2004 American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol* **22**: 330-353.
- PIGNON, J. P., H. TRIBODET, G. V. SCAGLIOTTI, J. Y. DOUILLARD, F. A. SHEPHERD *et al.*, 2008 Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* **26**: 3552-3559.
- PINTER, F., J. PAPAY, A. ALMASI, Z. SAPI, E. SZABO *et al.*, 2008 Epidermal growth factor receptor (EGFR) high gene copy number and activating mutations in lung adenocarcinomas are not consistently accompanied by positivity for EGFR protein by standard immunohistochemistry. *J Mol Diagn* **10**: 160-168.
- PIRKER, R., 2012 EGFR-directed monoclonal antibodies in non-small cell lung cancer. *Target Oncol*.
- PLESEC, T. P., and J. L. HUNT, 2009 KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol* **16**: 196-203.
- POLITI, K., M. F. ZAKOWSKI, P. D. FAN, E. A. SCHONFELD, W. PAO *et al.*, 2006 Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* **20**: 1496-1510.
- POWELL M., Z. A., 2014 High-Sensitivity Detection of Cancer Biomarkers. *Genetic Engineering & Biotechnology News* **34**: 14-19.
- PRICE, A., 2003 Lung cancer 5: state of the art radiotherapy for lung cancer. *Thorax* **58**: 447-452.
- PROCTOR, R. N., 2001 Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nat Rev Cancer* **1**: 82-86.
- QIAGEN, 2008 HotStarTaq® PCR Handbook, pp. 44.
- QUERINGS, S., J. ALTMULLER, S. ANSEN, T. ZANDER, D. SEIDEL *et al.*, 2011 Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PLoS One* **6**: e19601.
- RAMALINGAM, S. S., F. BLACKHALL, M. KRZAKOWSKI, C. H. BARRIOS, K. PARK *et al.*, 2012 Randomized phase II study of dacomitinib (PF-00299804), an irreversible pan-human epidermal growth factor receptor inhibitor, versus erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **30**: 3337-3344.
- RAN, R., L. LI, M. WANG, S. WANG, Z. ZHENG *et al.*, 2013 Determination of EGFR mutations in single cells microdissected from enriched lung tumor cells in peripheral blood. *Anal Bioanal Chem* **405**: 7377-7382.
- RAYMOND, E., S. FAIVRE and J. P. ARMAND, 2000 Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* **60 Suppl 1**: 15-23; discussion 41-12.
- REGALES, L., M. N. BALAK, Y. GONG, K. POLITI, A. SAWAI *et al.*, 2007 Development of new mouse lung tumor models expressing EGFR T790M mutants associated with clinical resistance to kinase inhibitors. *PLoS One* **2**: e810.
- REGUART, N., R. ROSELL, F. CARDENAL, A. F. CARDONA, D. ISLA *et al.*, 2014 Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression. *Lung Cancer* **84**: 161-167.

7- BIBLIOGRAFIA

- RIELY, G. J., W. PAO, D. PHAM, A. R. LI, N. RIZVI *et al.*, 2006 Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* **12**: 839-844.
- ROMA, C., C. ESPOSITO, A. M. RACHIGLIO, R. PASQUALE, A. IANNACCONE *et al.*, 2013 Detection of EGFR mutations by TaqMan mutation detection assays powered by competitive allele-specific TaqMan PCR technology. *Biomed Res Int* **2013**: 385087.
- RONAGHI, M., 2001 Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* **11**: 3-11.
- ROSELL, R., E. CARCERENY, R. GERVAIS, A. VERGNENEGRE, B. MASSUTI *et al.*, 2012 Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **13**: 239-246.
- ROSELL, R., J. GOMEZ-CODINA, C. CAMPS, J. JAVIER SANCHEZ, J. MAESTRE *et al.*, 1999 Preresectional chemotherapy in stage IIIA non-small-cell lung cancer: a 7-year assessment of a randomized controlled trial. *Lung Cancer* **26**: 7-14.
- ROSELL, R., M. A. MOLINA, C. COSTA, S. SIMONETTI, A. GIMENEZ-CAPITAN *et al.*, 2011 Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* **17**: 1160-1168.
- ROSELL, R., T. MORAN, C. QUERALT, R. PORTA, F. CARDENAL *et al.*, 2009 Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* **361**: 958-967.
- ROSKOSKI, R., JR., 2004 The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 1-11.
- RUBIN, I., and Y. YARDEN, 2001 The basic biology of HER2. *Ann Oncol* **12 Suppl 1**: S3-8.
- SAINTIGNY, P., and J. A. BURGER, 2012 Recent advances in non-small cell lung cancer biology and clinical management. *Discov Med* **13**: 287-297.
- SAKAI, Y., T. YAMASAKI, Y. KUSAKABE, D. KASAI, Y. KOTANI *et al.*, 2013 Large-cell neuroendocrine carcinoma of lung with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation and co-expression of adenocarcinoma markers: a case report and review of the literature. *Multidiscip Respir Med* **8**: 47.
- SANDERS, H., QU, K., SFERRUZZA, A., STROM, C., BENDER, C., 2008 A sensitive and specific method for detection of mutations in Exons 19 and 21 of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in the plasma of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancer Therapy* **6**: 793-804.
- SANDLER, A., R. GRAY, M. C. PERRY, J. BRAHMER, J. H. SCHILLER *et al.*, 2006 Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **355**: 2542-2550.
- SANGER, F., S. NICKLEN and A. R. COULSON, 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- SASAKI, H., K. ENDO, K. OKUDA, O. KAWANO, N. KITAHARA *et al.*, 2008 Epidermal growth factor receptor gene amplification and gefitinib sensitivity in patients with recurrent lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **134**: 569-577.
- SAUKKONEN, K., P. LAKKISTO, V. PETTILA, M. VARPULA, S. KARLSSON *et al.*, 2008 Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clin Chem* **54**: 1000-1007.
- SAUNDERS G., P. H., 1999 *Analytical Molecular Biology: Quality and Validation*. Laboratory of the Government Chemist by the Royale Society of Chemistry, Cambridge CB4 0WF UK.
- SAXENA B., S. S. T., WALTON W., PATEL I., KUO P., KHAN S., MATATHIA A., PUROHI TA., CROWLEY R., ZHOU Q., 2011 Differentiation between the EGFR antibodies necitumumab, cetuximab, and panitumumab: In vitro biological and binding activities. *J Clin Oncol* **29** (suppl; abstr e13030).
- SCAGLIOTTI, G. V., F. DE MARINIS, M. RINALDI, L. CRINO, C. GRIDELLI *et al.*, 2002 Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **20**: 4285-4291.

- SCAGLIOTTI, G. V., P. PARIKH, J. VON PAWEL, B. BIESMA, J. VANSTEENKISTE *et al.*, 2008 Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **26**: 3543-3551.
- SCAGLIOTTI, G. V., U. PASTORINO, J. F. VANSTEENKISTE, L. SPAGGIARI, F. FACCILOLO *et al.*, 2012 Randomized phase III study of surgery alone or surgery plus preoperative cisplatin and gemcitabine in stages IB to IIIA non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **30**: 172-178.
- SCAGLIOTTI, G. V., G. SELVAGGI, S. NOVELLO and F. R. HIRSCH, 2004 The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 4227s-4232s.
- SCULIER, J. P., and D. MORO-SIBILOT, 2009 First- and second-line therapy for advanced nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* **33**: 915-930.
- SCHMIEDEL, J., A. BLAUKAT, S. LI, T. KNOCHEL and K. M. FERGUSON, 2008 Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell* **13**: 365-373.
- SCHULZE, W. X., L. DENG and M. MANN, 2005 Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* **1**: 2005 0008.
- SCHWARZENBACH, H., C. ALIX-PANABIERES, I. MULLER, N. LETANG, J. P. VENDRELL *et al.*, 2009 Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 1032-1038.
- SCHWARZENBACH, H., D. S. HOON and K. PANTEL, 2011 Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* **11**: 426-437.
- SEKIDO, Y., K. M. FONG and J. D. MINNA, 1998 Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* **1378**: F21-59.
- SEQUIST, L. V., B. BESSE, T. J. LYNCH, V. A. MILLER, K. K. WONG *et al.*, 2010 Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **28**: 3076-3083.
- SEQUIST, L. V., V. A. JOSHI, P. A. JANNE, D. W. BELL, P. FIDIAS *et al.*, 2006 Epidermal growth factor receptor mutation testing in the care of lung cancer patients. *Clin Cancer Res* **12**: 4403s-4408s.
- SEQUIST, L. V., R. G. MARTINS, D. SPIGEL, S. M. GRUNBERG, A. SPIRA *et al.*, 2008 First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol* **26**: 2442-2449.
- SEQUIST, L. V., J. C. YANG, N. YAMAMOTO, K. O'BYRNE, V. HIRSH *et al.*, 2013 Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* **31**: 3327-3334.
- SHAH, S. P., R. D. MORIN, J. KHATTRA, L. PRENTICE, T. PUGH *et al.*, 2009 Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* **461**: 809-813.
- SHAKEEL, S., KARIM, S. AND ALI, A. , 2006 Peptide nucleic acid (PNA) — a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**: 892–899.
- SHARMA, S. V., D. W. BELL, J. SETTLEMAN and D. A. HABER, 2007 Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* **7**: 169-181.
- SHEPHERD, F. A., J. RODRIGUES PEREIRA, T. CIULEANU, E. H. TAN, V. HIRSH *et al.*, 2005 Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **353**: 123-132.
- SHI, F., S. E. TELESKO, Y. LIU, R. RADHAKRISHNAN and M. A. LEMMON, 2010 ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 7692-7697.
- SHI, Y., J. S. AU, S. THONGPRASERT, S. SRINIVASAN, C. M. TSAI *et al.*, 2014 A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol* **9**: 154-162.
- SHIGEMATSU, H., and A. F. GAZDAR, 2006 Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* **118**: 257-262.

7- BIBLIOGRAFIA

- SHIGEMATSU, H., L. LIN, T. TAKAHASHI, M. NOMURA, M. SUZUKI *et al.*, 2005 Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* **97**: 339-346.
- SHIMAMURA, T., D. LI, H. JI, H. J. HARINGSMA, E. LINIKER *et al.*, 2008 Hsp90 inhibition suppresses mutant EGFR-T790M signaling and overcomes kinase inhibitor resistance. *Cancer Res* **68**: 5827-5838.
- SHITARA, M., H. SASAKI, K. YOKOTA, K. OKUDA, Y. HIKOSAKA *et al.*, 2012 Polymorphisms in intron 1 of the EGFR gene in non-small cell lung cancer patients. *Exp Ther Med* **4**: 785-789.
- SHUKUYA, T., T. TAKAHASHI, R. KAIRA, A. ONO, Y. NAKAMURA *et al.*, 2011 Efficacy of gefitinib for non-adenocarcinoma non-small-cell lung cancer patients harboring epidermal growth factor receptor mutations: a pooled analysis of published reports. *Cancer Sci* **102**: 1032-1037.
- SILVA, C. M., 2004 Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* **23**: 8017-8023.
- SIMONETTI, S., M. A. MOLINA, C. QUERALT, I. DE AGUIRRE, C. MAYO *et al.*, 2010 Detection of EGFR mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer. *J Transl Med* **8**: 135.
- SOH, J., S. TOYOOKA, K. AOE, H. ASANO, S. ICHIHARA *et al.*, 2006 Usefulness of EGFR mutation screening in pleural fluid to predict the clinical outcome of gefitinib treated patients with lung cancer. *Int J Cancer* **119**: 2353-2358.
- SONE, T., K. KASAHARA, H. KIMURA, K. NISHIO, M. MIZUGUCHI *et al.*, 2007 Comparative analysis of epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification as predictors of gefitinib efficacy in Japanese patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **109**: 1836-1844.
- SONG, W. A., N. K. ZHOU, W. WANG, X. Y. CHU, C. Y. LIANG *et al.*, 2010 Survival benefit of neoadjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: an updated meta-analysis of 13 randomized control trials. *J Thorac Oncol* **5**: 510-516.
- SORDELLA, R., D. W. BELL, D. A. HABER and J. SETTLEMAN, 2004 Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **305**: 1163-1167.
- SOS, M. L., H. B. RODE, S. HEYNCK, M. PEIFER, F. FISCHER *et al.*, 2010 Chemogenomic profiling provides insights into the limited activity of irreversible EGFR Inhibitors in tumor cells expressing the T790M EGFR resistance mutation. *Cancer Res* **70**: 868-874.
- SOZZI, G., D. CONTE, L. MARIANI, S. LO VULLO, L. ROZ *et al.*, 2001 Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* **61**: 4675-4678.
- SPIRO, S. G., R. M. RUDD, R. L. SOUHAMI, J. BROWN, D. J. FAIRLAMB *et al.*, 2004 Chemotherapy versus supportive care in advanced non-small cell lung cancer: improved survival without detriment to quality of life. *Thorax* **59**: 828-836.
- SRIDHAR, S. S., L. SEYMOUR and F. A. SHEPHERD, 2003 Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* **4**: 397-406.
- SRIRAM, K. B., M. E. TAN, S. M. SAVARIMUTHU, C. M. WRIGHT, V. RELAN *et al.*, 2011 Screening for activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* **38**: 903-910.
- STINCHCOMBE, T. E., and M. A. SOCINSKI, 2008 Considerations for second-line therapy of non-small cell lung cancer. *Oncologist* **13 Suppl 1**: 28-36.
- STOLLAR, B. D., and F. STEPHENSON, 2002 Apoptosis and nucleosomes. *Lupus* **11**: 787-789.
- SU, K. Y., H. Y. CHEN, K. C. LI, M. L. KUO, J. C. YANG *et al.*, 2012 Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **30**: 433-440.

- SUDA, K., K. TOMIZAWA, M. FUJII, H. MURAKAMI, H. OSADA *et al.*, 2011 Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *J Thorac Oncol* **6**: 1152-1161.
- SUGIO, K., H. URAMOTO, T. ONITSUKA, M. MIZUKAMI, Y. ICHIKI *et al.*, 2009 Prospective phase II study of gefitinib in non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *Lung Cancer* **64**: 314-318.
- SUN J.M., K. C., WEN W., WAKELEE H., CHIEN S., MANN E., O'DONNELL P., ANGENENDT P., DZIADZIUSZKO R., HORN L., SPIGEL D.R., SEQUIST L., SORIA JC, SOLOMON B., CAMIDGE D.R., GOLDMAN J., GADGEEL S.M., RAPONI M., WU L., PARK K. , 2013 Serial monitoring of EGFR mutations in plasma and evaluation of EGFR mutation status in matched tissue and plasma from NSCLC patients treated with CO-1686. *Mol Cancer Ther* **12(11 Suppl):Abstract nr B25**.
- SUN, J. M., M. J. AHN, Y. L. CHOI, J. S. AHN and K. PARK, 2013a Clinical implications of T790M mutation in patients with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer* **82**: 294-298.
- SUN, P. L., Y. JIN, H. KIM, C. T. LEE, S. JHEON *et al.*, 2013b High concordance of EGFR mutation status between histologic and corresponding cytologic specimens of lung adenocarcinomas. *Cancer Cytopathol* **121**: 311-319.
- SUTANI, A., Y. NAGAI, K. UDAGAWA, Y. UCHIDA, N. KOYAMA *et al.*, 2006 Gefitinib for non-small-cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor gene mutations screened by peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Br J Cancer* **95**: 1483-1489.
- SUZUKI, M., S. KAGEYAMA, K. SHINMURA, K. OKUDELA, T. BUNAI *et al.*, 2008 Inverse relationship between the length of the EGFR CA repeat polymorphism in lung carcinoma and protein expression of EGFR in the carcinoma. *J Surg Oncol* **98**: 457-461.
- SUZUKI, S., Y. DOBASHI, H. SAKURAI, K. NISHIKAWA, M. HANAWA *et al.*, 2005 Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer* **103**: 1265-1273.
- TAKANO, T., Y. OHE, H. SAKAMOTO, K. TSUTA, Y. MATSUNO *et al.*, 2005 Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **23**: 6829-6837.
- TAKANO, T., Y. OHE, K. TSUTA, T. FUKUI, H. SAKAMOTO *et al.*, 2007 Epidermal growth factor receptor mutation detection using high-resolution melting analysis predicts outcomes in patients with advanced non small cell lung cancer treated with gefitinib. *Clin Cancer Res* **13**: 5385-5390.
- TAMKOVICH, S. N., A. V. CHEREPANOVA, E. V. KOLESNIKOVA, E. Y. RYKOVA, D. V. PYSHNYI *et al.*, 2006 Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci* **1075**: 191-196.
- TAMURA, K., I. OKAMOTO, T. KASHII, S. NEGORO, T. HIRASHIMA *et al.*, 2008 Multicentre prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: results of the West Japan Thoracic Oncology Group trial (WJTOG0403). *Br J Cancer* **98**: 907-914.
- TANAKA, T., M. MATSUOKA, A. SUTANI, A. GEMMA, M. MAEMONDO *et al.*, 2010 Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *Int J Cancer* **126**: 651-655.
- TANAKA, T., Y. NAGAI, H. MIYAZAWA, N. KOYAMA, S. MATSUOKA *et al.*, 2007 Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* **98**: 246-252.
- TANIGUCHI, K., J. OKAMI, K. KODAMA, M. HIGASHIYAMA and K. KATO, 2008 Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer Sci* **99**: 929-935.

7- BIBLIOGRAFIA

- TANIGUCHI, K., J. UCHIDA, K. NISHINO, T. KUMAGAI, T. OKUYAMA *et al.*, 2011 Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* **17**: 7808-7815.
- TARON, M., Y. ICHINOSE, R. ROSELL, T. MOK, B. MASSUTI *et al.*, 2005 Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* **11**: 5878-5885.
- TARON M., QUERALT C., MAYO C., DE AGUIRRE I., GASCO A., INSA A., PALMERO R., CAMPS C., SANCHEZ J., AND ROSELL R., 2010 Outcome to erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with EGFR in-frame deletions of exon 19 according to the size of the deletion. *Journal of clinical oncology* **28 (15s) suppl; abstr 7549**.
- TEICHER, B. A., and R. V. CHARI, 2010 Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clin Cancer Res* **17**: 6389-6397.
- THATCHER, N., A. CHANG, P. PARIKH, J. RODRIGUES PEREIRA, T. CIULEANU *et al.*, 2005 Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* **366**: 1527-1537.
- THELWELL, N., S. MILLINGTON, A. SOLINAS, J. BOOTH and T. BROWN, 2000 Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res* **28**: 3752-3761.
- THONGPRASERT, S., P. SANGUANMITRA, W. JUTHAPAN and J. CLINCH, 1999 Relationship between quality of life and clinical outcomes in advanced non-small cell lung cancer: best supportive care (BSC) versus BSC plus chemotherapy. *Lung Cancer* **24**: 17-24.
- TISEO, M., M. CAPELLETTI, G. DE PALMA, V. FRANCIOSI, A. CAVAZZONI *et al.*, 2008 Epidermal growth factor receptor intron-1 polymorphism predicts gefitinib outcome in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **3**: 1104-1111.
- TOKUMO, M., S. TOYOOKA, K. KIURA, H. SHIGEMATSU, K. TOMII *et al.*, 2005 The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* **11**: 1167-1173.
- TOYOOKA, S., K. KIURA and T. MITSUDOMI, 2005 EGFR mutation and response of lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **352**: 2136; author reply 2136.
- TRAVIS, W. D., E. BRAMBILLA, M. NOGUCHI, A. G. NICHOLSON, K. R. GEISINGER *et al.*, 2011 International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* **6**: 244-285.
- TSAI, C. M., J. T. CHEN, D. J. STEWART, C. H. CHIU, C. L. LAI *et al.*, 2011 Antagonism between gefitinib and cisplatin in non-small cell lung cancer cells: why randomized trials failed? *J Thorac Oncol* **6**: 559-568.
- TSAO, M. S., A. SAKURADA, J. C. CUTZ, C. Q. ZHU, S. KAMEL-REID *et al.*, 2005 Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* **353**: 133-144.
- TSIATIS, A. C., A. NORRIS-KIRBY, R. G. RICH, M. J. HAFEZ, C. D. GOCKE *et al.*, 2010 Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* **12**: 425-432.
- UMETANI, N., S. HIRAMATSU and D. S. HOON, 2006 Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci* **1075**: 299-307.
- UYBICO, S. J., C. C. WU, R. D. SUH, N. H. LE, K. BROWN *et al.*, 2010 Lung cancer staging essentials: the new TNM staging system and potential imaging pitfalls. *Radiographics* **30**: 1163-1181.
- VAN EIJK, R., J. LICHT, M. SCHRUMPF, M. TALEBIAN YAZDI, D. RUANO *et al.*, 2011 Rapid KRAS, EGFR, BRAF and PIK3CA mutation analysis of fine needle aspirates from non-small-cell lung cancer using allele-specific qPCR. *PLoS One* **6**: e17791.

- VAN MEERBEECK, J. P., D. A. FENNEL and D. K. DE RUYSSCHER, 2011 Small-cell lung cancer. *Lancet* **378**: 1741-1755.
- VIVANCO, I., and C. L. SAWYERS, 2002 The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**: 489-501.
- VLAHOVIC, G., and J. CRAWFORD, 2003 Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist* **8**: 531-538.
- VOIGT, M., F. BRAIG, M. GOTHEL, A. SCHULTE, K. LAMSZUS *et al.*, 2012 Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab. *Neoplasia* **14**: 1023-1031.
- WAKELING, A. E., S. P. GUY, J. R. WOODBURN, S. E. ASHTON, B. J. CURRY *et al.*, 2002 ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* **62**: 5749-5754.
- WANG, R., and M. G. BRATTAIN, 2006 AKT can be activated in the nucleus. *Cell Signal* **18**: 1722-1731.
- WARD, T. H., J. CUMMINGS, E. DEAN, A. GREYSTOKE, J. M. HOU *et al.*, 2008 Biomarkers of apoptosis. *Br J Cancer* **99**: 841-846.
- WEISS, J., M. L. SOS, D. SEIDEL, M. PEIFER, T. ZANDER *et al.*, 2010 Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* **2**: 62ra93.
- WENYONG CHEN, H. Y. A. Z. W., 2011 De Novo Acquisition of BCR-ABL Mutations for CML Acquired Resistance, Myeloid Leukemia - Basic Mechanisms of Leukemogenesis.
- WILD, P., R. KNUECHEL, W. DIETMAIER, F. HOFSTAEDTER and A. HARTMANN, 2000 Laser microdissection and microsatellite analyses of breast cancer reveal a high degree of tumor heterogeneity. *Pathobiology* **68**: 180-190.
- WU WS, C. Y., TSAI CM, SHIH JF, CHIU CH, CHOU KT, LAI SL, WU CH, LUO YH, HUANG CY, LEE YC, PERNG RP, WHANG-PENG J., 2012 Erlotinib has better efficacy than gefitinib in adenocarcinoma patients without EGFR-activating mutations, but similar efficacy in patients with EGFR-activating mutations. *Exp Ther Med* **3**: 207-213.
- WU, J. Y., C. J. YU, Y. C. CHANG, C. H. YANG, J. Y. SHIH *et al.*, 2011 Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **17**: 3812-3821.
- WU, S. G., J. Y. SHIH, C. J. YU and P. C. YANG, 2008 Lung adenocarcinoma with good response to erlotinib after gefitinib treatment failure and acquired T790M mutation. *J Thorac Oncol* **3**: 451-452.
- XUE, X., M. D. TEARE, I. HOLEN, Y. M. ZHU and P. J. WOLL, 2009 Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta* **404**: 100-104.
- YAMADA, K., S. KANAZAWA, J. KOIKE, H. SUGIYAMA, C. XU *et al.*, 2010 Microsatellite instability at tetranucleotide repeats in sporadic colorectal cancer in Japan. *Oncol Rep* **23**: 551-561.
- YAMAMOTO, C., Y. BASAKI, A. KAWAHARA, K. NAKASHIMA, M. KAGE *et al.*, 2010 Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res* **70**: 8715-8725.
- YAMAMOTO, H., H. SHIGEMATSU, M. NOMURA, W. W. LOCKWOOD, M. SATO *et al.*, 2008 PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res* **68**: 6913-6921.
- YAMANE, H., N. OCHI, M. YASUGI, T. TABAYASHI, T. YAMAGISHI *et al.*, 2013 Docetaxel for non-small-cell lung cancer harboring the activated EGFR mutation with T790M at initial presentation. *Onco Targets Ther* **6**: 155-160.
- YANAGISAWA, S., N. MORIKAWA, Y. KIMURA, Y. NAGANO, K. MURAKAMI *et al.*, 2012 Large-cell neuroendocrine carcinoma with epidermal growth factor receptor mutation: possible transformation of lung adenocarcinoma. *Respirology* **17**: 1275-1277.

- YANG, C. H., C. J. YU, J. Y. SHIH, Y. C. CHANG, F. C. HU *et al.*, 2008 Specific EGFR mutations predict treatment outcome of stage IIIB/IV patients with chemotherapy-naive non-small-cell lung cancer receiving first-line gefitinib monotherapy. *J Clin Oncol* **26**: 2745-2753.
- YANG, J. C., J. Y. SHIH, W. C. SU, T. C. HSIA, C. M. TSAI *et al.*, 2012 Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial. *Lancet Oncol* **13**: 539-548.
- YANO, S., T. YAMADA, S. TAKEUCHI, K. TACHIBANA, Y. MINAMI *et al.*, 2011 Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol* **6**: 2011-2017.
- YAP, T. A., M. GERLINGER, P. A. FUTREAL, L. PUSZTAI and C. SWANTON, 2012 Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med* **4**: 127ps110.
- YASUDA, H., S. KOBAYASHI and D. B. COSTA, 2012 EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol* **13**: e23-31.
- YATABE, Y., T. HIDA, Y. HORIO, T. KOSAKA, T. TAKAHASHI *et al.*, 2006 A rapid, sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer. *J Mol Diagn* **8**: 335-341.
- YATABE, Y., K. MATSUO and T. MITSUDOMI, 2011 Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol* **29**: 2972-2977.
- YE, X., Z. Z. ZHU, L. ZHONG, Y. LU, Y. SUN *et al.*, 2013 High T790M Detection Rate in TKI-Naive NSCLC with EGFR Sensitive Mutation: Truth or Artifact? *J Thorac Oncol* **8**: 1118-1120.
- YEH, J. I., E. POHL, D. TRUAN, W. HE, G. M. SHELDRIK *et al.*, 2010 The crystal structure of non-modified and bipyridine-modified PNA duplexes. *Chemistry* **16**: 11867-11875.
- YEO, C. D., J. W. KIM, K. H. KIM, J. H. HA, C. K. RHEE *et al.*, 2013 Detection and comparison of EGFR mutations in matched tumor tissues, cell blocks, pleural effusions, and sera from patients with NSCLC with malignant pleural effusion, by PNA clamping and direct sequencing. *Lung Cancer* **81**: 207-212.
- YOSHIDA, K., Y. YATABE, J. Y. PARK, J. SHIMIZU, Y. HORIO *et al.*, 2007 Prospective validation for prediction of gefitinib sensitivity by epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **2**: 22-28.
- YOSHIOKA, H., K. HOTTA, K. KIURA, N. TAKIGAWA, H. HAYASHI *et al.*, 2010 A phase II trial of erlotinib monotherapy in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer who do not possess active EGFR mutations: Okayama Lung Cancer Study Group trial 0705. *J Thorac Oncol* **5**: 99-104.
- YOUNG, E. C., M. M. OWENS, I. ADEBIYI, T. BEDENHAM, R. BUTLER *et al.*, 2013 A comparison of methods for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer. *Diagn Mol Pathol* **22**: 190-195.
- YU, H. A., M. E. ARCILA, M. D. HELLMANN, M. G. KRIS, M. LADANYI *et al.*, 2014 Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann Oncol* **25**: 423-428.
- YU, H. A., M. E. ARCILA, N. REKHTMAN, C. S. SIMA, M. F. ZAKOWSKI *et al.*, 2013 Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* **19**: 2240-2247.
- YU, J., S. KANE, J. WU, E. BENEDETTINI, D. LI *et al.*, 2009 Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 3023-3028.
- YUAN, H., Z. Z. ZHU, Y. LU, F. LIU, W. ZHANG *et al.*, 2012 A modified extraction method of circulating free DNA for epidermal growth factor receptor mutation analysis. *Yonsei Med J* **53**: 132-137.
- YUN, C. H., T. J. BOGGON, Y. LI, M. S. WOO, H. GREULICH *et al.*, 2007 Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* **11**: 217-227.

- YUN, C. H., K. E. MENGWASSER, A. V. TOMS, M. S. WOO, H. GREULICH *et al.*, 2008 The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2070-2075.
- YUNG, T. K., K. C. CHAN, T. S. MOK, J. TONG, K. F. TO *et al.*, 2009 Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* **15**: 2076-2084.
- ZACZEK, A., B. BRANDT and K. P. BIELAWSKI, 2005 The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol Histopathol* **20**: 1005-1015.
- ZHANG, L., X. YUAN, Y. CHEN, X. J. DU, S. YU *et al.*, 2013 Role of EGFR SNPs in survival of advanced lung adenocarcinoma patients treated with Gefitinib. *Gene*.
- ZHANG, W., L. P. STABILE, P. KEOHAVONG, M. ROMKES, J. R. GRANDIS *et al.*, 2006a Mutation and polymorphism in the EGFR-TK domain associated with lung cancer. *J Thorac Oncol* **1**: 635-647.
- ZHANG, X., J. GUREASKO, K. SHEN, P. A. COLE and J. KURIYAN, 2006b An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**: 1137-1149.
- ZHAO, X., R. B. HAN, J. ZHAO, J. WANG, F. YANG *et al.*, 2013 Comparison of epidermal growth factor receptor mutation statuses in tissue and plasma in stage I-IV non-small cell lung cancer patients. *Respiration* **85**: 119-125.
- ZHOU, C., Y. L. WU, G. CHEN, J. FENG, X. Q. LIU *et al.*, 2011 Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* **12**: 735-742.
- ZHU, C. Q., G. DA CUNHA SANTOS, K. DING, A. SAKURADA, J. C. CUTZ *et al.*, 2008a Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* **26**: 4268-4275.
- ZHU, J. Q., W. Z. ZHONG, G. C. ZHANG, R. LI, X. C. ZHANG *et al.*, 2008b Better survival with EGFR exon 19 than exon 21 mutations in gefitinib-treated non-small cell lung cancer patients is due to differential inhibition of downstream signals. *Cancer Lett* **265**: 307-317.
- ZIEGLER, A., U. ZANGEMEISTER-WITTKE and R. A. STAHEL, 2002 Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev* **28**: 255-271.

Esquema I: Encebadors utilitzats per analitzar les mutacions del gen EGFR**Exó 19**1a PCR (amplicó 372pb)

NE19F1: GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC

NE19R1: CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG

Nested PCR (amplicó 300pb)

S19F2: GTGCATCGCTGGTAACATCC

S19R2: TGTGGAGATGAGCAGGGTCT

GeneScan (amplicó 120pb)

encebadors

ELREA 19F: ACTCTGGATCCCAGAAGGTGAG

ELREA 19R: 5' FAM-CCACACAGCAAAGCAGAAACTC

sonda

PNA: 5'Ac-AGATGTTGCTTCTCTTA 3'

S'utilitzen els mateixos encebadors en la 1a PCR i en la nested per analitzar les delecions de l'exó 19 de l'ADN circulant de sang perifèrica.

Reacció de seqüenciació

S'utilitzen els mateixos encebadors de la nested (S19F2 i S19R2) a una concentració d'1µM

Exó 211a PCR (amplicó 415pb)

NE21F1: CTAACGTTCCGCCAGCCATAAGTCC

NE21R1: GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG

Nested PCR (amplicó 350pb)

S21F2: GCTCAGAGCCTGGCATGAA

S21R2: CATCCTCCCCTGCATGTGT

Reacció de seqüenciació

S'utilitzen els mateixos encebadors de la nested (S21F2 i S21R2) a una concentració d'1µM

8- ANNEX I

Allelic discrimination TaqMan assay (TaqMan) (amplicó 63pb)

encebadors

858F: AACACCGCAGCATGTCAAGA

858R: TTCTCTCCGCACCCAGC

sondes

PNA: 5'Ac-AGTTTGGCCAGCCCA3'

E21-FAM: 6-FAM-CAGATTTTGGGCGGGCCAAAC-TAMRA

E21-VIC: VIC-TCACAGATTTTGGGCTGGCCAAAC-TAMRA

Exó 20

1a PCR (amplicó 510pb)

20F: ACTTCACAGCCCTGCGTAAAC

20R: ATGGGACAGGCACTGATTTGT

Nested PCR (amplicó 378pb)

20F2: ATCGCATTTCATGCGTCTTCA

20R2: ATCCCCATGGCAAACCTTTG

Reacció de seqüenciació

S'utilitzen els mateixos encebadors de la nested (20F2 i 20R2) a una concentració d'1 µM

Allelic discrimination TaqMan assay (TaqMan) (amplicó 51pb)

encebadors

T790M-F: AGGCAGCCGAAGGGCA

T790M-R: CCTCACCTCCACCGTGCA

sondes

PNA: 5'Ac-TCATCACGCAGCTC3'

E20-FAM: 6-FAM-TGAGCTGCATGATGA-MGB

E20-VIC: VIC- TGAGCTGCGTGATGA-MGB

Esquema II: Mapa dels encebadors utilitzats

Exó 19

aaataatcagtggtgattcgtggagcccaacagctgcagggctgcggggcgctcacagccccagcaatatcagccttaggtgcggtcca
cagccccagtgctcctcaccttcgggtgcatcgctggtaacatccaccagatcactgggcagcatgtggcaccatctcacaattgccagt
taacgttctctctctctgtcatagG**ACTCTGGATCCCAGAAGGTGAG**AAAGTTAAATCCCGTCGCTATC

AA**GAAT**TAAGAGAAGCAACATCT**CCGAAAGCCAACAAGGAAATCCT**CGATgtgagtttctgcttctgtgtggg

E---L---R---E---A---T---S---P---K---A---N---K---E---I

745

750

755

759

ggtccatggctctgaacctcagccaccctttctcatgtctggcagctgctctct**agaccctgctcatctccacatcctaaatgttcact**
ttctatgtctttcccttctagctctagtggtataactccctccccttagagacagcactg

En negre la seqüència del gen

EN VERMELL I MAJÚSCULA: exó 19

Dins del requadre: zona de deleció

En negre subratllat: encebadors de 1a PCR

En verd subratllat: encebadors de *nested*

En groc: encebadors de GeneScan

En gris: sonda PNA

Exó 21

ttacatcttcttcatgagcctttccattcttggatcagtagtca**ctaacgttcggcagccataagtcct**cgacgtggagag**gctcagagcct**
ggcatgaacatgacctgaattcggatgcagagcttctccatgatgatctgtccctcacagcagggtcttctgtttcag**GGCATGA**
ACTACTTGGAGACCGTCGCTTGGTGACCCGCGACCTGGCAGCCAGGAACGTACTGGTGAAACACCGC
AGGTCAAGATCAGATTTTGGGCTGGCCAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAA
GGAGGCAAACATgtaaggaggtggctttaggtcagccagcatttctgacaccagggaccaggctgcctcccactagctgtattgt
tta**acacatgcagggaggat**ctct**ccagacattctgggtgagctgcagc**agctgctgctggcagctgggtccagccagggctcctg
gtagtgtgagccagagctgcttgggaacagtacttctgctgggacagtgaatgaggatgta

En negre la seqüència del gen

EN BLAU MAJÚSCULA: exó 21

Dins dels requadres vermells: mutacions puntuals L858R i L861Q

En negre subratllat: encebadors de 1a PCR

En verd subratllat: encebadors de *nested*

En vermell: encebadors de TaqMan

En groc: sondes de TaqMan

Subratllat taronja: sonda PNA

La posició CTG subratllada en blau és la L858R

La posició CTG subratllada en vermell és la L861Q

Exó 20

tgctgggctctctgtcatggggaatcccagatgcacccaggagggccctctcccactgcatctgtcacttcacagccctgcgtaaacg
tcctgtgctaggtctttgcaggcacagctttctccatgagtacgtatttgaaactcaagatcgcattcatgcttcacctggaaggg
gtccatgtgccctccttctgcccacatgcgaagccacactgacgtgcctctccctccctccag**GAAGCCTACGTGATGGCCAGC**
GTGGACAACCCACGTGTGCCGCTGCTGGGCATCTG**CCTCACCTCCACCGTGCA**GCTCATCACGCAGC
TCATG**CCCTTCGGCTGCCT**CCTGGACTATGTCCGGAAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTC
AACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAGgtaatcaggaaggagatacggggaggggagataaggagccaggatcctcacatgc
ggtctgcctcctgggatagcaagagttgcatggggatatgtgtgtgctgcatgcagcacacacacattcctttatttggattcaatca
agttgatcttctgtgcacaaatcagtgctgtcccatctgcatgtgaaactctcatcaatcagctaccttt

En minúscula la seqüència del gen

EN MAJÚSCULA: exó 20

En negre subratllat: encebadors de 1a PCR

En verd subratllat: encebadors de *nested*

En vermell: encebadors de TaqMan

En groc: sondes de TaqMan

Subratllat taronja: sonda PNA

**I. INSTRUCCIÓ D'OBTENCIÓ DE SÈRUM, PLASMA I LIMFÒCITS DE LA SANG PERIFÈRICA
(modificació de la IN-14: *Separación de linfocitos en sangre periférica*)**

1. Reactius

Solució TLE 1X

Volum que es vol preparar x 0,0084 = grams de clorur amònic per pesar (Ref. 21236.267 Normapur)

Volum que es vol preparar x $3,5 \times 10^{-5}$ = grams EDTA per pesar (Ref. A2937.0100 Applichem)

Volum que es vol preparar x 0,01 = ml de Hepes (Ref. H-4034 Sigma)

Pesar tots els reactius en una campana extractora

Introduir-los en un vas de precipitats

Dissoldre amb un agitador magnètic la meitat del volum per preparar

Un cop dissolt enrasar amb aigua destil·lada fins el volum final

Passar la dissolució a una botella de vidre

Per preparar la solució de treball només cal realitzar una dilució 1:10

Solució RA

Volum que es vol preparar x 0,14 = grams d'urea per pesar (Ref. A1049.0500 Applichem)

Volum que es vol preparar x 0,20 = grams d'isoticianat de guanidina per pesar (Ref. A1107.0500 Applichem)

Volum que es vol preparar x 0,05 = grams de N-lauroyl sarcosine per pesar (Ref. L-9150 Sigma)

Volum que es vol preparar x 0,05 = ml de nonidet P40 (Ref. 74385 Fluka)

Pesar tots els reactius en una campana extractora

Introduir-los en un vas de precipitats

Dissoldre amb un agitador magnètic la meitat del volum per preparar a 50°C de temperatura

Un cop dissolt ajustar el pH a 8 utilitzant HCl o NaOH

Enrasar amb aigua destil·lada fins el volum final

Passar la dissolució a una botella de vidre

2. Procediment de treball

Mostra de sèrum

Centrifugar el tub SST 10min a 2300rpm

Recollir el sobrenedant i passar-lo a un vial net

Centrifugar el vial 10min a 2300rpm

Recollir el sobrenedant i passar-lo a un altre vial net

Etiquetar i guardar-lo a -80°C

Mostra de plasma

Centrifugar el tub K3/ EDTA durant 10min a 2300rpm

Recollir el sobrenedant i passar-lo a un vial net
Centrifugar el vial 10min a 2300rpm
Recollir el sobrenedant i passar-lo a un altre vial net
Etiquetar i guardar-lo a -80°C

Obtenció de limfòcits

Centrifugar el tub K3/ EDTA durant 10min a 2300rpm
Traspasar la fase blanca (fase intermèdia que conté els limfòcits) a un tub de 30ml i enrasar amb TLE
Agitar en un roller mixer durant 30min
Centrifugar 10min a 2300rpm
Descartar el sobrenedant
Realitzar un rentat del pellet de limfòcits amb un volum de TLE per eliminar l'excés d'eritròcits
Resuspendre el pellet de limfòcits en 1ml de TLE
Repartir en alíquotes de 250µl
Centrifugar a 3000rpm durant 5min
Retirar el sobrenedant
Resuspendre els limfòcits en 150µl de solució RA
Etiquetar i congelar a -80°C

II. INSTRUCCIÓ D'EXTRACCIÓ D'ADN DE LIMFÒCITS (modificació de la IN 15: *Extracción de ADN de linfocitos*)

Quan es comença un nou QIAamp® DNA Blood Mini Kit cal preparar els diferents tampons segons indica el protocol d'ús de la casa comercial

1. Reactius

QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Ref. 51106 Qiagen)
Etanol absolut (Ref. K36630483 Merck)
Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

2. Controls

Control d'extracció: Preparar 200µl d'aigua destil·lada i afegir-li 200µl de tampó AL i 20µl de proteasa

3 Procediment de treball

Pipetejar en un eppendorff 200µl d'una mostra de limfòcits resuspendes en solució RA i afegir 200µl de tampó AL i 20µl proteasa
Agitar les mostres per inversió
Incubar les mostres durant 10 minuts a 56°C
Afegir 200µl d'etanol absolut en mostres i controls
Agitar les mostres per inversió

Transferir tot el volum a una microcolumna (les proporciona el kit)
Centrifugar 1 minut a 8000rpm
Descartar l'elut i afegir 500µl de tampó AW1
Centrifugar 1 minut a 8000rpm
Descartar l'elut i afegir 500µl de tampó AW2
Centrifugar 4 minuts a 10000rpm
Descartar l'elut i transferir les microcolumnes a un eppendorf estèril
Afegir 100 µl d'aigua destil·lada
Deixar les mostres a temperatura ambient durant 1 minut
Centrifugar 1 minut a 8000rpm
Descartar la microcolumna i quedar-se amb l'elut
Etiquetar correctament els *eppendorfs* per identificar-los i guardar-los adequadament (a 4°C mentre dura l'anàlisi i a -20°C o a -80°C per emmagatzemar-los)

III. INSTRUCCIÓ PER TALLAR MOSTRES DE TEIXIT INCLÒS EN PARAFINA (modificació de la IN-1: *Microtomia*)

Tot el material utilitzat haurà de ser tractat prèviament amb RNAasa ZAP. En el cas dels portaobjectes amb membrana, el procés es realitzarà de la següent manera:

Tractar els portaobjectes amb poli-L-lisina durant 5 minuts

Deixar assecar en l'estufa o a l'aire

1. Aparells i material necessari

Micròtom de rotació (Leica)

Bany termostàtic (Leica)

Portaobjectes (Ref. 2007-10 Menzel-Glasër)

Portaobjectes amb membrana (Ref.415101-4401-600 Zeiss)

Fulles Microtome blade R35 (Ref.02.075.00.005 Feather)

Placa freda (Leica EG1150C-11)

2. Reactius

RNAasa ZAP (Ref. 9780;9782 Ambion)

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

Poli-L-lisina (Ref. P8920 Sigma)

3. Procediment de treball

Revisar la correcta identificació de les mostres de teixit inclòs en parafina

Introduir les mostres parafinades en la placa freda durant 30 minuts

Encendre el bany termostàtic a 42°C

Col·locar la fulla en el micròtom

En alguns casos caldrà piramidar el bloc amb l'ajut d'un bisturí, abans de procedir a tallar-lo per eliminar l'excés de parafina al voltant del teixit

Col·locar el bloc de parafina en el micròtom i ajustar-lo

Determinar el gruix del tall (entre 2 i 10µm)

Aproximar el portafalles al bloc fins que pràcticament coincideixin. S'ha de tenir present que la fulla i la superfície de tall han de ser paral·leles per poder obtenir una tira recta. El carro ha d'estar frenat mentre s'orienta el bloc i el micròtom en una zona lliure de vibracions i corrents d'aire

Tallar el bloc amb un moviment ferm, constant, rítmic i de rotació, sempre en el mateix sentit per formar una cinta seriada de talls

En tots els casos caldrà fer dos talls seriatos com a mínim. Un es muntarà sobre un portaobjectes normal i servirà per a que el patòleg marqui la zona tumoral. L'altre es muntarà sobre un portaobjectes amb o sense membrana, on es realitzarà la microdissecció

Comprovar que els talls surten sencers

Estendre la cinta obtinguda en el bany amb l'ajut del pinzell o l'agulla histològica. Utilitzar un o l'altre segons el cas

Recollir els talls amb el portaobjectes. Si el portaobjectes és amb membrana, caldrà tenir present que un cop adherides les seccions no podran separar-se de nou

Identificar correctament les mostres a mida que es vagin recollint els talls del bany

Assecar les mostres en un forn/estufa a 60°C per adherir el teixit al portaobjectes

Un cop s'ha finalitzat el procés de tall, les mostres es guardaran a temperatura ambient en un lloc lliure de pols i resguardat de la llum

IV. INSTRUCCIÓ PER TENYIR AMB HEMATOXILINA-EOSINA (modificació de la IN-2: *Tinció con hematoxilina-eosina*)

1. Aparells i material necessari

Cubetes de tinció i cistelles (Deltalab)

Portaobjectes (Ref. 2007-10 Menzel-glasër)

Portaobjectes amb membrana (Ref.415101-4401-600 Zeiss)

Cubreobjectes (Ref. BB024040A1 Menzel-glasër)

2. Reactius

Alcohol absolut (Ref. 100986.2500 Merck)

Alcohol 96%

Alcohol 70%

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

Xilol (Ref. 141769-0314 Panreac)

Hematoxilina de Harris (Ref. 1.09253.2500 Merck)

Eosina (Ref. 1.15935 Merck)

DPX, medi de muntatge (Ref. 44581 Fluka)

RNAasa ZAP (Ref. AM 9780;9782 Ambion)

Automation Buffer

Volum que es vol preparar x 17,53 = gr de NaCl 0,3M per pesar (Ref. 141659.1211 Panreac)

Volum que es vol preparar x 12,114 = gr de Tris 0,1M per pesar (Ref.A2264 Applichem)

Volum que es vol preparar x 200 = µl de nonidet P-40 0,02% (Ref. 74385 Fluka)

Pesar tots els reactius en una campana extractora

Introduir-los en un vas de precipitats

Dissoldre amb un agitador magnètic, la meitat del volum desitjat

Un cop dissolt, enrasar amb aigua destil·lada fins el volum final

Passar la dissolució a una botella de vidre

La concentració de treball requereix una dilució 1:10

3. Procediment de treball

Posar les mostres que s'han de tenyir en una cistella de tinció (no es trauran de la cistella durant tot el procés)

Incubar las mostres en la estufa a 60°C durant 45 minuts

Dins de la campana extractora, desparafinar les mostres durant 10 minuts introduint-les en una cubeta amb xilol, a temperatura ambient

Passar les mostres per una sèrie d'alcohols a concentracions decreixents per hidratar-les i per a que pugui penetrar el colorant (1 minut cada un):

Alcohol absolut

Alcohol 96%

Alcohol 70%

Aigua destil·lada

Tenyir les mostres durant 1 minut amb hematoxilina de Harris a temperatura ambient (diluïda 1:2 en aigua destil·lada). L'hematoxilina s'ha de filtrar per evitar que s'oxidi i provoqui artefactes en la tinció

Rentar amb aigua destil·lada durant 1 minut per eliminar l'hematoxilina sobrant

Posar les mostres en automation buffer durant 1 minut

Rentar amb aigua destil·lada durant 1 minut

Tenyir les mostres durant 1 minut amb eosina 30% a temperatura ambient

Passar les mostres per una sèrie d'alcohols a concentracions creixents, per deshidratar-les (1 minut cada un)

Alcohol 70%

Alcohol 96%

Alcohol absolut

Dins de la campana extractora, introduir les mostres en xilol durant 5 minuts a temperatura ambient

Les mostres que no han de ser muntades amb DPX, deixar assecar a l'aire. Les que s'han de muntar, afegir la quantitat de DPX per cobrir tota la mostra i col·locar al damunt un cubreobjectes. Deixar assecar a l'aire

Etiquetar els portaobjectes i guardar-los. Les mostres es guardaran a temperatura ambient en un lloc lliure de pols i resguardat de la llum. Les mostres muntades amb DPX podran guardar-se indefinidament. Les no muntades i sense cubreobjectes només podran ser emmagatzemades un temps màxim de dos anys

V. INSTRUCCIÓ PER MICRODISSECCIONAR EL TEIXIT INCLÒS EN PARAFINA (modificació de la IN-3: Microdissección)

1. Aparells i material necessari

Microdissector làser (Zeiss; Olympus, Palm)

Portaobjectes amb membrana (Ref.415101-4401-600 Zeiss)

2. Reactius

Tampó de digestió I

Volum final: 30ml preparat en condicions estèrils

600µl de Tris 0.5M

30µl d'EDTA 0.1M

3ml d'SDS 20%

Enrasar amb aigua destil·lada fins a un volum final de 30ml

Tampó de digestió II (per a mostres amb poca cel·lularitat tumoral)

Volum final: 250µl preparat en condicions estèrils

25µl de tampó de PCR 10x

0,50µl de proteïnasa K (20mg/ml)

224,5µl d'aigua destil·lada

3. Procediment de treball

Valorar la zona tumoral de la mostra que es vol microdisseccionar, prèviament marcada per un patòleg o persona experta.

Tallar el tap d'un eppendorf estèril i posar-li 2 µl de tampó de digestió I o II, segons la mostra

Col·locar el portaobjectes amb la mostra en la platina del microdissector i ajustar-lo amb les pinces

Col·locar el tap de l'eppendorf en el lloc indicat del microscopi

Aproximar de forma automàtica el tap de l'eppendorf a la membrana però sense que la toqui. Ha de quedar paral·lel a la mostra

Seleccionar la zona per microdisseccionar

Microdisseccionar la mostra

Tapar un nou eppendorf amb el tap utilitzat en el procés de microdissecció i barrejar-ho per inversió per a que baixi el material microdisseccionat del tap

Paral·lelament, pipetejar en l'eppendorf el volum de tampó de digestió corresponent (200µl de tampó I o 18 µl de tampó II)

Microcentrifugar per evitar que el material es quedi en el tap

Etiquetar el tub eppendorf per a la seva identificació i realitzar una doble comprovació

Les mostres muntades sobre portaobjectes amb membrana no podran tornar-se a microdisseccionar passats dos anys del seu muntatge. Es guardaran a temperatura ambient en un lloc lliure de pols i resguardat de la llum. El material microdisseccionat es podrà guardar a temperatura ambient fins al seu anàlisi fins a un màxim de 3 dies. Si no, es guardarà a -20°C

VI. INSTRUCCIÓ D'EXTRACCIÓ D'ADN DE TEIXIT INCLÒS EN PARAFINA PEL MÈTODE DE FENOL-CLOROFORM-ALCOHOL ISOAMÍLIC (modificació de la IN-12: *Instrucción para la extracción de ADN utilizando fenol:cloroformo*)

1. Reactius

Tampó de digestió I

Proteïnasa K (20mg/ml) (Ref. 19131 Qiagen)

Fenol: cloroform-alcohol isoamílic (Ref. A0889.0500 Applichem)

Acetat sòdic (Ref. A0686.0500 Applichem)

Glicogen (Ref. 901393 Roche)

Isopropanol (Ref. 1.09634.2500 Panreac)

Alcohol 70%

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

2. Controls

Control d'extracció: Pipetejar en un eppendorf 200µl de tampó de digestió I i tractar-lo com una mostra més

3. Procediment de treball

Incubar les mostres i el control al menys 16 hores a 60°C

Afegir 10µl de proteïnasa K

Agitar per inversió

Incubar aproximadament 5 minuts a 60°C. Si durant aquest temps el teixit no es digereix, tornar a afegir proteïnasa K i incubar de nou

En campana extractora, afegir 300µl de fenol:cloroform-alcohol isoamílic (25:24:1)

Agitar per inversió

Incubar 5 minuts a temperatura ambient

Centrifugar a 12600rpm durant 10 minuts i a temperatura ambient

Traspasar la fase aquosa a eppendorfs nous degudament identificats

Afegir a cada mostra 0.1 volums d'acetat sòdic 3M pH=4.6; 2µl de glicogen i 1 volum d'isopropanol

Agitar per inversió

Precipitar la mostra durant un mínim de 30 minuts a -20°C

Centrifugar 10 minuts a 14000rpm a temperatura ambient

Eliminar el sobrenedant i afegir 150µl d'etanol al 70%

Centrifugar a 14000rpm durant 5 minuts

Eliminar el sobrenedant i deixar assecar el pellet a 60°C

Resuspendre la mostra en 20µl d'aigua destil·lada

Agitar amb vòrtex

L'ADN obtingut pel procés d'extracció es conservarà a 4°C mentre duri l'anàlisi. Posteriorment, es guardarà a -20°C o -80°C

VII. INSTRUCCIÓ D'AMPLIFICACIÓ DE L'ADN PER PCR DE MOSTRES DE TEIXIT INCLÒS EN PARAFINA (modificació de la IN-13: *Instrucción para la amplificación por PCR de los exones 19 y 21 del gen EGFR en muestras parafinadas*)

1. Aparells i material necessari

Termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)

Termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)

2. Reactius

Taq polimerasa (conté Taq, MgCl₂ i tampó 10x) (Ref. R0401K Ecogen)

Encebadors 10 µM

dNTP 100mM (Ref. U121D Promega)

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

3. Controls

Control negatiu: Aigua destil·lada

Control positiu mutat: línia cel·lular PC9 delecionada de l'exó 19 i línia cel·lular H1975 mutada en la posició L858R de l'exó 21

Control positiu wt: limfòcit

Control d'extracció

4. Procediment de treball

1a PCR

Preparar les *master mix* (una per a cada exó que s'amplifiqui) en funció del número de mostres. Cal incloure en cada PCR un control negatiu, un control positiu i un control d'extracció i tractar-los com una mostra més (concentració de l'ADN de mostres i controls positius al voltant de 25-500 ng d'ADN). La *master mix* s'ha de preparar en el moment d'utilització

Distribuir 48µl de master mix per tub

Afegir als tubs 2µl de cada mostra i cada control

Agitar i centrifugar les mostres i els controls

Introduir els tubs en el termociclador i iniciar el procés

Nested PCR

Preparar les master mix (una per a cada exó que s'amplifiqui) en funció del número de mostres. Cal afegir un control negatiu de 2a PCR

Distribuir 47µl de master mix per tub

Afegir als tubs 3µl del producte de la primera PCR

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir els tubs en el termociclador i iniciar el procés

5. Càlcul dels volums necessaris per mostra

1a PCR

Reactius	1 mostra (µl)
Tampó Taq 10x	5
MgCl ₂ a 50mM	1
dNTP a 10mM	1,25
Encebador NE19F1 o NE21F1	2,5
Encebador NE19R1 o NE21R1	2,5
Taq polimerasa 5u/µl	0,2
Aigua destil·lada	35,55

Nested PCR

Reactius	1 mostra (µl)
Tampó Taq 10x	5
MgCl ₂ a 50mM	1
dNTP a 10mM	1,25
Encebador S19F2 o S21F2	2,5
Encebador S19R2 o S21R2	2,5
Taq polimerasa 5u/µl	0,2
Aigua destil·lada	34,55

6. Cicles d'amplificació

1a PCR

95°C	→	5 min	} 20 cicles
95°C	→	30 seg	
62°C	→	30 seg	
72°C	→	1 min	
72°C	→	5 min	
4°C	→	indet	

Nested PCR

95°C	→	5 min	} 35 cycles
95°C	→	30 seg	
64°C	→	30 seg	
72°C	→	1 min	
72°C	→	5 min	
4°C	→	indet	

VIII. INSTRUCCIÓ D'AMPLIFICACIÓ DE L'ADN PER PCR PER A L'EXÓ 19 I 21 PER A MOSTRES AMB POCA CEL·LULARITAT TUMORAL (modificació de la IN-27: Instrucció para la amplificación por PCR de los exones 19 y 21 del gen EGFR (material escaso))

1. Aparells i material necessari

Termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)

Termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)

2. Reactius

Taq polimerasa (conté Taq, MgCl₂ 50 mM i tampó 10x) (Ref. ETAQ-500 Ecogen)

Encebadors 10 µM

dNTP 100mM (Ref. EDN-100 Ecogen)

Aigua destil·lada (Ref. A7398,1000 Ecogen)

3. Controls de PCR

Control negatiu: Aigua destil·lada

Control positiu mutat: línia cel·lular PC9 delecionada de l'exó 19 i línia H1975 mutada en la posició L858R de l'exó 21

Control positiu wt: limfòcit

Control de tampó de microdissecció

4. Procediment de treball

Incubar les mostres microdisseccionades a 60°C de 4 a 16 hores

Microcentrifugar les mostres

Incubar les mostres 10 minuts a 95°C

Posar les mostres en gel

1a PCR

Preparar les master mix (una per a cada exó que s'amplifiqui) en funció del número de mostres. Cal incloure en cada PCR un control negatiu, un control positiu i un control de tampó de microdissecció i tractar-los com una mostra més. La master mix s'ha de preparar en el moment d'utilització

Distribuir 47µl de master mix per tub

Afegir als tubs 3µl de cada mostra i cada control

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir els tubs en el termociclador i iniciar el procés

Nested PCR

Preparar les master mix (una per a cada exó que s'amplifiqui) en funció del número de mostres. Cal afegir un control negatiu de 2a PCR

Distribuir 46µl de master mix per tub

Afegir als tubs 4µl del producte de la primera PCR

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir els tubs en el termociclador i iniciar el procés

5. Càlcul dels volums necessaris per mostra

1a PCR

Reactius	1 mostra (µl)
Tampó Taq 10x	7,5
MgCl ₂ a 50mM	3
dNTP a 10mM	1,25
Encebador NE19F1 o NE21F1	2,5
Encebador NE19R1 o NE21R1	2,5
Taq polimerasa 5u/µl	0,4
Aigua destil·lada	32,55

Nested PCR

Reactius	1 mostra (µl)
Tampó Taq 10x	5
MgCl ₂ a 50mM	1,5
dNTP a 10mM	1,25
Encebador S19F2 o S21F2	2,5
Encebador S19R2 o S21R2	2,5
Taq polimerasa 5u/µl	0,25
Aigua destil·lada	37

6. Cicles d'amplificació

1a PCR

95°C	→	5 min	} 25 cicles
95°C	→	30 seg	
64°C	→	30 seg	
72°C	→	1 min	
72°C	→	5 min	
4°C	→	indet	

Nested PCR

95°C	→	5 min	}	35 cicles exó 19
95°C	→	30 seg		
64°C	→	30 seg	}	40 cicles exó 21
72°C	→	1 min		
72°C	→	5 min		
4°C	→	indet		

IX. INSTRUCCIÓ PER VISUALITZAR LES BANDES D'AMPLIFICACIÓ PER PCR: GEL D'AGAROSA (modificació de la IN-7: *Instrucciones para preparar soluciones*)

1. Reactius

- Solució TBE (Ref. 15581-044 Invitrogen)
- Agarosa (Ref. AG-220 Ecogen)
- Superladder-low (400 µl) (Ref. SLL100 Ecogen)
- SYBR safe DNA gel stain (Ref. S33102 Invitrogen)

2. Procediment de treball

- Preparar la cubeta d'electroforesis segellant amb cinta adhesiva els dos costats oberts
- Encaixar la/es pinta/es i comprovar que les pues ni toquin el fons de la cubeta ni quedin massa elevades
- Pesar en un erlenmeyer la quantitat d'agarosa necessària segons el percentatge del gel que es vulgui preparar (normalment entre el 0,8 y el 2%, segons la mida dels fragments que s'hagin amplificat)
- Afegir el volum de TBE 1X necessari (el volum dels gels petits és d'aproximadament 30ml i el dels gels grans de 60ml)
- Escalfar breument en el microones fins l'ebullició
- Esperar a que es refredi, sense arribar a solidificar (es pot refredar sota l'aixeta)
- Afegir 2µl (gels petits) o 3µl (gels grans) de colorant SYBR Safe
- Posar la barreja en la cubeta i esperar a que solidifiqui completament (vira a blanc)
- Retirar la/es pinta/es i la cinta i introduir el gel en la cubeta d'electroforesi i cobrir-lo amb tampó TBE 1X
- Carregar les mostres. En un dels pouets afegir 5µl de marcador de pes molecular
- Connectar la cubeta d'electroforesi a la corrent entre 80-120 V. Seguir el desplaçament del BPB (banda blau fosc) i el XC (blau clar) fins que es consideri suficientment separat
- Desconnectar els cables, recuperar el gel i fer-li una foto amb l'aparell de captació d'imatges

3. Acceptació de resultats

Si en els pouets on s'han carregat els controls negatius de PCR (on no s'havia afegit ADN) o d'extracció/tampó de microdissecció no apareixen bandes d'amplificació, s'acceptarà el resultat de la PCR. Si en algun d'aquests pouets apareixen bandes d'amplificació, no s'acceptarà el resultat de la PCR.

Si la banda apareix en el control d'extracció/tampó de microdissecció es tornarà a microdisseccionar la mostra i es farà de nou l'extracció d'ADN, si procedeix, i l'amplificació. Si és el control negatiu de 1a PCR es repetirà l'amplificació de nou. Si és el control negatiu de la *nested*, només es repetirà la 2a PCR

X. INSTRUCCIÓ PER PURIFICAR EL PRODUCTE DE PCR PRÈVI A LA REACCIÓ DE SEQÜÈNCIA (modificació de la IN-19: *Instrucción para el tratamiento enzimático del producto de PCR con exonucleasa y fosfatasa alcalina*)

1. Aparells i material necessari

Termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)

Termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)

2. Reactius

ExoSap-It (Ref. 78200 Amersham Bioscience)

3. Procediment de treball

Pipetejar en un eppendorf 2µl de ExoSap-It per cada 5µl de producte de PCR que s'hagi de purificar

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir les mostres en el termociclador. Iniciar el procés

La incubació serà:

37°C → 20 min

85°C → 15 min

4°C → indet

XI. INSTRUCCIÓ PER REALITZAR LA REACCIÓ DE SEQÜÈNCIA I LA PRECIPITACIÓ DE MOSTRES DE TEIXIT INCLÒS EN PARAFINA (modificació de la IN-17: *Instrucción para llevar a cabo una reacción de secuenciación y precipitación*)

1. Aparells i material necessari

3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Termociclador Geneamp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)

2. Reactius

Hi-Di formamide (Ref. 4311320 Applied Biosystems)

Acetat Sòdic (Ref. A0686.500 Applichem)

EDTA (Ref 2967.0100 Applichem)

Etanol (A3678,1000 Applichem)

BigDye v3.1 (Inclou BigDye 3.1 i tampó 5x) (Ref. 4336917 Applied Biosystems)

Encebadors a 1 µM

3. Procediment de treball

Preparar la master mix en funció del número de mostres. A cada mix només se li afegirà un encebador (forward o reverse) de l'exó que es vulgui seqüenciar. Si es vol obtenir la seqüència de la cadena forward i la reverse caldrà preparar dues master mix independents cada una amb el seu encebador. La master mix ha de ser preparada en el moment de realitzar la reacció, en tot moment protegint de la llum el BigDye

Introduir 17µl de la master mix corresponent en cada tub

Afegir d'1,5 a 3µl d'ADN, en funció de la intensitat de la banda vista en el gel d'agarosa

Afegir els µl pertinents d'aigua destil·lada, fins a arribar a un volum final de 20µl

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir els mostres en el termociclador i iniciar la reacció

Un cop acabat el procés, precipitar l'ADN afegint a cada mostra:

2µl de acetat sòdic 3M

2µl d'EDTA 125mM

50µl d'etanol absolut (guardat a -20°C)

Mantenir les mostres al voltant de 15 minuts a temperatura ambient

Centrifugar de 15 a 20 minuts a 14000rpm i a temperatura ambient

Retirar el sobrenedant

Rentar el pellet amb 150µl d'etanol al 70% (guardat a -20°C)

Centrifugar 5 minuts a 14000rpm

Retirar el sobrenedant i deixar assecar (es poden assecar a 60°C en el bany)

Afegir 15µl de formamida i resuspendre el pellet

Introduir les mostres en el seqüenciador automàtic i iniciar el procés

4. Càlcul dels volums de la reacció de seqüenciació.

Reactius	1 mostra (µl)
Tampó 5x	2
BigDye v. 3.1	3
Encebador a 1µM	3,3
Aigua destil·lada	8,8

5. Reacció de seqüenciació

95°C	→	5 min	} 30 cicles
96°C	→	10 seg	
50°C	→	5 seg	
60°C	→	5 seg	
4°C	→	indet	

6. Acceptació de resultats

S'acceptaran totes les seqüències que, independentment de la fluorescència mitjana, presentin un patró nucleotídic correcte i permetin una lectura inequívoca per comparació amb la seqüència de referència del gen EGFR

Si la fluorescència és massa elevada i hi ha saturació de lectura, es realitzarà una dilució en formamida per eliminar les inespecificitats aparegudes per sobresaturació en el moment que el programa d'anàlisi integra les dades

Per a les mostres amb electroferogrames que en raw data no presenten fluorescència o el patró sigui defectuós, es repetirà la reacció de seqüenciació. Aquesta manca de fluorescència es pot atribuir a una possible pèrdua del pellet durant el procés de precipitació de la seqüència

Per a les seqüències que, malgrat presentar un patró correcte de lectura, aparegui un background superior a 1/5 de la fluorescència basal mitjana, es repetirà des del procés de purificació ja que possiblement s'ha produït un problema en la digestió enzimàtica

En el cas que hi hagi algun dubte sobre la lectura d'una seqüència que no permeti donar un resultat clar i inequívoc, es repetirà la reacció de seqüència de la mostra, i si el problema persisteix, es repetiran les PCR des de l'ADN

Si en el mateix grup de mostres analitzades apareix més d'una mostra amb la mateixa alteració (amb el mateix tipus de deleció de l'exó 19 o la mateixa mutació de l'exó 21) es repetiran les PCR de l'exó corresponent des de l'ADN. Aquest procés es realitzarà per assegurar que no s'hagi produït cap contaminació creuada entre mostres, independentment que els controls negatius de PCR i d'extracció/tampó de microdissecció hagin estat correctes

En el cas que, en repetir una anàlisi, hi hagi discrepància entre el primer i segon resultat, es procedirà a una nova microdissecció de la mostra i una nova anàlisi

XII. INSTRUCCIÓ PER DETECTAR LES DELECCIONS DE L'EXÓ 19 PER GENESCAN EN MOSTRES DE TEXTIL INCLÒS EN PARAFINA (modificació de la IN-20: *Instrucción para el análisis de fragmentos del exón 19 del gen EGFR en parafina*)

1. Aparells i material necessari

Termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)

Termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)

3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Placa de 96 pouets (Ref. 4306737 Applied Biosystems)

2. Reactius

Taq polimerasa (conté Taq, MgCl₂ i tampó 10x) (Ref. R0401K Ecogen)

Encebadors 10 µM

dNTP 100mM (Ref. U121D Promega)

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

Hi-Di formamide (Ref. 4311320 Applied Biosystems)

GeneScan 500LIZ (-250) Size Standard (Ref. 4322682 Applied Biosystems)

3. Controls

Control negatiu de PCR (Aigua destil·lada)

Control positiu de la deleció del exó 19: línia cel·lular PC9

Control positiu wt: limfòcit

4. Procediment de treball

Preparar la master mix en funció del número de mostres. Cal incloure en la PCR un control negatiu, un control positiu i un control d'extracció/tampó de microdissecció i tractar-los com una mostra més (concentració de mostres i controls positiu al voltant de 50-500ng d'ADN). La master mix s'ha de preparar en el moment d'utilització. Com que el primer reverse està marcat amb un fluorocrom, cal protegir-lo de la llum en tot moment

Distribuir 47µl de master mix per tub

Afegir als tubs 3µl de cada mostra i cada control

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir els tubs en el termociclador i iniciar el procés

Segons la intensitat de la banda d'amplificació observada en el gel d'agarosa, es prepararà una dilució del producte de la PCR en aigua destil·lada entre 1:10 y 1:200

Barrejar en un eppendorf 9µl de Hi-Di formamide, 0,25µl de GeneScan 500LIZ (-250) Size Standard i 1µl de la dilució del producte de PCR

Incubar les mostres i controls durant 3 minuts a 95°C

Posar les mostres en gel

Carregar-les en el 3130 Genetic Analyzer i iniciar el procés

5. Càlcul dels volums per la PCR de GeneScan:

Reactius	1 mostra (µl)
Tampó Taq 10x	5
MgCl ₂ a 50mM	1
dNTP a 10mM	1,25
Encebador ELREA 19F	2,5
Encebador ELREA 19R FAM	2,5
Taq polimerasa 5u/µl	0,2
Aigua destil·lada	37

6. La reacció de PCR serà:

95°C	→	5 min	} 40 cicles
95°C	→	30 seg	
58°C	→	30 seg	
72°C	→	1 min	
72°C	→	5 min	
4°C	→	indet	

7. Acceptació de resultats

S'acceptaran com a vàlids tots aquells resultats de GeneScan que permetin una interpretació inequívoca del resultat

En el cas que existeixi algun dubte d'interpretació per sobresaturació, es diluirà la mostra en formamida per tal d'eliminar inespecificitats aparegudes per sobresaturació quan el programa d'anàlisi de fragments integra i processa les dades

Tots els pacients que presentin un resultat de GeneScan deletionat es corroborarà per seqüenciació Sanger

Si en el mateix grup de mostres analitzades apareix més d'una mostra amb la mateixa deleció es procedirà a analitzar la mostra per seqüenciació Sanger

XIII. INSTRUCCIÓ PER A L'ANÀLISI DE LA MUTACIÓ L858R DE L'EXÓ 21 PER LA TÈCNICA TAQMAN EN MOSTRES DE TEIXIT INCLÒS EN PARAFINA (modificació de la IN-22: *Instrucción para la determinación de la mutación L858R del exón 21 del gen EGFR mediante la técnica TaqMan en muestras parafinadas*)

Com que es treballa amb sondes marcades amb fluorocroms, cal tenir-les resguardades de la llum en tot moment

1. Aparells i material necessari

7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

Placa de 96 pouets (Ref. 4306737 Applied Biosystems)

MicroAmp Optical Adhesive Film (Ref. 4311971 Applied Biosystems)

2. Reactius

TaqMan Master Mix (conté Ampli Taq Gold ADN polimerasa, tampó (30mM Tris pH 8,05; 100mM KCl), dNTP (400µM cada un), MgCl₂ (5mM) i estabilitzants) (Ref. 4318157 Applied Biosystems)

Encebadors a 10µM

Sondes específiques a 10µM

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

3. Controls

Control d'extracció si l'ADN s'ha extret pel mètode fenol-cloroform o control de tampó de PCR si és una mostra amb poca cel·lularitat tumoral

Control negatiu d'aigua destil·lada (NTC, Not Template Control)

Control positiu L858R mutat: línia cel·lular H1975

Control positiu wt: limfòcit

4. Procediment de treball

Preparar la TaqMan master mix tenint en compte els controls que s'han d'afegir. S'ha de preparar en el mateix moment d'utilització

Afegir 23µl de la master mix als pouets corresponents

Pipetejar 2µl de cada mostra, control negatiu i control positiu en el pouet corresponent.

En el pouet del NTC hi afegirem 2µl d'aigua destil·lada. La concentració d'ADN de les mostres i controls és al voltant de d'1-100ng/µl

Segellar la placa amb un Clear Adhesive Film MicroAmp

Introduir la placa en el termociclador/lector de l'equip 7000 Sequence Detection System

Realitzar la lectura inicial de fluorescència de la placa

Iniciar el procés d'amplificació

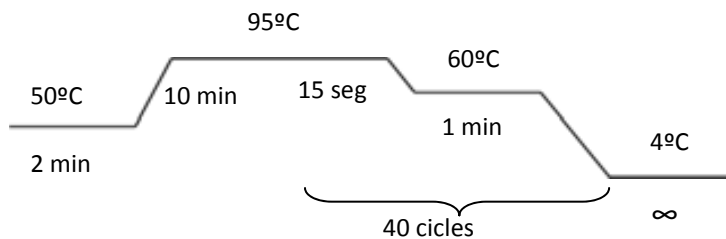
Realitzar la lectura final de la fluorescència de la placa

Analitzar els resultats obtinguts

5. Càlcul dels volums per realitzar la TaqMan

Reactius	1 mostra (µl)
TaqMan Master Mix 2x	12,5
Encebador Forward	1,5
Encebador Reverse	1,5
Sonda VIC	0,5
Sonda FAM	0,5
Aigua destil·lada	6,25

6. La reacció de PCR serà:



7. Acceptació de resultats

S'acceptaran com vàlids tots aquells resultats de TaqMan que permetin una interpretació inequívoca del resultat sempre i quan els controls de la placa siguin correctes. Si no és així es repetirà la placa

Tots els pacients que presentin un resultat de TaqMan mutat es corroborarà per seqüenciació Sanger

Si en el mateix grup de mostres analitzades apareix més d'una mostra mutada es procedirà a analitzar-les per seqüenciació Sanger

XIV. INSTRUCCIÓ PER DETECTAR LA MUTACIÓ T790M DE L'EXÓ 20 PER PCR (*modificació de la IN-18: Instrucción para la amplificación por PCR del exón 20 del gen EGFR en muestras parafinadas*)

1. Aparells i material necessari

Termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)

Termociclador 2720 Thermal cyclers (Applied Biosystems)

2. Reactius

Taq polimerasa (conté Taq, MgCl₂ i tampó 10x) (Ref. R0401K Ecogen)

Encebadors 10µM

dNTP 100mM (Ref. U121D Promega)

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

3. Controls

Control negatiu: Aigua destil·lada

Control positiu: línia cel·lular H1975 mutada de l'exó 20 en la posició T790M.

Control positiu wt: limfòcit

Control d'extracció/tampó de microdissecció si la mostra té poca cel·lularitat tumoral.

4. Procediment de treball

1a PCR

Preparar la master mix en funció del número de mostres. Cal incloure en cada PCR un control negatiu. La master mix s'ha de preparar en el moment d'utilització

Distribuir 48µl de master mix per tub

Afegir als tubs 2µl de cada mostra i cada control

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir els tubs en el termociclador i iniciar el procés

Nested PCR

Preparar la master mix en funció del número de mostres. Cal afegir un control negatiu de 2a PCR

Distribuir 47µl de master mix per tub

Afegir als tubs 3µl del producte de la primera PCR

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir els tubs en el termociclador i iniciar el procés

5. Càlcul dels volums per realitzar les amplificacions:

1a PCR

Reactius	1 mostra (μ l)
Tampó Taq 10x	5
MgCl ₂ a 50mM	1
dNTP a 10mM	1,25
Encebador 20F1	2,5
Encebador 20R1	2,5
Taq polimerasa 5u/ μ l	0,2
Aigua destil·lada	35,55

Nested PCR

Reactius	1 mostra (μ l)
Tampó Taq 10x	5
MgCl ₂ a 50mM	1
dNTP a 10mM	1,25
Encebador 20F2	2,5
Encebador 20R2	2,5
Taq polimerasa 5u/ μ l	0,2
Aigua destil·lada	35,55

6. Cicles d'amplificació

1a PCR

95°C>	5 min	} 35 cicles
95°C>	30 seg	
58°C>	30 seg	
72°C>	1 min	
72°C>	5 min	
4°C>	indet	

Nested PCR

95°C>	5 min	} 20 cicles
95°C>	30 seg	
59°C>	30 seg	
72°C>	1 min	
72°C>	5 min	
4°C>	indet	

XV. INSTRUCCIÓ PER DETECTAR LA MUTACIÓ T790M DE L'EXÓ 20 PER TAQMAN (*modificació de la IN-23: Instrucción para la determinación de la mutación T790M del exón 20 del gen EGFR mediante la técnica TaqMan*)

Com que es treballa amb sondes marcades amb fluorocroms, cal tenir-les resguardades de la llum en tot moment

1. Aparells i material necessari

Placa de 384 pouets (Ref. 4309849 Applied Biosystems)

MicroAmp Clear Adhesive Film (Ref. 4306311 Applied Biosystems)

ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems)

2. Reactius

TaqMan Master Mix (conté Ampli Taq Gold ADN polimerasa, tampó (30mM Tris pH 8,05; 100mM KCl), dNTP (400µM cada un), MgCl₂ (5mM) i estabilitzants) (Ref. 4318157 Applied Biosystems)

Encebadors a 10µM

Sondes específiques a 10µM

Sonda PNA 10µM

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

3. Controls

Control positiu mutat: línia cel·lular H1975 amb PNA

Control positiu wt: limfòcit amb i sense PNA

Control negatiu (NTC): Aigua destil·lada amb i sense PNA

Control negatiu d'extracció amb i sense PNA

En el cas de l'anàlisi de mutacions en sang perifèrica s'afegeixen els controls següents:

Control s/p mutat (pacient ja analitzat) amb PNA

Control s/p wt (pacient ja analitzat) amb PNA

4. Procediment de treball

Preparar les TaqMan master mix (una amb PNA i l'altra sense PNA) tenint en compte els controls que s'han d'afegir. S'ha de preparar en el mateix moment d'utilització

Afegir 11,5µl de la master mix als pouets corresponents

Pipetejar 1µl de cada mostra, control negatiu i control positiu en el pouet corresponent.
En els pouets dels NTC s'afegeix 1µl d'aigua destil·lada

Segellar la placa amb un Clear Adhesive Film MicroAmp

Introduir la placa en l'equip 7900HT Sequence Detection System

Realitzar la lectura inicial de fluorescència de la placa

Iniciar el procés d'amplificació

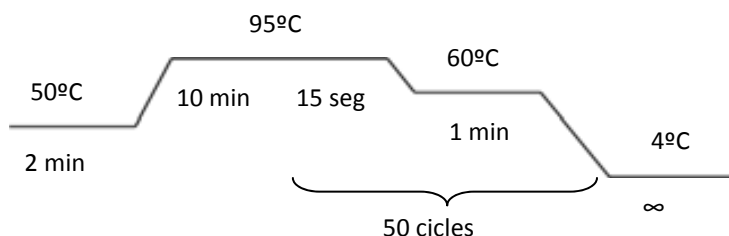
Realitzar la lectura final de la fluorescència de la placa

Analitzar els resultats obtinguts

5. Càlcul dels volums per a la reacció de TaqMan

Reactius	1 mostra (μ l) amb PNA	1 mostra (μ l) sense PNA
TaqMan Master Mix 2x	6,25	6,25
Encebador Forward	0,75	0,75
Encebador Reverse	0,75	0,75
Sonda VIC	0,25	0,25
Sonda FAM	0,25	0,25
PNA 10 μ M	0,625	--
Aigua destil·lada	2,325	3,75

6. La reacció de PCR serà:


XVI. INSTRUCCIÓ PER EXTREURE L'ADN CIRCULANT DE SANG PERIFÈRICA (modificació de la IN-21: Extracció de ADN mediante el kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen))

Quan es comença un nou QIAamp® DNA Blood Mini Kit és necessari preparar els diferents tampons segons indica el protocol d'ús de la casa comercial.

1. Reactius

QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Ref. 51106 Qiagen)

Etanol absolut (Ref. K36630483 Merck)

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

2. Controls

Control d'extracció: Preparar 200 μ l d'aigua destil·lada i afegir-li 200 μ l de tampó AL i 20 μ l de proteasa

3. Procediment de treball

Pipetejar en un eppendorff 200 μ l de sèrum o plasma, per duplicat, i afegir 200 μ l de tampó AL i 20 μ l proteasa

Barrejar per inversió

Incubar les mostres durant 10 minuts a 56°C

Afegir 200 μ l d'etanol absolut en mostres i controls

Transferir tot el volum a una microcolumna (les proporciona el kit)

Centrifugar 1 minut a 8000rpm

Descartar l'eluït i afegir 500µl de tampó AW1
 Centrifugar 1 minut a 8000rpm
 Descartar l'eluït i afegir 500µl de tampó AW2
 Centrifugar 4 minuts a 10000rpm
 Descartar l'eluït i transferir les microcolumnes a un eppendorf estèril
 Afegir 50µl d'aigua destil·lada en un dels duplicats
 Deixar les mostres a temperatura ambient durant 1 minut
 Centrifugar la rèplica que s'ha afegit l'aigua destil·lada 1 minut a 8000rpm
 Descartar la microcolumna i quedar-se amb l'eluït
 Traspasar l'eluït de la primera rèplica a la segona columna (segona rèplica)
 Deixar les mostres 1 minut a temperatura ambient
 Centrifugar 1 minut a 8000rpm
 Descartar la microcolumna i quedar-se amb l'eluït
 Identificar correctament els tubs y guardar-los adequadament.

L'ADN obtingut es conservarà a 4°C fins que no s'acabi l'anàlisi de la mostra. Posteriorment, es guardarà a -20°C o -80 °C

XVII. INSTRUCCIÓ PER DETECTAR LES DELECCIONS DE L'EXÓ 19 PER GENESCAN EN L'ADN CIRCULANT DE SANG PERIFÈRICA (modificació de la IN-25 Instrucció para el analisis de fragmentos del exon 19 del gen EGFR en muestras de suero y plasma)

Com que el primer *reverse* està marcat amb un fluorocrom, cal protegir-lo de la llum en tot moment.

1. Aparells i material necessari

Termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)
 Termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)
 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
 Placa de 96 pouets (Ref. 4306737 Applied Biosystems)

2. Reactius

Taq polimerasa (conté Taq, MgCl₂ i tampó 10x) (Ref. R0401K Ecogen)
 Encebadors 10µM
 dNTP 100mM (Ref. U121D Promega)
 Sonda PNA 10µM
 Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)
 Hi-Di formamide (Ref. 4311320 Applied Biosystems)
 GeneScan 500LIZ (-250) Size Standard (Ref. 4322682 Applied Biosystems)

3. Controls

Control negatiu de PCR (Aigua destil·lada)

Control positiu delecionat del exó 19: línia cel·lular PC9

Control positiu wt: limfòcit

4. Procediment de treball

1a PCR

Preparar les master mix (una amb PNA i l'altra sense PNA) en funció del número de mostres. Cal incloure per a cada mix de PCR un control positiu wt, i un control positiu delecionat. Les master mix s'han de preparar en el moment d'utilització. Els controls no s'amplificaran amb sonda PNA

Distribuir 22µl de master mix per tub

Afegir als tubs 3µl de cada mostra i cada control

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir els tubs en el termociclador i iniciar el procés

Nested PCR

Preparar les master mix (una amb PNA i l'altra sense PNA) en funció del número de mostres. Les master mix s'han de preparar en el moment d'utilització. Els controls no s'amplificaran amb sonda PNA. Cal afegir un nou control de 2na PCR

Distribuir 22µl de master mix per tub

Afegir als tubs 3µl de cada mostra i cada control

Tancar bé els tubs. Agitar i microcentrifugar

Introduir els tubs en el termociclador i iniciar el procés

Segons els resultats observats en el gel d'agarosa, es prepararà una dilució d'1/5-1/10 del producte de la PCR en aigua destil·lada

Barrejar en un eppendorf 9µl de Hi-Di formamide, 0,25µl de GeneScan 500LIZ (-250) Size Standard i 1µl de la dilució del producte de PCR

Incubar les mostres i controls durant 3 minuts a 95°C

Posar les mostres en gel

Carregar les mostres en el 3130 Genetic Analyzer i iniciar el procés

5. Càlcul dels volums per a la PCR de GeneScan:

1a PCR

Reactius	1 mostra (µl) amb PNA	1 mostra (µl) sense PNA
Tampó Taq 10x	2,5	2,5
MgCl ₂ a 50mM	0,5	0,5
dNTP a 10mM	0,625	0,625
Encebador ELREA 19F	1,25	1,25
Encebador ELREA 19R FAM	1,25	1,25
Taq polimerasa 5u/µl	0,1	0,1
PNA 10µM	12,5	--
Aigua destil·lada	1,275	18,725

Nested PCR

Reactius	1 mostra (µl) amb PNA	1 mostra (µl) sense PNA
Tampó Taq 10x	2,5	2,5
MgCl ₂ a 50mM	0,5	0,5
dNTP a 10mM	0,625	0,625
Encebador ELREA 19F	1,25	1,25
Encebador ELREA 19R FAM	1,25	1,25
Taq polimerasa 5u/µl	0,1	0,1
PNA 10µM	7,5	--
Aigua destil·lada	8,275	18,725

6. Les reaccions seran:

1a PCR

95°C	→	5 min	} 40 cicles
95°C	→	30 seg	
58°C	→	30 seg	
72°C	→	1 min	
72°C	→	5 min	
4°C	→	indet	

Nested PCR

95°C	→	5 min	} 30 cicles
95°C	→	30 seg	
58°C	→	30 seg	
72°C	→	1 min	
72°C	→	5 min	
4°C	→	indet	

XVIII. INSTRUCCIÓ PER DETECTAR MUTACIONS L858R DE L'EXÓ 21 PER TAQMAN EN L'ADN CIRCULANT DE SANG PERIFÈRICA (modificació de la IN-23: *Instrucción para la determinación de la mutación L858R del exón 21 del gen EGFR mediante la técnica TaqMan en muestras de sangre periférica*)

Tots els càlculs estan relacionats amb l'equip 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) que s'utilitzen plaques de 96 pouets i volums de reacció de 25µl finals. Si es tracta de l'equip 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) els volums de reacció seran la meitat dels descrits ja que s'utilitzen plaques de 384 pouets. El volum d'ADN de mostres i controls també seran la meitat del que es descriu.

Com que es treballa amb sondes marcades amb fluorocroms, cal tenir-les resguardades de la llum en tot moment

1. Aparells i material necessari

Placa de 384 pouets (Ref. 4309849 Applied Biosystems)

Placa de 96 pouets (Ref. 4306737 Applied Biosystems)

MicroAmp Clear Adhesive Film (Ref. 4306311 Applied Biosystems)

ABIPRISM 7900HT o 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

2. Reactius

TaqMan Master Mix (conté Ampli Taq Gold ADN polimerasa, tampó (30mM Tris pH 8,05; 100mM KCl), dNTP (400µM cada un), MgCl₂ (5mM) i estabilitzants) (Ref. 4318157 Applied Biosystems)

Encebadors a 10µM

Sondes específiques a 10µM

Sonda PNA 10µM

Aigua destil·lada (Ref. D34209 Braun)

3. Controls

Control positiu mutat: línia cel·lar H1975 amb PNA

Control positiu wt: limfòcit amb i sense PNA

Control s/p mutat (pacient ja analitzat) amb PNA

Control s/p wt (pacient ja analitzat) amb PNA

Control negatiu (NTC): Aigua destil·lada amb i sense PNA

Control negatiu d'extracció amb i sense PNA (quan escaigui)

Totes les mostres que s'analitzin de novo, caldrà analitzar-les amb i sense PNA per determinar si hi ha o no ADN en la mostra

4. Procediment de treball

Preparar la TaqMan master mix tenint en compte els controls que s'han d'afegir. S'ha de preparar en el mateix moment d'utilització

Afegir 23µl de la master mix als pouets corresponents

Pipetejar 2µl de cada mostra, controls negatius i controls positius en el pouet corresponent. En els pouets dels NTC hi afegirem 2µl d'aigua destil·lada

Segellar la placa amb un Clear Adhesive Film MicroAmp

Introduir la placa en l'equip 7000 Sequence Detection System o 7900HT Sequence Detection System

Realitzar la lectura inicial de fluorescència de la placa

Iniciar el procés d'amplificació

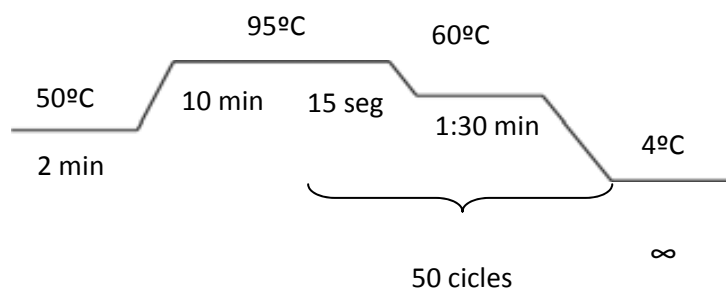
Realitzar la lectura final de la fluorescència de la placa

Analitzar els resultats obtinguts

5. Càlcul dels volums necessaris per a la TaqMan (per a l'equip 7900HT Sequence Detection System seran la meitat):

Reactius	1 mostra (μ l) amb PNA	1 mostra (μ l) sense PNA
TaqMan Master Mix 2x	12,5	12,5
Encebador Forward	1,5	1,5
Encebador Reverse	1,5	1,5
Sonda VIC	0,5	0,5
Sonda FAM	0,5	0,5
PNA 10 μ M	1,25	--
Aigua destil·lada	5	6,25

6. La reacció de PCR serà:



9 ANNEX-II

I-Exemple de seqüències en sentit *reverse* dels exons 19 i 21 del limfòcit, exó 19 deletat 15pb de la línia cel·lular PC9 i exons 21 (L858R) i 20 (T790M) de la línia cel·lular H1975

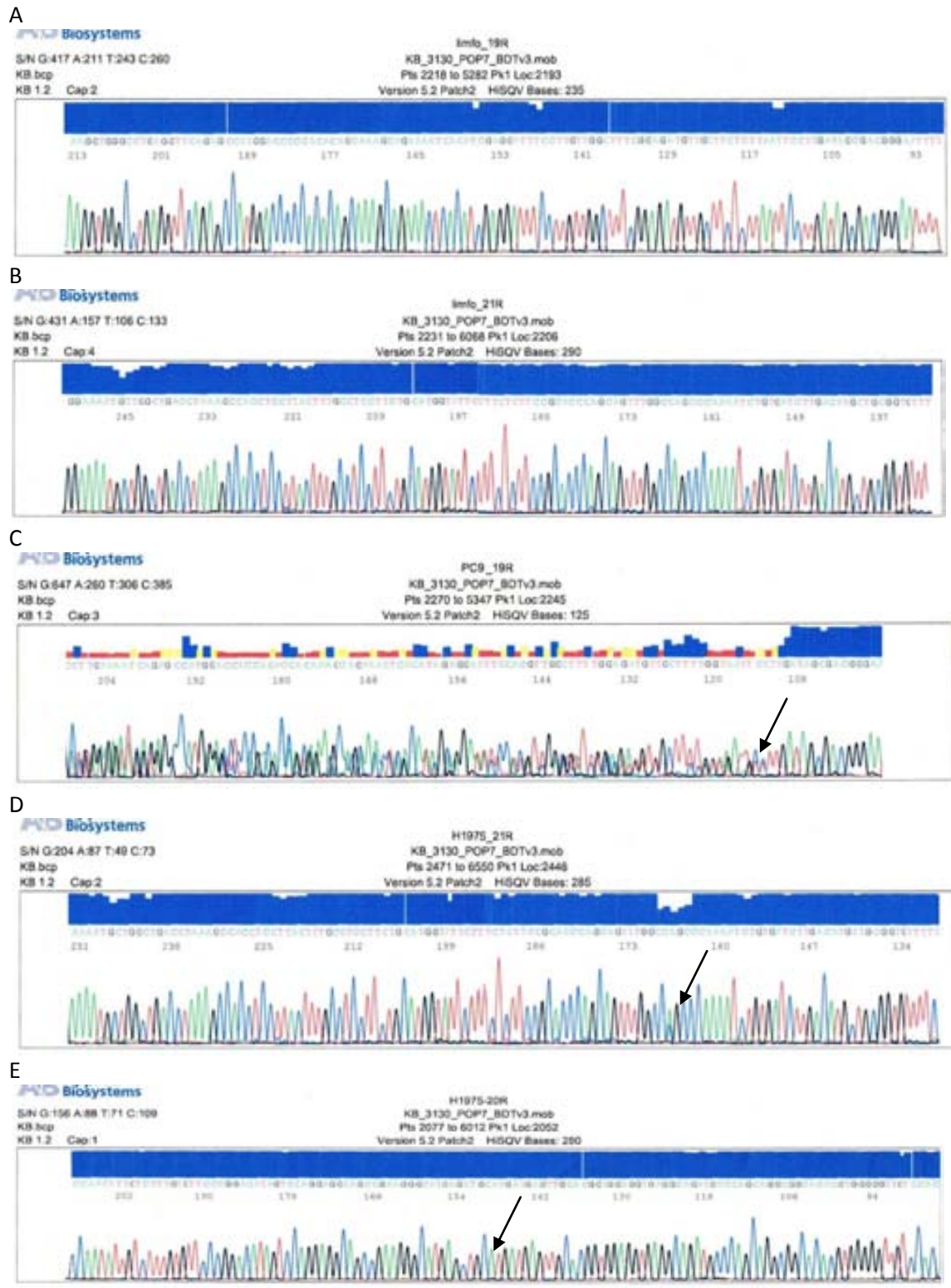
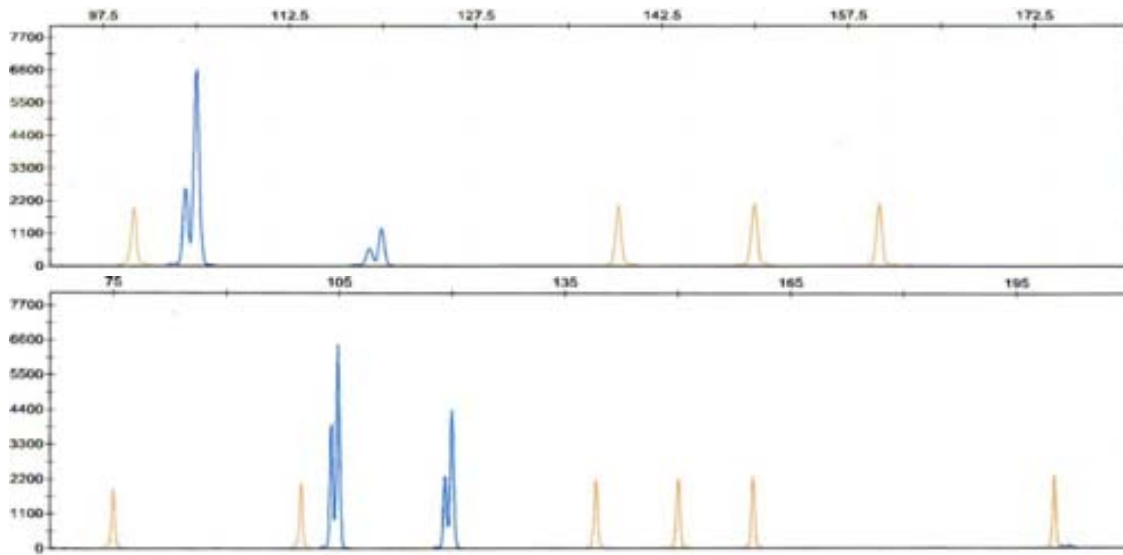


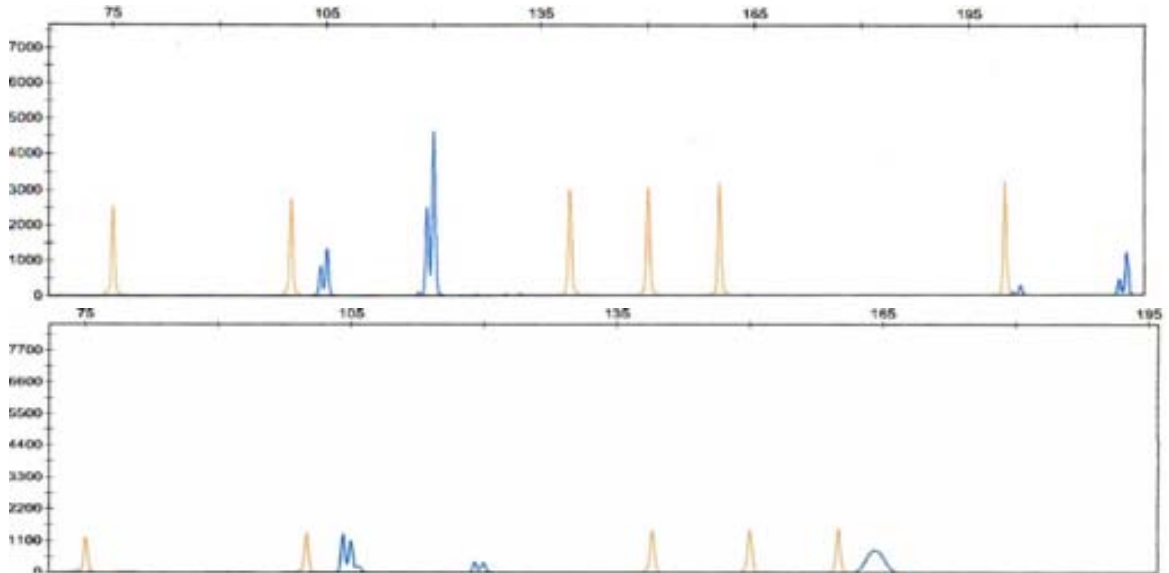
FIG. I. Exemple de seqüències en sentit *reverse*. En A i B es poden veure les seqüències wt de l'exó 19 i 21, respectivament, del limfòcit. En C hi ha la seqüència de l'exó 19 deletat de la línia PC9 (l'inici de la deleció de 15pb està indicada amb una fletxa). En D i E es poden veure les mutacions en les seqüències de l'exó 21 (L858R) i 20 (T790M) de la línia mutada H1975 (indicades amb una fletxa).

II- Exemple de *plots* obtinguts de l'anàlisi del límit de detecció de la tècnica de GeneScan

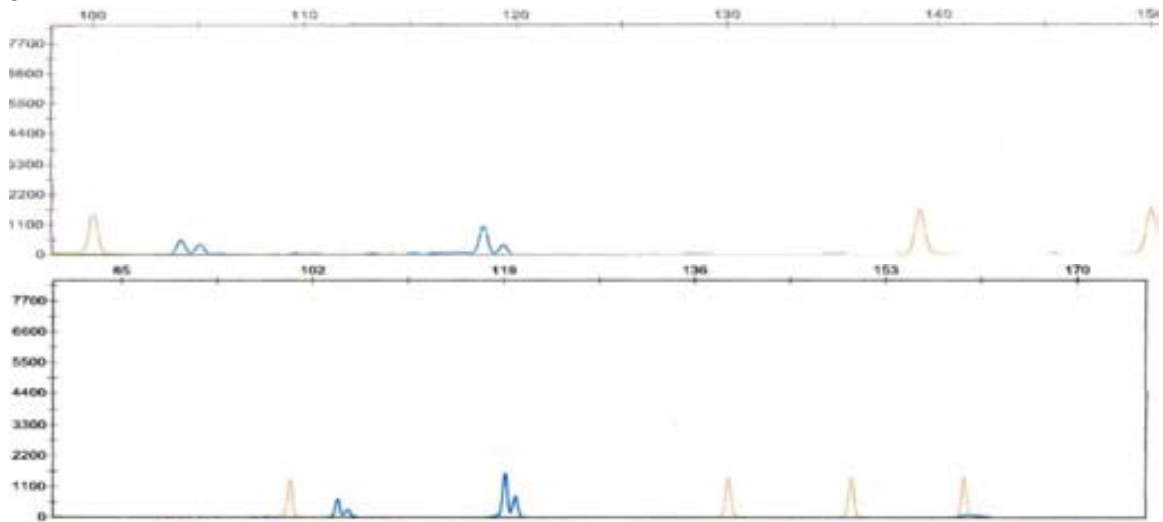
A



B



C



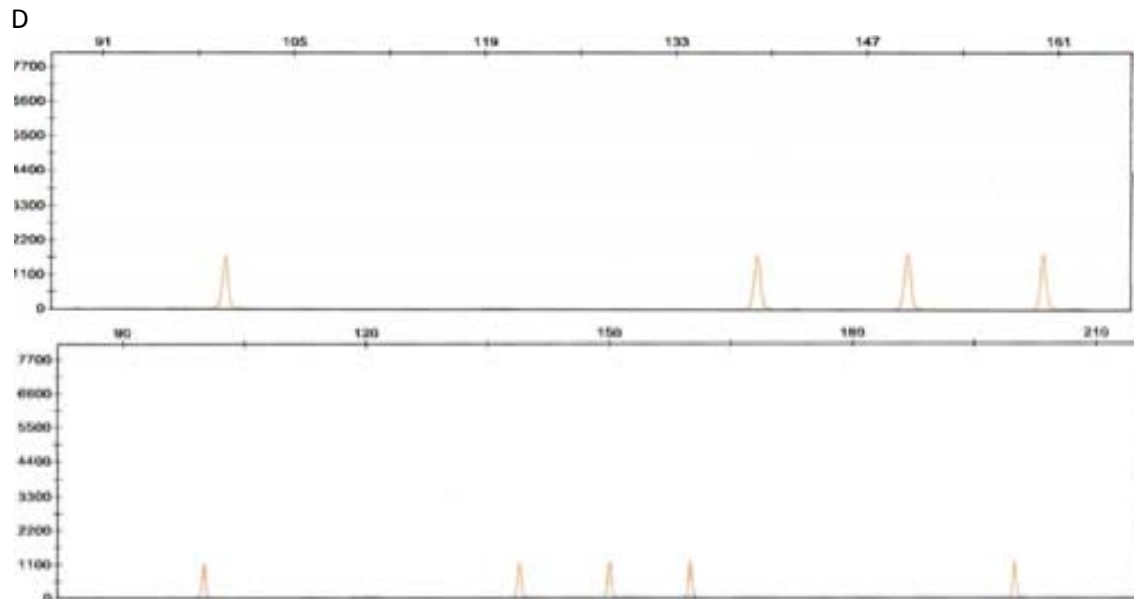
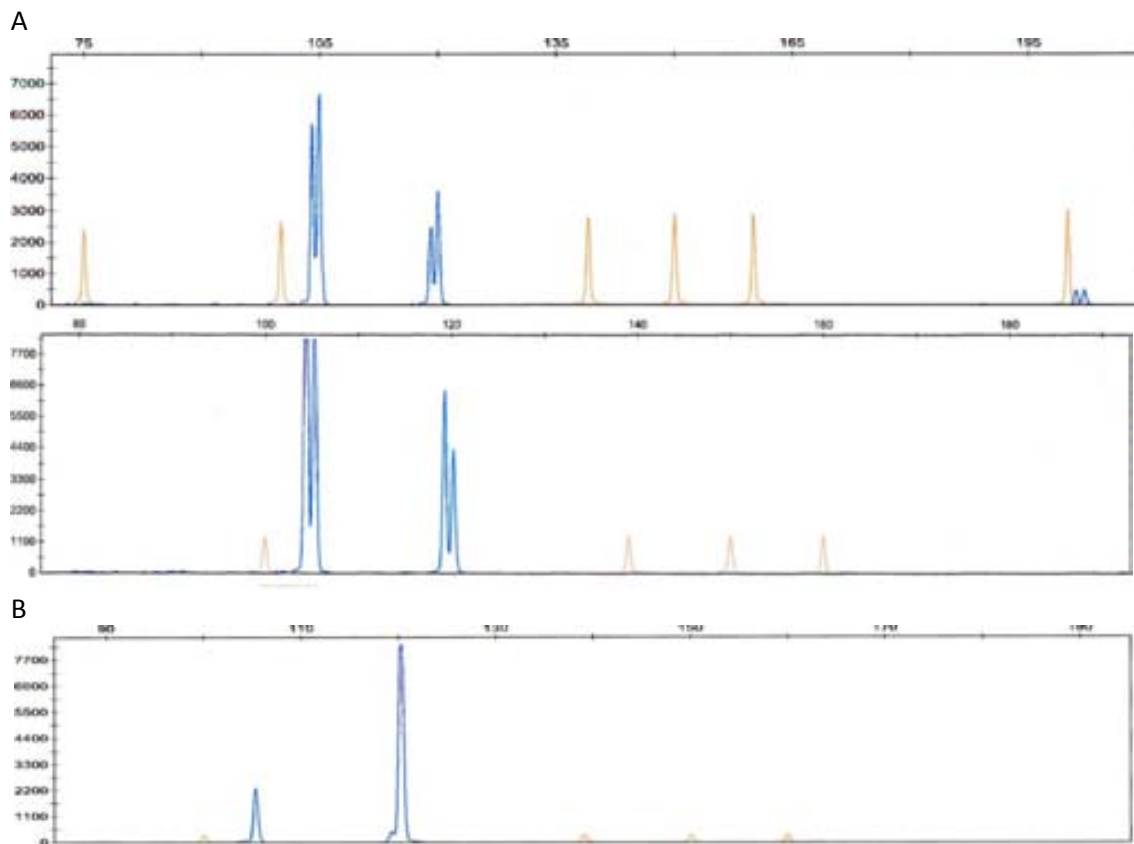


FIG. II. Exemple dels plots obtinguts de dues rèpliques de les 20 que es van analitzar de cada concentració. En A, pics corresponents a una mostra delecionada 15pb (el primer pic a 104-105pb i el segon a 119-120pb). A mida que l'ADN estava més diluït, la intensitat dels pics disminuïa (B a 50pg/ μ L; C a 5pg/ μ L) fins al punt de ser indetectables (D).

III- Exemple de *plots* obtinguts de l'anàlisi de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan de diferent nombre de cèl·lules d'una extensió de la línia PC9



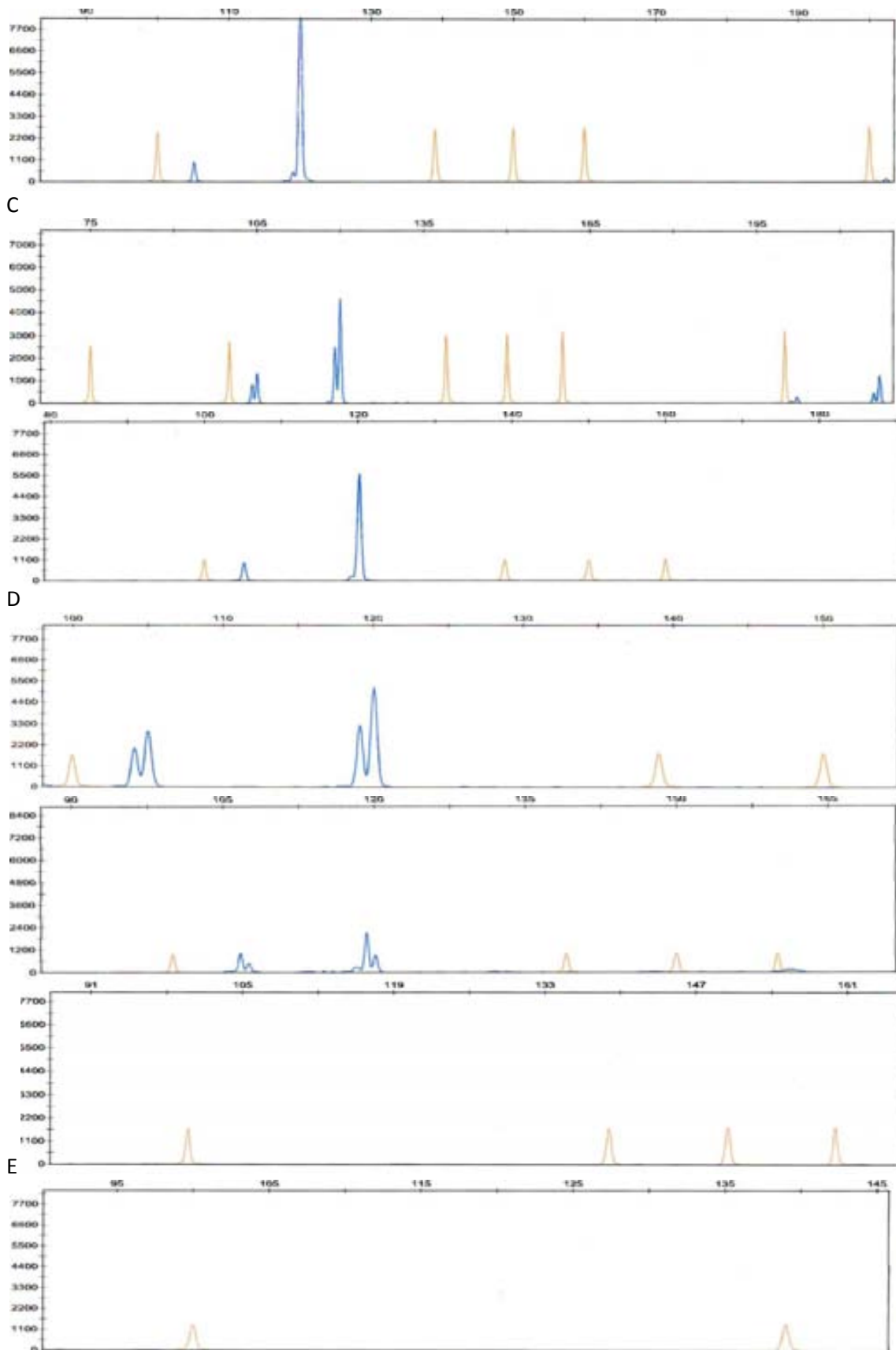


FIG. III. Exemple de plots obtinguts de dues de les 20 rèpliques de cada grup de cèl·lules microdisseccionades. En A, es va detectar la deleció de 15pb de l'anàlisi de 40 cèl·lules, de 20 cèl·lules (B), de 8 cèl·lules (C) i de 4 cèl·lules (D). En l'anàlisi d'una sola cèl·lula (E), la tècnica no va detectar la deleció.

IV- Exemple dels *plots* obtinguts de la titulació de la tècnica de GeneScan de la línia delecionada PC9

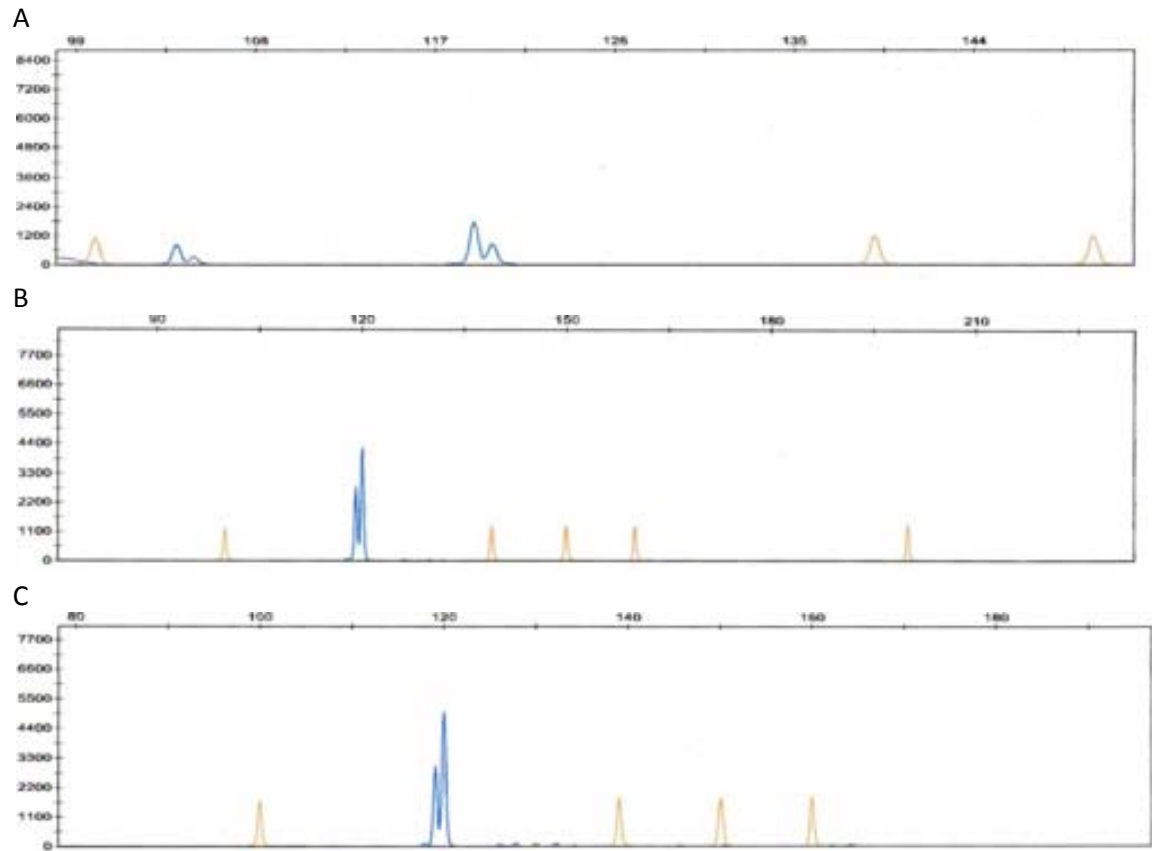
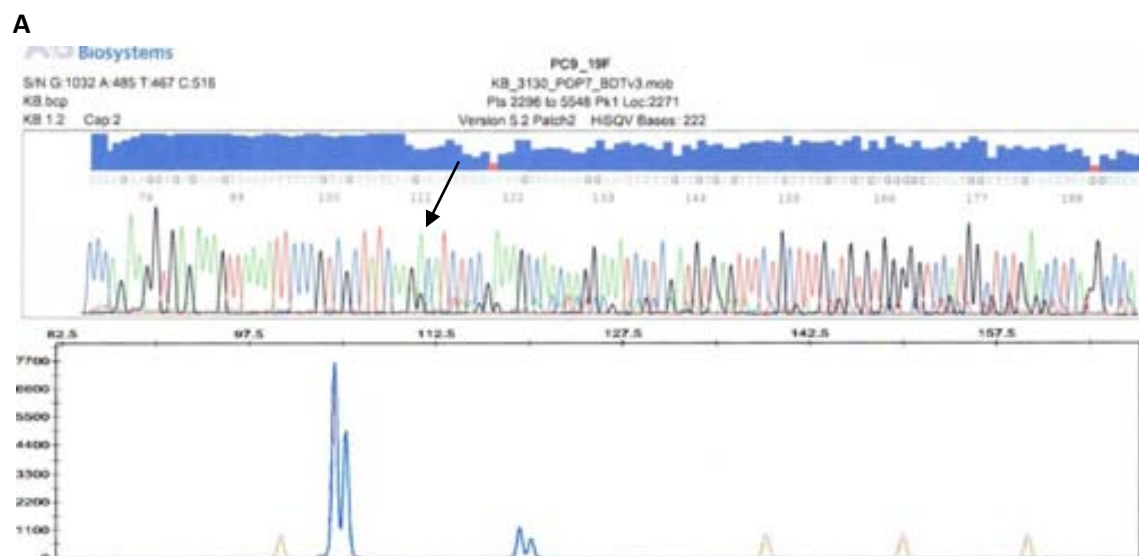
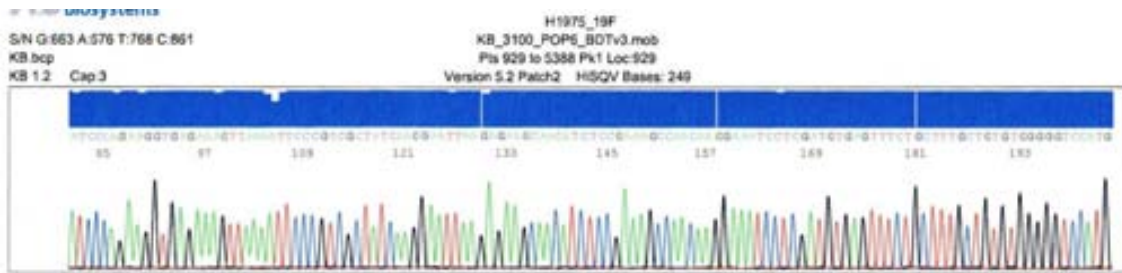


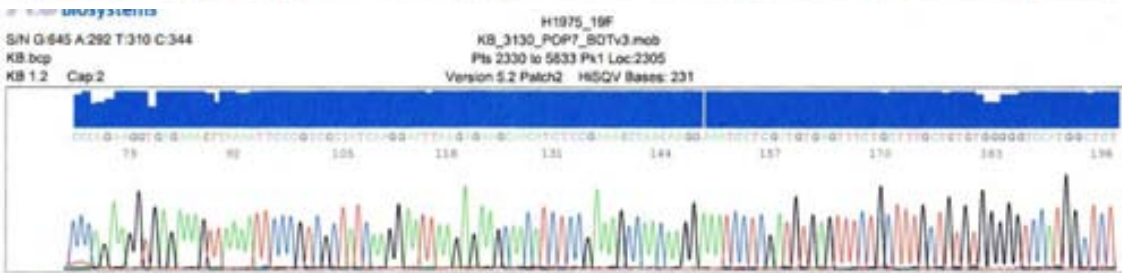
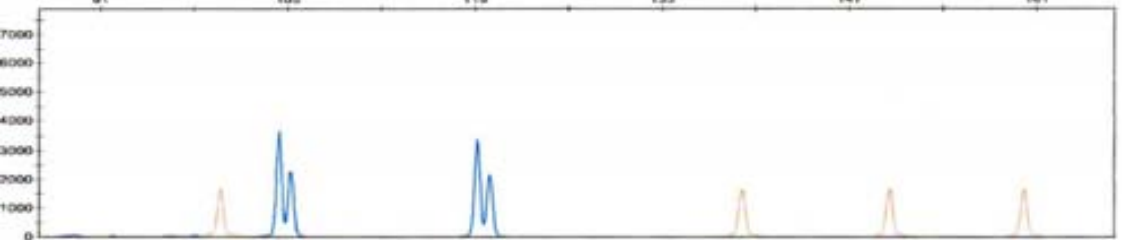
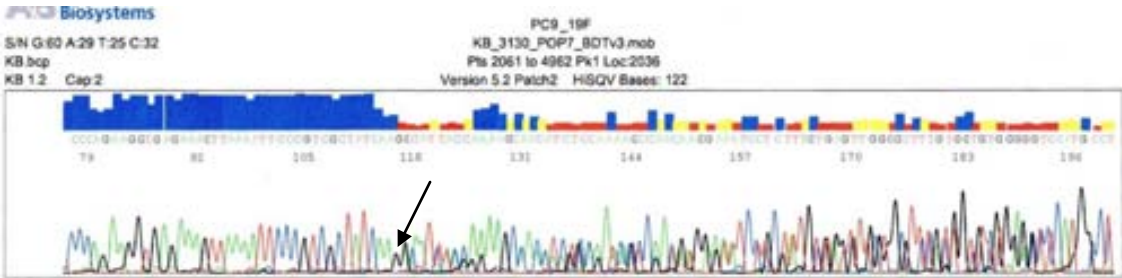
FIG. IV. Exemple de *plots* obtinguts de l'anàlisi de titulació de l'ADN de la línia delecionada PC9 diluïda en ADN wt. En A, la delecíó es detectava en la dilució 1/10 mentre que per a dilucions més elevades (C i D; 1/100 i 1/1000 respectivament), la tècnica no la detectava.

V- Exemple de seqüències i *plots* de la repetibilitat l'anàlisi per GeneScan de la línia PC9

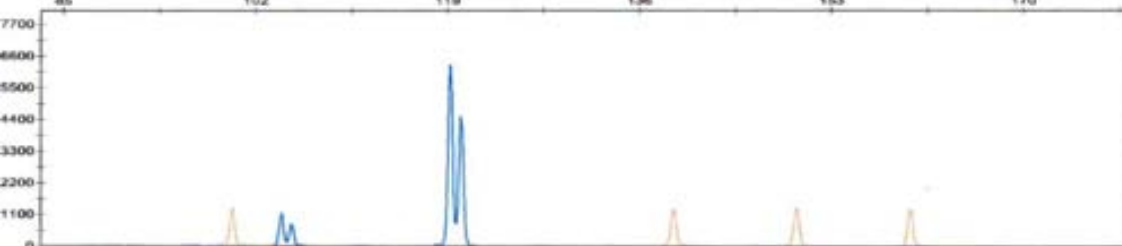
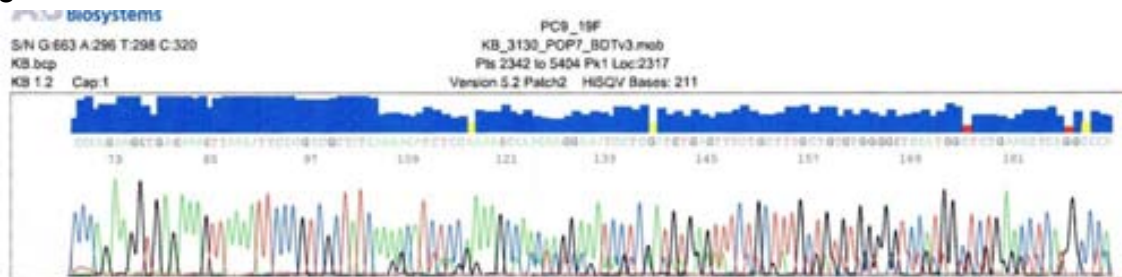




B



C



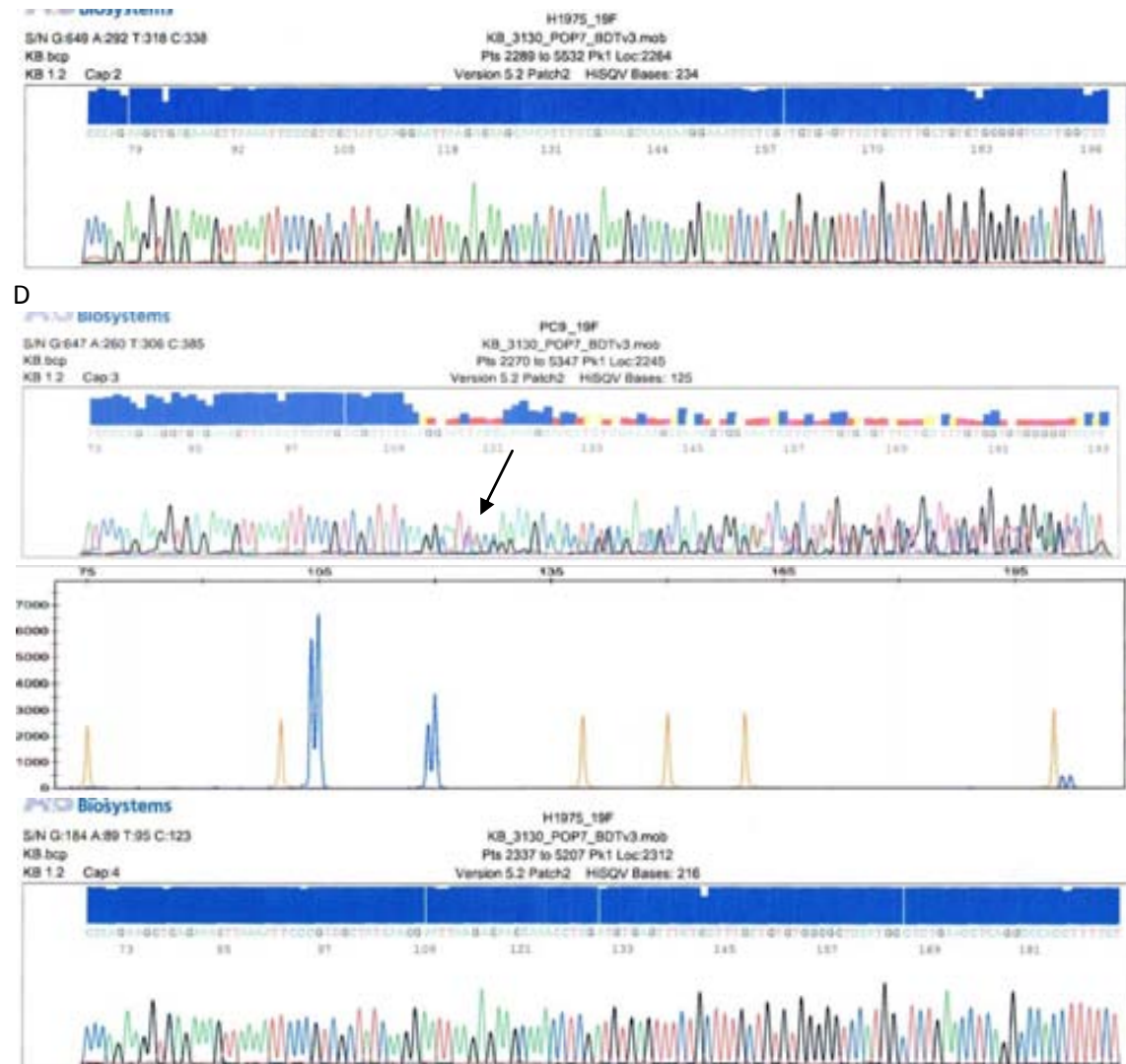
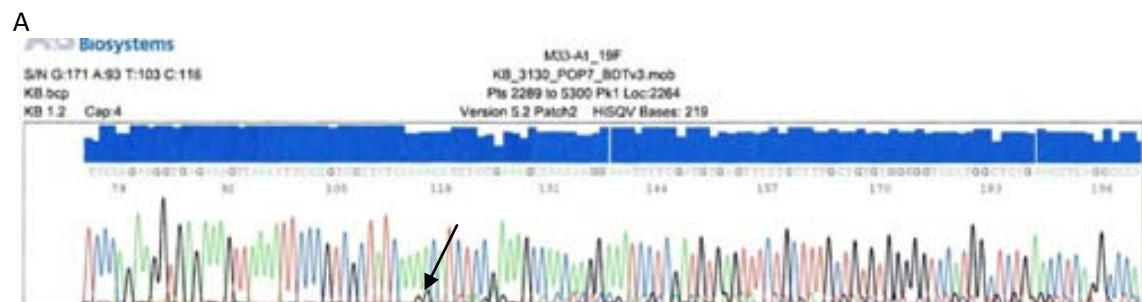
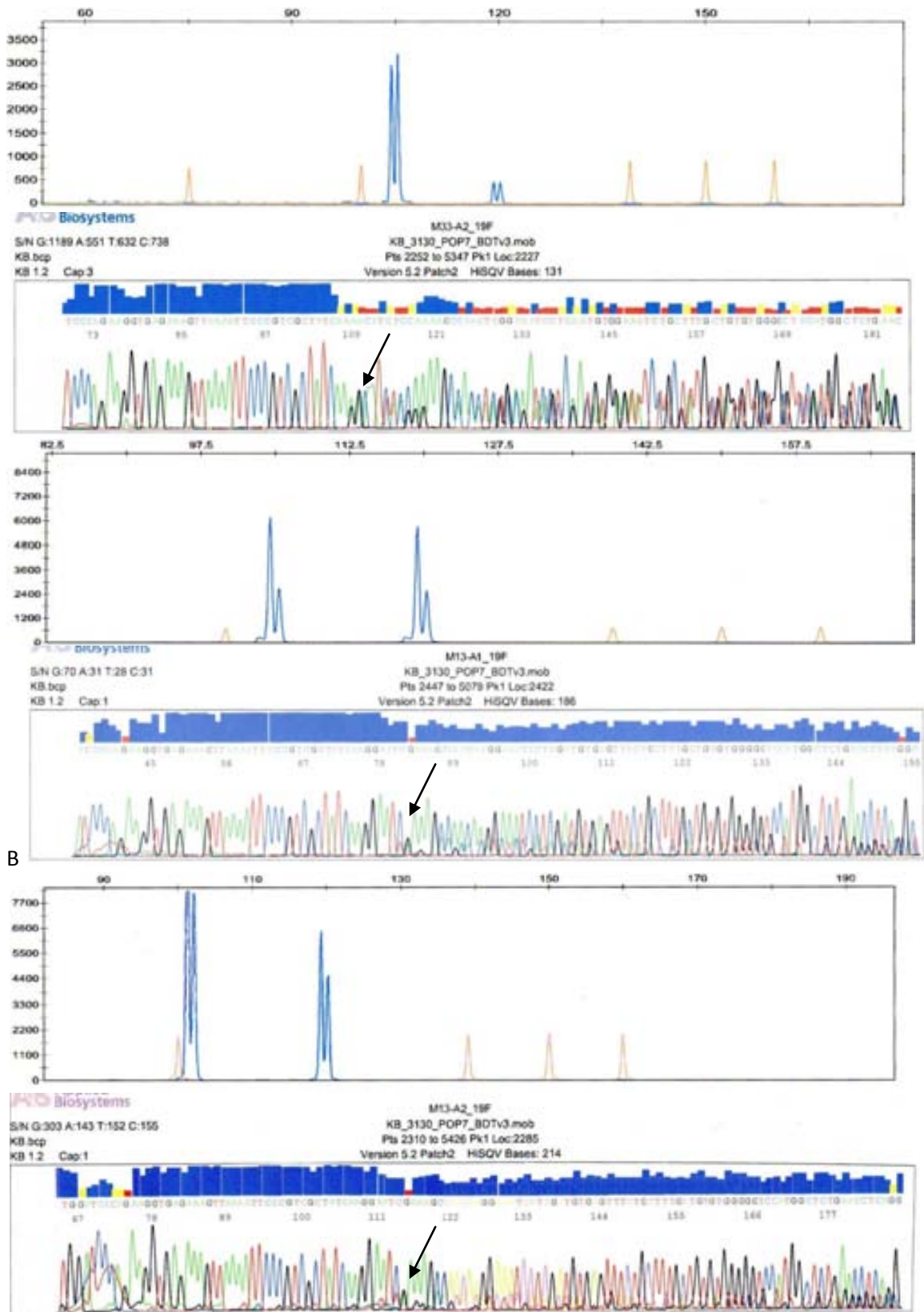


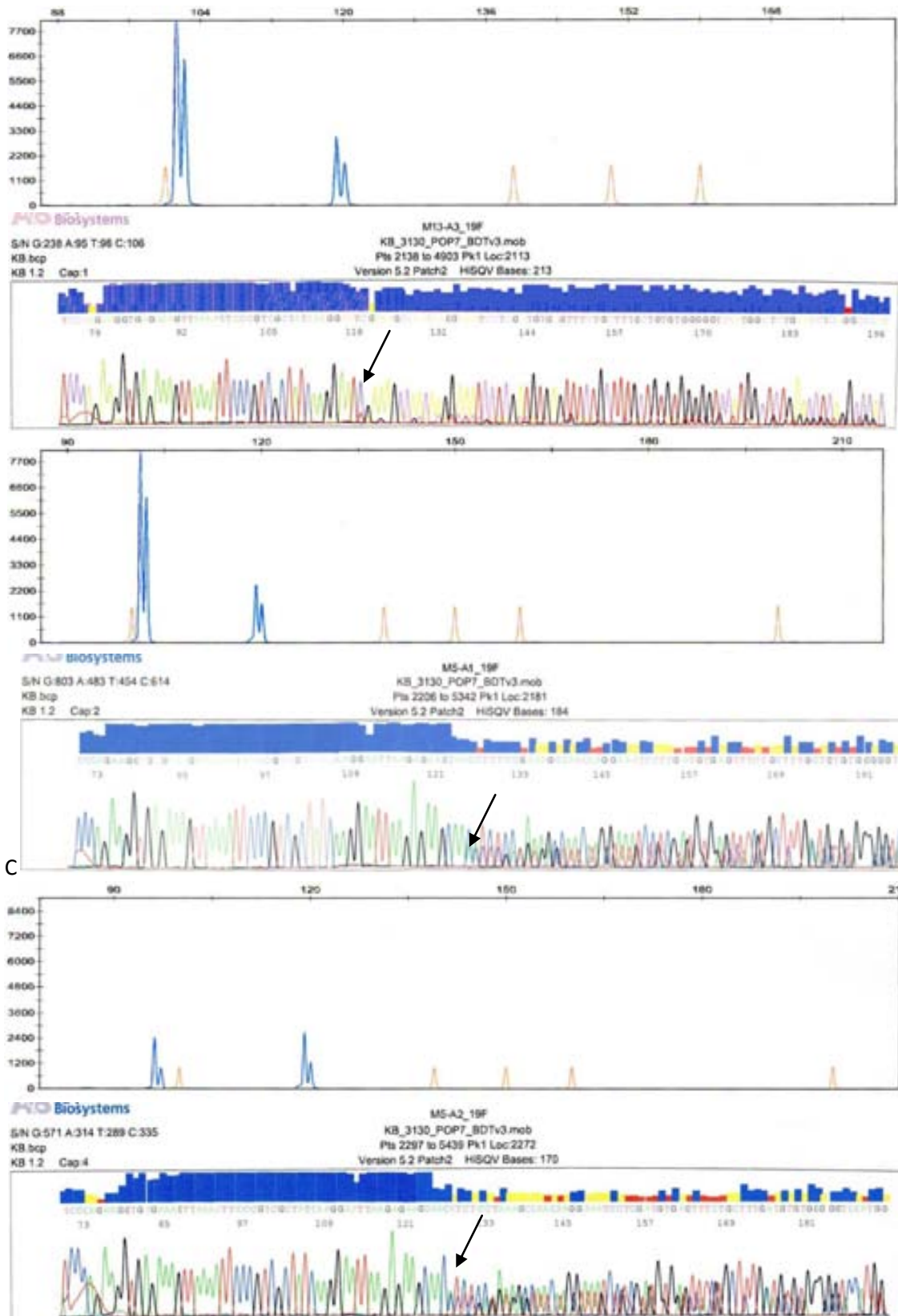
FIG. V. Exemple de seqüències i plots de l'avaluació de la repetibilitat de la tècnica de GeneScan al llarg de quatre mesos. En A, l'anàlisi del mes de febrer. Tant els resultats de la deleció de la línia PC9 com els wt de la línia H1975 concorden al llarg del temps. Aquest mateix resultat s'obté en B, C i D (març, abril i maig, respectivament). L'inici de la deleció el marca una fletxa negra.

VI- Exemple dels *plots* obtinguts de l'heterogeneïtat tumoral de les deleccions de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan





B



C

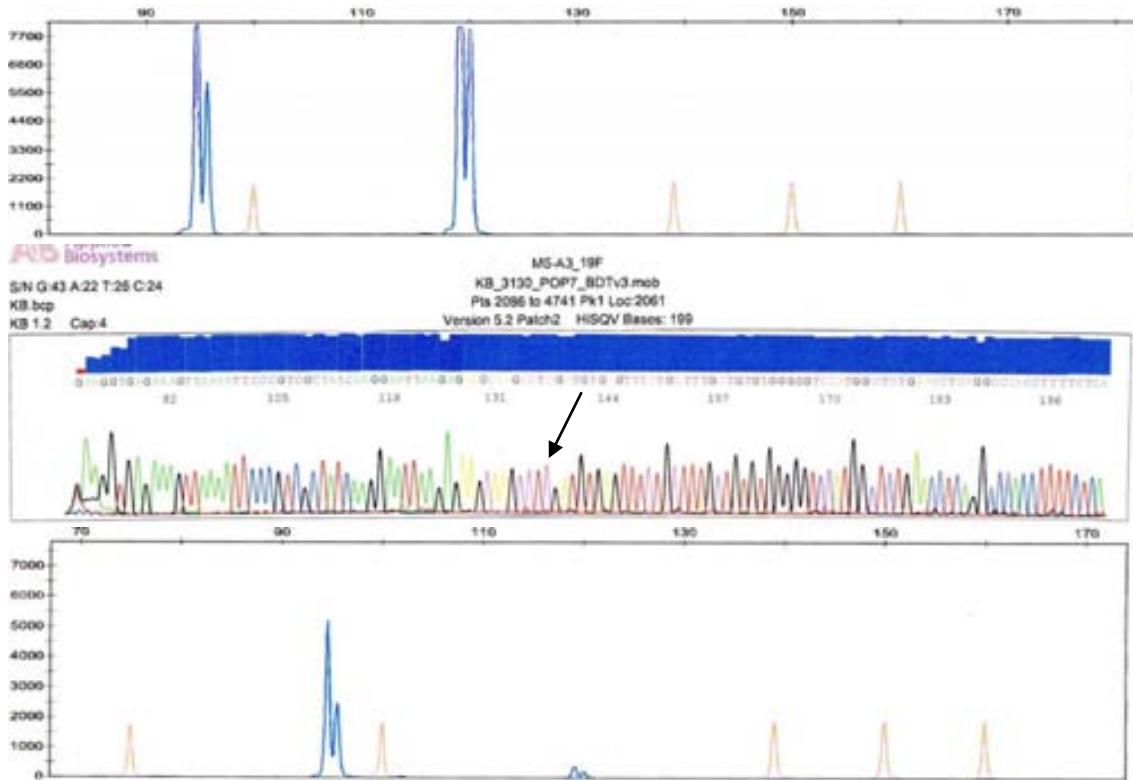
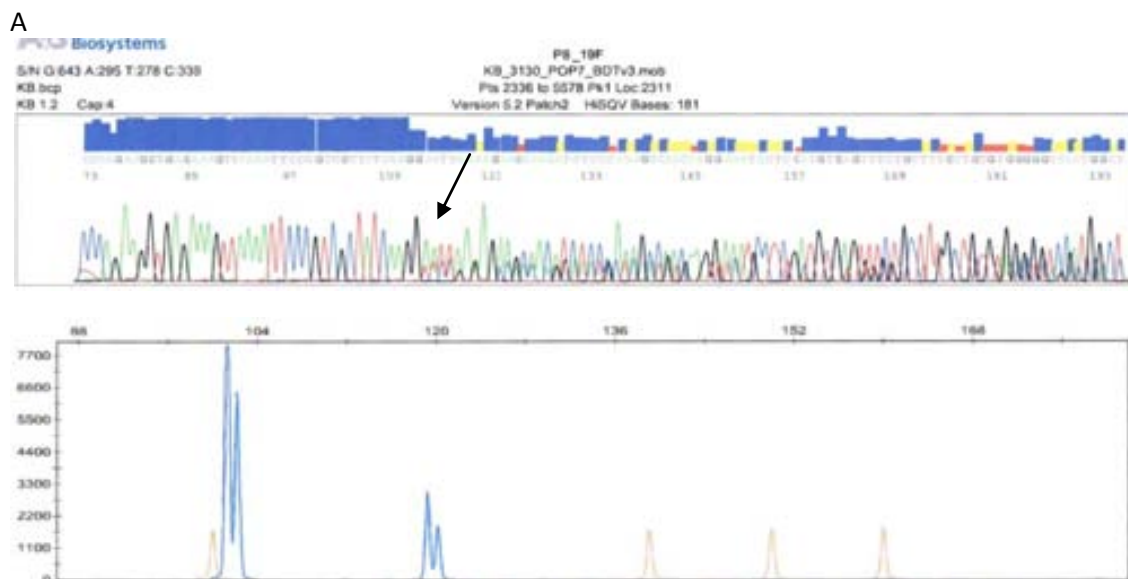


FIG. VI. Exemple dels *plots* de l'avaluació de l'heterogeneïtat tumoral de l'exó 19 per la tècnica de GeneScan. Tal com es pot comprovar per les seqüències i els *plots* de l'anàlisi de fragments, les àrees que es van microdisseccionar de la mostra 33 (2 àrees) delecionada de 15pb, 13 (2 àrees) delecionada 18pb i 5 (3 àrees) delecionada 24pb, presenten resultats concordants (A, B i C, respectivament). L'inici de les delecions està marcat amb una fletxa negra.

VII- Exemple dels *plots* obtinguts en la reanàlisi per la tècnica de GeneScan dels pacients delecionats per seqüenciació dels estudis de validació clínica



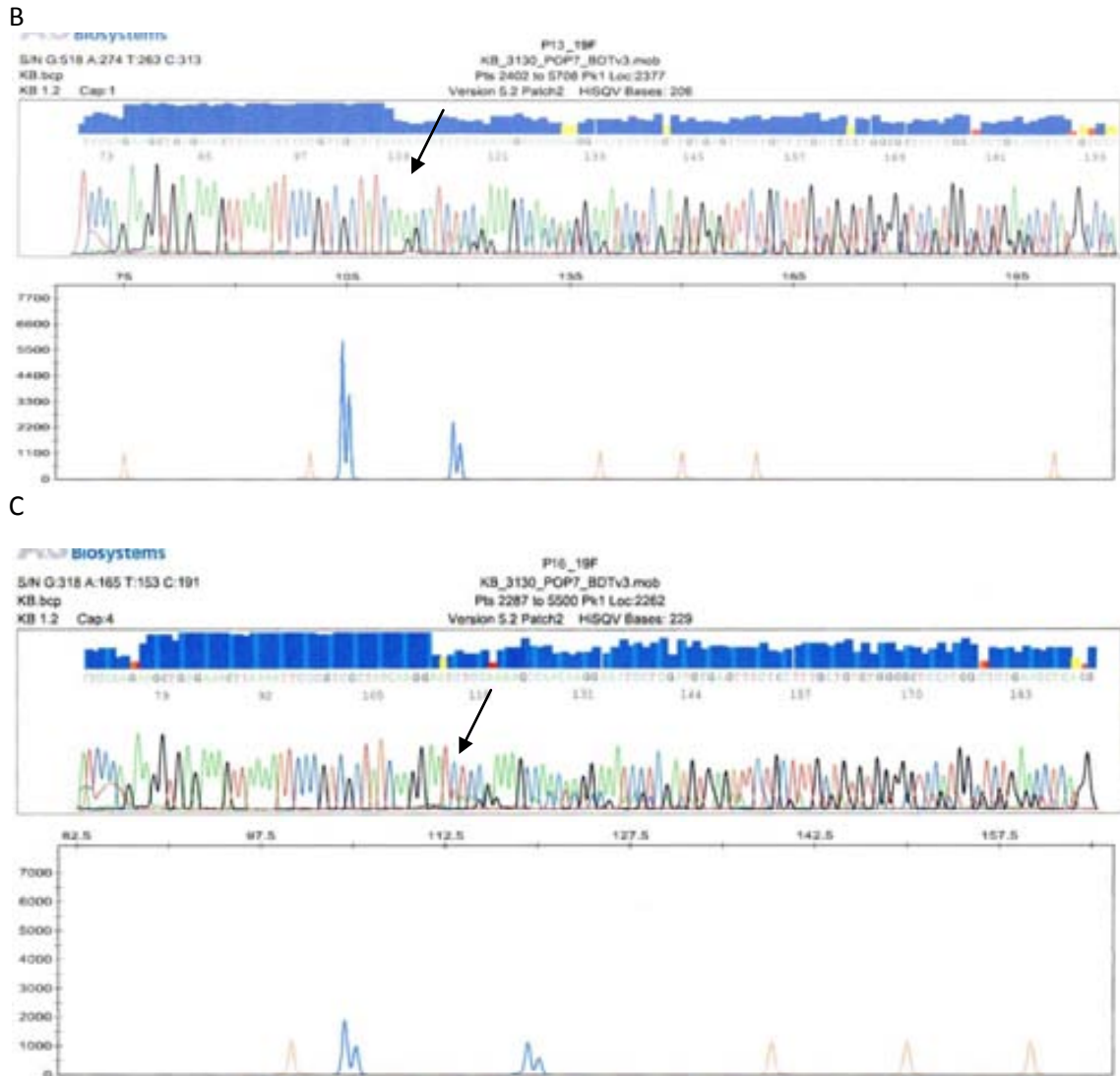


FIG. VII. Comprovació de les delecions per seqüenciació Sanger de la nova tècnica de GeneScan. En A, es confirmà la delecio de 18pb del pacient 8 ja que s'obtingué un pic a 101-102pb de l'al·lel delecionat i un pic a 119-120pb de l'al·lel wt. Es van confirmar les delecions de 15pb dels pacients 13 i 16 (B i C respectivament) ja que en el plot de GeneScan apareixien els pics a 104-105pb i a 119-120pb). El principi de les delecions s'indiquen amb una fletxa negra.

VIII- Exemple dels *plots* de l'avaluació del límit de detecció de la mutació L858R de la tècnica TaqMan utilitzant diferents concentracions de la línia cel·lular H1975

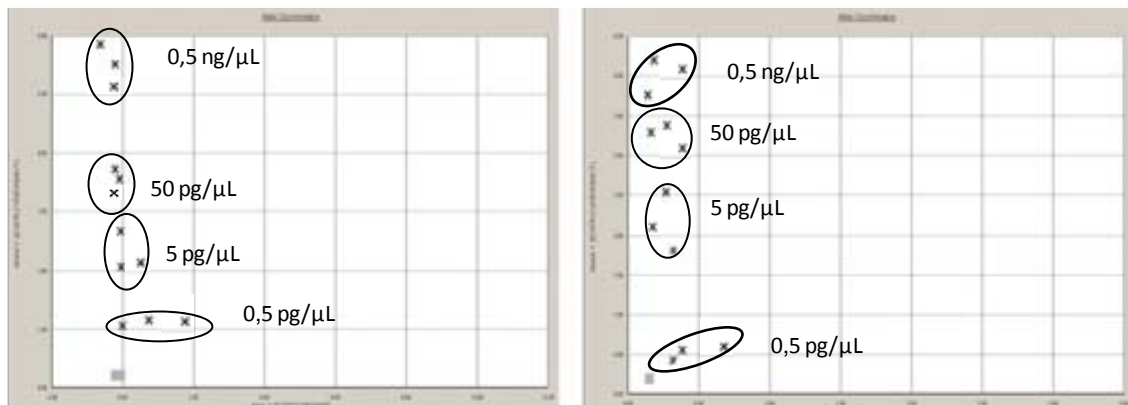


FIG. VIII. Es van analitzar per triplicat les diferents concentracions d'ADN de la línia cel·lular H1975. Es detectava la mutació a les concentracions de 0,5ng/μL; 50pg/μL i 5pg/μL. En canvi, a 0,5pg/μL no es detectava ja que les mostres apareixen al voltant del NTC (quadrat gris).

IX- Exemple dels *plots* obtinguts en l'avaluació del límit de detecció de la tècnica TaqMan per detectar les mutacions T790M de l'exó 20

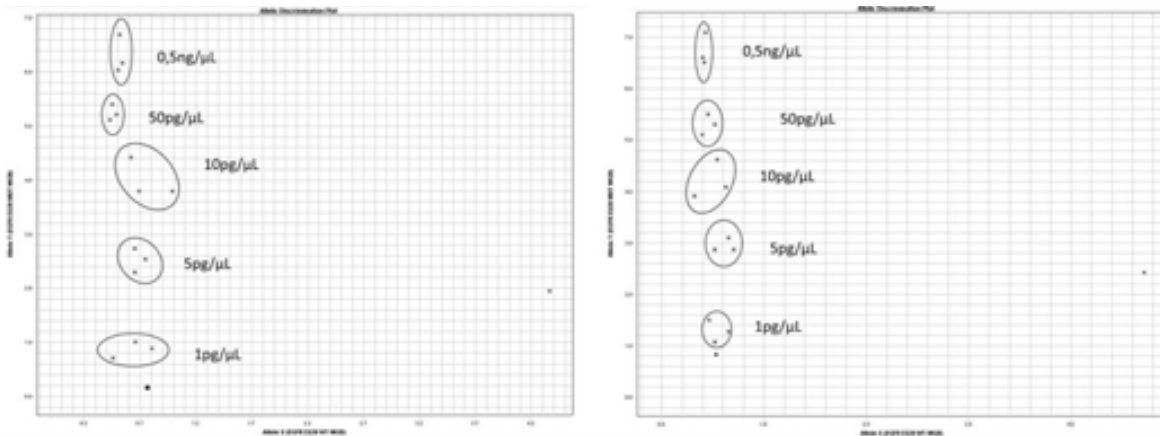


FIG. IX. Exemple de dos *plots* de l'avaluació del límit de detecció de la mutació T790M de l'exó 20 en dilucions decreixents de triplicats de l'ADN de la línia cel·lular H1975 en aigua destil·lada. Per a les concentracions altes la detecció era clara (0,5ng/μL; 50pg/μL; 10pg/μL i 5pg/μL) mentre que a 1pg/μL, no es detectava la mutació ja que les rèpliques apareixien al costat del NTC (quadrat negre). Es va afegir la sonda PNA en la discriminació al·lèlica menys per a un limfòcit que es troba en la zona d'alta fluorescència de l'eix de les x.

X- Exemple dels *plots* obtinguts en l'avaluació del límit de detecció de la mutació L858R de la tècnica TaqMan utilitzant diferent nombre de cèl·lules microdisseccionades de la línia H1975

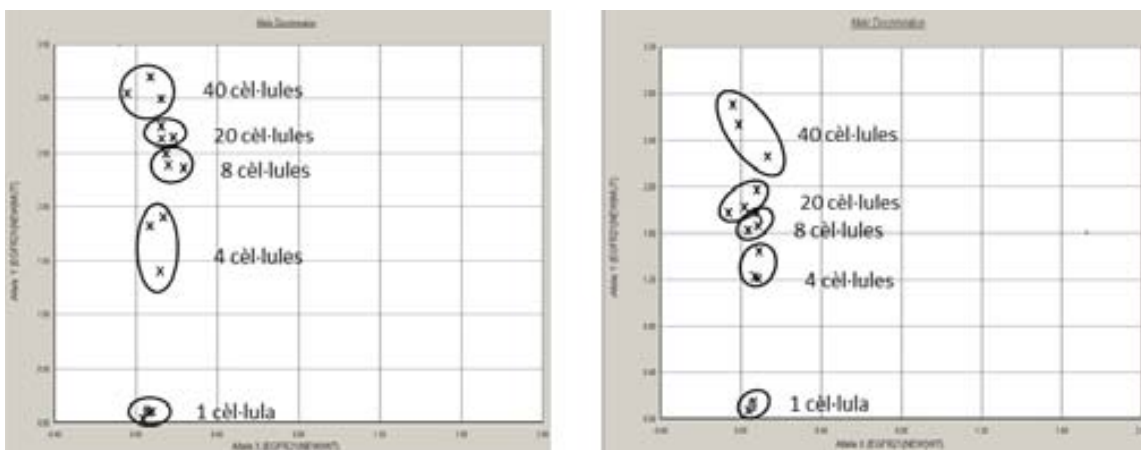


FIG. X. Per triplicats, es va analitzar la mutació L858R de diferents quantitats cel·lulars. La tècnica TaqMan detectava la mutació fins a 4 cèl·lules. Per a quantitats cel·lulars menors, la detecció no és possible ja que les mostres apareixen al costat del NTC (quadrat gris).

XI- Exemple dels *plots* obtinguts en la titulació de l'ADN per la tècnica TaqMan utilitzant diferents concentracions de la línia cel·lular H1975 per a l'exó 21

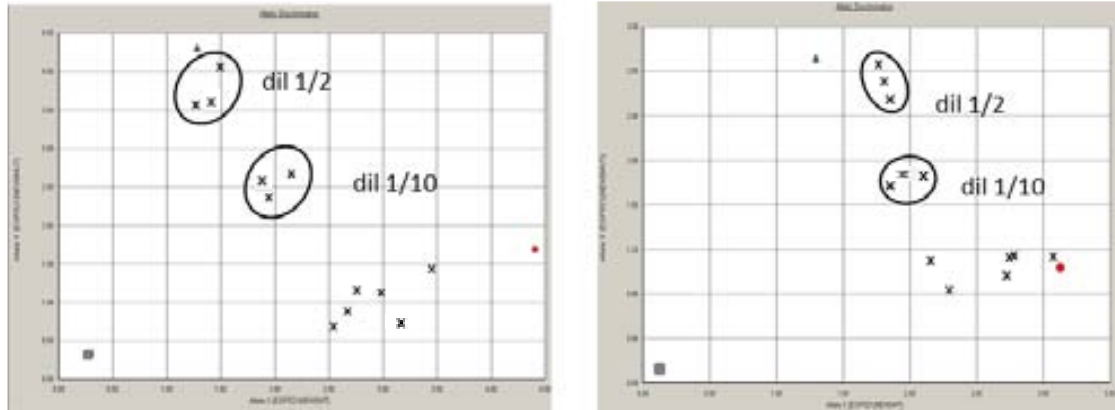


FIG. XI. Exemple de *plots* obtinguts de la dilució de la línia H1975 en ADN wt. En les dilucions a 1/2 i 1/10 es detectava la mutació ja que les mostres apareixien al voltant de la línia cel·lular H1975 sense diluir, (control positiu de mutació, triangle verd). En canvi, la mutació deixava de detectar-se en fer dilucions superiors a 1/100, ja que les mostres apareixien al voltant del limfòcit wt (rodona vermella).

XII- Exemple dels *plots* obtinguts en la titulació de l'ADN de la línia H1975 mutada en la posició T790M de l'exó 20 diluït en ADN de limfòcit

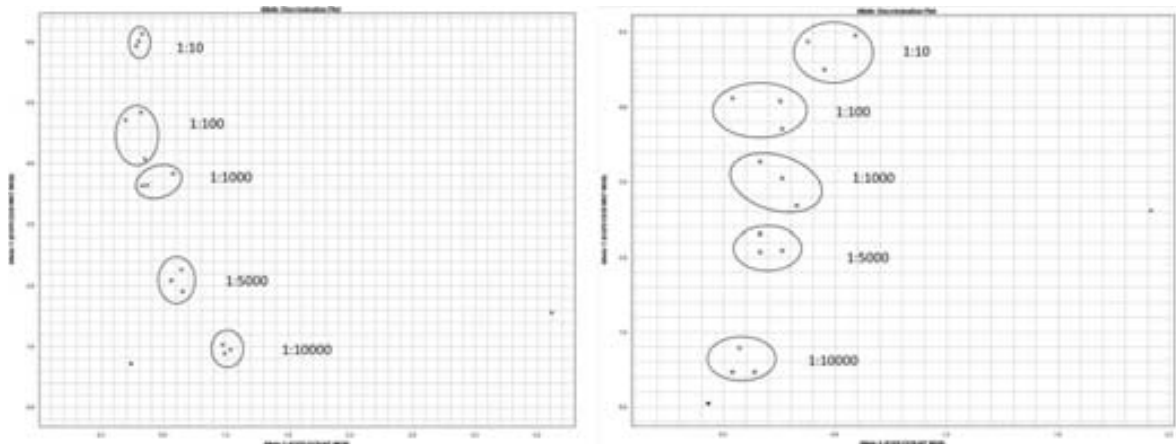


FIG. XII. Exemple dels *plots* obtinguts en l'avaluació de la titulació de l'ADN mutata de la línia cel·lular H1975 diluït amb ADN wt de limfòcit. A mida que augmentava la proporció d'ADN wt, la detecció de la mutació per discriminació al·lèlica era més difícil malgrat que s'havia afegit en la reacció la sonda PNA.

XIII- Exemple de plots obtinguts durant l'avaluació de la repetibilitat de l'exó 21

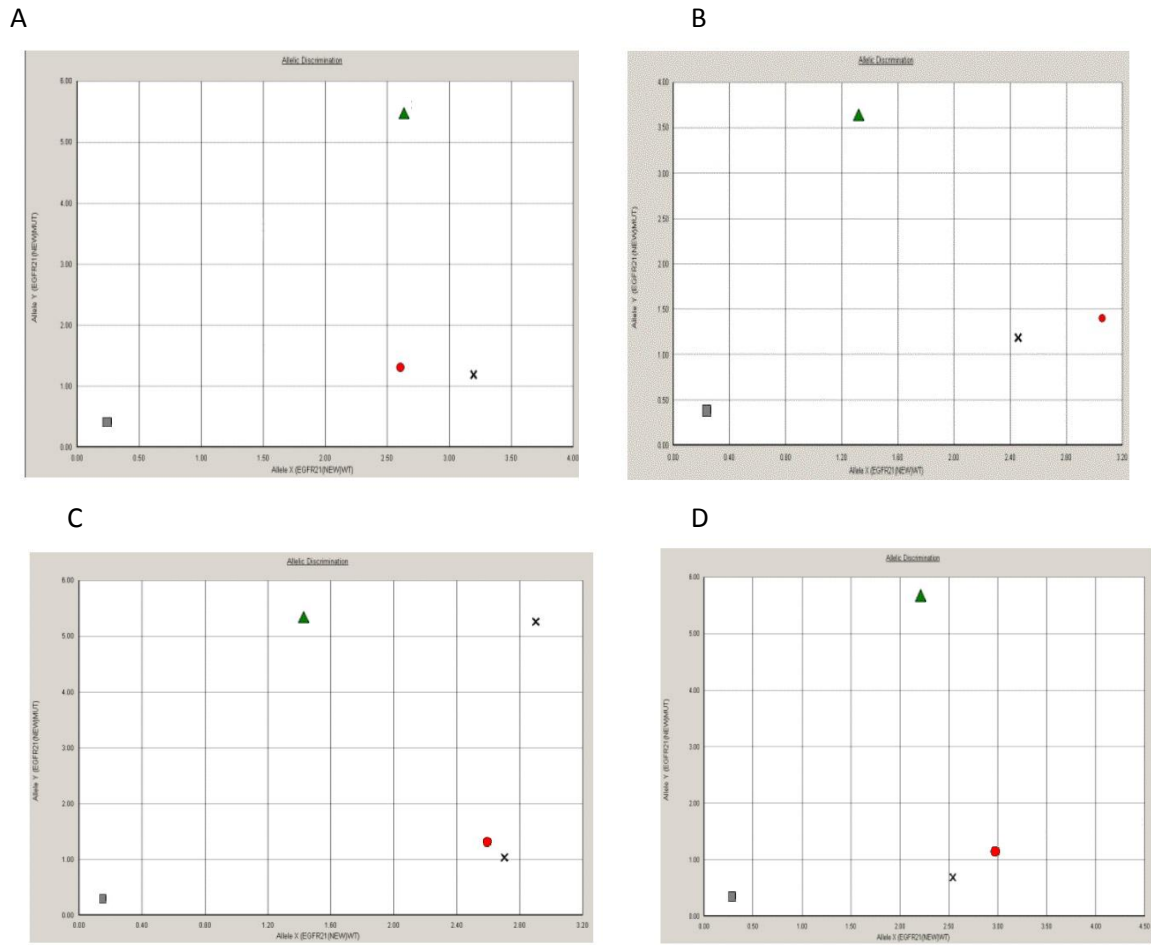
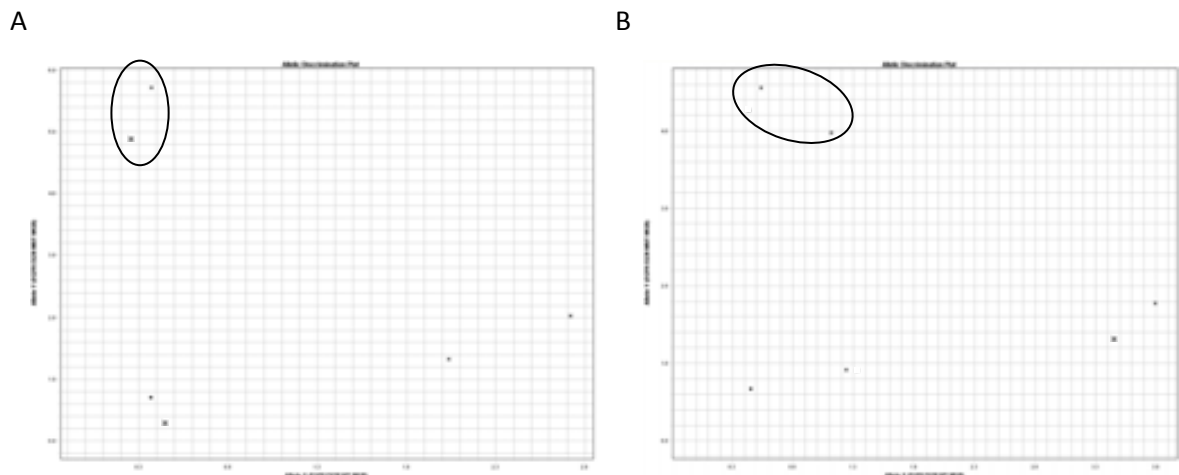


FIG. XIII. Exemple de plots obtinguts en l'avaluació de la repetibilitat. Es pot observar la línia H1975 en la part superior de l'eix de les y (màxima fluorescència de la sonda que detecta l'al·lel mutat) i la línia PC9 al voltant del limfòcit (rodona vermella), indicant que és wt. A, B, C i D representen un exemple del mes de febrer, març, abril i maig, respectivament.

XIV- Exemple dels plots obtinguts de la repetibilitat per detectar la mutació T790M realitzada durant tres mesos



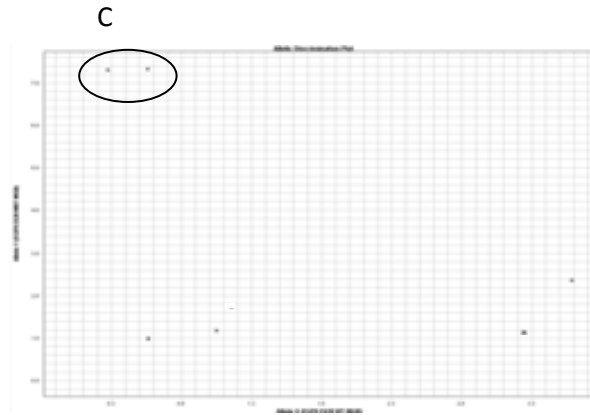
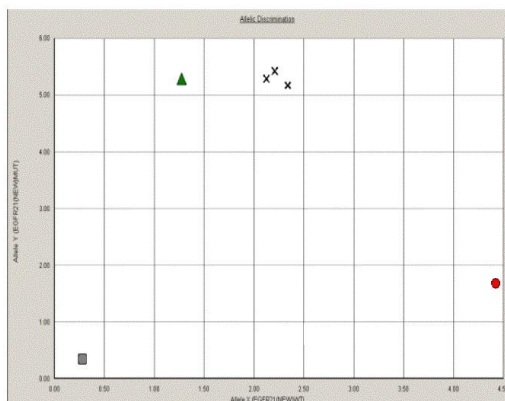


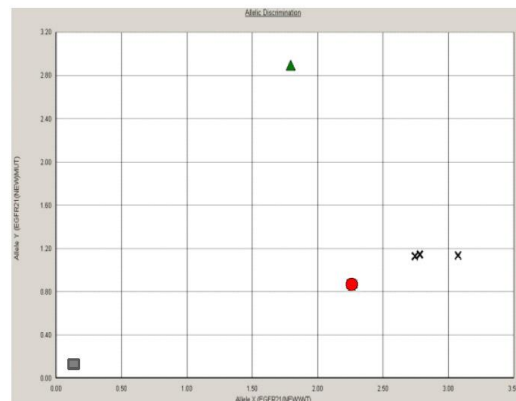
FIG. XIV. Exemple dels plots obtinguts al llarg de tres mesos per avaluar la repetibilitat de la detecció de la mutació T790M. En els tres plots apareix la línia cel·lular mutada H1975 en la zona alta de fluorescència de l'eix y emesa per la sonda que hibrida amb l'al·lel mutat (dins del cercle). En canvi, el limfòcit amb PNA, apareix al costat del NTC. En tots els assajos es va afegir el limfòcit sense PNA per tal de comprovar si hi havia ADN (en la zona d'alta fluorescència de l'eix x). Cada plot correspon a l'experiment de desembre, gener i febrer, respectivament.

XV- Exemple de plots i seqüències obtinguts en l'anàlisi d'heterogeneïtat tumoral d'una mostra mutada L858R i d'una mostra wt

A



B



C

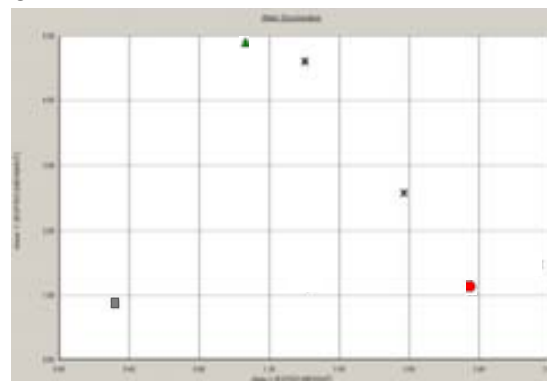
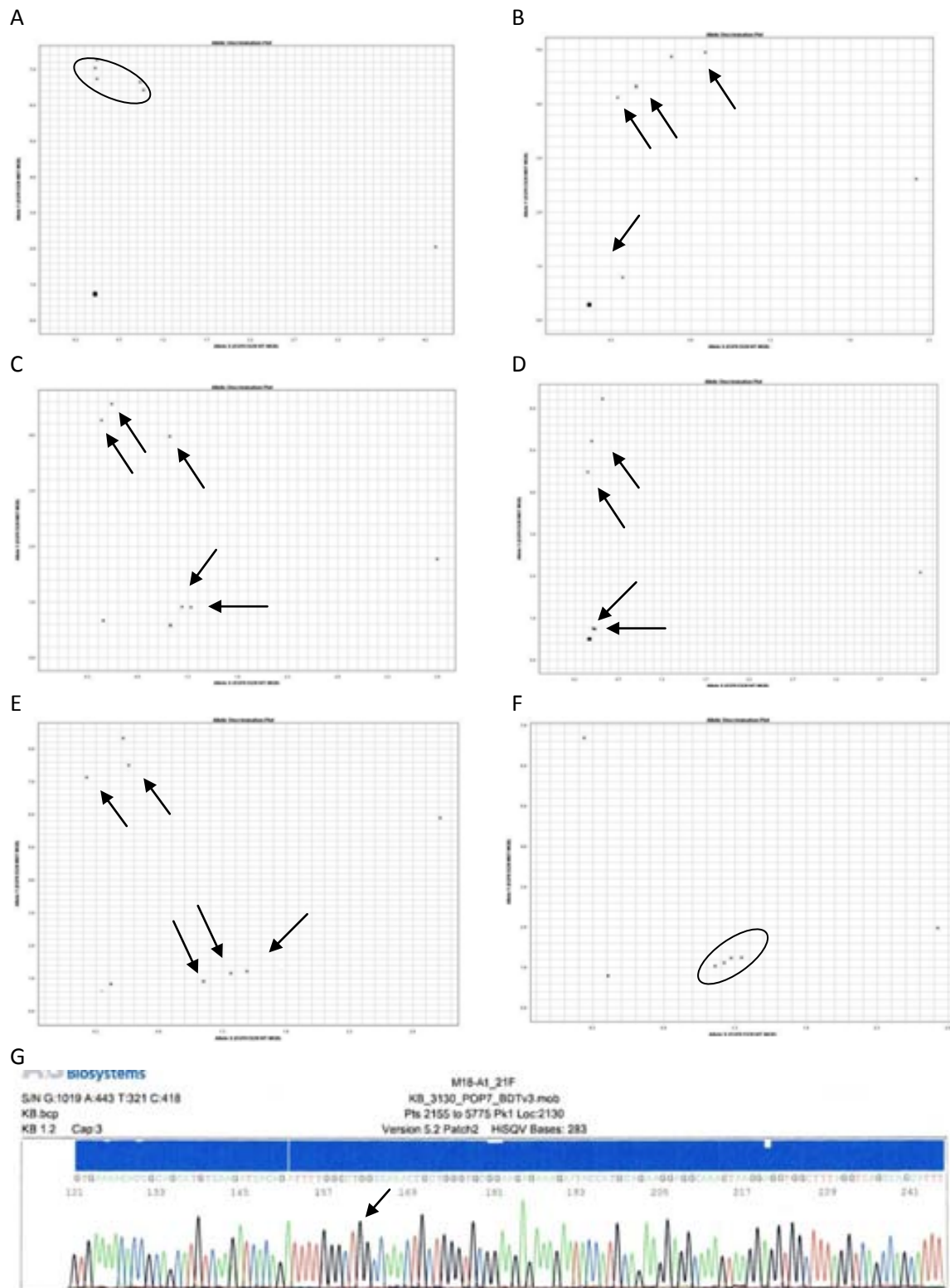


FIG. XV. En el plot A, les tres àrees tumorals de la mostra 4 apareixien en la zona de màxima fluorescència emesa per la sonda que detectava l'al·lel mutat en l'eix de les y (el limfòcit del plot A funcionava com control wt; rodona vermella). En el plot B, les tres àrees de la mostra 18 wt es trobaven al voltant del limfòcit. En C, el plot de la mostra 31 amb resultat no concordant de les dues àrees analitzades: una d'elles estava a prop de la línia cel·lular mutada, representada amb un triangle verd, mentre que l'altra era a prop del limfòcit.

XVI- Exemple dels *plots* obtinguts de l'avaluació de l'heterogeneïtat tumoral de la mutació T790M de l'exó 20



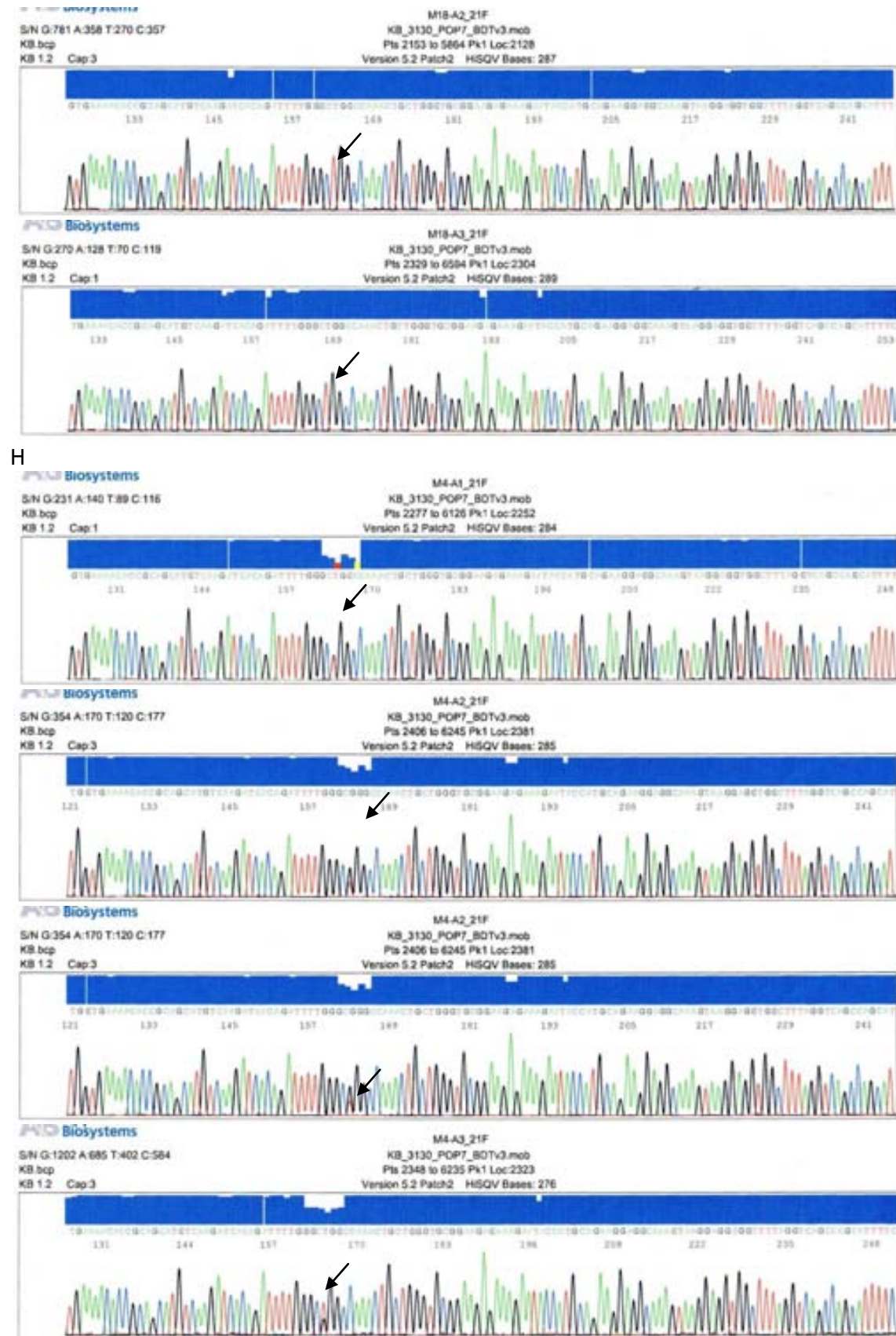


FIG. XVI. Exemple dels plots obtinguts en l'estudi de l'heterogeneïtat tumoral de la mutació T790M. En A, les 4 rèpliques analitzades de la mostra 24 van ser mutades, donant a entendre que, per a aquest tumor, la mutació era homogènia. Els plots B, C D i E representen les mostres 14, 22, 18 i 12 amb heterogeneïtat del

75%, 66,67%, 50% i 40% respectivament. Per a la mostra 15 wt, representada en el plot F, cap de les rèpliques va discriminar-se mutada. Les rèpliques amb mutació es trobaven en la part d'alta fluorescència de l'eix de les y, al voltant de la línia cel·lular H1975, que funcionava com control positiu. Les rèpliques wt es troben al voltant del NTC (quadrat negre) a prop de la intersecció entre eixos. Com control negatiu sense sonda PNA hi havia el limfòcit en la zona de màxima fluorescència de l'eix de les x. Les seqüències de G corresponen a les tres àrees tumorals independents de la mostra 18, totes elles wt. En H, les seqüències de tres àrees tumorals independents de la mostra 4, on s'observa que totes presentaven la mutació L858R.

XVII- Comparació entre els resultats per seqüenciació Sanger i TaqMan d'un parell de pacients mutats en els estudis de validació clínica

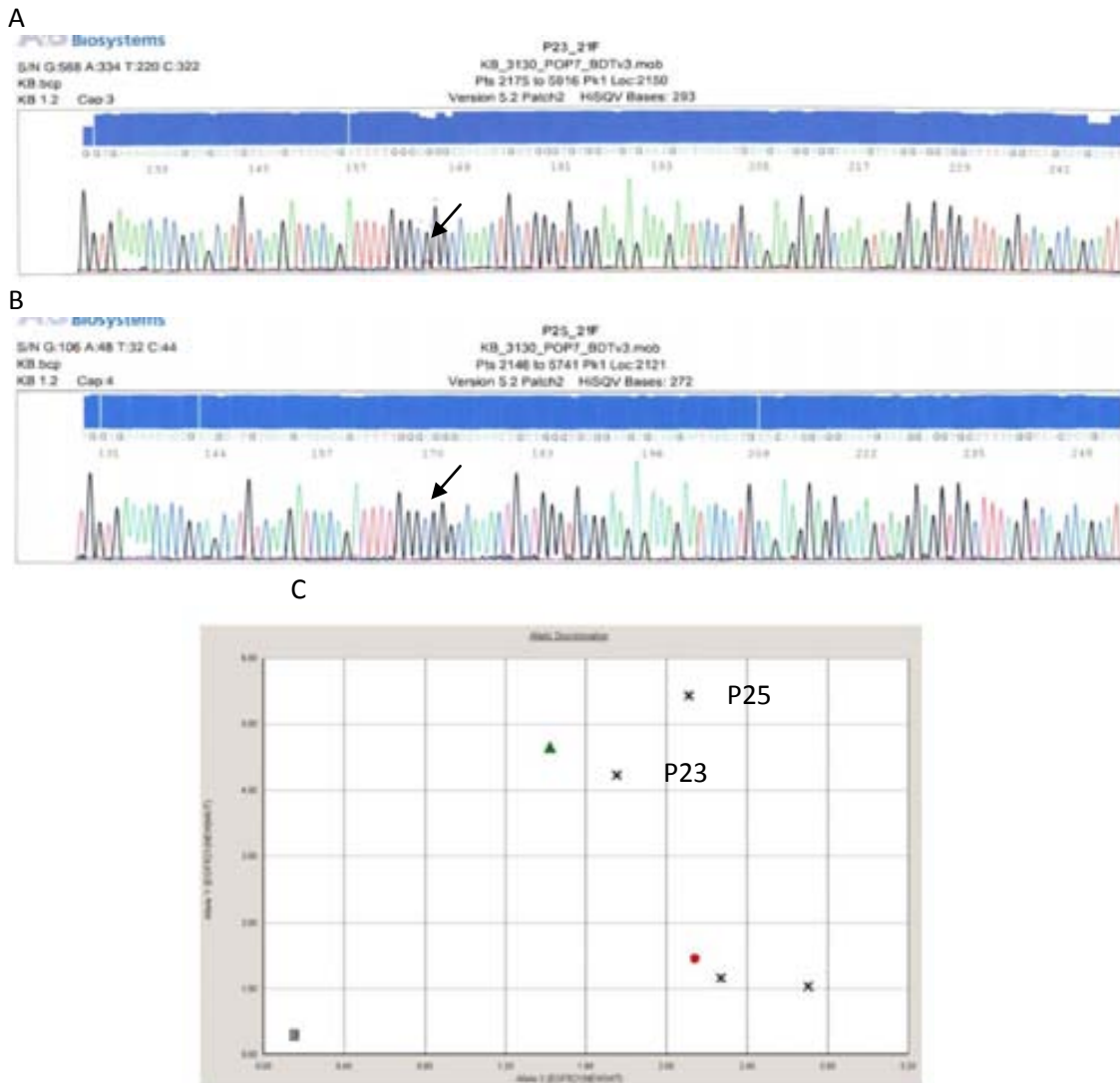
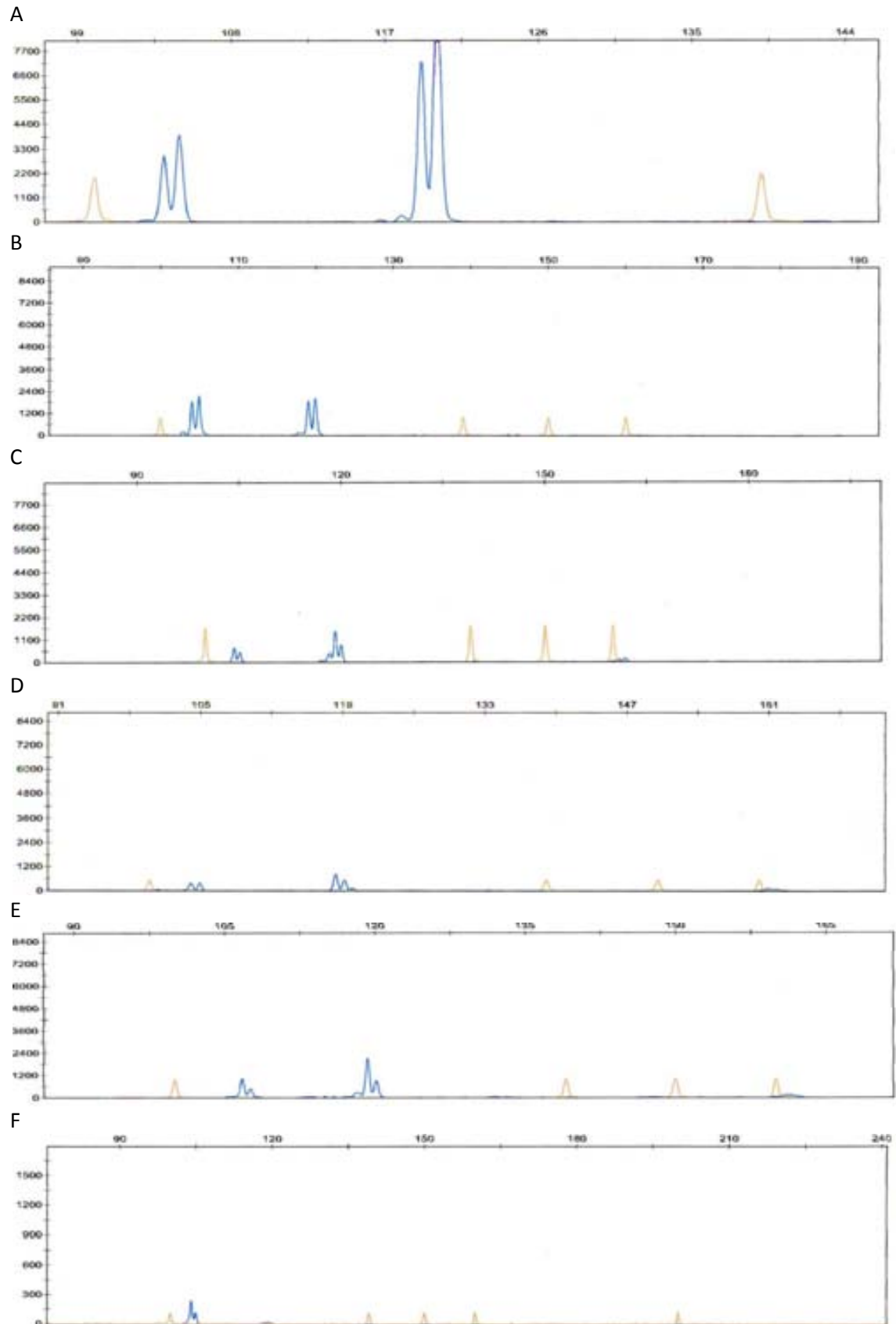


FIG. XVII. Comparació dels resultats de la reanàlisi per la tècnica TaqMan dels pacients detectats mutats L858R per seqüenciació Sanger. En A i B, les seqüències dels pacients 23 i 25 eren mutades (el pacient 25 en homozigosi; mutació indicada per una fletxa negra). En el plot de TaqMan es pot veure que el pacient 25, com que era homozigot, el senyal de fluorescència de la sonda TaqMan era superior al de la línia H1975 (triangle verd) que és heterozigota com el pacient 23. Al mateix temps es van analitzar dos altres pacients wt que apareixen al costat del limfòcit. El quadrat gris era el NTC.

XVIII- Exemple dels *plots* del límit de detecció de la tècnica de GeneScan de l'ADN de sang perifèrica

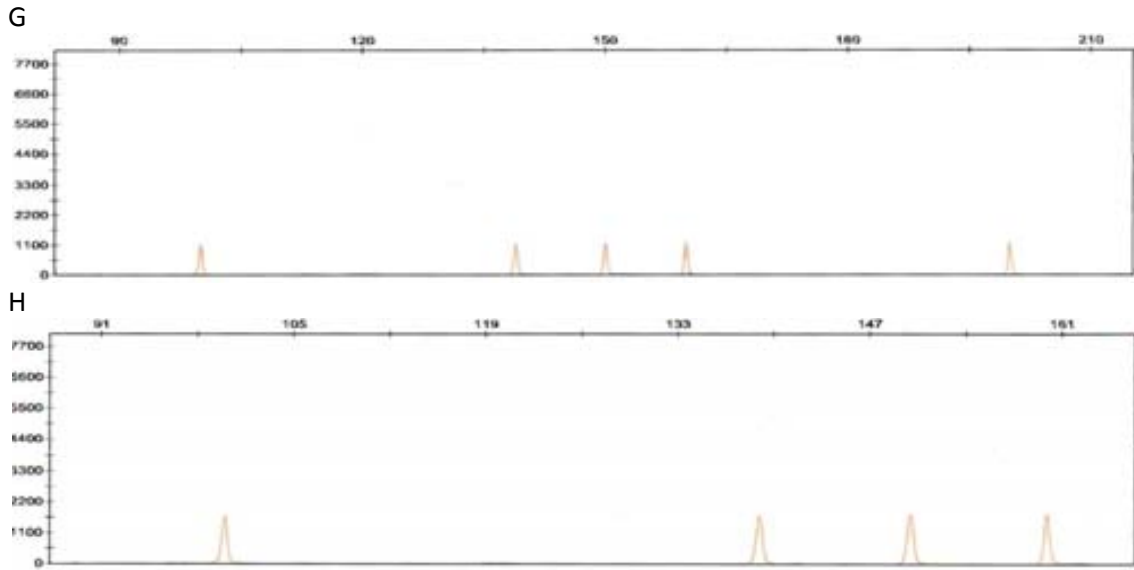
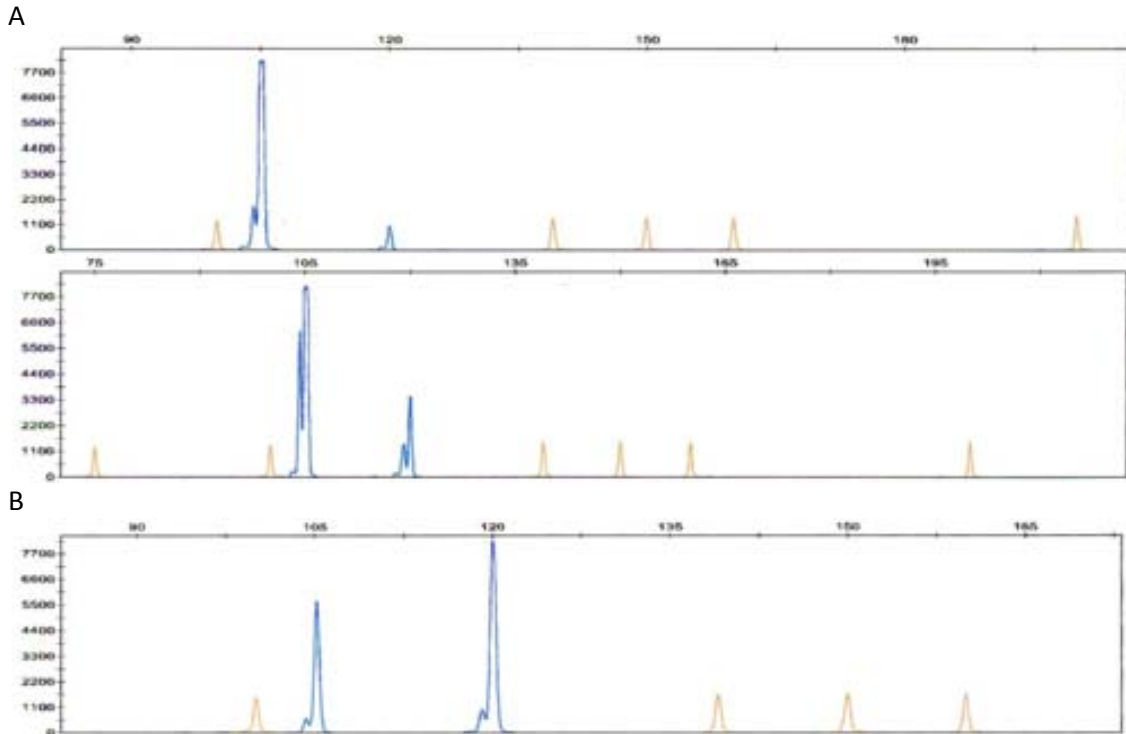


FIG. XVIII. Exemple dels plots de l'anàlisi del límit de detecció de la tècnica de GeneScan de la línia delecionada PC9. En A i B, els pics d'una mostra delecionada (104-105pb el primer pic i 119-120pb el segon). A mida que l'ADN estava més diluït, la intensitat dels pics disminuïa (C i D a 50pg/ μ L; E i F a 5pg/ μ) fins al punt de ser indetectable (G i H). En totes les amplificacions es va afegir la sonda PNA.

XIX- Exemple dels plots obtinguts de la titulació de l'ADN delecionat per la tècnica de GeneScan



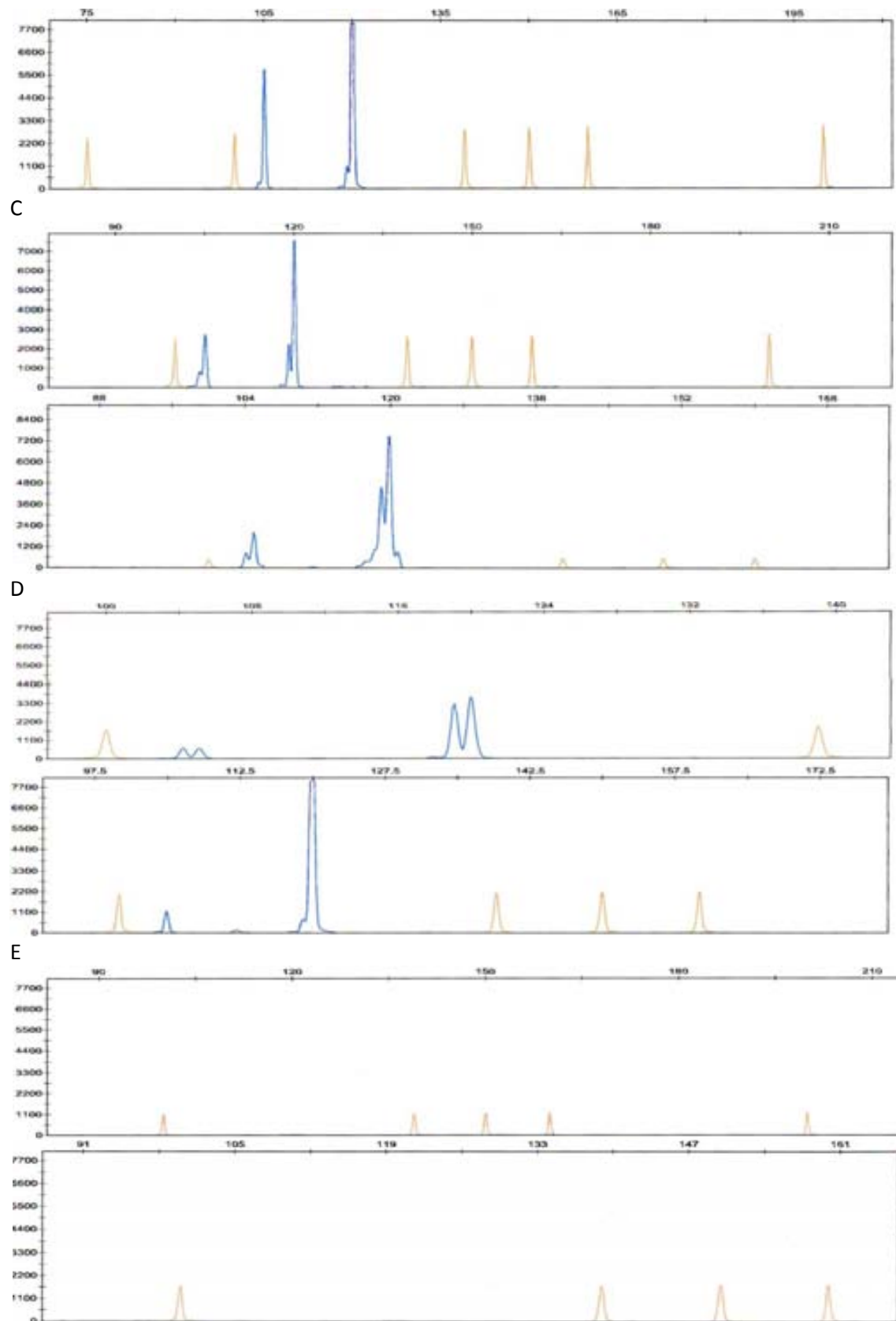


FIG. XIX. Exemple de plots de la titulació de l'ADN de la línia delecionada PC9 amb ADN wt. En els plots A, B, C i D, la delecio era detectable fins a una dilucio 1/5.000. No es detectava la delecio en la dilucio més elevada 1/10.000, del plot E. Respectivament, A, B, C i D corresponen a les dilucions 1/10, 1/100, 1/1.000 i 1/5.000. En les reaccions d'amplificacio s'havia afegit la sonda PNA.

XX- Exemple dels plots de la repetibilitat de la tècnica de GeneScan al llarg de tres mesos

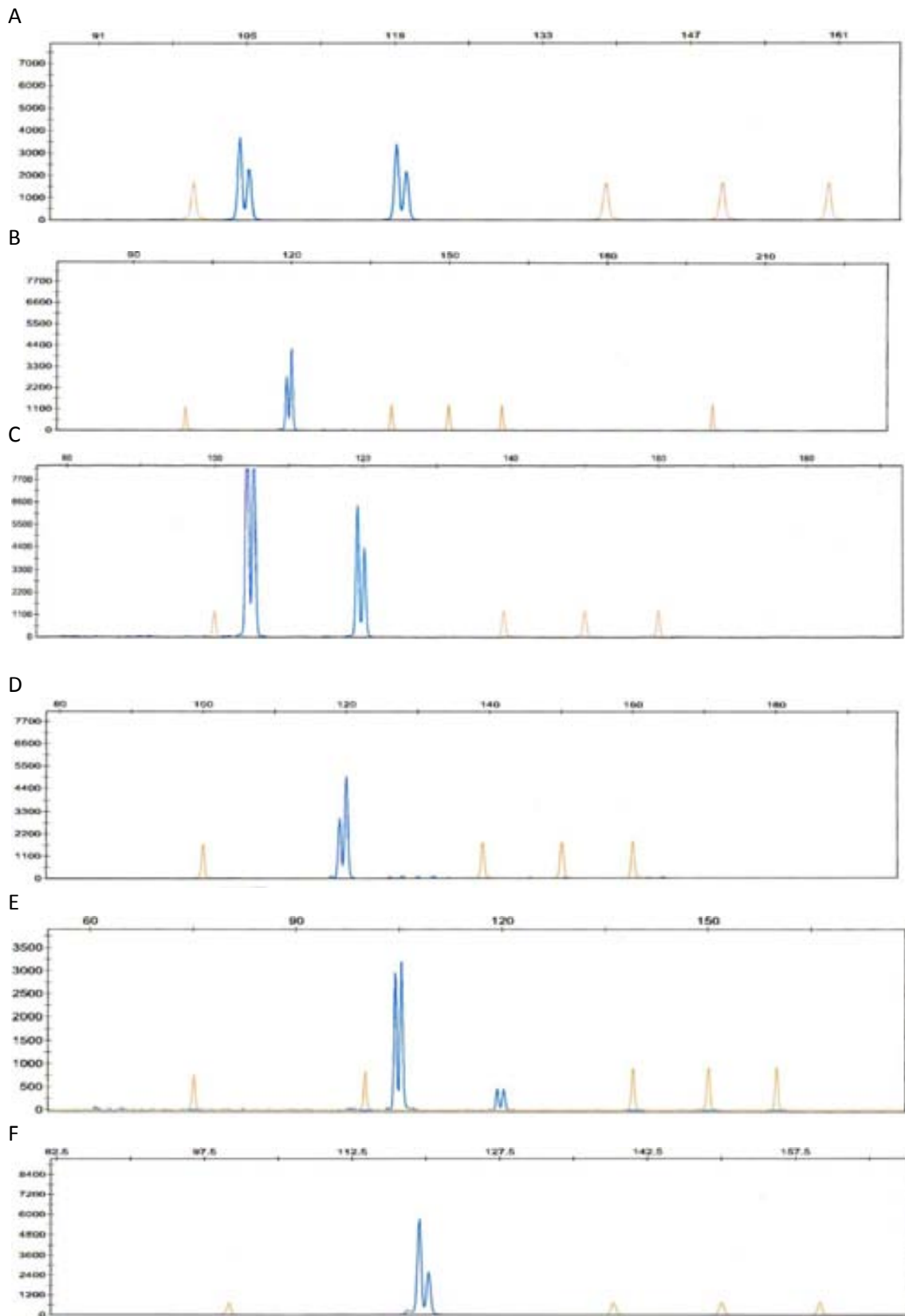


FIG. XX. Exemple de plots de GeneScan al llarg de tres mesos. La deleció de 15pb de la línia PC9 era detectable al llarg dels assaigs. Per a la línia H1975 no s'obtingué cap alteració en aquest exó. Aquest

mateix resultat s'obtingué en A-B, C-D, E-F (octubre, novembre i desembre; PC9 i H1975, respectivament). En tots els assajos es va afegir la sonda PNA.

XXI- Exemple de *plots* de l'optimització de la concentració de la sonda PNA en la discriminació al·lèlica per TaqMan de l'ADN de sang perifèrica

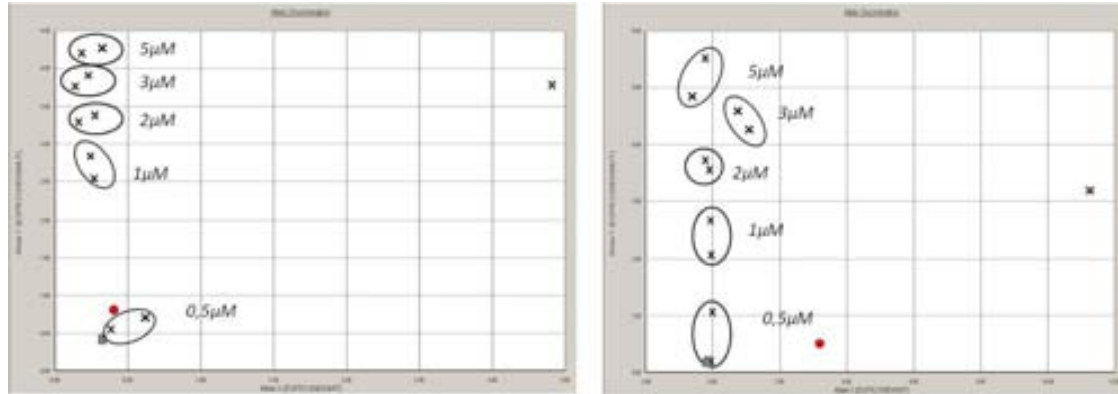


FIG. XXI. Exemple de *plots* obtinguts en afegir la sonda PNA a la reacció de discriminació al·lèlica de l'ADN de sang perifèrica. Per duplicat, es van provar diferents concentracions de sonda PNA (0,5µM; 1µM; 2µM; 3µM i 5µM) per inhibir l'ADN wt i detectar la mutació L858R de l'exó 21. A mida que s'augmentava la concentració de la sonda la discriminació de la mutació era més clara. El cercle vermell representa el limfòcit que funciona com control wt. El quadrat gris és el NTC.

XXII- Exemple dels *plots* de l'avaluació del límit de detecció de la tècnica TaqMan en l'anàlisi de la mutació L858R de l'exó 21 en sang perifèrica, utilitzant diferents concentracions de la línia H1975

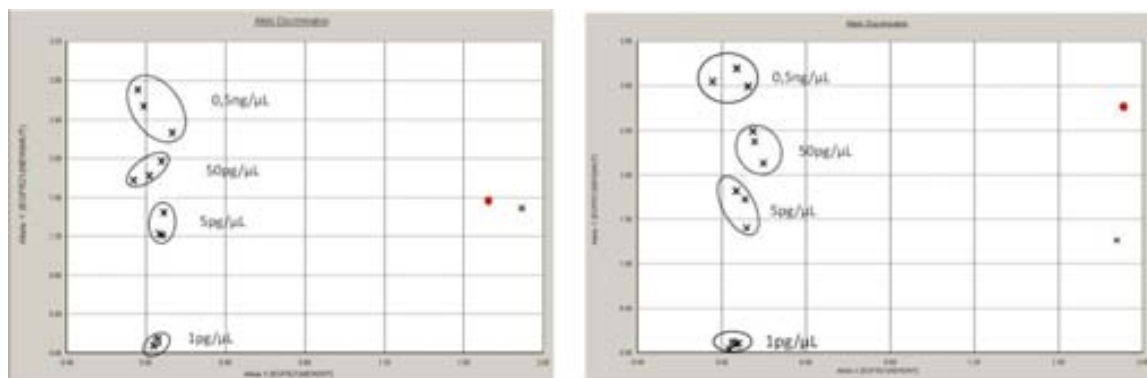


FIG. XXII. *Plots* de l'avaluació del límit de detecció de la tècnica TaqMan en l'anàlisi de la mutació L858R. A mida que la concentració de la línia H1975 disminuïa, la detecció de la mutació era més difícil malgrat haver afegit en la reacció la sonda PNA. Per a les concentracions de 0,5ng/µL; 50pg/µL i 5pg/µL es detectava la mutació, mentre que a 0,5pg/µL no es va detectar ja que les mostres apareixien al costat del NTC (quadrat gris).

XXIII- Exemple dels *plots* obtinguts de la titulació de l'ADN mutat de la línia cel·lular H1975 per la tècnica TaqMan afegint la sonda PNA

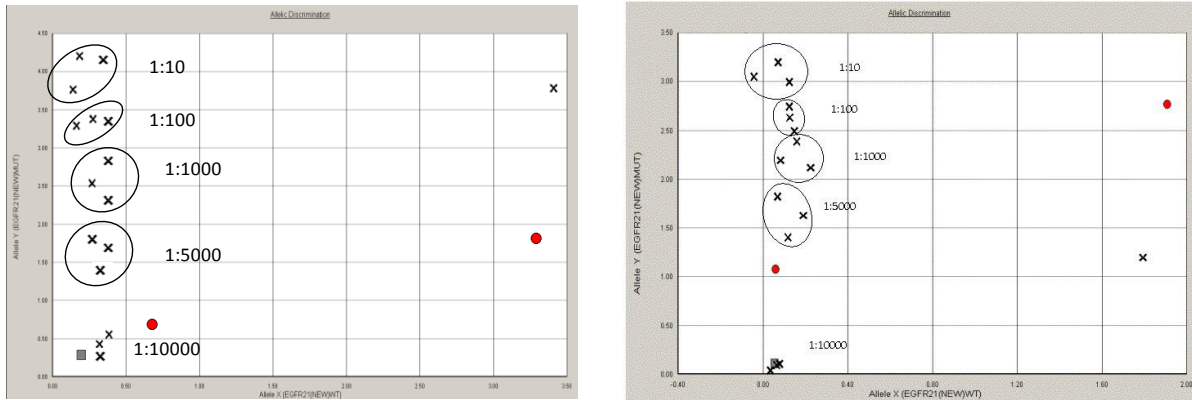


FIG. XXIII. Exemple de *plots* de la dilució de la línia cel·lular H1975 en ADN wt. En les dilucions a 1/10; 1/100; 1/1.000 i 1/5.000 es podia detectar la mutació. En canvi, la mutació deixava de detectar-se en fer dilucions superiors a 1/10000, ja que les mostres apareixien al voltant del NTC (quadrat gris).

XXIV- Exemple de *plots* de la repetibilitat de la tècnica TaqMan afegint la sonda PNA durant tres mesos

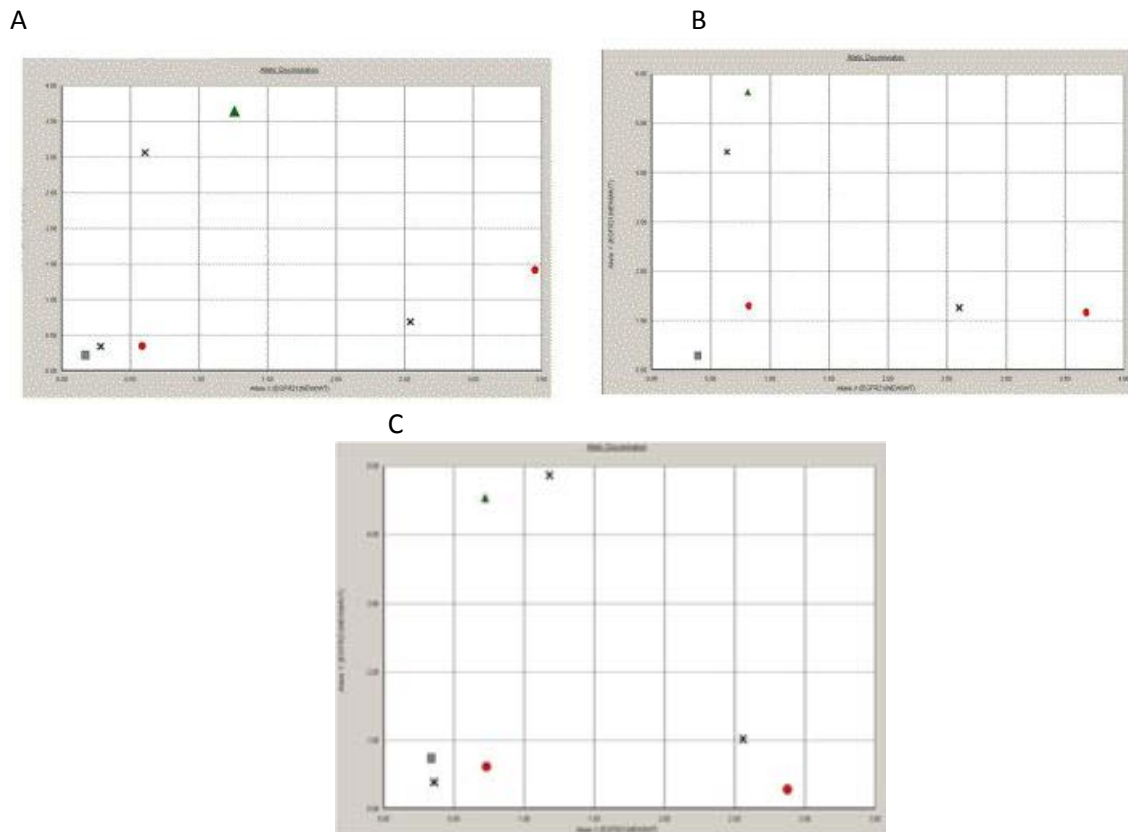
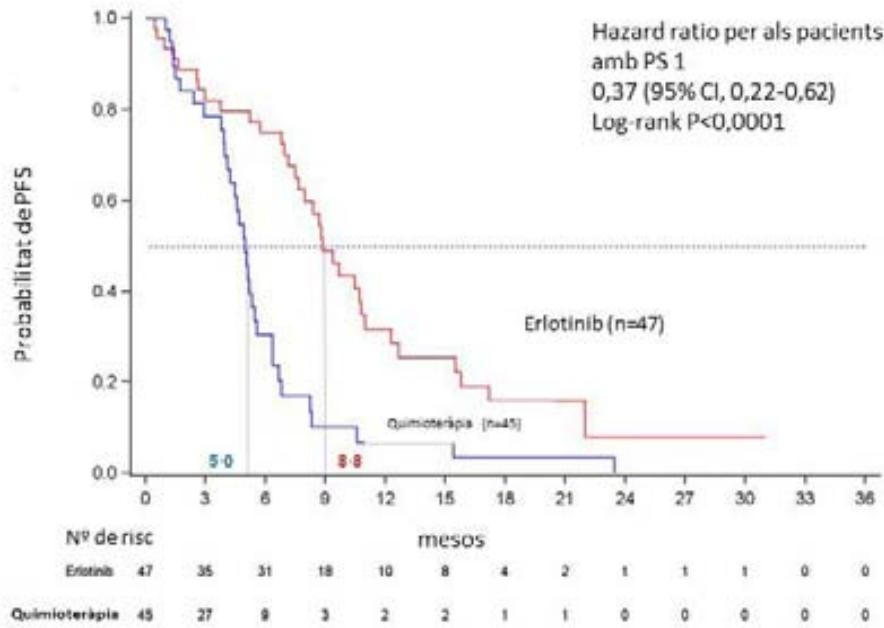


FIG. XXIV. Exemple dels *plots* de repetibilitat realitzats durant tres mesos. Tant la línia H1975 mutada L858R com la línia PC9 mantenien els seus resultats en afegir la sonda PNA en la reacció de discriminació al·lèlica. La línia mutada es mantenia en la part d'alta fluorescència mentre que la línia PC9 es mantia al costat del NTC. En tots els experiments es va afegir el limfòcit (rodona vermella) com control wt.

XXV- Corbes de Kaplan–Meier de la PFS dels pacients amb ECOG PS 1 i 2 inclosos en l'EURTAC

A



B

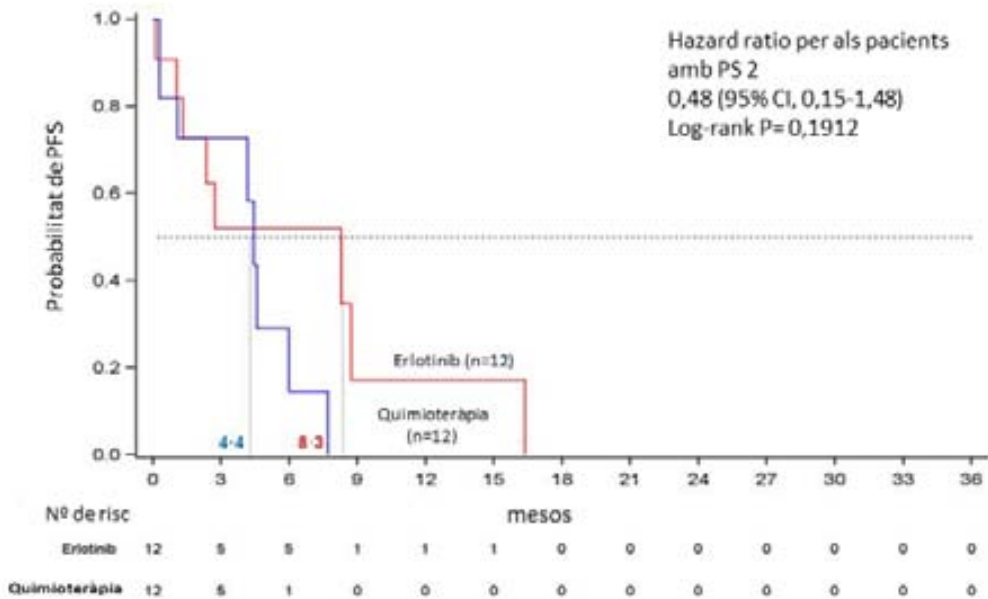


FIG.XXV. Corbes de Kaplan–Meier de la PFS. En A, la corba de l'ECOG PS 1. En vermell, la mitjana de la PFS dels pacients tractats amb erlotinib era de 8,8 mesos (95% CI, 7,5 a 10,8), significativament superior als 5 mesos dels pacients tractats amb quimioteràpia convencional (en blau) (95% CI, 4,1 a 5,5) $p<0,0001$. En B, la PFS respecte a l'ECOG PS 2. En vermell, la mitjana de la PFS dels pacients tractats amb erlotinib va ser de 8,3 mesos (95% CI, 1,0 a 16,4) respecte als 4,4 mesos (95% CI, 0,3 a 6,0) dels pacients tractats amb quimioteràpia convencional (en blau).

XXVI- Corba de Kaplan-Meier de l'avaluació de la PFS dels pacients de l'EURTAC segons la detecció de les mutacions d'EGFR en sang perifèrica de la branca de tractament amb quimioteràpia convencional

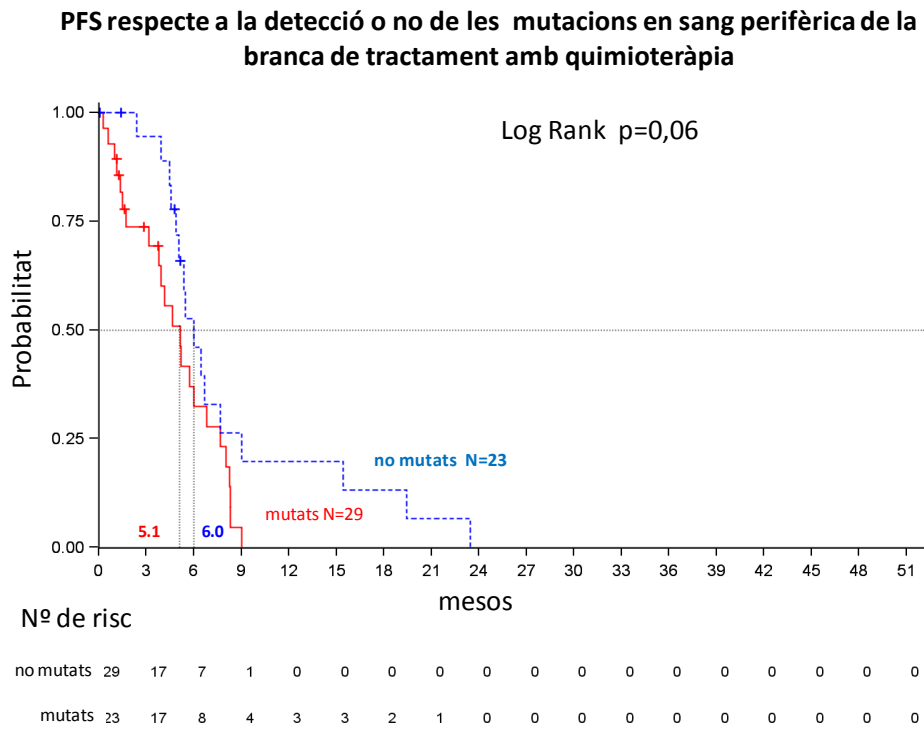


FIG. XXVI. Corba de Kaplan-Meier de l'avaluació de la PFS de la branca de tractament amb quimioteràpia convencional dels pacients de l'EURTAC en sang perifèrica. Es pot observar que no hi havia diferències significatives entre detectar les mutacions i no detectar-les en aquest grup de pacients (6 mesos, 95% CI, 4.9 a 7.7 mesos i 5,1 mesos, 95% CI, 3.2 a 6.8 mesos, respectivament) $P=0,06$.

