

Estado mutacional de los exones 19 y 21 de EGFR en adenocarcinoma de pulmón: Estudio en 122 pacientes peruanos y revisión de la evidencia de eficacia del inhibidor tirosina kinasa erlotinib

Mutational status of EGFR exons 19 and 21 in lung adenocarcinoma: Study in 122 peruvian patients and review of the efficacy of tyrosine kinase inhibitor erlotinib.

Luis Mas^{1,2}, Juan Gómez de la Torre³ y Claudia Barletta³.

RESUMEN

Introducción: El cáncer de pulmón tiene altas tasas de incidencia y mortalidad, tanto en el país como en el mundo. El conocimiento de las alteraciones moleculares en esta neoplasia ha permitido desarrollar tratamientos individualizados, observándose resultados terapéuticos muy alentadores. El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de mutaciones en los exones 19 y 21 en adenocarcinoma de pulmón en nuestra población y realizar una revisión de la evidencia de eficacia de erlotinib en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. **Métodos:** Se recibieron 133 muestras consecutivas de adenocarcinoma de pulmón entre enero y octubre de 2011. El estado mutacional en el exón 19 de EGFR se realizó por el método de PCR convencional, con la técnica de enriquecimiento del alelo mutado. El estado mutacional en el exón 21 fue determinado mediante el análisis de la curva de desnaturalización por PCR en tiempo real. **Resultados:** El estado mutacional del exón 19 fue determinado en 122 muestras (11 muestras fueron no evaluables para este análisis, debido a falta de amplificación) y del exón 21 en 104 muestras (29 no fueron evaluables). La frecuencia de mutaciones en cualquiera de los exones fue del 39,3% (48 casos), en el exón 19 fue del 32% (39 casos), en el exón 21 fue de 8,7% (9 casos) y, simultáneamente, en ambos exones, en el 1,9% (2 casos). **Conclusiones:** Se detectaron una incidencia de mutaciones similares a otras poblaciones latinoamericanas. La evidencia clínica revisada de los estudios OPTIMAL y EURTAC muestra resultados alentadores.

ABSTRACT

Introduction: Lung cancer has a high incidence and mortality rates in this country as other countries. The knowledge of molecular disruptions in this neoplasm has permitted to develop individual treatments, observing therapeutic results very encouraging. The aim of this study was to establish the frequency of mutations of exons 19 and 21 in lung adenocarcinoma of our population and to make a review of the evidence of erlotinib's efficacy in patients with non-small cell lung cancer. **Methods:** One hundred and thirty three consecutive samples of lung adenocarcinoma were received between January and October of 2011. The mutational state in the exon 19 of EGFR was made by the PCR conventional method with the enrichment technique of the mutated allele. The mutational state in exon 21 was set through the analysis of the melting curve by PCR in real time. **Results:** The mutational status of exon 19 was set in 122 samples (11 samples were non-evaluated for this analysis, due to the lack of amplification) and exon 21 in 104 samples (29 were non-evaluated). The frequency of mutations in any of the exons were 39.3% (48 cases), in the exon 19 was 32% (39 cases), in the exon 21 was 8.7% (9 cases) and simultaneity in both exons were 1.9% (2 cases). **Conclusions:** There was detected an incidence of mutation similar to other Latin American populations. Clinic evidence reviewed of studies Optimal and EURTAC show encouraged results.

Palabras clave: Cáncer de Pulmón, Adenocarcinoma, EGFR, Erlotinib.

Key words: Lung Cancer, Adenocarcinoma, EGFR, Erlotinib.

Afiliaciones:

- 1, Departamento de Oncología Médica. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.
- 2, Oncosalud
- 3, Laboratorio Clínico ROE

Autor para correspondencia:

Luis Mas López
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas
Av. Angamos Este 2520, Surquillo
Lima 34 – Perú
Email: lmasl@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Cuando Stanley Cohen estudiaba el factor de crecimiento neural, observó que cuando se inyectaba extracto crudo de glándula salival de ratón a ratones recién nacidos, se originaba como efecto la apertura ocular más temprana y el crecimiento de sus ganglios simpáticos. Cohen aisló una proteína de 53 aminoácidos que actualmente es conocida como factor de crecimiento epidermal (EGF).¹ Posteriormente, se identificó al receptor del EGF (el EGFR), una proteína transmembrana con actividad tirosina kinasa (TK) intrínseca.² El EGFR (o también llamado HER1) pertenece a la familia HER (human epidermal receptor) con otros tres receptores de membrana con estructura similar: el ERBB4 (HER4) que es un receptor autónomo, el ERBB3 (HER3) que no tiene actividad TK y el ERBB2 (HER2) que carece de ligando.

Erlotinib es una molécula inhibidora de la actividad tirosina kinasa (ITK), reversible, que ha mostrado actividad en el tratamiento de segunda línea del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en estudios fase II. Un estudio fase III del National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC-CTG) BR.21 randomizó 731 pacientes con CPCNP avanzado que habían recibido uno o dos cursos previos de tratamiento con quimioterapia para recibir erlotinib o placebo en una proporción de 2 a 1.³ La tasa de respuesta fue de 8.9% versus <1%, respectivamente ($P < 0,001$). La mediana de supervivencia global fue de 6.7 versus 4.7 meses a favor de erlotinib (RR 0,70, $P < 0,001$). Adicionalmente, se obtuvo beneficio en la mejoría de los síntomas como tos, disnea y dolor. Un mayor beneficio se observó en la subpoblación de sexo femenino, histología de adenocarcinoma y en pacientes no fumadores.^{3,4,5}

En el año 2004, se identificaron mutaciones en el gen EGFR que predecían la sensibilidad al uso de ITKs.^{6,7,8} El interés de poder determinar las mutaciones que dominan el comportamiento de la enfermedad en genes codificantes de proteínas con actividad kinasa y el uso de estas como blancos terapéuticos, condujo al descubrimiento de TKIs del EGFR, mostrando altas tasas de respuestas, periodos largos de supervivencia global y libre de progresión, menor toxicidad, mejor control de los síntomas, calidad de vida y mejor conveniencia de tratamiento en primera línea de los pacientes portadores de CPCNP con mutaciones activadoras de EGFR.

Se ha descrito que las mutaciones somáticas en el dominio TK del gen EGFR, corresponden principalmente, a deleciones del exón 19 o mutaciones puntuales en el exón 21. Una proporción importante de las mutaciones, alrededor del 90 %, ocurre como deleciones en el marco de lectura en el exón 19, lo que produce la eliminación de 4

aminoácidos (Leu-Arg-Glu-Ala), o como una sustitución de un nucleótido simple en la posición 2573 (TfIG) del exón 21, resultando como consecuencia la sustitución de arginina por leucina en la posición 858 (L858R).

La incidencia de mutaciones del gen EGFR en tumores de pulmón varía de acuerdo al grupo poblacional, se reporta en el 10 % de la población de América del Norte y mayores porcentajes en las series de los países asiáticos.⁹

Nuestros objetivos fueron determinar la incidencia de mutaciones en los exones 19 y 21 del gen EGFR en la población peruana y, secundariamente, revisar la actividad clínica de erlotinib en el tratamiento de primera línea de CPCNP en pacientes portadores de las mutaciones activadoras del gen del EGFR.

MÉTODOS

Muestras

Se analizaron 133 biopsias consecutivas de adenocarcinoma pulmonar recibidas entre enero y octubre de 2011. Estas muestras de tumor fueron fijadas en formol e incluidas en parafina. Cada muestra fue recibida con su respectiva lámina histológica, la que se usó para delimitar la zona del tejido con mayor proporción de células tumorales. Se extrajo una porción de tejido de la zona de interés con un sacabocado y se volvió a incluir en un nuevo bloque de parafina. Posteriormente, se colocó en un vial entre 5 a 10 cortes de tejido de 10 μ m de grosor para el aislamiento del material genético.

Pre tratamiento y aislamiento del DNA

Se realizó un pre-tratamiento de las muestras previo a la extracción del DNA, que consistió en un lavado con xilol (por 30 minutos) y lavados breves con etanol (100%, 80% y 60%). El tejido fue concentrado entre cada lavado mediante centrifugación a 13 000 rpm por 2 minutos. Se incubó la muestra con un buffer de lisis y proteinasa K (Kit High Pure PCR Template, Roche Diagnostics) en baño maría a 40° C durante 12 horas. Posteriormente, se procedió a aislar el DNA usando un sistema de purificación de DNA genómico en columnas de sílica (High Pure PCR Template, Roche Diagnostics) y se eluyó el DNA en un volumen de 50 μ L.

Cuantificación del DNA

La concentración de DNA fue determinada por fluorimetría con el instrumento Qubit (Invitrogen), empleando el Kit de cuantificación de alta sensibilidad del mismo fabricante. La concentración de DNA de las muestras estuvo en el rango de 0.125 – 40 ng/ μ L. En los casos con altas concentraciones de DNA, se realizó una dilución previa a la amplificación por PCR.

Ensayos de PCR para EGFR

Análisis de deleciones en exón 19:

Método de PCR convencional con enriquecimiento del alelo mutado

Este método está conformado por dos rondas de PCR interrumpidas por un paso de digestión de los productos de la primera ronda con una enzima de restricción que elimina selectivamente los alelos no mutantes o de tipo salvaje (*wild type*) mediante el corte de la secuencia TTAA (codón 747-primer letra de codón 748), frecuentemente, ausente en mutantes con deleción en codones 747-749.¹⁰

La secuencia de los cebadores para la amplificación del exón 19 fueron las siguientes: EX19f: 5'-ATCCCAGAAGGTGAGAAAGATAAAATTC-3' y EX19r: 5'-CCTGAGGTTTCAGAGCCATGGA-3'. Las rondas de amplificación fueron realizadas en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). La primera ronda de amplificación se realizó en un volumen final de reacción de 50 µL con el siguiente programa térmico: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 17 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 20 segundos; seguido, finalmente, de un paso de elongación a 72°C por 7 minutos y un hold a 4°C. Se trabajó con 2-50 ng de muestra de DNA, 150 µM de dNTPs, 2 pmol de cada cebador y 2 unidades de FastStart Taq DNA Polimerasa (Roche Diagnostics). La digestión de los productos de PCR con la enzima Msel (Fermentas) fue realizada en un termo bloque a 37°C durante 4 horas, incubando 10 µL de producto de la primera ronda con 10 unidades de Msel, en un volumen final de digestión de 31 µL.

En la segunda ronda de PCR, se trabajó con la misma concentración de cebadores, dNTPs y enzima a un volumen final de reacción de 50 µL, y con 4 µL de producto de la digestión con la enzima Msel. La segunda ronda fue con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 20 segundos; seguido, finalmente, de un paso de elongación a 72°C por 7 minutos y un hold a 4°C. Un control negativo (sin plantilla de DNA) y controles positivos (para el alelo mutado y el tipo salvaje) fueron incluidos desde la primera ronda de PCR.

La separación de los productos de la amplificación se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, empleando un estándar de pesos moleculares de 100- 1000 pb (Fermentas). La visualización y detección de los amplicones se realizó mediante la tinción del gel con bromuro de etidio, y posterior observación en el transiluminador UV. La asignación de genotipos de cada muestra se realizó por

comparación directa con las bandas de los controles positivos (mutante y tipo salvaje) y el estándar de peso molecular (figura 1).

Mutación L858R del exón 21

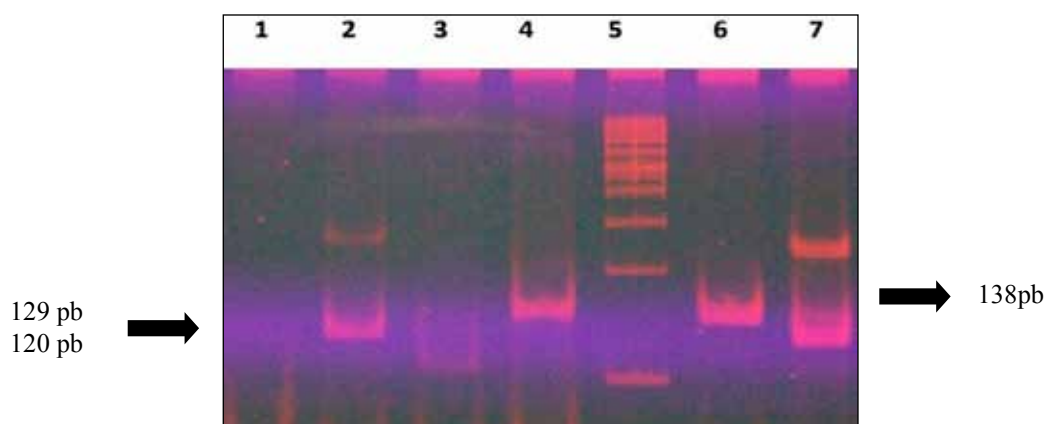
Análisis de la curva de desnaturalización por PCR en tiempo real

Este ensayo nos permite diferenciar amplicones portando la mutación L858R de amplicones de tipo salvaje, mediante un análisis de curva de disociación. La curva de disociación o curva de desnaturalización se realizó finalizado el programa de amplificación en un instrumento LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics), usando como formato de detección sondas FRET. Una de las sondas fue diseñada para hibridar perfectamente con el alelo mutante dando una temperatura de desnaturalización característica ($t_m = 65^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), mientras que en presencia del alelo de tipo salvaje, mostrará una disociación temprana al no existir un apareamiento perfecto ($t_m = 52^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$).¹¹

Se trabajó con un volumen final de reacción de 20 µL que incluyó la adición de sondas y cebadores específicos para la amplificación del exón 21, el reactivo LightCycler® FastStart DNA Master Hyb-Probe (Roche Diagnostics) y 2-5 ng de DNA por reacción. La secuencia de los cebadores y sondas para la amplificación del exón 21 fueron las siguientes: EX21f: 5'-GCTCAGAGCCTGGCATGAA-3', EX21r: 5'-CATCCTCCCCTGCATGTGT-3', sonda EX21LC:5'-GCCTCCTTCTGCATGGTATTCTTTCTCTCCGCACCCA-LC640 y sonda EX21 FAM: 5'-6FAM-CAGTTTGGCCCGCCC-PH. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron: un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 55 ciclos de 95°C por 10 segundos, 57°C por 10 segundos, y 72°C por 14 segundos. Esto fue seguido por un ciclo de curva de desnaturalización, la cual inicia con un incremento en la temperatura a 95°C para desnaturalizar los amplicones, seguido por una pausa de 30 segundos a 45°C y un suave incremento de la temperatura a una tasa de cambio de 0.1°C por segundo hasta 80°C, seguido de un ciclo final de enfriamiento a 40°C por 30 segundos. Se realizó un análisis de temperatura de desnaturalización en el canal de detección de 640. La temperatura de desnaturalización para el alelo normal es de 52°C \pm 1°C, mientras que para el alelo mutante la temperatura de desnaturalización es de 65°C \pm 1°C (figura 2 y 3).

RESULTADOS

Entre Enero y Octubre del 2011 se recibieron un total de 133 muestras, de las cuales 122 muestras fueron evaluables para el estudio del exón 19 y 104 para el exón 21; es decir, un 10% de muestras no fueron evaluables para el estudio de deleciones en



Leyenda:

- Carril 1: Control Negativo
- Carril 2: Muestra positiva para delección de codones 747-749
- Carril 3: Muestra negativa para delección de codones 747-749
- Carril 4: Muestra de tipo salvaje sin completar digestión
- Carril 5: Ladder de peso molecular (100-1000 pb)
- Carril 6: Control positivo de tipo salvaje
- Carril 7: Control positivo mutante (delección 747-749)

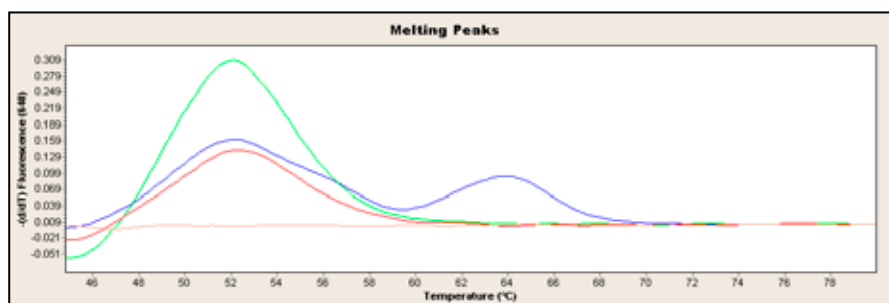
Figura 1. Gel de Poliacrilamida al 8% con muestras positiva para la delección en los codones 747-749 del Exón 19 del gen EGFR.

los codones 747-749 del exón 19 y un 22% de muestras no fueron evaluables para detectar la mutación L858R del exón 21.

La ocurrencia de cualquiera de las dos mutaciones, es decir delecciones en los codones 747-749 del exón 19 o la mutación L858R del exón 21 estuvo presente en 48 casos (39,3%). Las delecciones en los codones 747-749 (exón 19) estuvieron presentes

en 39 casos (32%), la mutación L858R (exón 21) se presentó en 9 casos (8,7%) y la ocurrencia simultánea de ambas mutaciones se presentó en 2 casos (1,9%).

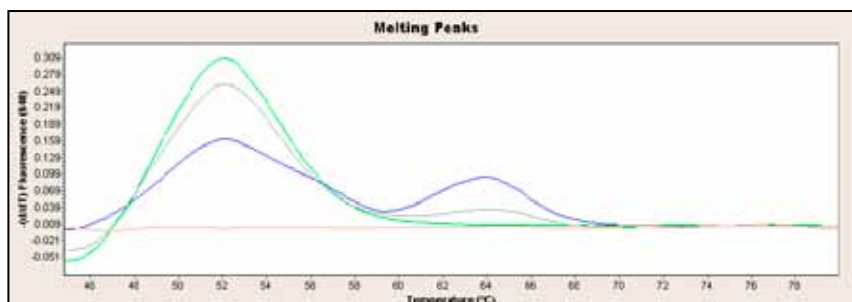
En la **tabla 1** se presentan los resultados de la incidencia de mutaciones en exón 19 y 21 de los 122 pacientes estudiados.



Leyenda

- Control positivo mutante (dos picos de desnaturalización = 52°C +/- 1°C y 65°C +/- 1°C).
- Control positivo tipo salvaje (pico de desnaturalización = 52°C +/- 1°C).
- Muestra tipo salvaje (pico de desnaturalización = 52°C +/- 1°C).
- Control Negativo (sin pico de desnaturalización).

Figura 1. Curvas de desnaturalización de una muestra tipo salvaje para la mutación L858R del exón 21 en el LightCycler 2.0.



Leyenda

- Control positivo mutante (dos picos de desnaturalización = 52°C +/- 1°C y 65°C +/- 1°C).
- Control positivo tipo salvaje (pico de desnaturalización = 52°C +/- 1°C).
- Muestra mutante (dos picos de desnaturalización = 52°C +/- 1°C y 65°C +/- 1°C).
- Control Negativo (sin pico de desnaturalización)

Figura 3. Curvas de desnaturalización de muestra con la mutación L858R del exón 21 en el LightCycler 2.0.

DISCUSIÓN

En el Perú, el cáncer de pulmón tiene una tasa de incidencia en varones de 7,7 casos nuevos por cada 100 000 varones cada año, y en mujeres presenta una incidencia de 6.5 por cada 100 000 mujeres. La mortalidad es alta y se estima una tasa de 7,6 y 6,3 muertes cada año por cada 100 000 varones y mujeres, respectivamente.¹²

Existen diversos estudios que han mostrado la implicancia terapéutica del estado mutacional de EGFR en el cáncer de pulmón de células no pequeñas y se ha mostrado que la presencia de ciertas mutaciones incrementan la sensibilidad de las células tumorales a la terapia blanco-dirigida.^{6,7,8} Una detección de dichas mutaciones antes del tratamiento, podría facilitar una terapia más personalizada, específica y eficaz.¹³

Dentro de las mutaciones en el dominio TK de EGFR, las mutaciones en el exón 18 se presentan en alrededor del 5% de los casos, en el exón 19 en aproximadamente el 45% de los casos, en el exón 20, en 5% de los casos y en el exón 21, en cerca del 45% de los casos.¹⁴

Aunque previamente, se describió en nuestro país una frecuencia mayor de mutaciones de EGFR (66,7%) como parte de un estudio a nivel Latinoamericano¹⁵, nosotros reportamos una menor frecuencia de mutaciones. Recientemente, en la XIV Conferencia Mundial de Cáncer de Pulmón, se reportaron las frecuencias de mutaciones activadoras de EGFR en algunos países de Latinoamérica, observándose una incidencia del 22.2% para Chile¹⁶, del 13% y 25% para Colombia^{17,18}, y del 25.3% para Brasil.¹⁹ El estudio antes mencionado que evaluó muestras de varios países de Latinoamérica, encontró una frecuencia de mutaciones del 33.2% (Argentina 23%, Colombia 23,6%, México 32%, Perú 66.7%).¹⁵

A continuación se describen los hallazgos en 2 estudios clínicos que evaluaron la eficacia de erlotinib en cáncer de pulmón de células no pequeñas:

Estudio OPTIMAL

Este es un estudio de primera línea de tratamiento, de fase III prospectivo, randomizado conducido en 23 centros en China, donde se enrolaron pacientes mayores de edad con diagnóstico histológico confirmado de CPCNP en estadios clínicos III-B y IV, sin exposición previa a tratamiento, y que presentaban alteraciones moleculares del gen del EGFR como deleciones del exón 19 o mutaciones puntuales del exón 21, con enfermedad mensurable de acuerdo a los criterios de RECIST, buen estado de actividad ECOG (ECOG 0-2) y adecuada función hematológica y hepática. Se excluyeron a los pacientes portadores de enfermedad metastásica cerebral no controlada.

Los pacientes fueron aleatorizados en una proporción de 1:1 para recibir 150 mg diarios de erlotinib o quimioterapia convencional con el esquema: carboplatino AUC 5 en el día 1 de tratamiento, asociado a gemcitabina 1000 mg/m² los días 1 y 8, cada tres

Tabla 1. Frecuencias de Mutaciones en Exón 19 y Exón 21 en pacientes con adenocarcinoma de pulmón.

Mutaciones	n	%
Exón 19 ó 21	48/122*	39,3%
Exón 19	39/122*	32%
Exón 21	9/104*	8,7%
Ambos exones	2/104*	1,9%

*Muestras genotipables

Tabla 2. Incidencia de mutaciones activadoras de EGFR en la población Latinoamericana.

Autor	País	n	Incidencia	Exón19*	Exón21*
Aren et al. ¹⁶	Chile	118	22,2%	58,4%	41,6%
Arrieta et al. ¹⁵	Latinoamérica	933	33,2%	49,5%	47,4%
Cardona et al. ¹⁷	Colombia	228	25%	70%	30%
Guerrero et al. ¹⁸	Colombia	53	13%	85%	15%
Melo et al. ¹⁹	Brasil	150	25,3%	—	—
Presente estudio	Perú	122	39,3%	81%	18,7%

*, Proporción con respecto a los casos EGFR positivos.

semanas, por un mínimo de 4 ciclos de tratamientos. Los pacientes fueron estratificados de acuerdo al tipo de mutación, histológica y estado de fumador, la evaluación de eficacia se realizó cada 6 semanas. El objetivo primario del estudio fue la sobrevida libre de progresión (SLP) y los objetivos secundarios incluyeron sobrevida global (SG), tasa de respuestas objetivas, tiempo a la progresión de enfermedad, duración de la respuesta, evaluación de calidad de vida con la escala de FACT-L = *Functional Assessment of Cancer Therapy-Lung* y LCSS = *Lung Cancer Symptom Scale*. Adicionalmente, se realizó estudio de biomarcadores.

Los resultados mostraron una SLE de 13,1 meses en los pacientes tratados con erlotinib comparado contra 4,6 meses del grupo que recibió quimioterapia (HR=0,16; IC95% 0,10–0,26; P<0,0001). Mejor tasa de respuesta, respuesta completa, erlotinib 2 (2%) contra 0 (0%) para Gem/Carbo, respuesta parcial de 66 (81%) para erlotinib contra 26 (36%) para Gem/Carbo con una tasa de respuestas objetivas del 83 % contra 36 % a favor de erlotinib (P<0,0001). Adicionalmente, el control clínico de la enfermedad, la suma de respuesta objetiva global y enfermedad estable favoreció al grupo de erlotinib con 96 % contra el 82 % del grupo control (P=0,002).

Los beneficios de mejora de la SLP fueron independientes de varios subgrupos de pacientes, para los pacientes portadores de adenocarcinoma erlotinib (72 pacientes) fue 13,1 meses contra 4,6 meses para Gem/Carbo (62 pacientes; HR=0,17; IC95%:0,11–0,28). Para la histología no adenocarcinoma el HR fue de 0,22 (IC95%:0,06–0,73; P=0,0079), la proporción de pacientes es pequeña (10 pacientes en cada brazo de tratamiento), pero la

mediana de SLP no ha sido alcanzada en el grupo de tratamiento con erlotinib y la mediana de SLP en Gem/Carbo fue de 3,2 meses. Para los pacientes fumadores la mediana de SLP fue de 15,3 meses para erlotinib (23 pacientes) contra 5,5 meses para Gem/Carbo (22 pacientes), con un HR de 0.21 (IC95%:0,09–0,49; P<0,0001). Para el grupo de pacientes no fumadores la SLP para erlotinib (59 pacientes), fue de 12,6 meses contra Gem/Carbo (50 pacientes) con 4,3 meses (HR=0,14; IC95%:0,08–0,25; P<0,0001). La mediana de SLP para los pacientes portadores de alteraciones moleculares que recibieron erlotinib fue de 15,3 meses en aquellos que presentaban deleciones del exón 19 (43 pacientes), y para los portadores de la mutación L850R del exón 20 (39 pacientes) fue de 12,5 meses.

El análisis de calidad de vida se realizó cada 6 semanas usando el cuestionario de FACT-L (*Functional Assessment of Cancer Therapy-Lung*), TOI (*Trial Outcome Index*) y LCSS (*Lung cancer symptom scale*). Se consideró clínicamente significativo si se obtenía una mejoría de 6 puntos en la puntuación de FACT-L y TOI o una mejoría de más de 2 puntos en la escala LCSS. El valor de P para calidad de vida fue evaluado usando un modelo de regresión logística, teniendo como variables el estado de actividad, historia de fumador y género. La proporción de pacientes que obtuvieron mejora de los resultados de calidad de vida, de acuerdo a FACT-L, fue para erlotinib 73 % comparado con 29,6 % para Gem/Carbo; escala TOI, para erlotinib 71,6 % contra 24,1 % para Gem/Carbo; escala LCSS, para erlotinib 75,7 % contra 31,5 % para Gem/Carbo; el valor de P<0.0001, fue claramente significativo.^{20,21,22}

Tabla 1. Frecuencias de Mutaciones en Exón 19 y Exón 21 en pacientes con adenocarcinoma de pulmón.

Características basales	OPTIMAL		EURTAC	
	Erlotinib (n=82)	Gem/Carbo (n=72)	Erlotinib (n=77)	Quimioterapia (n=76)
Mediana de edad (rango), años	57 (31–74)	59 (36–78)	64 (24–82)	64 (29–82)
Edad <65 años / ≥65 años	77 % / 23%	71% / 29%	49% / 51%	51% / 49%
Masculino / Femenino	42 % / 58%	40% / 60%	32% / 68%	21% / 79%
Adenocarcinoma / no adenocarcinoma	88 % / 12%	86% / 14%	95% / 5%	91% / 9%
Fumadores / no fumadores	28% / 72%	31% / 69%	4% / 70% / 26%*	13% / 13% / 74%*
Deleción exón 19 / mutación L858R	52% / 48%	54% / 46%	64% / 36%	63% / 37%
EP 0 / 1 / 2	92%** / 8%	96%** / 4%	30% / 57% / 13%	34% / 54% / 12%
EC IIIB / IV,	13% / 87%	7% / 93%	9% / 91%	7% / 93%
Resultado Clínico				
Sobrevida libre de progresión (mediana en meses)	13,1	4.6	9,4	6,2
<i>Hazard ratio</i>	0,16	1	0,42	1
Eventos adversos				
Cualquier EA, todos los grados	93%	96%	96%	99%
EA relacionados al tratamiento (todos los grados)	87%	94%	92%	95%
EA Grado 3 / 4	17%	65%	45%	81%
Modificación de dosis / interrupción de tratamiento debido a EA	6%	6%	27%	53%
Modificación de dosis / interrupción debido a un EA relacionado a tratamiento	0%	6%	23%	47%
Descontinuación de tratamiento por EA	12%	14%	12%	15%
Descontinuación debido a EA relacionado al tratamiento	0%	6%	5%	14%
Evento adverso serio	12%	14%	27%	26%
Evento adverso serio relacionado a tratamiento	2%	14%	7%	16%
Muerte relacionado al tratamiento	0%	0%	1%	3%

Abreviaturas: Gem, gemcitabina; Carbo, carboplatino; EP, estado de performance; EC, estadio clínico; EA, evento adverso. *, Ex fumadores; **, EP 0-1.

Estudio EURTAC

Es el segundo estudio en primera línea de tratamiento, fase III prospectivo, randomizado conducido en 27 centros en España, 9 centros en Francia y 6 centros en Italia. Pacientes mayores de edad con diagnóstico histológico confirmado de CPCNP en estadios clínicos III-B y IV, sin exposición previa a

tratamiento, que presentaban alteraciones moleculares del gen EGFR, como deleciones del exón 19 o mutaciones puntuales del exón 21 detectado por secuenciación en un laboratorio central, con enfermedad mensurable de acuerdo a los criterios de RECIST, buen estado de actividad ECOG 0-2 y adecuada función hematológica y hepática, fueron incluidos en este estudio.

Los pacientes fueron aleatorizados en una proporción de 1:1 a recibir erlotinib 150 mg diarios o quimioterapia convencional con una dupleta basada en platino, se permitían como tratamientos convencionales: Cisplatino 75mg/m² día 1 / docetaxel 75mg/m² día 1; cisplatino 75mg/m² día 1 / gemcitabina 1250mg/m² día 1 y 8; carboplatino AUC6 día 1 / docetaxel 75mg/m² día 1; carboplatino AUC5 día 1 / gemcitabina 1000mg/m² días 1 y 8. Tratamientos a repetirse cada 3 semanas por un mínimo de 4 aplicaciones. Los pacientes fueron estratificados de acuerdo al tipo de mutación y el estado de actividad (0-1 vs 2).

El objetivo primario del estudio fue supervivencia libre de progresión con un análisis interino planificado a la ocurrencia de 88 eventos. Los objetivos secundarios fueron supervivencia global, tasa de respuestas objetivas, localización de la progresión, seguridad, análisis de mutaciones del EGFR en suero y evaluación de calidad de vida.

En este estudio, se extraían muestras de ADN en las muestras de los pacientes tamizados, por medio de disección de captura con láser, se realizaba secuenciación de ADN para detectar alteraciones moleculares; adicionalmente, para la búsqueda de deleciones del Exón 19 se realizaba la prueba GenScan y para las mutaciones del Exón 21, la pruebaTaqMan. Los pacientes que presentaban mutación positiva por ambos métodos, secuenciación y Kits comerciales eran incluidos en el estudio.

El estudio EURTAC fue presentado con los resultados del análisis interino por el Dr. Rossell en el congreso de ASCO-2011 y en el congreso de IASLC-2011. Se tamizaron 1139 pacientes, de los cuales fueron aleatorizados 154 pacientes. En suma, 77 pacientes recibieron erlotinib y 77 quimioterapia. Permanecen en seguimiento 97 de los 154 pacientes, con una mediana de seguimiento de 14 meses para el grupo de erlotinib y 11 meses en el grupo de quimioterapia.

Los resultados al análisis interino de la mediana SLP, fue para erlotinib (77 pacientes) 9,4 meses contra quimioterapia (76 pacientes) 5,2 meses (HR=0,42; IC95%:0,27–0,64; P<0,0001).

Con respecto a las tasas de respuestas, se observó 2 respuestas completas en el brazo de erlotinib y 48 respuestas parciales, observándose un total de respuestas objetivas del 58%. En el grupo de quimioterapia, no hubieron respuestas completas pero se observaron 13 respuestas parciales, haciendo un total de respuestas objetivas del 15 %.

Un análisis exploratorio preplanificado mostró que aquellos pacientes que recibían erlotinib y desarrollaron rash cutáneo mayor de grado 2 (40 pacientes) tienen una mediana de SLP de 11,2 meses comparada con 8,4 meses del grupo que desarrolla rash

grado 0-1(46 pacientes) con un P=0,0178.

Los eventos adversos más frecuentes para erlotinib fueron: elevación de ALT (80% en cualquier grado y 5 % en grados 3 y 4), rash (80 % cualquier grado y grado 3 del 9 %), diarreas, (cualquier grado 57 % y grado 3 el 4 %). La frecuencia de la enfermedad pulmonar intersticial grado 3 fue del 1%.²³

Mutaciones y resistencia

A pesar de la respuesta inicial a los tratamientos con ITK, los tumores desarrollan resistencia y progresión de enfermedad en un promedio de 12 meses. A la fecha dos, mecanismos de resistencia han sido claramente definidos, 50 % por el desarrollo de una mutación secundaria del EGFR, la más común involucra el cambio de una citosina por timina en la posición 2369 del exón 20 que sustituye metionina por treonina en la posición 790 (T790M), la cual inhibe la actividad de los ITK. Un adicional 15-20% sufren activación del Receptor MET, el cual activa una señal intracelular independiente del EGFR, señal básicamente vía PI3K dependiente de ERBB3.^{24,25,26}

La mutación T790M ocasionalmente es vista en pacientes que no tienen exposición previa a ITK, esta se denomina T790M “*de novo*”, varía dependiendo del método utilizado esta se encuentra asociada a una pobre respuesta al tratamiento con ITK. Los pacientes que desarrollan como segunda mutación T790M tienen una evolución clínica diferente. **Oxnard et al.** identificó en un estudio prospectivo de rebiopsia a los pacientes que desarrollan progresión de enfermedad, la mutación T790M se identificó en 58 de 93 (63 %) de los casos de pacientes rebiopsiados a la progresión en tratamiento con ITK, la T790M fue más frecuente en la muestra de pulmón, pleura o ganglio que en otros lugares (P = 0,014), y la mediana de supervivencia post-progresión fue de 19 meses comparada con los 12 meses de los pacientes sin mutación.²⁷

La mutación T790M ha sido detectada en pacientes sin exposición a ITK y esta asociada a una supervivencia corta de 7,7 contra 16,5 meses.²⁸ El reporte del Grupo Español de estudio de cáncer de pulmón detectó la presencia de la mutación T790M en 45 de 129 pacientes evaluados (35%) y se correlaciona significativamente con la presencia de metástasis óseas (P=0,03) y el tipo de mutación de EGFR (P=0,05). En una actualización de estos datos en un cohorte de 78 pacientes con mutaciones del EGFR, se detectó la mutación en el 38 % de los casos. La mediana de SLP de los pacientes con mutación T790M fue de 12 meses (IC95%:7,6-16,4) y 18 meses en los pacientes sin la presencia de la mutación (IC95%:14,1 – 21,9; P<0,05). Los pacientes que recibieron tratamiento con erlotinib, las SLP fue de 8 meses (IC95%:3,5 – 12,5) en pacientes con Mutación T790M y 18 meses (IC95%:13,2 – 22,7;P< 0,04)

en pacientes sin la mutación.²⁹

Otro mecanismo de resistencia a los ITK es la activación de MET, un receptor de membrana que se acopla con ERBB3, que condiciona una activación sostenida de la vía PI3K/AKT, originando un puente de la vía EGFR bloqueada; en los estudios iniciales se reportó la incidencia de mutaciones del MET en un 22%, pero en estudios recientes la incidencia fue de 3 a 5 %, probablemente, esto esté relacionado a la dificultad que existe para poder detectar la mutación, tanto MET como EGFR se encuentran localizados en el cromosoma 7. La estrategia para revertir este efecto se encuentra en investigación y se tienen resultados positivos con el uso de ARQ 197, un ITK contra MET y MetMab un anticuerpo monoclonal contra MET.²⁴⁻²⁶

Un mecanismo adicional de resistencia es la transformación de un cáncer pulmonar de células pequeñas a un carcinoma neuroendocrino de pulmón, que en la serie del *Memorial* es de un 3%.³⁰

Conclusiones

La frecuencia de mutaciones en el gen EGFR en pacientes con Cáncer de Pulmón en el Perú es similar a otros países de la región, con una mayor frecuencia de las deleciones en el exón 19. Los estudios clínicos revisados, OPTIMAL y EURTAC, muestran que 150 mg diarios de erlotinib es una terapia altamente efectiva en los pacientes portadores de cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones activadores del gen EGFR, mostrando un aceptable perfil de seguridad.

REFERENCIAS

- Levi-Montalcini R, Cohen S. Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Ann NY Acad Sci* 1960;85:324-341.
- Cohen S, Carpenter G, King L Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 1980;255:4834-4842.
- Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:123-32.
- Perez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, et al. Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:3238-47.
- Tsao M-S, Sakurada A, Cutz J-C, et al. Erlotinib in lung cancer-molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005;353:133-44.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
- Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, et al. 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* 2005; 23:2513-20.
- Huang SF, Liu HP, Li LH, et al. High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8195-8203.
- Asano H, Toyooka S, Tokumo M, et al. Detection of EGFR Gene Mutation in Lung Cancer by Mutant-Enriched Polymerase Chain Reaction Assay. *Clin Cancer Res* 2006;12:43-8.
- Hidefumi Sasaki, et al. EGFR Mutation Status in Japanese Lung Cancer Patients: Genotyping Analysis Using LightCycler. *Clin Cancer Res* 2005;11(8) April 15, 2005
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, Acceso el 02/nov/2011.
- Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009; 28(S1): S24-S31.
- García-Foncillas J, Garrido P, Gómez J, Palacios J, Tarón M. Recomendaciones para la determinación de las mutaciones del gen EGFR en el carcinoma de pulmón no microcítico. *Rev Esp Patol.* 2011;44:17-31.
- Arrieta O, Cardona AF, Gallo A. Genotyping non small cell lung cancer (NSCLC) in Latinamerican (LATAM) patients. *J Thor oncol* 2011;6(S):O12.02.
- Aren O, Voguel C, Orellana E, et al. Non small cell lung cancer (NSCLC) with activating EGFR mutations in Chile. *J Thor oncol* 2011;6(S):P.4.202.
- Cardona AF, Serrano SJ, Ramos PL, et al. Screening for mutations in Colombian metastatic Non small cell lung cancer (NSCLC) patients (ONCOLGROUP). *J Thor oncol* 2011;6(S):P.2.065.
- Guerrero AJ, Valderrama-Aguirre AE, Valderrama G, et al. frequency of EGFR activating mutations in lung adenocarcinoma patients from the southwest region of Colombia, Latin-america. *J Thor oncol* 2011;6(S):P2.245.
- Melo AC, Inada HK, Barros M. Non-small cell lung cancer (NSCLC) genotyping in a Brazilian cohort. *J Thor oncol* 2011;6(S): P2.123.
- Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, et al. Preliminary results of randomized phase III study comparing efficacy and safety of first-line erlotinib versus carboplatin (CBDCA) plus gemcitabine (GEM) in Chinese advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts) with EGFR-activating mutations (OPTIMAL). *Proceedings of the ASCO annual Meeting* 2010. Abstract 7575.
- Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, et al. Updated efficacy and quality-of-life (QoL) analyses in OPTIMAL, a phase III, randomized, open-label study of first-line erlotinib versus gemcitabine/carboplatin in patients with EGFR-activating mutation-positive (EGFR Act Mut+) advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proceedings of the ASCO annual Meeting* 2011. Abstract 7520.
- Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, et al. 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* 2011;12:735-42.
- Rosell R, Gervais R, Vergnenegre A. Erlotinib versus chemotherapy (CT) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations: Interim results of the European Erlotinib Versus Chemotherapy (EURTAC) phase III randomized trial. *Proceedings of the ASCO annual Meeting* 2011. Abstract 7503.
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-43.
- Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, et al. 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* 2007;104:20932-7.
- Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; 3:75ra26.
- Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, et al. 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* 2011;17:1616-1622
- Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ullus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366-77.
- Rosell R, Molina MA, Costa C, et al. Pretreatment EGFR T790M Mutation and BRCA1 mRNA Expression in Erlotinib-Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients with EGFR

Mas et al.

Mutations Clin Cancer Res 2011;17:1160-1168.
30. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. 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 2011;17:1169-80.

Declaración de conflictos de intereses: Los autores declaran que no existen potenciales conflictos de intereses con esta investigación.

Financiación: El análisis molecular de las muestras fue patrocinado por el laboratorio Roche.