

Universidade de Vigo



Dianas moleculares en cáncer de pulmón: estudio de la evolución de biomarcadores (EGFR y PI3K) asociada a tratamiento con inhibidores tirosina kinasa

Trabajo Fin de Máster

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de **Biología Avanzada**

Realizado por:

Esmeralda Esteban Benjamín

Tutores Externos

Dr. Ángel Concha López

Dra. Begoña Otero Alén

Tutora Académica

Dra. María del Carmen Arufe Gonda

Línea de Investigación:

Implicación terapéutica de la vía EGFR-PI3K en cáncer de pulmón

Grupo de Investigación:

Área de Biología Molecular en el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña

Universidad de A Coruña. Facultad de Ciencias
Máster Universitario en Biología Avanzada
Departamento de Biología
A Coruña, España
2018

Trabajo Fin de Máster

Dianas moleculares en cáncer de pulmón: estudio de la evolución de biomarcadores (EGFR y PI3K) asociada a tratamiento con inhibidores tirosina kinasa

Dianas moleculares en cancro de pulmón: estudo da evolución de biomarcadores (EGFR e PI3K) asociada a tratamento con inhibidores tirosina quinasa

Molecular targets in lung cancer: study of the evolution of biomarkers (EGFR and PI3K) associated with treatment with tyrosine kinase inhibitors

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de
Biotechnología Avanzada

Realizado por:

Esmeralda Esteban Benjamín

Tutores Externos

Dr. Ángel Concha López

Dra. Begoña Otero Alén

Tutora Académica

Dra. María del Carmen Arufe Gonda

Línea de Investigación:

Implicación terapéutica de la vía EGFR-PI3K en cáncer de pulmón

Grupo de Investigación:

Área de Biología Molecular en el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios el darme la oportunidad de poder realiza el máster de Biotecnología Avanzada.

Agradezco al Dr. Ángel Concha López, Jefe del Servicio Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, por abrirme la puerta y permitirme entrar a tan prestigiosa institución para completar mi práctica externa y mi trabajo de fin de máster

Agradezco a la Dra. Begoña Otero encargada de la investigación en el área de Biología Molecular del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, por enseñarme con paciencia, cariño y respeto las diversas técnicas experimentales del área de Biología Molecular, además de orientarme en todo, tanto a nivel teórico como práctico en cuanto a este trabajo de fin de máster.

Agradezco a todos los técnicos del área de Biología Molecular porque siempre estuvieron prestos para enseñarme y orientarme en las diferentes técnicas que ellos realizan.

Agradezco a la Dra. María Arufe Gonda mi tutora académica por sus orientaciones y disposición.

AUTORIZACIÓN DE LOS TUTORES EXTERNOS

Certificamos que el presente trabajo titulado **“Dianas moleculares en cáncer de pulmón: estudio de la evolución de biomarcadores (EGFR y PI3K) asociada a tratamiento con inhibidores tirosina kinasa”** ha sido realizado por **Esmeralda Esteban Benjamín**, bajo nuestra tutoría en el Área de Biología Molecular del Servicio de Anatomía Patológica en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

Y autorizamos la presentación del Trabajo Fin de Máster el cual se adecúa plenamente a los requisitos formales, metodológicos y de contenido que requiere un Trabajo Fin de Máster, de acuerdo con la normativa publicada por la Comisión Académica del Máster en Biotecnología Avanzada de la Universidad de A Coruña.

Tutores Externos del Trabajo Fin de Máster:

Dr. Ángel Concha López

Dra. Begoña Otero Alén

AUTORIZACIÓN DE LA TUTORA ACADÉMICA

Certifico que el presente trabajo titulado **“Dianas moleculares en cáncer de pulmón: estudio de la evolución de biomarcadores (EGFR y PI3K) asociada a tratamiento con inhibidores tirosina kinasa”** ha sido realizado por **Esmeralda Esteban Benjamín**, bajo mi tutoría en el Área de Biología Molecular del Servicio de Anatomía Patológica en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

Y autorizo la presentación del Trabajo Fin de Máster el cual se adecúa plenamente a los requisitos formales, metodológicos y de contenido que requiere un Trabajo Fin de Máster, de acuerdo con la normativa publicada por la Comisión Académica del Máster en Biotecnología Avanzada de la Universidad de A Coruña.

Tutora Académica del Trabajo Fin de Máster:

Dra. María del Carmen Arufe Gonda

RESUMEN

La necesidad de conocer y controlar con más efectividad el cáncer nos lleva a seguir buscando y experimentando con técnicas preventivas, diagnósticas y terapéuticas que sean más precisas y eficaces. La búsqueda de biomarcadores específicos son una nueva y prometedora aproximación. Alteraciones en el gen de EGFR en cáncer de pulmón no microcítico identifican una subpoblación de pacientes con unas características clínicas y de respuesta al tratamiento particulares. Existen mutaciones que derivan en un aumento de sensibilidad al tratamiento dirigido contra estas alteraciones genéticas, así como mutaciones que confieren resistencia a los mismos. Estos datos nos han llevado al planteamiento de este trabajo, estudiar nuevas dianas moleculares en cáncer de pulmón: EGFR y PI3K asociadas a la respuesta a ITKs. Mediante la detección de mutaciones en ambas dianas, tanto en biopsia tisular como líquida, hemos evaluado la presencia de mutaciones de EGFR de sensibilidad y resistencia a ITKs en ADN libre circulante en plasma de 49 pacientes con CPCNP a tratamiento oncológico. Estudiamos el papel de mutaciones de PKI3CA en cáncer de pulmón y su implicación en la resistencia adquirida al tratamiento con EGFR-ITKs; y analizamos el papel de la biopsia líquida como método de diagnóstico no invasivo.

ABSTRACT

The need to know and control cancer more effectively leads us to continue searching and experimenting with preventive, diagnostic and therapeutic techniques that are more precise and effective. The search for specific biomarkers is a new and promising approach. Alterations in the EGFR gene in non-small cell lung cancer identify a subpopulation of patients with particular clinical characteristics and response to treatment. There are mutations that lead to an increase in sensitivity to treatment directed against these genetic alterations, as well as mutations that confer resistance to them. These data have led us to the approach of this work, to study new molecular targets in lung cancer: EGFR and PI3K associated with the response to ITKs. By detecting mutations in both targets, both in tissue and fluid biopsies, we have evaluated the presence of EGFR mutations of sensitivity and resistance to ITKs in circulating free DNA in plasma of 49 patients with NSCLC under oncological treatment. We studied the role of PKI3CA mutations in lung cancer and their involvement in acquired resistance to treatment with EGFR-ITKs; and we analyzed the role of liquid biopsy as a non-invasive diagnostic method.

ABREVIATURAS

- (**ADN**) Ácido desoxirribonucleico
- (**ARN**) Ácido ribonucleico
- (**ALK**) Kinasa de linfoma anaplásico
- (**AKT**) Proteína kinasa B
- (**BDNF**) Brain Derived Neurotrophic Factor
- (**ctDNA**) ADN tumoral circulante.
- (**cfDNA**) ADN circulante libre.
- (**CPCP**) Carcinoma pulmonar de célula pequeña o carcinoma microcítico
- (**CPCNP**) Carcinoma pulmonar de célula no pequeña.
- (**CTCs**) Células tumorales circulantes
- (**DNA PBB**) ADN Binding Buffer
- (**DNA EB**) ADN Elution Buffer
- (**DNA TLB**) ADN Tissue Lysis Buffer
- (**DNA-PK**) Proteínas kinasas dependientes de ADN.
- (**D1-CDK4-RB**) Kinasas dependientes de ciclina D
- (**DTCs**) Células tumorales diseminadas
- (**EBUS**) Ultrasonido endobronquial
- (**EGFR**) Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- (**FFPE**) Muestras de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina)
- (**FDA**) Food and Drug Administration
- (**HPEA**) High Pure Extension Assembly.
- (**IVD**) Diagnóstico *in vitro*
- (**ITKs**) Inhibidores tirosina kinasa
- (**K2 EDTA**) K2-Ácido etilendiaminotetraacético
- (**MAPK**) Proteínas kinasas activadas por mitógenos
- (**nRTK**) non Tyrosine kinase receptor
- (**NGF**) Factor de crecimiento nervioso
- (**NT-3**) Neurotropin-3
- (**PI3K**) Fosfatidilinositol 3kinasa
- (**PAAF**) Punción Aspiración con Aguja Fina
- (**PTEN**) Phosphatase and tensin homolog
- (**PIP2**) Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
- (**PIP3**) Fosfatidilinositol -3, 4, 5-trifosfato
- (**PDGF**) Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- (**RTK**) Receptor tirosina kinasa
- (**TGFbeta**) Factor de crecimiento transformante beta
- (**Ruo**) Research use only
- (**SEAP-SEOM**) Sociedad Española de Anatomía Patología-Sociedad Española de Oncología Médica
- (**VEGF**) Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

1. Introducción

1.1 El Cáncer de pulmón

1.2 Tipos de cáncer de pulmón

1.3 Etiología del cáncer de pulmón

- Síntomas del cáncer de pulmón
- Causas del cáncer de pulmón
- Biología del cáncer de pulmón

1.4 Métodos diagnósticos del cáncer de pulmón

1.5 Tratamiento del CPCNP

1.6 EGFR

1.7 PI3K

1.8 Biopsia líquida

2. Hipótesis

2.1 Objetivo General

2.2 Objetivos Específicos

3. Materiales y Métodos

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones

6. Referencias Bibliográficas

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Cáncer de pulmón

El término cáncer de pulmón hace referencia a todo proceso maligno que se origina inicialmente en el pulmón (SEO, 2014). El cáncer de pulmón es el segundo tumor más frecuente en hombres y en mujeres, por detrás del cáncer de próstata y de mama, respectivamente. Sin embargo, supone la primera causa de muerte por cáncer en el mundo en ambos sexos. Su incidencia ha venido marcada por su estrecha relación con el tabaquismo. En torno al 85% de los cánceres de pulmón están causados por el tabaco. El humo del tabaco contiene una multitud de agentes tóxicos que provocan daños en el material genético de las células que recubren las vías respiratorias. Estos daños genéticos o mutaciones causadas por el humo del tabaco son los responsables, en última instancia, de que una célula normal se transforme en una célula tumoral con capacidad ilimitada para dividirse y originar un cáncer de pulmón (SEO, 2014). Otros agentes como el radón, humo de combustibles o contaminantes ocupacionales son los responsables de que haya una tendencia hacia una mayor incidencia en mujeres no fumadoras.

El cáncer de pulmón es una patología con mal pronóstico a pesar de los avances en el conocimiento de la enfermedad y en la aprobación de nuevos tratamientos en los últimos años. Una de las mayores revoluciones en el tratamiento del cáncer en general y del cáncer de pulmón en particular, ha sido la identificación de alteraciones moleculares “*drivers*” (mutaciones, amplificaciones génicas) que son responsables de la carcinogénesis (Lema, 2010).

1.2 Tipos de Cáncer de Pulmón

En términos histológicos existen dos grandes grupos de cánceres de pulmón:

- Carcinoma pulmonar de célula pequeña o carcinoma microcítico (CPCP). Supone entre un 10-15% del total de cánceres de pulmón y su incidencia está disminuyendo de forma paulatina.
- Carcinoma pulmonar de célula no pequeña (CPCNP). Dentro de este subgrupo se encuentran distintas categorías (WHO, 2015):
 - Adenocarcinoma.
 - Carcinoma escamoso.

- Carcinoma de pulmón de célula grande.
- Otros: sarcomatoide, pleomórfico...
- De categoría Inclasificable.

1.3 Etiología de Cáncer Pulmón

Síntomas del Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón generalmente no presenta signos ni síntomas en los estadios más tempranos. Las evidencias de la patología se manifiestan normalmente cuando la enfermedad está avanzada. Además, esta sintomatología es muy variable dependiendo de distintos factores: tamaño y localización del tumor, tiempo de evolución, presencia de infiltración de estructuras anatómicas adyacentes, etc. Aún así, los síntomas más frecuentes suelen ser: dificultad respiratoria, tos, hemoptisis, adelgazamiento o pérdida de peso, disnea, dolor torácico o expectoración (Tausa, 2011).

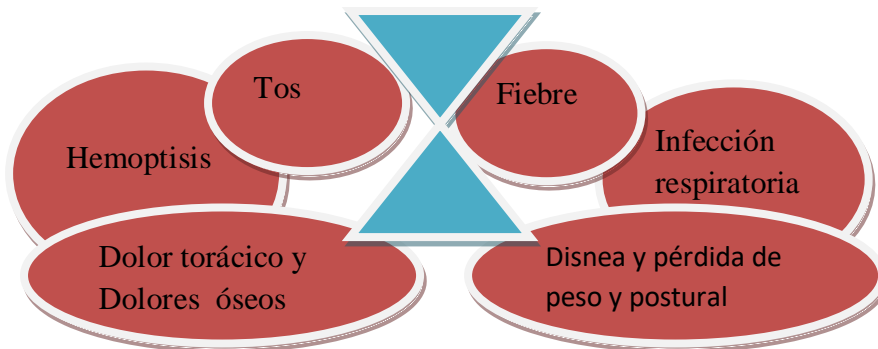


Figura: 1 Síntomas más frecuentes de cáncer de pulmón. Fuente: elaboración propia.

Causas del cáncer de pulmón

Las principales causas del cáncer de pulmón son el tabaco (causa principal), los efectos del radón, exposición a carcinógenos y la predisposición genética. Otros agentes causantes son: inflamación recurrente, exposición a minerales, exceso o deficiencias de vitaminas o contaminación del aire (Minna, 2004).

Biología del cáncer de pulmón

El cáncer es una enfermedad genética compleja en la que concurren una serie de procesos progresivos hasta dar lugar a la transformación definitiva de la célula normal a la célula tumoral. La característica fundamental de la célula tumoral es que pierde la función habitual que realizan las células normales de un determinado órgano, y además,

se divide de forma progresiva, acelerada y sin límite, al haber perdido una de las características que tienen las células normales, que es la de la muerte celular programada. Conforme el tumor va progresando, las células neoplásicas se van seleccionando y adquiriendo alteraciones genómicas que aumentan su potencial maligno, empezando a surgir otros procesos: capacidad invasiva que da lugar a la extensión local o loco-regional; y la diseminación metastásica mediante la infiltración de los microvasos linfáticos y sanguíneos, que es lo que finalmente producirá el transporte a través del torrente linfático, dando lugar a la invasión de ganglios linfáticos o bien del torrente sanguíneo y colonización ulterior de otros órganos (metástasis a distancia) (SEO, 2017).

El pulmón es una estructura altamente especializada expuesta al entorno externo a través del proceso respiratorio. Las células normales que se transforman en tumorales se encuentran en el epitelio que reviste todo el árbol respiratorio desde la tráquea hasta el bronquiolo terminal y los alveolos pulmonares (Blandin, 2017). Las vías respiratorias conductoras están compuestas por un epitelio pseudoestratificado complejo compuesto predominantemente de células ciliadas, pero también contiene poblaciones de células secretoras y células de reserva que pueden servir como células progenitoras después de una lesión (Hogan, 2014). En contraste, los alveolos están revestidos con solo dos tipos celulares de neumocitos: células epiteliales alveolares tipo I, que representan aproximadamente el 90% de la cobertura alveolar y son responsables de la interacción capilar, y células epiteliales alveolares cuboidales tipo II, que son responsables de secretar lípidos y proteínas que reducen la tensión superficial durante la ventilación, y también pueden actuar como precursores de células tipo I durante la reparación alveolar (Barkauskas, 2013). Las células de reserva serían las células susceptibles de sufrir la transformación neoplásica debido a sus características pluripotenciales. Aunque el origen del carcinoma microcítico aún no se ha identificado formalmente, distintos datos apuntan a las células neuroendocrinas del tracto respiratorio como punto de partida para el CPCP (Karachaliou, 2016). En el caso del CPCNP, el origen en los adenocarcinomas estaría en las células epiteliales alveolares de tipo II, mientras que la célula de origen para el carcinoma de células escamosas se originaría mediante una metaplasia escamosa en el árbol bronquial medial (Hanna, 2013).

El proceso del cáncer de pulmón es similar al de otros tipos de cáncer, y al igual que ellos, presenta múltiples cambios en la secuencia del ADN (mutaciones) y anomalías en

la expresión genética (alteraciones epigenéticas) que generalmente se inician en una célula precursora neoplásica. Si bien es conocido que la inflamación produce transformación neoplásica por diferentes vías moleculares, las células neoplásicas inducen a su vez una respuesta inmunitaria regulada por mediadores inflamatorios. (Crusz, 2015). Todas estas anomalías juntas resultan en la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores y reparadores de ADN. La alteración genética más frecuente en cáncer de pulmón es la mutación de EGFR, que permite a los tumores ser independientes de las señales de supervivencia transducidas por otros genes. También están afectadas otras vías con receptores y transductores de señales bioquímicas, genes supresores de tumores (como P53), la vía p16INK4a-Ciclina D1-CDK4-RB, la señalización del TGFbeta, la delección de 3p y genes reparadores del ADN, así como la vía de K-RAS, ALK, ROS-1 o HER-2 (Amorín, 2013).

1.4 Métodos Diagnósticos de cáncer de pulmón

El diagnóstico del cáncer de pulmón se realiza mediante una o diversas técnicas como: broncoscopia, diversas técnicas de imagen: radiografías, tomografía axial computarizada, resonancia magnética, o gammagrafía ósea; y mediante técnicas anatomo-patológicas como citologías, PAAF, EBUS o biopsias, siendo imprescindibles las técnicas inmunohistoquímicas para determinar el tipo histológico tumoral de forma concluyente. Los biomarcadores que se estudian para determinar la patología son:

Rutinarias

- Determinación de mutaciones de EGFR
- Determinación de reordenamientos de ALK
- Determinación de translocación de ROS-1

En investigación Experimental

- Mutaciones de K-Ras
- Mutaciones de BRAF
- Translocaciones de RET
- Amplificación de MET
- Mutación de HER-2
- Translocaciones de NRTKs
- Otros métodos de determinación de las alteraciones de EGFR
- Otras alteraciones en estudio

- Biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento
- Biomarcadores predictivos de respuesta a la inmunoterapia
- Nuevas técnicas de detección de alteraciones genéticas (De Castro, 2016).

1.5 Tratamiento del CPCNP

El tratamiento del cáncer de pulmón depende de la fase de la enfermedad en la cual ésta es diagnosticada. El estadio del cáncer de pulmón se basa en la clasificación TNM . En esta, la T hace referencia al tamaño y localización del tumor primario pulmonar, N a la extensión de la afectación ganglionar o adenopática y M a la presencia de metástasis. A continuación detallamos cada estadio y el tratamiento general del carcinoma pulmonar de célula no pequeña en función del mismo según la 7ª edición de la TNM, según la cual se han diagnosticado los pacientes del estudio, aunque la 8ª edición está vigente desde el presente año (7ª ed. TNM, 2010).

- I. Entre un 5-15% de los pacientes son diagnosticados en esta situación. El tumor está localizado solo en el pulmón. El tratamiento fundamental es intentar una cirugía que permita la extirpación completa del tumor junto con los ganglios o adenopatías de la zona de entrada pulmonar (hilio) y el mediastino (parte medial del tórax localizada entre ambos pulmones) del mismo lado. Si por las características del paciente la cirugía no se considera oportuna, se puede valorar un tratamiento con radioterapia.
- II. El tumor es de mayor tamaño que en el estadio I y/o puede afectar a estructuras que rodean el pulmón o algún bronquio o ganglio en la zona hilar. Entre un 5-15% de pacientes tienen este estadio al diagnóstico. El planteamiento es el mismo que para el estadio I. A veces es necesario el uso de quimioterapia o radioterapia antes o después de la cirugía para garantizar un mayor éxito de la misma y/o disminuir el riesgo de recaída o recidiva de la enfermedad.
- III. El tumor es de mayor tamaño y puede afectar a estructuras fuera de la cavidad pulmonar como tráquea, corazón, grandes vasos y ganglios en mediastino o zona supraclavicular. Supone un 20-30% de los nuevos pacientes con CPCNP. En esta situación cada caso se trata de forma individualizada pues suele ser preciso combinar cirugía, quimioterapia y/o radioterapia en algún momento del tratamiento.

- IV. El tumor, independientemente del tamaño, localización o ganglios afectos, afecta a estructuras fuera del pulmón en que se originó (cavidad pleural, pulmón opuesto, pericardio o cualquier otro órgano o estructura fuera del tórax como hueso, cerebro, glándulas suprarrenales). La mayoría de los pacientes, hasta un 50%, son diagnosticados en este estadio. El tratamiento fundamental se basa en quimioterapia o terapias dirigidas. La radioterapia o cirugía pueden tener un papel, fundamentalmente, para la solución de problemas localizados.

Como se acaba de comentar, de forma general en los estadios III-IV, el tratamiento debe ser sistémico y consiste fundamentalmente en el uso de tratamientos basados en agentes quimioterápicos (agentes de platino en combinación con un segundo agente) (SEO,2014). Los diferentes estudios indican que la mayoría de las posibles combinaciones de quimioterápicos parecen tener una eficacia similar. En ocasiones, el médico puede considerar asociar a esos agentes un agente biológico u ofrecer la participación en algún ensayo clínico (SEO, 2014). El objetivo de estos tratamientos es, no sólo prolongar la supervivencia del paciente, sino mejorar su calidad de vida y retrasar o evitar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con CPCNP finalmente la progresión ocurre. En este momento también existen tratamientos que han demostrado aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Los avances en técnicas diagnósticas y un mejor conocimiento de las bases moleculares del cáncer, han permitido identificar 2 tipos de cáncer de pulmón con características particulares: tumores con mutaciones activadoras del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y con translocaciones de la kinasa del linfoma anaplasico (ALK) y ROS-1. Los tipos CPCNP avanzado portadores de mutaciones de EGFR o reordenamientos de ALK han demostrado un comportamiento y una evolución clínica diferente al CPCNP convencional, una respuesta elevada a los inhibidores tirosina kinasa (ITKs) específicos que producen un aumento de la supervivencia libre de progresión y, posiblemente, un aumento de la supervivencia global. Por tanto, según las guías de la SEAP-SEOM, se recomienda la realización del estudio de mutaciones de EGFR y los reordenamientos de ALK y ROS-1 a todos los pacientes con CPCNP en estado avanzado en los que se pueda sospechar su existencia. Fundamentalmente estos pacientes deben ser todos aquellos que tengan un carcinoma de histología no escamosa o los que no hayan sido fumadores, con independencia de que pueda hacerse a cualquier

paciente con CPCNP en los que se estime necesario el estudio genético para valorar potenciales tratamientos dirigidos o adoptar una decisión terapéutica (Moreira, 2010).

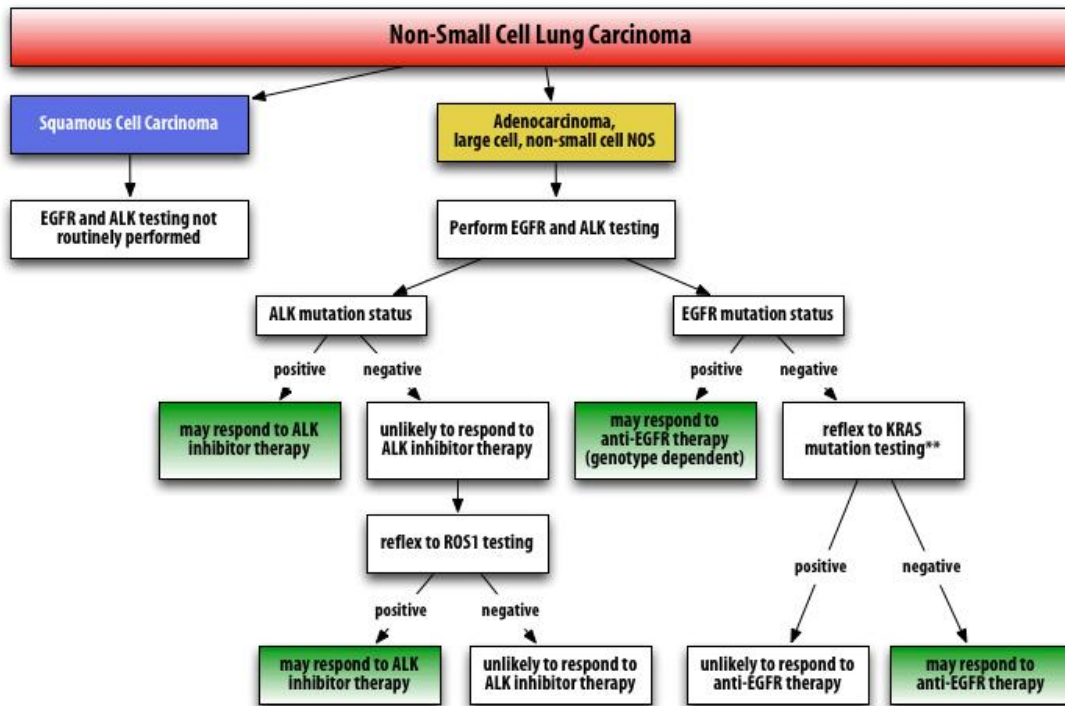


Figura 2. Las pruebas de las mutaciones EGFR, ALK, KRAS y ROS1 se pueden ordenar por separado en el momento de la resección. Alternativamente, dado que todas estas mutaciones son esencialmente mutuamente excluyentes, las pruebas de KRAS y ROS1 a menudo se ordenan como reflejo, si EGFR o ALK1 son negativas, respectivamente. Imagen extraída de: http://www.apmggroup.net/innovation/molecular_testing/Lung_Pathways/lung.html

1.6 EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB) pertenece a una súper familia de receptores localizados en la membrana plasmática que presentan actividad tirosina kinasa intrínseca. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue identificado en 1962 por Stanley Cohen, mientras que el receptor fue purificado y caracterizado por el mismo autor en 1980. Fue el primer receptor tirosina quinasa en descubrirse y la mayor parte de los mecanismos de activación de este tipo de receptores fueron establecidos a partir del EGFR (Moreira, 2010). La familia del receptor, también conocida como HER, consta de 4 miembros, el HER1 (EGFR), HER2, HER3 y HER4, y todos son receptores de membrana con un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina kinasa. Todos están relacionados con distintos procesos oncogénicos ya que su sobreexpresión puede generar el fenotipo oncológico,

específicamente aumentando la proliferación celular y la evasión de la apoptosis, entre otros (Tausa, 2011).

La señalización a través del EGFR es crucial en el desarrollo embrionario, específicamente en el desarrollo epitelial, la proliferación y la organogénesis. Sin embargo, su importancia no se limita a estas funciones, ya que el EGFR tiene una función fundamental en la transformación y progresión tumoral regulando procesos como la proliferación, migración, invasión, angiogénesis y apoptosis (Lema, 2010). Ver Figura 3.

El EGFR desencadena dos vías de señalización principales: el eje *RAS-RAF-MAPK* involucrado primordialmente en la proliferación celular, y la vía *PI3K-PTEN-AKT* involucrada en la supervivencia celular, migración e invasión (Lema, 2010).

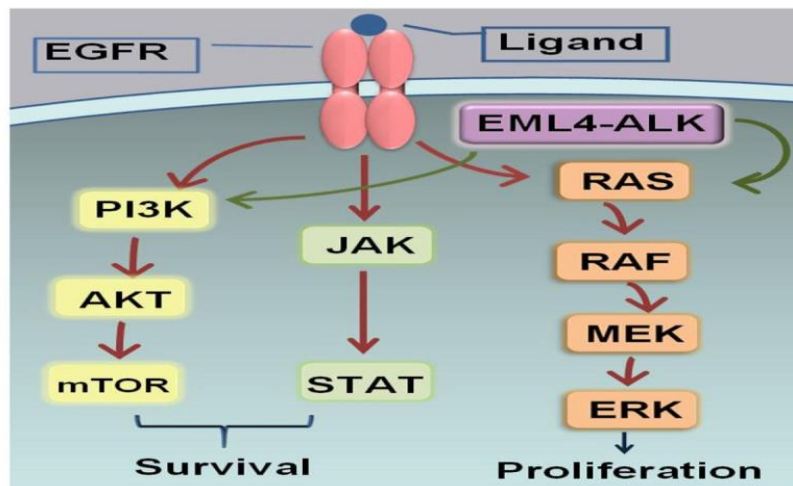


Figura: 3 Vías de señalización del EGFR. Figura extraída de: Personalized Targeted Therapy for Lung Cancer – Scientific. (2012)

1.7 PI3K

La familia de PI3K constituye un gran grupo de proteínas serina/treonina kinasas, que incluyen las fosfatidilinositol kinasa o proteínas kinasas dependientes de ADN (DNA-PK (Lema, 2010; Minna, 2004; Moreira, 2010).

El PI3K es una enzima con 2 subunidades: una reguladora denominada p85 y otra catalítica denominada p110. La importancia de la PI3K estriba en que diversas señales que estimulan sus RTKs la utilizan para amplificar su ruta de señalización intracelular, como: BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), EGF, Ephrinas, FGF, IGF-1, IGF-2, NGF, NT-3 (Neurotrophin-3), NT-4/5, PDGF, VEGF. Además, hay una estrecha

interacción de la PI3K con el Ras pues muchas de los estímulos que activan PI3K también activan el Ras, y el Ras estimula la actividad de la PI3K (Karachaliou, 2016).

La activación de la ruta sucede cuando se fosforilan las tirosinas del receptor que se unen a la PI3K por los dominios SH2 de la subunidad reguladora p85 cerca de la membrana celular. La actividad kinasa de la subunidad p110 transforma PIP2 en PIP3. La activación independiente del Ras (y otras proteínas adaptadoras como la $\beta\gamma$) aumenta estabilidad de la conformación activa de la p110 (Karachaliou, 2016). (Figura 4)

Esta vía es estimulada fisiológicamente como consecuencia de muchos factores de crecimiento y factores reguladores. Varias alteraciones genéticas como amplificación, mutación y reordenamientos cromosómicos pueden comprometer la vía PI3K, generando su activación constitutiva. En diferentes tipos de cáncer se han encontrado evidencias de estas modificaciones genéticas deletéreas (Moreira, 2010). La activación anormal de la vía PI3K resulta en alteración de los mecanismos de control del crecimiento y la supervivencia celular, lo que favorece el crecimiento competitivo, la capacidad metastásica y, frecuentemente, una mayor resistencia a los tratamientos (Moreira, 2010).

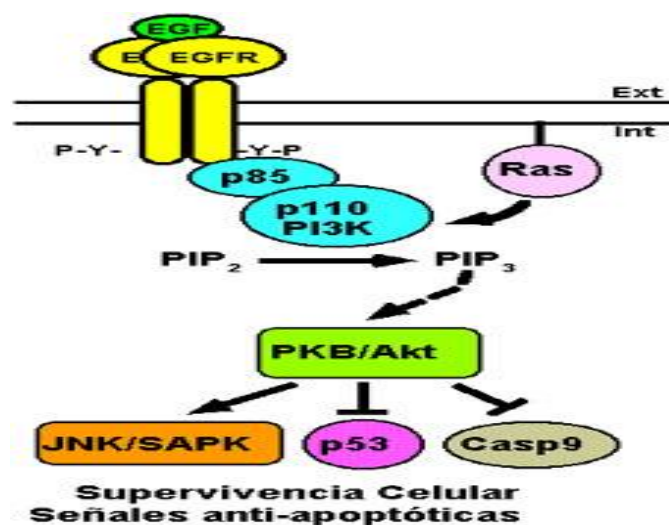


Figura 4. Ruta de señalización de EGFR/PI3K. Figura extraída de: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeCinco/Articulos/BiologiaCelular/rutasde.htm> (Villalobo).

1.8 Biopsia líquida

La biopsia líquida consiste en la detección y caracterización de células tumorales circulantes en la sangre, así como de ácidos nucleicos, proteínas o exosomas asociados a ellas. Ofrece la oportunidad de investigar el tumor primario y, simultáneamente, la metástasis. A diferencia de las biopsias tradicionales que requieren una cirugía u otros

procedimientos invasivos, la biopsia líquida se realiza a través de la toma de muestras de sangre. Más importante aún, la biopsia líquida proporciona una visión dinámica del tumor, ya que puede realizarse en los sucesivos tiempos de evolución de la enfermedad tumoral, permitiendo una monitorización seriada de su curso, una definición rápida de sensibilidad o resistencia a los tratamientos y, finalmente, un diagnóstico precoz de las recaídas (García, 2017).

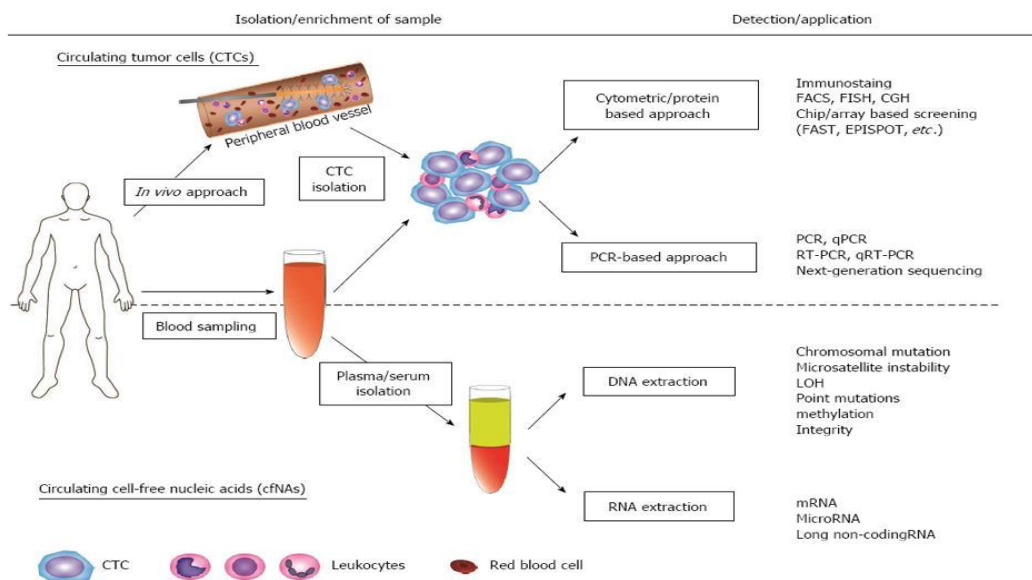


Figura: 5. Proceso metodológico de la biopsia líquida. Figura extraída de: Liquid biopsy of gastric cancer patients: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids (Tsujiura, 2014).

El término biopsia líquida en oncología engloba dos conceptos, la detección de células tumorales circulantes (CTCs) liberadas al torrente sanguíneo desde tumores primarios o metástasis y la detección de DNA tumoral circulante (ctDNA) procedente de células tumorales apoptóticas. La presencia de ctDNA fue descrita en 1977 no obstante, debido a su fragmentación y la baja de proporción de ctDNA presente en plasma, su utilidad clínica se ha visto íntimamente ligada a la aparición de nuevas tecnologías de alta sensibilidad como la PCR cuantitativa alelo-específica, la PCR digital, BEAMing y técnicas secuenciación masiva. Ver Figura 5 (Román, 2017).

Estas nuevas tecnologías abren un amplio abanico de aplicaciones clínicas para el estudio de ctDNA. (Ver Figura 6)

- **Caracterización de tumores en pacientes donde no es posible obtener una biopsia.** Numerosos estudios han demostrado una alta correlación entre la detección de mutaciones puntuales clínicamente relevantes, como KRAS o

EGFR, en tumores y plasma de pacientes oncológicos, especialmente en estadios avanzados o metastásicos. La Food and Drug Administration (FDA) aprobó en junio del 2016 el uso de un test de PCR cuantitativa (cobas EGFR Mutation Test v2, Roche) para la detección de mutaciones de EGFR en plasma de pacientes con CPCNP que puedan así beneficiarse del uso de inhibidores específicos como Erlotinib.

- **Aparición de resistencias al tratamiento.** La detección de mutaciones de resistencia en el plasma de pacientes en tratamiento con quimioterapia, incluso antes de que sea visible su progresión radiológicamente, puede permitir un cambio terapéutico con evidente beneficio clínico y evitar toxicidades innecesarias. La monitorización de la cantidad de ctDNA durante el tratamiento puede a su vez ser un indicador de respuesta.
- **Factor pronóstico.** Aunque los niveles de ctDNA varían dependiendo del tipo de tumor, su velocidad de crecimiento y apoptosis y su vascularización, existe una correlación entre la cantidad de ctDNA y el estadio (Roman, 2017).

Por lo tanto, la biopsia líquida es un método útil para:

- Detección temprana de mutaciones asociada a respuestas a tratamiento.
- Detecciones de resistencia a los fármacos administrados.
- Ver la heterogeneidad del tumor; evolución de los diferentes clones.

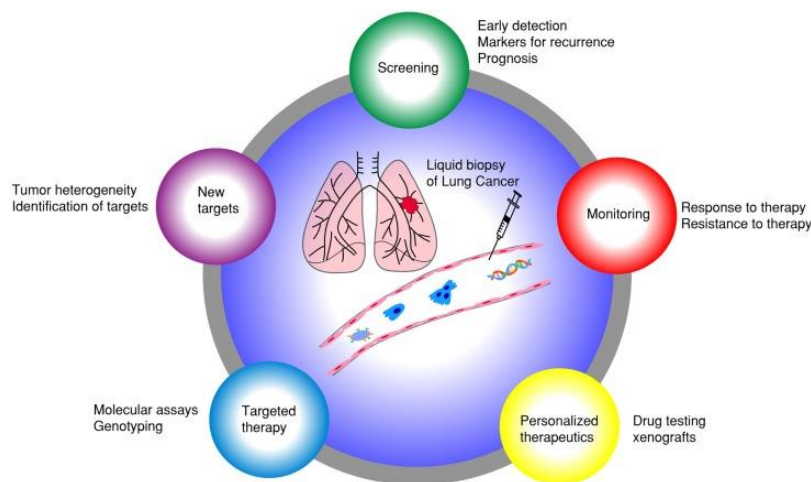


Figura 6. CTCs en cáncer de pulmón. Figura extraída de: Current status of CTCs as liquid biopsy in lung cancer and future directions. *Frontiers in oncology* (Zhang, 2015).

2. HIPÓTESIS

En el cáncer de pulmón no microcítico, mutaciones en el receptor tirosina kinasa EGFR identifican una subpoblación de pacientes con unas características clínicas y de respuesta al tratamiento diferente de aquellos que no las presentan. Existen mutaciones que derivan en un aumento de sensibilidad al tratamiento dirigido contra estas alteraciones génicas, así como mutaciones que confieren resistencia a los mismos. La determinación de las mutaciones en este gen implica pues, cambios en la actitud terapéutica de los pacientes con cáncer de pulmón en la práctica clínica habitual. PI3K y Akt son parte importante de la vía de señalización *downstream* de EGFR. La vía PI3K/AKT es importante en la oncogénesis y la progresión del cáncer de pulmón. Además, mutaciones en PIK3CA, a menudo coexisten con otras mutaciones en EGFR o KRAS y parecen tener una correlación negativa con la supervivencia en pacientes con CPCNP y relacionarse con la resistencia a inhibidores tirosin-kinasa. El hecho de que los pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados y mutados para el gen EGFR muestren progresión al tratamiento con ITKs en un tiempo variable, así como que la interacción entre las mutaciones PIK3CA y EGFR todavía no sea clara, nos lleva a plantearnos los objetivos que se detallan a continuación.

2.1 Objetivos generales:

Estudiar la asociación entre mutaciones de EGFR y PI3KCA en cáncer de pulmón y su relación con la respuesta a tratamiento con inhibidores tirosina kinasa.

2.2 Objetivos específicos:

- Analizar la presencia de mutaciones de EGFR en ADN libre circulante (cfDNA) en el plasma de pacientes con cáncer de pulmón a tratamiento oncológico.
- Evaluar el papel de la mutación T790M en la resistencia a los fármacos inhibidores tirosina kinasa.
- Determinar el papel de mutaciones de PIK3CA en CPCNP y su papel en la resistencia adquirida al tratamiento con EGFR-ITKs.
- Análisis secundario de la biopsia líquida como método de diagnóstico no invasivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

MUESTRAS HUMANAS. El protocolo de estudio de muestras humanas fue aprobado por el comité ético local (CAIC Galicia) y llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Las muestras fueron obtenidas gracias al Biobanco de A Coruña. Se utilizaron muestras de plasma y biopsias de 49 pacientes con cáncer de pulmón la mayoría en estadios avanzados (estadios III-IV). Todos los pacientes analizados presentaban CPCNP. Se analizaron 43 adenocarcinomas, 3 carcinomas escamosos y 3 de tipo histológico desconocido. La estadificación del tumor se evaluó según la séptima edición de la clasificación TNM del American Joint Committee on Cancer de 2010. Las muestras de tejido patológico fueron de carcinomas de pulmón ubicados en pleura, tejido bronquial, transbronquial y alguna muestra metastásica.

MÉTODOS

PROCESADO PLASMA

Se toman dos tubos de sangre de K2 EDTA (5 mL c/u) de los pacientes para la extracción de plasma. La muestra debe centrifugarse durante las 4 horas posteriores a la extracción de sangre. La muestra sanguínea se centrifuga durante 20 minutos a 4,000 rpm a temperatura ambiente. El volumen recomendado de plasma obtenido es de 4 mL, siendo 2 mL el mínimo necesario. El plasma resultante se traspasa a un tubo del volumen adecuado y debe congelarse a -20 °C de inmediato una vez obtenido.

EXTRACCIÓN ADN MUESTRAS PLASMA

La extracción de ADN de muestras plasmáticas se realiza con el kit comercial Cobas cfDNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, DE). Se descongela el plasma a temperatura ambiente. Se procesa de inmediato una vez descongelado. Se añaden 250 ul de proteínasa K (PK) + 2 ml de DNA Binding Buffer (DNA PBB) a cada tubo. Se homogeniza mediante inversión 5 veces y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añaden 500 ul de isopropanol y se homogeneiza la mezcla. Se transfiere todo el volumen a columnas de 50 ml HPEA (High Pure Extension Assembly) y se centrifugan a 4.000 g durante 5 minutos. Se descarta el contenedor y se continúa el proceso con la columna interior. Se añaden 500 ul de Wash Buffer I y se centrifuga a 8.000 g durante 1 minuto. Se descarta el tubo de desecho y

se repite el proceso con el Wash Buffer II. Posteriormente se realiza una centrifugación de 16.000-20.000 g durante 1 minuto y se añaden 100 ul de DNA Elution Buffer (DNA EB) en el centro de la columna. Se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifuga la muestra a 8.000 g durante 1 minuto para recoger el ADN extraído. La muestra eluída no se cuantifica, ya que se utiliza todo el volumen para la determinación de mutaciones de EGFR.

EXTRACCION ADN MUESTRAS FFPE (Muestras de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina)

DESPARAFINACIÓN DE TEJIDO

Antes de proceder a la extracción del ADN hay que desparafinar las muestras. El proceso es diferente si las muestras están o no montadas en portaobjetos. En muestras montadas se sumergen los cristales en xileno durante 5 min. Posteriormente se incuban en etanol absoluto otros 5 min y se dejan secar completamente para macrodisecionar el tejido mediante raspado con cuchilla estéril. En muestras no montadas, se hacen diversos cortes de 5 micras de tejido y se sumergen en xileno durante 5 min. Se añaden 500 ul de etanol absoluto y se incuban otros 5 min. Se centrifugan los tubos a 16.000-20.000 g durante 2 minutos y lavamos el pellet con 1 ml de etanol absoluto. Se centrifuga la muestra de nuevo a 16.000-20.000 g durante 2 minutos y se deja secar el pellet durante 10 min a 56°C.

EXTRACCIÓN ADN

La extracción de ADN de muestras parafinadas se realizó con el kit comercial Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, DE). Una vez realizado el proceso de desparafinación, se les añade a las muestras 180 ul de DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB) + 70 ul de PK y se incuban a 56°C durante 1 hora. Se vortean las muestras y se incuban de nuevo a 90°C durante una hora. Se atemperan a TA y se añaden 200 ul de DNA Paraffin Binding Buffer (DNA PBB) homogenizando la mezcla. Se incuban a temperatura ambiente 10 minutos y se añaden 100 ul de isopropanol. Se añade toda la mezcla a la columna de extracción y se centrifuga a 8.000 g durante 1 minuto. Se descarta el tubo de desecho y se añaden 500 ul de Wash Buffer I centrifugando a 8.000 g durante 1 minuto. Se descarta el tubo de desecho y se repite el proceso con el Wash Buffer II. Posteriormente se realiza una centrifugación de 16.000-20.000 g durante 1 minuto y se añaden 100 ul de DNA Elution Buffer (DNA EB) en el

centro de la columna. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó la muestra a 8.000 g durante 1 minuto para recoger el ADN extraído.

CUANTIFICACIÓN ADN

Se cuantifica el ADN eluído mediante un NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Lafayette, CO, USA) según el protocolo del fabricante. Se realiza el blanco del equipo con el DNA Elution Buffer (DNA EB) y se miden las muestras dos veces.

TEST MUTACIÓN EGFR

El análisis mutacional de EGFR se determinó mediante el kit comercial Cobas EGFR Mutation Test v2 (Roche Diagnostics, Mannheim, DE), que es válido tanto para muestras FFPE como para biopsia líquida en diagnóstico (certificado IVD). Las muestras de plasma no se diluyen, pero las FFPE se diluyen dependiendo de su concentración, siendo necesaria una concentración mínima de 2 ng/ul. Para la PCR en tiempo real se siguió el protocolo del fabricante. Se preparan las mezclas de reacción para el número de muestras a procesar (+1 reacción en exceso) + 2 controles, usando la tabla siguiente:

		N de muestras (2 controles +1 en exceso)									
Componente	Vol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
EGFR MIX 1, 2 o 3	20 ul	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 ul	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Total	25 ul	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

Para la preparación de la placa se añaden 25 ul de la mezcla de reacción a cada pocillo + 25 ul de Control Mutado/Control Negativo/Muestra según corresponda; homogenizando la mezcla con cuidado. La amplificación y detección se realiza en un termociclador cobas z 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, DE).

Detección de mutaciones por PCR a tiempo real cobas® Roche

- Detecta 41 mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 de EGFR
- A partir de un corte de 5 µm con > 10% de células tumorales (180 ng)
- Sensibilidad 5%
- Análisis automático e informe.



TEST MUTACIÓN PIK3CA

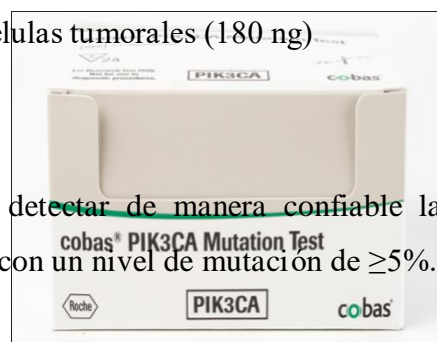
El análisis mutacional de PIK3CA se determinó mediante el kit comercial Cobas PIK3CA Mutation Test (Roche Diagnostics, Mannheim, DE), válido solamente como método experimental en muestras FFPE (certificado RUO). Las muestras se diluyen dependiendo de su concentración, siendo necesaria una concentración mínima de 2 ng/ul. Para la PCR en tiempo real se siguió el protocolo del fabricante. Se preparan las mezclas de reacción para el número de muestras a procesar (+1 reacción en exceso) + 2 controles, usando la tabla siguiente:

		N de muestras (2 controles +1 en exceso)									
Componente	Vol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PIK3CA MIX 1, 2 o 3	20 ul	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	7 ul	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Total	27 ul	108	135	162	189	216	243	270	297	324	351

Para la preparación de la placa se añaden 25 ul de la mezcla de reacción a cada pocillo + 25 ul de Control Mutado/Control Negativo/Muestra según corresponda; homogenizando la mezcla con cuidado. La amplificación y detección se realiza en un termociclador cobas z 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, DE).

DetECCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL DE MUTACIONES DE PIK3CA COBAS® ROCHE

- Detecta mutaciones en los exones 1, 4, 7, 9 y 20 de PI3K.
- A partir de un corte de 5 µm con > 10% de células tumorales (180 ng)
- Sensibilidad $\geq 5\%$.
- Análisis automático e informe.
- Validada en muestras de FFPE y puede detectar de manera confiable las mutaciones de PIK3CA en los exones 9 y 20 con un nivel de mutación de $\geq 5\%$.
- Uso RUO Exclusivamente.



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha utilizado estadística descriptiva para la caracterización de los datos clínicos y patológicos de los pacientes del estudio. Los diagramas de Venn se utilizaron para la comparación de las distintas mutaciones detectadas. La fuerza de la relación entre los diferentes parámetros del estudio se estimó mediante el coeficiente de correlación de Pearson tras pasar la prueba de normalidad Shapiro-Wilk.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

Hemos estudiado 49 casos de cáncer de pulmón no microcítico pendientes de estudio molecular para tratamiento con ITKs. Los pacientes tenían edades comprendidas entre los 36-86 años (media de edad de 68 años), de los cuales 26 eran mujeres y 23 varones. En cuanto a consumo de tabaco, 21 eran no fumadores (5 hombres, 16 mujeres), 9 eran fumadores (6 hombres, 3 mujeres), 14 ex-fumadores (8 hombres, 6 mujeres) y 5 pacientes tenían hábitos desconocidos. En cuanto a tipo histológico, 43 pacientes presentaban neoplasias de tipo adenocarcinoma (20 hombres, 24 mujeres), 3 eran de tipo carcinoma escamoso (2 hombres, 1 mujeres) y 3 CPCNP de tipo histológico desconocido (2 hombres, 1 mujeres). Los pacientes presentaban estadios comprendidos entre IB-IV, aunque la mayoría presentaban estadios avanzados. De todos ellos, 13 ya habían fallecido en el momento de redactar el estudio. Las características de todos los pacientes estudiados están resumidas en las Tablas 1 y 2.

Tabla1. Características de los 49 pacientes incluidos en el estudio.				
Sexo		M(23)	F(26)	Total 49
Edad		36-84	49-86	
Fumadores		Si 9	Ex 14	No 21 Otros 5
Tipo de Tumor	Adenocarcinoma 43	Carcinoma Escamoso 3	CPCNP sin Clasificar 3	
Estadios Tumor	I-II 2	III 3	IV 32	Sin Definir 13

MUTACIONES DE EGFR DETECTADAS EN TEJIDO EN COHORTE DE PACIENTES

Hicimos un estudio retrospectivo de las mutaciones de EGFR iniciales detectadas en tejido. Todos los pacientes presentaban resultados de estudios mutacionales tisulares previos de EGFR excepto 17 pacientes; en los cuales los resultados fueron inválidos, el material era insuficiente o no había material tisular disponible para el análisis.

Las mutaciones se detectaron con el kit cobas EGFR Mutation Test v2 aprobado por la FDA para diagnóstico, valido tanto para muestras FFPE como para muestras plasmáticas. Los resultados y el material tisular utilizado se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los pacientes estudiados							
n°	Sexo	Edad	Mutación Inicial	TAB	Tipo de Tumor	Est	Tipo de muestra
1	F	68	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Pleural
2	F	57	Mat insuf.	ex	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Bronquial
3	M	69	Mat insuf.	ex	Adenocarcinoma	-	PAAF Mediastino
4	F	64	Mat insuf.	ex	Adenocarcinoma	-	Citología BAL
5	F	61	Del ex.19	si	Adenocarcinoma	IV	BAG Percutanea Mtx
6	F	70	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Biopsia intraoperatoria
7	M	71	Del ex.19	no	Carcinoma Escamoso	-	Biopsia transbronquial
8	F	86	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Bloque Celular EBUS
9	M	73	L858R	si	Adenocarcinoma	IIIA	Biopsia Transbronquial
10	F	72	Mat insuf.	no	CPCNP	-	Biopsia Bronquial
11	F	48	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	-	Biopsia Bronquial
12	F	51	No Mat.	sí	Adenocarcinoma	III	Muestra No Especificada
13	F	61	Del ex.19	no	Carcinoma Escamoso	IV	Biopsia Pleural
14	F	71	No Mat.		Adenocarcinoma	-	Muestra No Especificada
15	M	84	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma	-	BAG Percutánea Mtx
16	M	62	Mat insuf.	sí	Adenocarcinoma	-	Biopsia transbronquial
17	F	56	S768I, L858R	ex	Adenocarcinoma	IV	PAAF
18	F	49	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma	IV	Biopsia pleural
19	M	71	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma	IV	Bloque Celular de Líquido Pleural
20	F	62	No Mat.	no	Adenocarcinoma	IIB	Biopsia transbronquial
21	F	65	L858R	no	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Bronquial
22	F	68	Mat insuf.	no	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Bronquial
23	M	60	No Mat.	-	Adenocarcinoma	IB	-
24	M	83	L858R	-	Adenocarcinoma	IV	Mtx Ósea
25	F	70	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Pleural
26	F	53	Mut no Det.	ex	Adenocarcinoma	IV	Biopsia bronquial
27	M	75	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Mtx vértebra
28	F	64	Mat insuf.	no	Adenocarcinoma	IV	Bloque Bronquial
29	F	60	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Citología de EBUS
30	M	59	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Trans- y Bronquial
31	M	57	L858R	ex	Adenocarcinoma	IV	Citología de Líquido Pleural
32	M	52	G719X	sí	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Bronquial
33	F	71	No Mat.	si	Adenocarcinoma	IV	Muestra No Especificada
34	M	58	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma	-	Biopsia
35	M	76	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Bronquial
36	M	68	L858R	si	Adenocarcinoma	-	Biopsia Pulmonar
37	M	80	Mat insuf.	ex	Adenocarcinoma	IV	Citología Aspirado Bronquial
38	F	50	L858R	no	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Bronquial
39	M	78	Mat insuf.	ex	CPCNP	-	Biopsia Bronquial
40	M	57	Mat insuf.	si	Adenocarcinoma	IIIB	Biopsia Pulmonar
41	F	81	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Biopsia con Aguja Gruesa
42	F	70	No Mut Det	no	Adenocarcinoma	IV	Biopsia Transbronquial
43	F	53	L858R	ex	Adenocarcinoma	IV	Muestra No Especificada
44	M	56	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	-	Muestra No Especificada
45	F	72	L858R, T790M	no	Adenocarcinoma	IV	Muestra No Especificada
46	M	64	No Mat.	no	Carcinoma Escamoso	IV	Muestra No Especificada
47	M	37	L858R	-	CPCNP	-	Muestra No Especificada
48	M	46	No Mat	si	Adenocarcinoma	IV	Biopsia por aguja Gruesa
49	M	36	No Mat.	-	Adenocarcinoma	-	

El kit detecta 41 mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR. Observamos 18 pacientes con delección del exón 19; 9 pacientes con la mutación L858R, 1 paciente con la mutación G719X, un paciente con las mutaciones L858R y S768I y otro con la mutación de sensibilidad L858R y la de resistencia T790M.

La mayoría de los pacientes estudiados (estadios III-IV) no respondían a tratamiento con inhibidores tirosina kinasa. Medicamentos como Gefitinib y Erlotinib son 2 ITKs_s utilizados en el tratamiento del CPCNP que inhiben de forma reversible al EGFR, interrumpiendo la transducción de la señal de crecimiento y produciendo un efecto antitumoral. Ambos tratamientos son ITKs de primera generación. La mayoría de los tumores que responden a los ITKs presentan mutaciones activadoras en el dominio tirosin-kinasa del gen EGFR.

De manera global, la frecuencia de mutaciones en los CPCNP es del 5-20% dependiendo de la población estudiada, siendo más frecuentes en mujeres, no fumadores, histología de adenocarcinoma y raza asiática. Alrededor de un 75% de los pacientes con mutación en el gen del EGFR responde al tratamiento con erlotinib/gefitinib, mientras que entre los no mutados solo responde un 10%. A pesar de la buena y prolongada respuesta inicial, en prácticamente todos los casos se observa una adquisición de resistencia a los inhibidores tirosin-kinasa de EGFR (EGFR-ITK) (Tausa, 2011).

Existen dos tipos de mutaciones de EGFR en el exón 19 y el exón 21 (la delección del exón 19 y la sustitución L858R) que son prevalentes en pacientes con cáncer de pulmón y sensibles a la inhibición de EGFR dirigida. Estas dos mutaciones comprenden aproximadamente el 90 % de todas las mutaciones de EGFR . El 10% restante se definen como mutaciones poco comunes (Xu, 2015). Se ha encontrado además, que una mutación de resistencia a los inhibidores de primera generación en el exón 20 (T790M) acompaña al tratamiento farmacológico cuando los pacientes recaen. Un 50% de los pacientes con mutaciones en EGFR con resistencia adquirida a erlotinib/gefitinib la presentan. Sin embargo, esta mutación es sensible a ITKs de tercera generación que inhiben de forma irreversible el EGFR como el Osimertinib. Estas tres mutaciones son valiosos biomarcadores de diagnóstico complementarios para guiar el tratamiento personalizado (Tausa, 2011).

En nuestra cohorte de pacientes observamos que ninguno de los pacientes presentaba la mutación de resistencia T790M en la biopsia inicial excepto uno (estadio IV), lo que es lógico ya que esa biopsia inicial se realiza para el estadiaje y clasificación de los pacientes

antes del tratamiento; mientras que un 59,18% del total los pacientes presentaba las de sensibilidad más comunes (Del ex 19, L858R).

El paciente 16 presentaba una mutación inicial de EGFR no identificada.

Las mutaciones S768I (exón 20) y la G719X (exón 18) son mutaciones también consideradas de sensibilidad a inhibidores tirosin kinasa, aunque los pacientes que las presentan son menos sensibles al tratamiento (Erlotinib y/o Gefitinib) que los que presentan la L858R o la delección del exón 19. Además, también aparecen con mucha menor frecuencia que las anteriores. (Chen, 2006) La G719X representa aproximadamente el 3% de las mutaciones de EGFR detectadas (MCG, 2004), mientras que la S768 suele ir acompañada de otras mutaciones, como la G719X o la L858R. En nuestro caso, sólo un 2% de los casos presentaba la G719X (n=1) y la S768I acompañada de la L858R (n=1).

MUTACIONES DE EGFR DETECTADAS EN BIOPSIA LÍQUIDA EN COHORTE DE PACIENTES

Como hemos comentado en la introducción de este TFM, la biopsia líquida abre un amplio abanico de aplicaciones clínicas en diversas patologías, y en el CPCNP en particular. Entre las más importantes: la caracterización de tumores en pacientes donde no es posible obtener una biopsia, el análisis de la aparición de resistencias al tratamiento incluso antes de que sea visible su progresión radiológica y cómo factor pronóstico, al poder ir monitorizando el ctDNA durante el tratamiento (Garcia, 2017-Tsujiura, 2014). Por lo tanto, estamos ante una herramienta diagnóstica no invasiva potencialmente muy eficaz.

A todos los pacientes incluidos en nuestro estudio se les realizaron análisis mutacionales de EGFR en plasma mediante el kit cobas EGFR Mutation Test v2. Los resultados están reflejados en la Tabla 3. A 14 pacientes se les realizó sólo un análisis. A 15 pacientes, 2 análisis. A 4 pacientes se les monitorizó 3 veces.; y a un paciente (el paciente número 43) se le realizaron hasta 4 análisis. El 30,61 % de los pacientes (n=15) presentaron genotipo no mutado (*wild type*) en todos de los análisis realizados, tanto en tejido como en plasma. En el 69,39 % de las muestras (n=34 pacientes), se detectaron distintas mutaciones de EGFR. Los resultados de los pacientes con mutaciones de EGFR detectadas en tejido y/o plasma se describen en la Tabla 4.

Tabla 3. Mutaciones de EGFR y PI3K detectadas en muestras FFPE y plasma. NMD: no mutación detectada. INV: resultado inválido											
nº	Sexo	Edad	Mutación Inicial	HT	Tipo de Tumor	Est	BL 1	BL 2	BL 3	BL4	PI3K
1	F	68	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	NMD	NMD			NMD
2	F	57	Mat ins	ex	Adenocarcinoma	IV	NMD				NMD
3	M	69	Mat insuf.	ex	Adenocarcinoma		NMD				NMD
4	F	64	Mat insuf.	ex	Adenocarcinoma		NMD				NMD
5	F	61	Del ex.19	sí	Adenocarcinoma	IV	NMD				NMD
6	F	70	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Del 19	Del 19 T790M			NMD
7	M	71	Del ex.19	no	Carcinoma Escamoso		Del 19	Del 19 T790M			NMD
8	F	86	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	NMD	Del 19 T790M			INV
9	M	73	L858R	sí	Adenocarcinoma	IIIA	NMD	L858R			NMD
10	F	72	Mat insuf.	no	CPCNP		NMD				NMD
11	F	48	Del ex.19	no	Adenocarcinoma		NMD	Del 19			-
12	F	51	No Mat.	sí	Adenocarcinoma	IIIA	NMD				NMD
13	F	61	Del ex.19	no	Carcinoma Escamoso	IV	Del 19 T790M				NMD
14	F	71	No Mat.		Adenocarcinoma		NMD				-
15	M	84	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma		NMD	NMD			NMD
16	M	62	Mat insuf.	sí	Adenocarcinoma		NMD				NMD
17	F	56	S768I, L858R	ex	Adenocarcinoma	IV	S768I	NMD	S768I, L858R T790M		NMD
18	F	49	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma	IV	NMD	NMD	NMD		NMD
19	M	71	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma	IV	NMD	Del 19 T790M			NMD
20	F	62	No Mat.	no	Adenocarcinoma	IIB	NMD				NMD
21	F	65	L858R	no	Adenocarcinoma	IV	L858R T790M				NMD
22	F	68	Mat insuf.	no	Adenocarcinoma	IV	Del 19				NMD
23	M	60	No Mat.		Adenocarcinoma	IB	NMD				NMD
24	M	83	L858R		Adenocarcinoma	IV	L858R				NMD
25	F	70	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Del 19 T790M				NMD
26	F	53	Mut no Det	ex	Adenocarcinoma	IV	NMD	NMD			NMD
27	M	75	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Del 19 T790M				NMD
28	F	64	Mat insuf.	no	Adenocarcinoma	IV	L858R	NMD	NMD		NMD
29	F	60	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Del ex.19				INV
30	M	59	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma	IV	NMD	NMD	NMD		NMD
31	M	57	L858R	ex	Adenocarcinoma	IV	L858R				-
32	M	52	G719X	sí	Adenocarcinoma	IV	NMD	NMD			-
33	F	71	No Mat.	sí	Adenocarcinoma	IV	NMD	L858R			NMD
34	M	58	Del ex.19	ex	Adenocarcinoma		NMD				NMD
35	M	76	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Del ex.19				NMD
36	M	68	L858R	sí	Adenocarcinoma		NMD				-
37	M	80	Mat insuf.	ex	Adenocarcinoma	IV	NMD				NMD

38	F	50	L858R	no	Adenocarcinoma	IV	L858R				NMD
39	M	78	Mat insuf.	ex	CPCNP		NMD				-
40	M	57	Mat insuf.	si	Adenocarcinoma	IIIB	NMD				-
41	F	81	Del ex.19	no	Adenocarcinoma	IV	Del 19 T790M				-
42	F	70	No Mut Det	no	Adenocarcinoma	IV	NMD				-
43	F	53	L858R	ex	Adenocarcinoma	IV	L858R T790M	NMD	NMD	L858R T790M	NMD
44	M	56	Del ex.19	no	Adenocarcinoma		NMD	Del 19 T790M			NMD
45	F	72	L858R, T790M	no	Adenocarcinoma	IV	T790M	T790M			-
46	M	64	No Mat.	no	Carcinoma Escamoso	IV	NMD	L858R			NMD
47	M	37	L858R		CPCNP		L858R	L858R			-
48	M	46	No Mat	sí	Adenocarcinoma	IV	NMD				NMD
49	M	36	No Mat.		Adenocarcinoma		NMD				-

Observamos que de los pacientes que presentaban la delección del exón 19 como mutación inicial (n=18), 6 de ellos no presentaban ninguna mutación detectable en plasma; mientras que en 12 de ellos sí aparecía, acompañada de la T790M en 9 pacientes. También aparecía en un paciente con resultado inválido en biopsia previa. (Figura 1)



Figura 1. Diagrama representativo de la detección de la delección del exón 19 en tejido y plasma de los pacientes estudiados.

En cuanto a la mutación de sensibilidad L858R, 10 pacientes la presentaban como mutación inicial, estando asociada a la mutación S781I y a la T790M en los pacientes 17 y 45 respectivamente. En plasma aparece como única mutación detectada en 8 pacientes: en 5 pacientes que ya la presentaban en biopsia previa, y en 3 casos de los cuales no se disponía información en tejido. Además, aparecía una vez más asociada a

la S768I (igual que en biopsia tisular) y a la T790M en el paciente 17, aunque en la tercera biopsia líquida, ya que en la primera sólo aparecía la S768I, y en la segunda no se detectó ninguna mutación. En los pacientes 21 y 43 se detectó acompañada de la T790M. El paciente 45, que presentaba en la biopsia inicial las dos mutaciones, sólo presentaba la T790M en la líquida, demostrando que la mutación inicial puede desaparecer con el tratamiento, apareciendo solo la de resistencia, aunque es muy común que ambas coexistan. (Figura 2)



Figura 2. Diagrama representativo de la detección de la mutación de sensibilidad L858R.

La mutación T790M aparece en el 38,23 % de las mutaciones totales detectadas (tejido y plasma) y en el 52,00% de las mutaciones detectadas en plasma (n=13); es decir, más de la mitad de los pacientes que presentaban mutaciones detectables tras el tratamiento, presentaban la mutación de resistencia. En algunos pacientes no aparecía en la primera biopsia líquida (pacientes 6,7, 8, 19), pero sí en las posteriores, lo que nos demuestra una de las limitaciones de la técnica, que es la de posible falsos negativos. Además, la T790M aparecía acompañada de la delección del exón 19 en 9 pacientes, 3 veces con la L858R y solamente una vez en solitario (paciente 45). (Figura 3)

Dos pacientes, el 33 y el 46, que no disponían de estudio tisular previo, presentaron la mutación de sensibilidad L858R y la de resistencia T790M en rebiopsia posterior al análisis en plasma, aunque en biopsia líquida sólo se detectó la L858R.



Figura 3 Diagrama representativo de la detección de la mutación de resistencia T790M.

Al paciente 32, que presentaba la mutación poco común G719X en biopsia inicial, no se le detectaron mutaciones en plasma.

Tabla 4. Mutaciones detectadas del gen EGFR en biopsia previa inicial y en biopsia/s líquida/s de los pacientes estudiados.

Pac	Edad	Mutación Inicial	BL 1	BL 2	BL 3	Pac	Edad	Mutación Inicial	BL 1	BL 2	BL 3	BL 4
1	F	68	Del ex. 19	NMD	NMD	27	M	75	Del ex. 19	Del 19 T790M		
5	F	61	Del ex. 19	NMD		28	F	64	Mat insuf.	L858R	NMD	NMD
6	F	70	Del ex. 19	Del 19	Del 19 T790M	29	F	60	Del ex. 19	Del ex. 19		
7	M	71	Del ex. 19	Del 19	Del 19 T790M	30	M	59	Del ex. 19	NMD	NMD	NMD
8	F	86	Del ex. 19	NMD	Del 19 T790M	31	M	57	L858R	L858R		
9	M	73	L858R	NMD	L858R	32	M	52	G719X	NMD	NMD	
11	F	48	Del ex. 19	NMD	Del 19	33	F	71	No Mat.	NMD	L858R	
13	F	61	Del ex. 19	Del 19 T790M		34	M	58	Del ex. 19	NMD		
15	M	84	Del ex. 19	NMD	NMD	35	M	76	Del ex. 19	Del ex. 19		
17	F	56	S768I, L858R	S768I	NMD	36	M	68	L858R	NMD		
18	F	49	Del ex. 19	NMD	NMD	38	F	50	L858R	L858R		
19	M	71	Del ex. 19	NMD	Del 19 T790M	41	F	81	Del ex. 19	Del 19 T790M		
21	F	65	L858R	L858R T790M		43	F	53	L858R	L858R T790M	NMD	NMD
22	F	68	Mat insuf.	Del 19		44	M	56	Del ex. 19	NMD	Del 19 T790M	
24	M	83	L858R	L858R		45	F	72	L858R, T790M	T790M	T790M	
25	F	70	Del ex. 19	Del 19 T790M		46	M	64	No Mat.	NMD	L858R	
26	F	53	Mut no Det	NMD	NMD	47	M	37	L858R	L858R	L858R	

Realizamos un análisis de correlación de Pearson para comprobar si las diferencias inter- e intra-pacientes eran estadísticamente significativas (ver Tabla 5). Observamos que la delección del exón 19 (detectada tanto en tejido como en plasma) y la T790M en plasma se correlacionaban fuertemente con el tabaquismo, es decir, que se detectaba más en pacientes no fumadores. Además, en nuestra cohorte de pacientes, las mujeres eran menos fumadoras que los hombres. Las mutaciones L858R y la delección del exón 19 detectadas en tejido seguían apareciendo en plasma en la mayoría de los pacientes de forma significativa y nunca aparecían juntas. Además, observamos que la aparición de la mutación de resistencia T790M está fuertemente relacionada con la delección del exón 19 (sensibilidad) en nuestros pacientes tal y como indicaban estudios anteriores.

	Tipo de										
	Sexo	Edad	Tab	Tumor	Estadio	MI Del ex. 19	MI L858R	MI T790M	BL Del ex. 19	BL L858R	BL T790M
Sexo		0,899	0,015*	0,340	0,238	0,795	0,832	0,352	0,681	0,631	0,180
Edad	-0,019		0,070	0,906	0,510	0,149	0,468	0,474	0,152	0,507	0,102
Tab	0,364	0,276		0,084	0,219	0,016*	0,564	0,357	0,012*	0,929	0,005**
Tipo de Tumor	-0,139	0,017	0,263		0,608	0,701	0,579	0,729	0,899	0,440	0,328
Estadio	0,208	0,117	0,220	0,091		0,099	0,681	0,721	0,515	0,593	0,150
MI Del ex. 19	0,038	0,209	0,361	0,056	0,287		0,006	0,452	5x10 ⁻⁷ ***	0,006*	0,004**
MI L858R	-0,031	-0,106	-0,089	-0,081	0,073	-0,386		0,047*	0,044*	2x10 ⁻⁶ ***	0,289
MI T790M	0,136	0,105	0,142	-0,051	0,064	-0,110	0,285		0,574	0,618	0,096
BL Del ex. 19	0,060	0,208	0,375	-0,019	0,116	0,649	-0,288	-0,082		0,044*	0,0001**
BL L858R	0,070	-0,097	-0,014	0,113	0,095	-0,386	0,623	-0,073	-0,288		0,786
BL T790M	0,195	0,236	0,413	0,143	0,253	0,405	0,154	0,240	0,518	0,040	

Tabla 5. Correlación de los parámetros encontrados en el estudio. Los valores del coeficiente de correlación (r) se presentan por debajo de la diagonal. El p-valor se representa por encima. * es significativo con un $p < 0.05$; ** es significativo con un $p < 0.01$; y *** es significativo con un $p < 0.001$. N = 49.

Todos nuestros datos son concordantes con la literatura publicada hasta la fecha. Observamos que los datos obtenidos nos muestran que las mutaciones de sensibilidad L858R y la delección del exón 19 son las alteraciones más frecuentes, (35,29% y 55,88% respectivamente), nunca se presentan en el mismo paciente, y se mantienen a lo largo del tiempo coexistiendo con la mutación de resistencia. Detectamos también las mutaciones poco frecuentes G719X y S768I en porcentajes similares a los reflejados en la bibliografía (2-3% aproximadamente).

La mutación de resistencia T790M aparece a posteriori en más de la mitad de los casos mutados y siempre asociada a pacientes con mutación de sensibilidad en biopsia inicial, coexistiendo más frecuentemente con la delección del exón 19. Solamente un paciente en estadio IV la presentaba en biopsia previa, asociada a la L858R. Estos pacientes podrían

ser potencialmente tratados con inhibidores tirosina kinasa de tercera generación como Osimertinib.

Los resultados también nos muestran que la biopsia líquida es una herramienta útil en cáncer de pulmón no microcítico cuando no es posible el análisis tisular o la rebiopsia presenta un alto riesgo. La técnica permite la monitorización de la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo. Su principal limitación es el alto porcentaje de falsos negativos ya que tiene una sensibilidad menor y, debida a la heterogeneidad tumoral (tanto local como temporal), el cfDNA en plasma puede no ser representativo de la patología en el momento del análisis. Además un alto porcentaje de cánceres de pulmón carece de perfiles mutacionales específicos, por lo que el diagnóstico específico requiere del estudio morfológico. Aún así, nuestros resultados avalan la técnica como un nuevo método de diagnóstico de rutina ya que evita la repetición de pruebas invasivas y ayuda a la toma de decisiones clínicas y terapéuticas.

MUTACIONES DE PI3K DETECTADAS EN MUESTRAS TISULARES EN COHORTE DE PACIENTES

El EGFR desencadena dos vías de señalización principales: la vía *RAS-RAF-MAPK* involucrada en proliferación celular, y la vía *PI3K-PTEN-AKT*, involucrada en supervivencia, migración e invasión (Lema, 2012). En diferentes tipos de cáncer se han encontrado evidencias de la activación constitutiva de esta segunda vía originadas por mutaciones en el gen de PI3K. Además, se han encontrado mutaciones somáticas en PI3KCA en aproximadamente el 1-3% de CPCNP. Estas mutaciones generalmente ocurren dentro del dominio helicoidal del exón 9 y el dominio kinasa del exón 20, siendo más comunes en adenocarcinomas y tanto en fumadores como en no fumadores. Estos datos, unidos al hecho de que se han detectado mutaciones de PIK3CA en un pequeño porcentaje (5%) de cánceres de pulmón mutantes de EGFR con resistencia adquirida al tratamiento con ITKs, nos llevó a estudiar la presencia de posibles mutaciones de la ruta en nuestra serie de pacientes.

Las mutaciones se detectaron con el kit cobas PIK3CA Mutation Test válido exclusivamente para ensayos experimentales. El kit detecta mutaciones en los exones 1, 4, 7, 9 y 20 del gen de la subunidad alfa de PI3K en muestras FFPE. Los resultados se describen en la Tabla 3. Sólo realizamos el test en 37 pacientes, ya que no disponíamos de material disponible del resto de muestras. Los ensayos se hicieron en la misma muestra en la cual se llevó a cabo la determinación de la mutación inicial del EGFR.

Estudiamos 33 muestras de adenocarcinoma (procedentes de biopsias y citologías), 3 de carcinomas escamosos y 1 de CPNCP de tipo histológico no identificado. Observamos que en 35 de las muestras no se detectaba ninguna mutación, y en 2 ellas el resultado fue inválido, ya que la cantidad de ADN no era suficiente.

Diversos ensayos han demostrado que la inhibición de los componentes de la vía PI3K puede hacer ayudar en la resistencia a quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y a los agentes dirigidos en cáncer. Un mecanismo potencial para esta oposición es incrementando la apoptosis. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado con compuestos relativamente no específicos y podrían reflejar la inhibición de kinasas similares a PI3K, activadas por daño o irradiación al ADN (Pinzón, 2009). PI3K, como ya hemos comentado, está frecuentemente mutado en diversos tipos de cáncer. En cáncer de mama, las mutaciones *missense* somáticas en el gen que codifica p110 α (PIK3CA) son muy frecuentes. Estas mutaciones ocurren sobre todo en cánceres HER2 amplificados y positivos para receptor de estrógenos y son causa de resistencia a terapias anti-HER2 como trastuzumab. También ocurren comúnmente en cáncer de colon (32%), ovario (mutaciones en subtipos de células endometriales y claras, y amplificación en tumores serosos), de cabeza y cuello, de cérvix, carcinomas gástrico (25%) o glioblastoma (27%).

Otras componentes fundamentales de la vía, como son Akt y PTEN sufren también frecuentemente cambios genómicos y epigenéticos en distintas patologías humanas. Se detectaron mutaciones no descritas en la vía de PI3K o en otras vías de kinasas, por ejemplo, en los tres genes que codifican los componentes de la vía PI3K/Akt (PDK1, AKT2 y kinasa activada por p21 (PAK4)) en cáncer colorrectal. En modelos específicos, se demostró que las isoformas de Akt tienen actividad de transformación. Las alteraciones genéticas también se presentan en moléculas de otras vías relacionadas con cáncer. En muchos casos, los efectos oncogénicos de estas anomalías están mediados, al menos parcialmente, por la señalización de PI3K/Akt. Además, mutaciones en Ras, que activan PI3K, son comunes en cáncer de páncreas (Pinzón, 2009).

Como se ha comentado al comienzo del epígrafe, diversas publicaciones han encontrado mutaciones de PIK3CA en CPNCP con resultados variados. También se ha demostrado que los inhibidores de PI3K pueden proporcionar actividad antitumoral preliminar en estudios preclínicos y ensayos clínicos en fase temprana en este tipo de patología.

(Bendell, 2012; Karakas, 2006). La vía PI3K / AKT es importante en la oncogénesis y la progresión del cáncer de pulmón y mutaciones de PIK3CA parecen tener correlación con una menor supervivencia. (Samuels, 2004) Además, aproximadamente el 5% de los pacientes con resistencia adquirida a EGFR-TKIs presentan mutaciones en PIK3CA (Ludovini, 2011). Esto nos ha llevado a pensar que podría haber una relación entre las mutaciones producidas en ambas dianas y la resistencia al tratamiento con ITKs. Sin embargo, estos trabajos están basados en un número pequeño de pacientes. Estudios posteriores y más recientes, con un número mayor de muestras, no han demostrado que mutaciones en PIK3CA estén asociadas con la resistencia primaria a inhibidores de EGFR. La frecuencia de mutaciones encontrada era muy baja (en torno al 2%). Esta información concuerda con nuestros resultados, y el hecho de no haber detectado ninguna mutación en tejido. Además, la mayoría de las mutaciones *driver* en cáncer son mutuamente excluyentes, aunque las mutaciones de PIK3CA coexisten con frecuencia con otras mutaciones (O'Brien, 2010). Por lo tanto, ¿cuál es la relación entre el EGFR y la vía PI3K-Akt-mTOR en pacientes con CPCNP resistentes a ITKs? ¿Son las mutaciones de PI3K responsables de esta resistencia adquirida o algunas de sus dianas *downstream*? ¿Son estas mutaciones iniciales o adquiridas tras la resistencia a tratamiento con inhibidores de EGFR? Las respuestas a estas preguntas necesitarían estudios adicionales con un mayor número de pacientes y con técnicas validadas diagnósticamente que nos permitiesen aumentar la sensibilidad del estudio.

5. CONCLUSIONES

Tras los resultados de nuestro estudio podemos concluir que:

-Las mutaciones de sensibilidad L858R y delección del exón 19 son las alteraciones genómicas de EGFR más frecuentes. No se presentan de forma simultánea y a pesar del tratamiento específico con ITKs suelen persistir a lo largo del desarrollo de la enfermedad.

-La mutación T790M aparece de forma secundaria como mecanismo de resistencia a tratamiento con inhibidores tirosina kinasa en más de la mitad de los pacientes, la mayoría de las veces asociada a la delección del exón 19. Sorprendentemente, también puede aparecer como mutación inicial, en nuestro caso, asociada a la L858R; por lo que no es forzosamente originada como respuesta al tratamiento.

-No hemos encontrado mutaciones de PI3KCA en los pacientes de nuestro estudio. El papel de PIK3CA en CPCNP y su implicación en la resistencia adquirida al tratamiento con EGFR-ITKs necesita estudios más exhaustivos.

-La biopsia líquida es una herramienta útil en la determinación de mutaciones de sensibilidad y de resistencia en pacientes con mutaciones EGFR. Puede servir para determinar genotipos mutados cuando no hay muestra para su obtención y para la monitorización de la enfermedad. El factor limitante es la posibilidad de falsos negativos, debido a la sensibilidad de la técnica o a la propia biología del tumor.

-Actualmente, la combinación de biopsia tisular, biopsia líquida y/o la rebiopsia son el método diagnóstico más preciso para evaluar el estado y desarrollo del cáncer de pulmón no microcítico.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amorín Kajatt , Edgar. 2013. Cáncer de Pulmón, una Revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. Perú Med Exp Salud Publica; 30(1):85-92.
2. Balsara, B. R. et al. 2004. Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. Carcinogenesis. 25, 2053-59.
3. Barkauskas CE et al 2013. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. J Clin Invest. 123(7):3025-36.
4. Bautista D. et al. Perfil Mutacional de los carcinomas pulmonares no microcíticos diagnosticados en el Hospital Carlos Haya de Málaga.
5. Bendell, J. C. et al. 2012. Phase I dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 30, 282-90.
6. Blandin Knight S. et al. 2017. Progress and prospects of early detection in lung cancer. Open Biol; 7(9): 170070.
7. Chen YR et al. 2006. Distinctive activation patterns in constitutively active and gefitinib-sensitive EGFR mutants. Oncogene. 25(8):1205-15.
8. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. 2014. Revista española Patología Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma de pulmón no microcítico avanzado.
9. Cortes Giraldez R. 2014. Evaluación de la actividad antitumoral de nuevos compuestos metálicos y estudio de la reprogramación metabólica en cáncer de pulmón: búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores diagnósticos. Tesis doctoral.
10. Crusz SM et al. 2015. Inflammation and cancer: advances and new agents. Nat Rev Clin Oncol. 12(10):584-96.
11. De Castro Carpeño J. 2016. Biomarcadores moleculares y genómica en el cáncer de pulmón. Oncoby. 28.
12. EGFR c.2369C>T (T790M) Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer <https://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/egfr/4/>
13. Encina S. G. 2013. Molecular Biology In Oncology: What A Phisician Should Know. 24, (4) 563-70.
14. García E. et al. 2017. Biopsia Líquida: aplicación de métodos ópticos y metabólicos para la detección y caracterización de ácidos nucleicos, proteínas y células en sangre periférica de pacientes con cáncer .
15. Hanna JM et al. 2013. Cell of origin of lung cancer. J Carcinogenesis. 12:6.
16. Hogan BL et al. 2014. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. Cell Stem Cell. 15(2):123-38.
17. <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeCinco/Articulos/BiologiaCelular/rutasde.htm> (Villalobo A.)
18. <https://molecular.roche.com/assays/cobas-pik3ca-mutation-test/>
19. <https://www.seom.org/es/info-sobre-el-cancer/cancer> de pulmon? showall =1#eQ04WbCarPV13Yov.99.(2017)
20. Karachaliou N et al. 2016. Cellular and molecular biology of small cell lung cancer: an overview. Transl Lung Cancer Res. 5(1):2-15.
21. Karakas, B., Bachman, K. E. & Park, B. H. 2006. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. British journal of cancer 94, 455-9.
22. Lema M. et al. 2012. Resumen Máster en Oncología Molecular. CNIO.
23. Lema Medina M. 2010. La familia del EGFR como diana molecular en cáncer por ONCO-E-ZINE.

24. Ludovini, V. et al . 2011. Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 6, 707-15.
25. Minna, JD. 2004. *Harrison's Principles of Medicine*. McGraw-Hill. 506-16. ISBN 0071391401.
26. Moreira L. et al . 2010. Inhibidores del EGFR: ¿qué pacientes se benefician de estos fármacos? *Vol. 9. N.º 5*. 233.
27. O'Brien, C. et al. 2010. Predictive biomarkers of sensitivity to the phosphatidylinositol 3' kinase inhibitor GDC-0941 in breast cancer preclinical models. *Clin Cancer Res*. 16, 3670-83.
28. Pinzón Carlos E. et al. 2009. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia)*. Vol. 7 (2): 47-66.
29. Review Article Molecular Markers with Predictive and Prognostic Relevance in Lung Cancer Access Full Text Article <http://dx.doi.org/10.2147/OTT>.
30. Roman, 2017. www.biopat.es/2017/03/14/biopsia-liquida
31. Samuels, Y. et al. 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304, 554.
32. Sequist, L. V. et al 2011. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Mes*. 3.
33. Sociedad Española de Oncología. 2014. Tratamiento personalizado del cáncer de pulmón y la importancia de las determinaciones moleculares para optimizar el tratamiento. Colección Oncovida.
34. Tausa Á et al. 2011. Mutaciones de sensibilidad y resistencia del gen epidermal growth factor receptor (EGFR) en el cáncer de pulmón de célula no pequeña: una realidad clínica. *Arch Bronconeumol*.
35. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the *AJCC Cancer Staging Manual* and the Future of TNM. 2010. 17(6), 1471-74.
36. Travis WD et al. 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*. 10(9); 1243-60.
37. Tsujiura M. et al. 2014. Liquid biopsy of gastric cancer patients: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids Brief Article *World J Gastroenterol*. 28; 20(12): 3265-86.
38. Wu K. et al. 2012. Personalized Targeted Therapy for Lung Cancer Scientific. Figure on Research Gate. Available from: https://www.researchgate.net/232739632_Epidermal-growth-factor-receptor-EGFR-The-binding-between-EGFR-and-ligand-triggers.
39. Xu Q, et al. 2015. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer by droplet digital polymerase chain reaction *OncoTargets and Therapy*.
40. Zhang Z. et al . 2015. Current status of CTCs as liquid biopsy in lung cancer and future directions. *Frontiers in Oncology*.