



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“Diseño y optimización de métodos de PCR para analizar mutaciones en *EGFR*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**KARLA MONSERRATH GARCIA GARCIA**

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. FELIPE VACA PANIAGUA**

México 2018





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatoria**

A mis padres por ser mi mayor ejemplo, por su apoyo para darme una formación profesional, por su comprensión y sacrificios en esta etapa de mi vida y forjarme como la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros son gracias a ustedes incluyendo éste.

A mis hermanos por hacer más divertida mi vida, los amo mucho.

A Osvaldo por ser mi apoyo, amigo y confidente en todo momento.

## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Felipe Vaca Paniagua por la enseñanza, confianza, tiempo y compromiso que me brindo. Por enseñarme que no existe límite en el camino. Gracias por la oportunidad de ser parte de su equipo.

A la Dra. Margarita Canales por ser un pilar fuerte en el transcurso de esta etapa, por su confianza, enseñanza y fuerza para seguir adelante. No tengo palabras para expresarle mi gratitud.

A la Dra. Clara Estela Díaz por su asesoría en estos años. Todos sus consejos son muy importantes para mí y para mi formación académica. Gracias por su amistad y tiempo.

A la Dra. Fabiola Méndez por su generoso apoyo. Por los momentos pequeños pero bastante agradables que nos hace pasar.

A mis compañeros del laboratorio Stef, Ferchi, Ernesto, Héctor, Bony, Pao, Rosy, Cris, Marco, Toño y Mark, por hacer cada momento agradable. Por su ayuda e incondicional apoyo.

A mis amigos de la carrera Carlos, Ricardo, Karen, y Pablo. Recordar el inicio y ver ahora el presente me llena de alegría, veo qué no cambiaría ninguno de nuestros días. Los quiero y estimo.

A todas las personitas que me brindaron durante este trayecto su amistad, no puedo poner tantos nombres porque no me bastarían estas páginas. Fue un placer trabajar y convivir con ustedes.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de ser parte de ella y ser mi segundo hogar. Por otorgarme las herramientas necesarias para mi desarrollo y crecimiento profesional.

“Recuerda mirar las estrellas, y no tus pies. Intenta dar sentido a lo que ves, pregúntate por la existencia del universo. Sé curioso. La vida puede parecer difícil, sin embargo, siempre hay algo que puedes hacer y tener éxito. Lo importante es que no te rindas.”

Stephen Hawking

## ÍNDICE

1. LISTA DE FIGURAS.....	1
2. ÍNDICE DE TABLAS.....	2
3. ABREVIATURAS .....	3
4. INTRODUCCIÓN .....	4
1. Cáncer .....	4
1.1 Epidemiología del cáncer.....	4
2. Cáncer de pulmón.....	5
2.2 Factores de riesgo .....	6
2.3 Tipos de cáncer pulmonar .....	7
2.4 Diagnóstico .....	9
2.5 Estadío clínico .....	10
2.6 Tratamiento.....	10
2.7 Alteraciones moleculares.....	13
3. Receptor para el factor de crecimiento epidérmico ( <i>EGFR</i> ) .....	14
3.1 Mutaciones del gen <i>EGFR</i> .....	17
3.2 Mutaciones en la población mexicana.....	19
4. Metodologías para la detección de mutaciones.....	20
4.1 E-ice-cold-PCR.....	22
4.2 Curvas de fusión de alta resolución (HRM).....	24
4.3 Secuenciación masiva en paralelo.....	25
5. JUSTIFICACIÓN .....	26
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	27
7. HIPOTESIS .....	28
8. OBJETIVOS.....	29
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
9.1 Análisis bioinformático. ....	30
9.2 Diseño de oligonucleótidos .....	30
9.3 Diseño de sondas con LNA.....	31
9.3 Cultivo celular y extracción de ADN.....	31
9.6 PCR.....	32
9.7 E-ice-cold-PCR.....	33

9.11 Secuenciación masiva en paralelo .....	35
9.12 Análisis de fusión de alta resolución .....	36
10. RESULTADOS .....	37
10.1 Amplificación del exón 20 y 21 del gen <i>EGFR</i> .....	37
10.2 E-ice-cold-PCR .....	38
10.2.1 Determinación de la temperatura crítica.....	38
10.2.2 Determinación de la Tc y la concentración optima de LNA.....	39
10.3 Sensibilidad de HRM.....	39
10.4 Sensibilidad SMP .....	42
11. DISCUSION .....	45
12. CONCLUSION .....	52
13. PERSPECTIVAS .....	53
14. REFERENCIAS.....	54

## 1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiología del cáncer.

Figura 2. Distribución geográfica de la mortalidad por cáncer de pulmón en México.

Figura 3. Genes que predisponen al cáncer de pulmón.

Figura 4. Clasificación del cáncer de pulmón.

Figura 5. Supervivencia libre de progresión.

Figura 6. Genes que presentan alteraciones en cáncer de pulmón.

Figura 7. Localización genómica de *EGFR*.

Figura 8. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Figura 9. Vía de señalización de *EGFR*.

Figura 10. Estructura del dominio cinasa de *EGFR*.

Figura 11. Distribución de los exones y mutaciones de *EGFR*.

Figura 12. Método del E-ice-cold-PCR.

Figura 13. Estructura de los LNA empleados en la sonda bloqueadora.

Figura 14. Curva de disociación de alta resolución.

Figura 15. Proceso de secuenciación de la plataforma Illumina.

Figura 16. Programa de PCR.

Figura 17. Programa de PCR E-ice-COLD-PCR.

Figura 18. Preparación de bibliotecas de secuenciación masiva.

Figura 19. Verificación de la especificidad en la amplificación de los exones 20 y 21 de *EGFR*.

Figura 20. Alineamiento de las secuencias mutante y silvestre de los exones 20 y 21 del gen *EGFR*.

Figura 21. Determinación de la  $T_m$  de los amplicones de los exones 20 y 21 de *EGFR*.

Figura 22. Enriquecimiento de alelos mutantes.

Figura 23. HRM usando la plataforma de PCR.

Figura 24. HRM usando la plataforma de E-ice-cold-PCR.

Figura 25. Límite de detección de mutaciones en el exón 20 de *EGFR*.

Figura 26. Límite de detección de mutaciones en el exón 21 de *EGFR*.



## 2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de pulmón.

Tabla 2. Métodos de detección de mutaciones.

Tabla 3. Frecuencias y posición de las mutaciones del gen *EGFR*.

Tabla 4. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las mutaciones más frecuentes del gen *EGFR*.

Tabla 5. Diseño de sondas bloqueadoras de los exones 20 y 21 del gen *EGFR*.

Tabla 6. Componentes de reacción PCR.

Tabla 7. Componentes de la reacción para la determinación de la Tc.

Tabla 8. Determinación de la Tc y concentración de la sonda bloqueadora.

Tabla 9. Componentes de reacción para la determinación de la Tc y [LNA].

Tabla 10. Componentes de reacción del análisis de HRM.

### 3. ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AKT</b>	Proteína cinasa B
<b>AR</b>	Anfiregulina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BTC</b>	Betacatulina
<b>cfDNA</b>	ADN libre circulante
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>E-ice-COLD-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa mejorada en frío
<b>EPR</b>	Epiregulina
<b>FA</b>	Frecuencia alélica
<b>GRB2</b>	Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>HER</b>	Familia de receptores tirosina cinasa
<b>HRM</b>	Análisis de fusión de alta resolución
<b>K</b>	Dominio cinasa
<b>LNA</b>	Ácido nucleico bloqueador
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno
<b>mTOR</b>	Diana de rapamicina en células de mamífero
<b>NGS</b>	Secuenciación de próxima generación
<b>Nrg -3</b>	Neuregulina 3
<b>Nrg-1</b>	Neuregulina 1
<b>Nrg-2</b>	Neuregulina 2
<b>Nrg-4</b>	Neuregulina 4
<b>NSCLC</b>	Cáncer de pulmón de célula no pequeña
<b>OS</b>	Supervivencia global
<b>PET</b>	Tomografía por emisión de positrones
<b>PFS</b>	Supervivencia libre de progresión
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3- cinasa
<b>PTEN</b>	Homólogo de fosfatasa y tensina
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>RXT</b>	Radiografía de tórax
<b>SCLC</b>	Cáncer de pulmón de célula pequeña
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>STAT3 y 5</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 y 5
<b>TAC</b>	Tomografía axial computada
<b>Tc</b>	Temperatura crítica
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor de crecimiento transformante alfa
<b>TK</b>	Tirosina cinasa
<b>TKI</b>	Inhibidores tirosina cinasa
<b>Tm</b>	Temperatura de desnaturalización

## 4. INTRODUCCIÓN

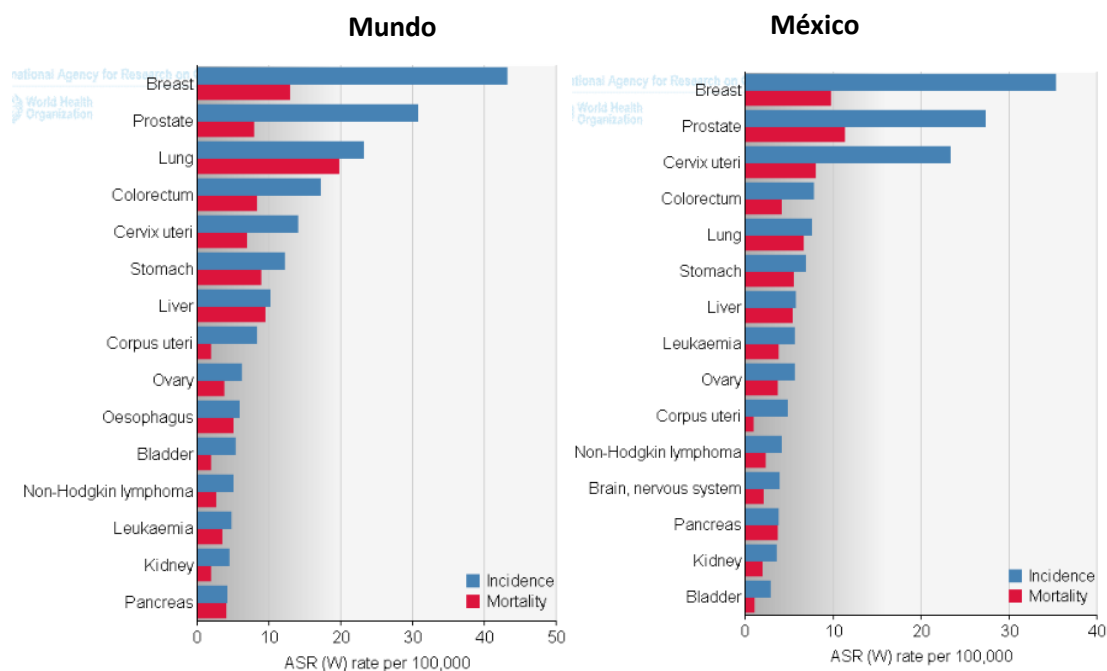
### 1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades causadas por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en genes conductores. Dichas alteraciones producen un desequilibrio en la homeóstasis celular alterando procesos como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular programada. Estos cambios confieren ventajas a las células provocando su transformación maligna que desencadena en la división descontrolada y metástasis (Barrett *et al.*, 1993; Hanahan & Weinberg *et al.*, 2011; Torti & Trusolino *et al.*, 2011).

#### 1.1 Epidemiología del cáncer

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial, en el año 2008 se estimaron alrededor de 7.6 millones de muertes y 12.6 millones de nuevos casos. Para el año 2012 estas cifras aumentaron, ya que se estimaron 8.2 millones de muertes y 14.1 millones de nuevos casos (Figura 1; Ferlay *et al.*, 2014).

A pesar de los avances en la investigación y la clínica, se considera que el número de nuevos casos y muertes, incrementan debido al crecimiento y envejecimiento de la población, junto con factores externos que aumentan el riesgo de padecer cáncer (Jemal *et al.*, 2011).



**Figura 1. Epidemiología del cáncer:** Estadísticas de los principales tipos de cáncer que afectan a la población. Tomada de Ferlay *et al.*, 2014

## 2. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte a nivel mundial por cáncer; la primera en hombres y la segunda en mujeres. Esta enfermedad presenta los índices de mortalidad más elevados y es una de las más diagnosticadas. La incidencia del cáncer de pulmón a nivel mundial es de 1.3 millones de nuevos casos, y la mortalidad anual es de 1.1 millones.

Debido a que los pacientes son asintomáticos en estadios tempranos, del 100% los casos de cáncer de pulmón tan solo el 15% presentan la enfermedad en estadio localmente avanzado y 56% en la fase de metástasis, en estas etapas ya no es posible la intervención quirúrgica. Por ello, el pronóstico del cáncer pulmonar es pobre, y sólo el 15% de estos pacientes presentan una sobrevida a 5 años (Jemal *et al.*, 2011).

En México el cáncer de pulmón es la segunda causa de muerte en hombres y la cuarta en mujeres (Ferlay *et al.*, 2012). El índice de fatalidad (mortalidad/incidencia) es de 0.96, es decir, casi el 100% de los pacientes con cáncer de pulmón muere a causa de esta neoplasia al año. Esta enfermedad aún no está controlada, ya que en los últimos 30 años la prevalencia del cáncer de pulmón ha aumentado drásticamente, principalmente en el periodo de 1998 a 2004 (Ruíz-Godoy *et al.*, 2007). México tiene diferencias epidemiológicas en cuanto a la incidencia del cáncer pulmonar entre sus estados. La incidencia y mortalidad se relaciona estrechamente con el tabaquismo, factores ambientales y ocupacionales; en México el consumo del tabaco es más frecuente en zonas urbanas y en ciudades industrializadas, como las del norte del país, además las lecturas más altas del índice metropolitano de la calidad del aire (IMECA) se registran predominantemente en esta zona, que corresponden a las tasas más altas de mortalidad por cáncer de pulmón (Figura 2) (Ruíz-Godoy *et al.*, 2007).

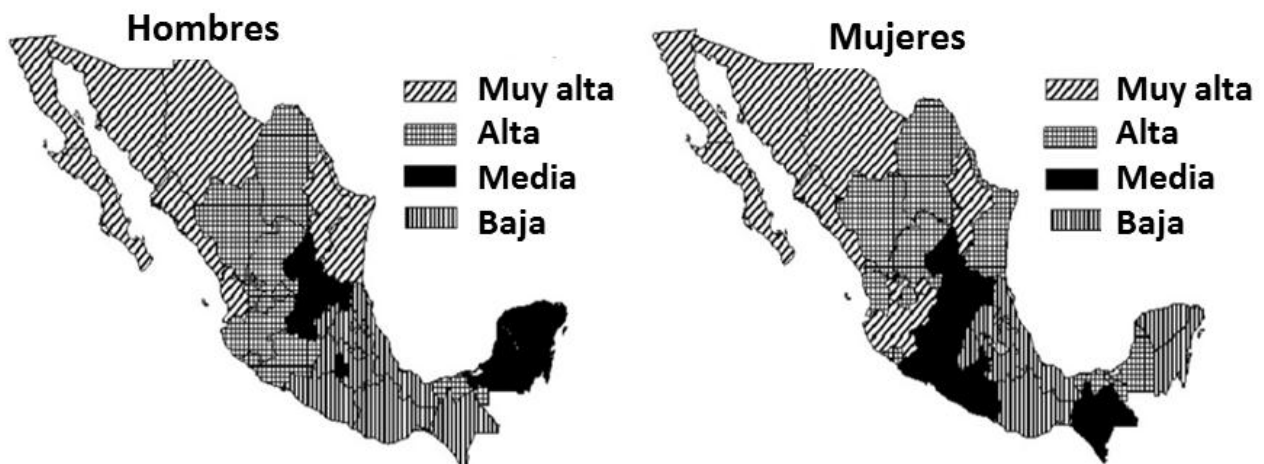


Figura 2. Distribución geográfica de la mortalidad por cáncer de pulmón en México.

Modificada de Meneses *et al.*, 2007

## 2.2 Factores de riesgo

El factor de riesgo más importante para el cáncer de pulmón es el hábito de fumar tabaco, el cual se asocia con el 85% a 90% de todas las muertes relacionadas con el cáncer pulmonar (Ettinger *et al.*, 2012). El humo de cigarro contiene carcinógenos como nitrozaminas, benzopirenos, y formaldehído. Existe una relación entre el tabaquismo activo y el cáncer de pulmón, el riesgo del fumador es afectado por factores como la edad, el número de cigarrillos consumidos al día, la duración del hábito, y la edad de iniciación. El fumador presenta entre 15% a 35% riesgo de desarrollar esta patología (OR 93.1; IC 95% 90.1 -96.2) en hombres y en mujeres (OR 82.6; IC 95% 79.6 -86.0), mientras que los fumadores pasivos presentan un riesgo aumentado del 30% en comparación con los no fumadores (Zhong *et al.*, 2000; Jemal *et al.*, 2011; Pesch *et al.*, 2012).

Otros factores de riesgo son los ocupacionales, en los que la exposición ocurre en entornos de trabajo específicos, donde hay contacto con arsénico, asbesto, níquel, cadmio, radón, hidrocarburos policíclicos y radiaciones ionizantes. Estos ambientes incluyen las minas de extracción de metales, obras de construcción, industrias textiles o de fibras plásticas, e incluso en el aire de manera natural. Estos factores de riesgo son responsables del 18% de los casos de cáncer de pulmón en hombres y de menos del 1% en mujeres. La inhalación de estas sustancias provoca que se depositen y acumulen en los pulmones, causando aductos en el ADN, que tienen como consecuencia la producción de alteraciones moleculares como las mutaciones (Mollberg *et al.*, 2011).

La base genética hereditaria en el cáncer de pulmón es otro factor de riesgo. Existen genes que predisponen al cáncer de pulmón como son la presencia en la línea germinal de variantes patogénicas raras en los genes *ATM* (50%), *TP53* (29%), *PARK2* (7%), *EGFR* (7%) y *BRCA2* (7%) (Figura 3; Parry *et al.*, 2017; Y. Wang *et al.*, 2014)

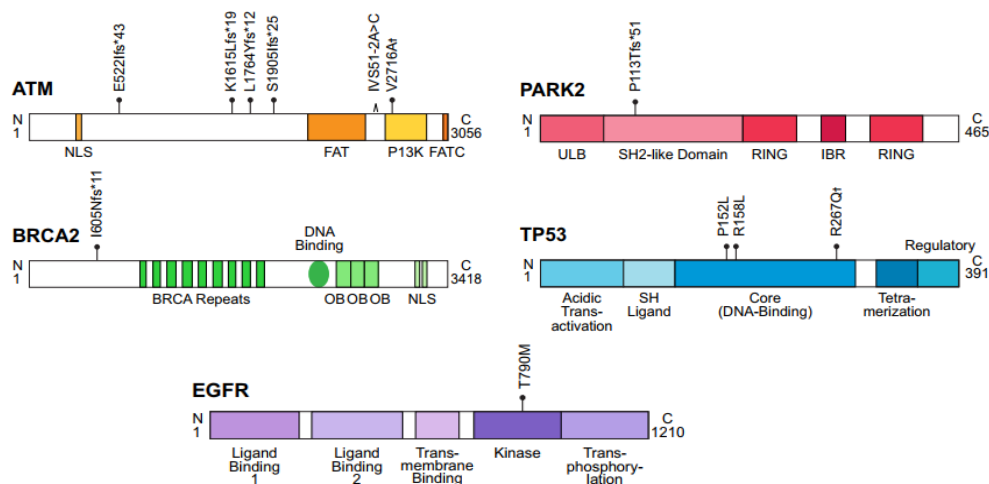


Figura 3. Genes que predisponen al cáncer de pulmón. Modificada de Parry *et al.*, 2017

Se ha encontrado un mayor riesgo en personas portadoras de variantes germinales del gen *TP53*. Si fuman, estas personas son 3 veces más susceptibles a desarrollar cáncer de pulmón que los portadores que no fuman (Delgado *et al.*, 2005). También se ha descrito la variación en la secuencia T790M del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Arrieta *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2008).

Además de los factores de riesgo mencionados anteriormente, la contaminación ambiental producida por la combustión incompleta de combustibles fósiles y la exposición a aeropartículas del humo de leña aumentan el riesgo de padecer cáncer de pulmón (OR 1.9; IC 95% 1.1-3.5; Ruíz Godoy *et al.*, 2007). La exposición a nanopartículas menores a 10  $\mu\text{M}$ , las cuales contienen hidrocarburos policíclicos aromáticos adosados, presentes en el aire incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Molina *et al.*, 2008; Gridelli *et al.*, 2015). El humo producido por la combustión de la leña causa mutaciones en la proteína p53, estas mutaciones ocurren en el dominio de unión a DNA y tienen como consecuencia la pérdida de su función como factor de transcripción (Arrieta *et al.*, 2012).

### 2.3 Tipos de cáncer pulmonar

De acuerdo con las características histopatológicas, el cáncer de pulmón se diferencian en 2 tipos: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), el cual ocupa el 15% de todos los casos de cáncer pulmonar y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) que representa el 85% ( Figura 4; Gridelli *et al.*, 2015;

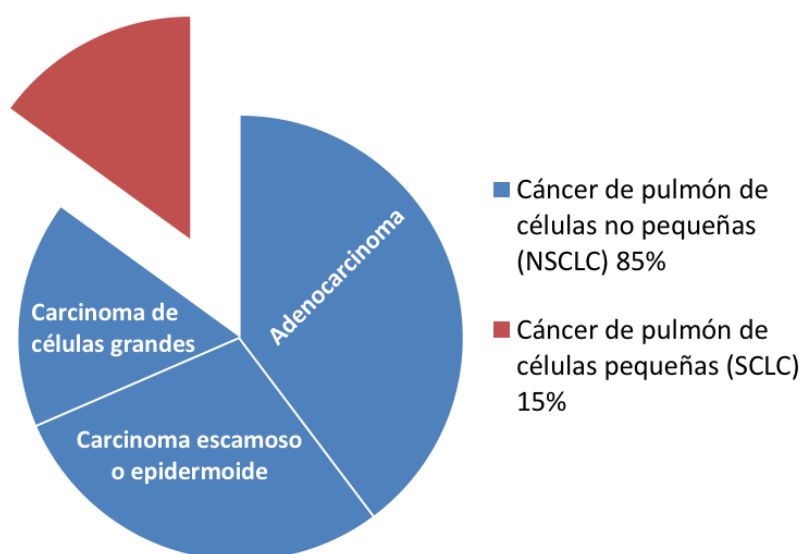


Figura 4. Clasificación del cáncer de pulmón. Adaptada de Gridelli *et al.*, 2015.

En cuanto a las diferencias entre tipos de cáncer pulmonar el SCLC se caracteriza por tener origen neuro-endocrino, presenta células pequeñas con poco citoplasma y tiene una localización peribronquial. La forma de las células es redondeada oval o fusiforme, con límites celulares mal definidos, un citoplasma pequeño, y presentan abundante necrosis con una alta tasa mitótica; son tumores muy agresivos y aparecen frecuentemente en fumadores. Se caracteriza por tener un crecimiento rápido, una elevada capacidad de generar metástasis y son significativamente sensibles al tratamiento con quimioterapia y radioterapia, sin embargo, la recurrencia en los dos primeros años es muy elevada ( Travis *et al.*, 2011; Davidson *et al.*, 2013;).

En cuanto al NSCLC las células tumorales son de mayor tamaño respecto a las células pulmonares normales, el citoplasma celular es muy abundante y la localización suele ser periférica o central al parénquima pulmonar, a diferencia del SCLC es un tumor de crecimiento lento y que generalmente deriva del epitelio bronquial. Sus manifestaciones clínicas son muy variables en los primeros estadios de modo que el 50% de los casos diagnosticados se encuentra en fase avanzada. La sensibilidad a la quimioterapia y radioterapia es baja (Travis *et al.*, 2011).

El NSCLS se divide en 3 histotipos; el epidermoide, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes. El histotipo epidermoide se origina del epitelio de revestimiento y frecuentemente se localiza en los bronquios lobales o principales, este histotipo se asocia con el consumo de tabaco y representa el 34% de los casos de NSCLC (Brcic *et al.*, 2012; Bubendorf *et al.*, 2017).

El adenocarcinoma se origina de las células broncoalveolares distales y es por ello que son tumores periféricos. Son frecuentemente operables, sin embargo, presentan un peor pronóstico comparado con el histotipo epidermoide. El adenocarcinoma es el histotipo más frecuente con una incidencia del 55% o mayor. Esta incidencia se cree que es debido a los cambios en la fabricación de cigarrillos, específicamente los cigarrillos con filtro y cigarrillos 'light', que permiten al fumador tener una aspiración más profunda; el humo alcanza las partes más profundas de los bronquios y los alvéolos, donde surge adenocarcinoma (Gridelli *et al.*, 2015; Bubendorf *et al.*, 2017).

El carcinoma de células grandes presenta un pronóstico similar al adenocarcinoma, su localización frecuentemente es en la periferia del pulmón aunque se ha encontrado también en localización central y es el subtipo menos frecuente teniendo una incidencia menor al 11% (Travis *et al.*, 2011; Bubendorf *et al.*, 2017).

## 2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de esta patología es un problema grave debido a que los pacientes son asintomáticos en etapas tempranas de la enfermedad, y por ello se diagnostican en etapas avanzadas. La posibilidad de detección en etapa clínica temprana permitiría el tratamiento con cirugía y agentes citotóxicos (Detterbeck *et al.*, 2013).

Existen pruebas diagnósticas basadas en imágenes como la radiografía de tórax (RXT), la tomografía computarizada (CT), la resonancia magnética (RM), o tomografía por emisión de positrones (PET). Este tipo de técnicas pretenden principalmente encontrar áreas sospechosas que podrían ser cancerosas y conocer si el cáncer se ha propagado. La RXT en proyección anteroposterior y lateral es el primer estudio que se solicita en pacientes que han sido vinculados con los factores de riesgo. Esta técnica muestra una sensibilidad del 40% para detectar nódulos pulmonares (Velasco *et al.*, 2009).

La tomografía axial computada (TAC) se ha vuelto un método de alta elección ya que muestra mejores resultados que la RXT (Team *et al.*, 2011), y tiene una sensibilidad hasta del 22% para la detección de nódulos pulmonares (Alpert & Naidich *et al.*, 2011).

La tomografía por emisión de positrones (PET-CT por sus siglas en inglés) permite observar las estructuras anatómicas y además establece el sitio exacto de las metástasis, permitiendo conocer el estadio de la enfermedad (Caers *et al.*, 2014).

La sintomatología como la tos (a veces con sangre), el dolor de pecho, la ronquera, la pérdida de peso, la dificultad para respirar, el cansancio y los resultados de los estudios de imagenología pueden sugerir padecer cáncer de pulmón. Pero el diagnóstico definitivo se hace mediante pruebas histológicas en donde se observan las células de pulmón. Las células se pueden obtener a partir de secreciones del pulmón (esputo o flema), del líquido del área que rodea el pulmón (toracocentesis), o de un área que causa sospecha (biopsia). Sin embargo, algunos de estos procedimientos son altamente agresivos o no brindan suficiente cantidad de muestra para el análisis. Es por esto que además de los estudios de imagenología y de los procedimientos invasivos, actualmente hay un creciente interés en el desarrollo de pruebas que incorporen biomarcadores genéticos y moleculares, usando muestras no invasivas o mínimamente invasivas tales como; sangre, aire exhalado o esputo (Ghosal *et al.*, 2009; Westeinde *et al.*, 2011; Jantus *et al.*, 2012). Estos biomarcadores podrían brindar un método de tamizaje y monitoreo de la enfermedad en pacientes con riesgo de cáncer de pulmón.



## 2.5 Estadio clínico

Para tener un diagnóstico completo del cáncer de pulmón es necesario conocer la extensión anatómica que ha alcanzado el cáncer. La estadificación del cáncer de pulmón se basa en la clasificación de tumores malignos, la cual utiliza parámetros como: el tamaño del tumor, la infiltración a los nódulos linfáticos, y metástasis (Tumor/Nódulos/Metástasis –TNM). El objetivo de este sistema de clasificación es conocer el estadio del tumor enfocado hacia el manejo clínico (Tabla 1; Greene *et al.*, 2002).

1. Tumor primario (T)	
<b>TX</b>	El tumor primario no puede ser evaluado
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario
<b>Tos</b>	Carcinoma in situ (cáncer inicial que no se ha diseminado a tejidos vecinos)
<b>T1, T2, T3, T4</b>	Tamaño y/o extensión del tumor primario
2. Nódulos linfáticos regionales (N)	
<b>NX</b>	Los nódulos linfáticos regionales no pueden ser evaluados
<b>N0</b>	No hay metástasis en nódulos linfáticos regionales
<b>N1, N2, N3</b>	Complicación de nódulos linfáticos regionales (número y/o extensión de diseminación)
3. Metástasis distante (M)	
<b>MX</b>	No es posible evaluar una metástasis distante
<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis distante (el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo)

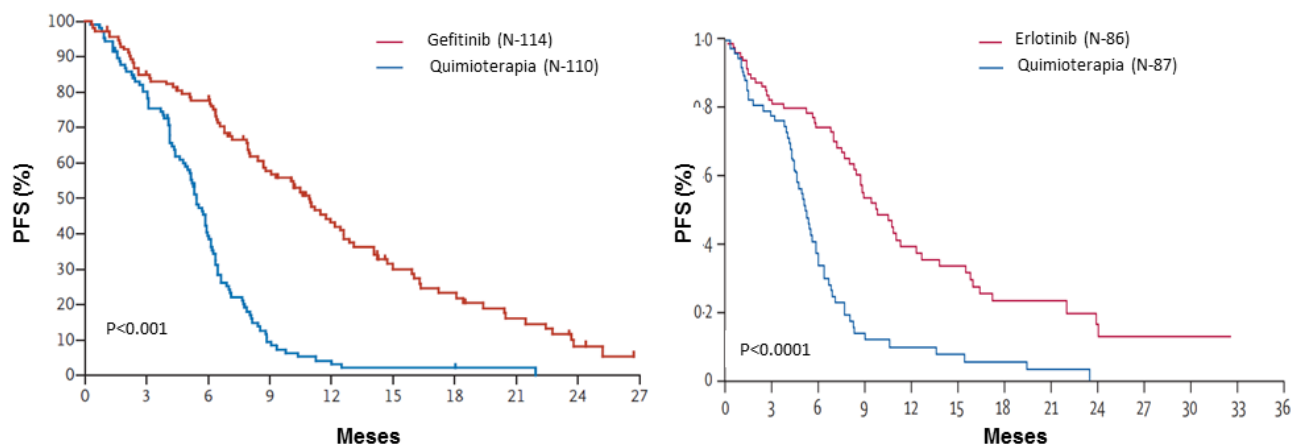
## 2.6 Tratamiento

El tratamiento de elección depende de factores como la histopatología, la estadificación, la biología del tumor y de la salud del paciente. Conocer la estadificación permite a la clínica otorgar el tratamiento más adecuado. En pacientes con NSCLC, la opción terapéutica de primera mano es la cirugía, la cual extirpa el tumor por completo. Sin embargo, sólo del 20 al 30% de los pacientes son elegibles a esta opción debido a que el diagnóstico se realiza frecuentemente en etapas avanzadas de la enfermedad (Spiro *et al.*, 2010).

La terapia de primera línea consiste en sales de platino, no obstante, se han reportado altas toxicidades asociadas a esta terapia. Además, los pacientes mueren por cáncer de pulmón en menos de 5 años, es por esto que se utilizan otros regímenes quimioterapéuticos como los taxanos (Molina *et al.*, 2008), o la quimioterapia paliativa en donde se utilizan regímenes de platino combinados con fármacos como el paxlitaxel, docetaxel, gemcitabina o vinorelbina (Molina *et al.*, 2008), sin embargo solo el 40% de los pacientes responden a estas modalidades (Earle *et al.*, 2008).

Otra opción es la radioterapia; ésta se asocia con una tasa de supervivencia más alta que la quimioterapia del 13 al 39% de estos pacientes presentan una sobrevida a 5 años en pacientes con tumores T1 y T2 (Baker *et al.*, 2016).

La quimioterapia de segunda línea se utiliza en caso de fracaso con la quimioterapia de primera línea. Una de las terapias utilizadas son las terapias dirigidas hacia alteraciones moleculares específicas, estas han demostrado que pacientes con dichas alteraciones moleculares responden mejor a esta modalidad. Algunas de estas alteraciones ocurren en los receptores tirosina cinasa (TK) como *EGFR*, y en vías de señalización que regulan procesos como la angiogénesis, apoptosis, y control del ciclo celular entre otros. Un ejemplo de terapia dirigida son los inhibidores tirosina cinasa (TKI). Se ha demostrado que pacientes con NSCLC que portan una mutación en *EGFR* responden favorablemente a los TKI mejorando la supervivencia libre de progresión (PFS), en comparación con la quimioterapia convencional (Figura 5) (Kwak *et al.*, 2010; Maemondo *et al.*, 2010)



**Figura 5. Supervivencia libre de progresión** A): Pacientes con NSCLC avanzado que albergan mutaciones en *EGFR*, gefitinib mejoró la supervivencia libre de progresión, en comparación con la quimioterapia estándar. B) Pacientes con NSCLC avanzado que albergan mutaciones en *EGFR*, erlotinib mejoró la supervivencia libre de progresión, en comparación con la quimioterapia estándar. Modificado de Maemondo *et al.*, 2010; Rosell *et al.*, 2012.

Los inhibidores de primera generación contra *EGFR*, incluyen a erlotinib y gefitinib, como tratamiento de primera línea en pacientes con una mutación en *EGFR*, lo que lleva a una PFS más prolongada (Gao *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015). En cuanto a la supervivencia global (OS) no muestran ser estadísticamente diferente entre los TKI de primera generación y la quimioterapia (Mok *et al.*, 2009; Maemondo *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2012; J.-Y. Han *et al.*, 2012; Rosell *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015)

Existe evidencia de varios estudios clínicos de fase I y II que hicieron uso de TKI como gefitinib y erlotinib. Estos inhibidores se administraron a pacientes tratados con quimioterapia citotóxica convencional, y aproximadamente el 10% de la

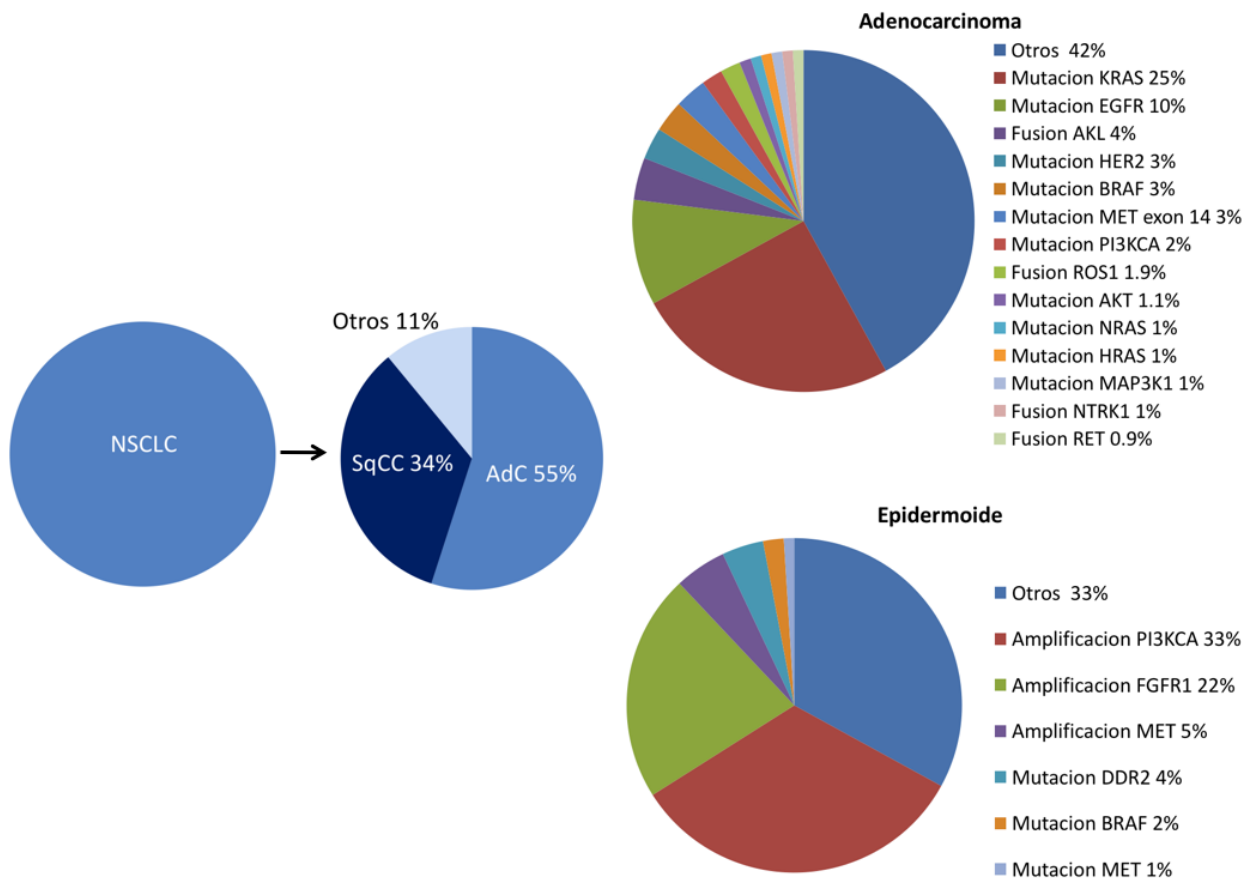
cohorte al azar demostró una mejoría sintomática y una respuesta parcial en los ensayos de fase I con un tiempo medio de progresión de aproximadamente 3 meses (Miller *et al.*, 2004) En cuanto a los ensayos de fase II estos mostraron regresión en el 14% de los pacientes y una mejoría sintomática del 39% (Miller *et al.*, 2004; Shigematsu *et al.*, 2005; Jackman *et al.*, 2009; Mok *et al.*, 2009;) mejorando la PFS hasta 27 y 33 meses (Figura 5; Maemondo *et al.*, 2010).

Con base en estos ensayos se concluye que las mutaciones confieren sensibilidad a los fármacos TKI tales como gefitinib y erlotinib, ya que estos compiten por el sitio activo de la enzima bloqueando la entrada del ATP y a su vez la activación. Por ello se encuentran actualmente aprobados por la administración de alimentos y medicamentos (FDA) como terapia de primera línea en pacientes que albergan una mutación en *EGFR*.

A pesar de que existe una buena respuesta a los TKI, la mayoría de los pacientes con NSCLC con mutaciones activadoras en *EGFR* desarrollan resistencia, generalmente de 9 a 14 meses después del inicio del tratamiento (Rosell *et al.*, 2009; Mitsudomi *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Jänne *et al.*, 2012). Los TKI de segunda generación, incluyen afatinib y dacomitinib, y se han desarrollado para combatir dicha resistencia adquirida, pero se ha observado una eficacia limitada (Miller *et al.*, 2012; Ellis *et al.*, 2014). Más recientemente, los fármacos de tercera generación, incluyen rociletinib y osimertinib, los cuales están diseñados para inhibir de forma irreversible la actividad TK de *EGFR*, incluida la activación por la mutación de resistencia T790M, sin afectar a *EGFR* tipo silvestre (Zhou *et al.*, 2009; Yap *et al.*, 2014). Es por ello que actualmente se requiere de la búsqueda de estas mutaciones en pacientes con adenocarcinoma antes de iniciar el tratamiento quimioterapéutico (Jett & Carr *et al.*, 2013).

## 2.7 Alteraciones moleculares

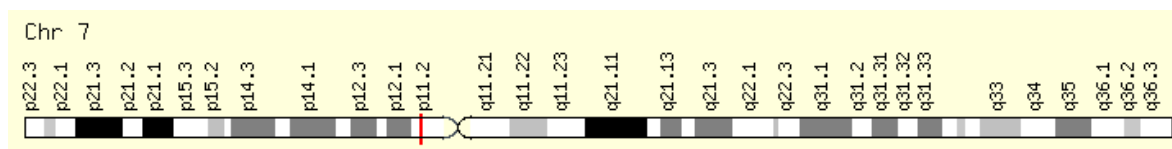
En la década pasada se realizaron descubrimientos clave que revolucionaron el cáncer de pulmón. La identificación de alteraciones recurrentes en diferentes vías de señalización demostró que el cáncer de pulmón es una enfermedad compleja y heterogénea. El reconocimiento de diferentes subtipos moleculares presentes de NSCLC ha llevado a la utilización de terapia dirigida. Un ejemplo de ello son las mutaciones en el dominio de la tirosina cinasa de *EGFR* en pacientes con una respuesta clínica favorable al gefitinib (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004). Por ello ahora, la presencia de una mutación del gen *EGFR* es de utilidad clínica, ya que se utiliza para seleccionar pacientes elegibles a un tratamiento con un inhibidor de tirosina cinasa u otros tratamientos dependiendo de las alteraciones que se presenten a nivel molecular (Figura 6) (Mok *et al.*, 2009).



**Figura 6. Genes que presentan alteraciones en cáncer de pulmón.** Las alteraciones genéticas en cáncer de pulmón se dan fundamentalmente en genes que codifican receptores, proteínas con actividad cinasa y fosfatasa, y factores de transcripción que participan en distintas vías de transducción de señales controlando, entre otros, los procesos de proliferación y supervivencia celular. Se indica, para cada gen, el tipo y la frecuencia de cada alteración, modificada a partir de Bubendorf *et al.*, 2017.

### 3. Receptor para el factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*)

*EGFR* es un gen que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (7p11.2; Figura 7); está conformado por 28 exones, y codifica una glicoproteína transmembranal con actividad TK de 1186 aminoácidos con una masa molecular de 170kDa, pertenece al grupo de receptores de la familia del factor de crecimiento epidérmico humano que consiste en cuatro miembros (HER1-4). Esta familia regula procesos como la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la diferenciación, y el desarrollo (Roskoski *et al.*,2014).



**Figura 7. Localización genómica de *EGFR*.** Tomada de The Human Gene Database (GeneCards)

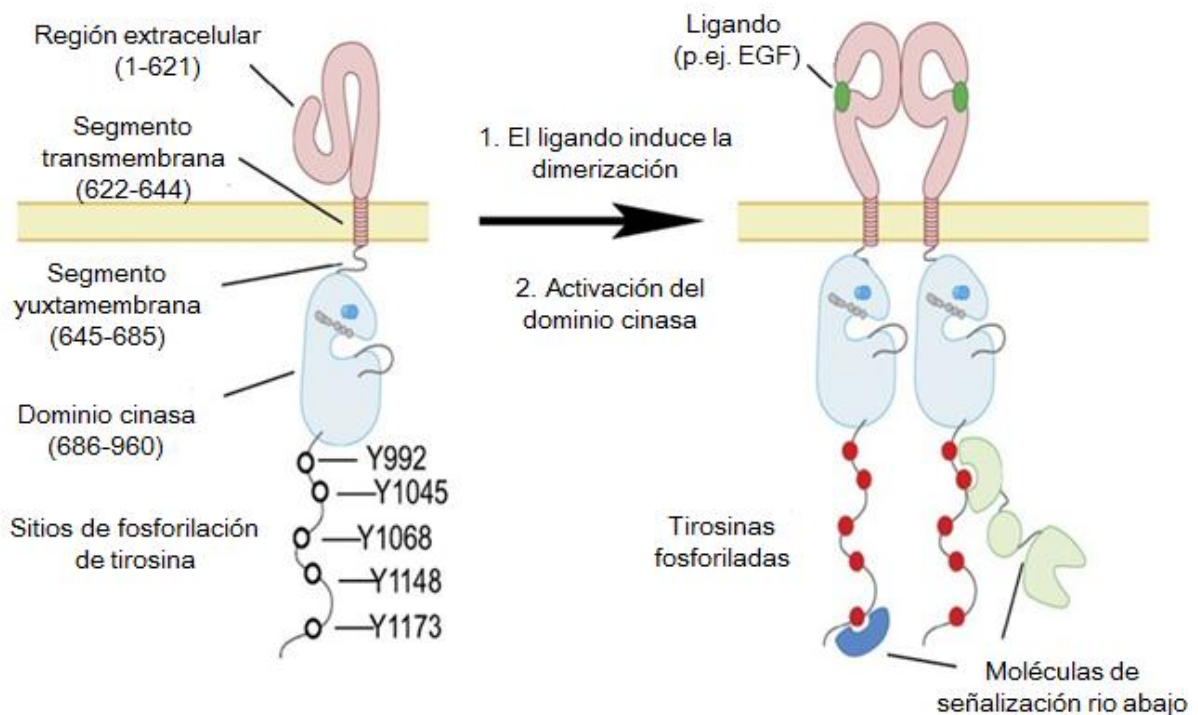
La familia de receptores HER interactúan con ligandos estos se dividen en cuatro grupos de acuerdo con el receptor al que se unen. El primer grupo está conformado por ligandos que se unen únicamente a *EGFR* como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y la anfiregulina (AR). El segundo grupo está conformado por betacelulina (BTC) y epiregulina (EPR) que se unen a *EGFR* y a HER4. El tercer grupo consiste en neuregulina 1 (Nrg-1) y la neuregulina 2 (Nrg-2), estos ligandos se unen a HER3 y HER4. En el cuarto grupo se encuentran neuregulina 3 (Nrg-3) y neuregulina-4 (Nrg-4) que se unen a HER4. El receptor HER2 no tiene ningún ligando reportado hasta ahora (Roskoski *et al.*, 2014).

Los receptores comparten características estructurales; contienen una región extracelular, una región transmembranal, un segmento adyacente a la región transmembranal, un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa y una región carboxilo terminal. La región extracelular es glucosilada y se divide en cuatro partes: dominios uno y tres intervienen en la unión del ligando, los dominios dos y cuatro intervienen en la homodimerización y heterodimerización con miembros de la familia HER. El dominio extracelular es seguido por un segmento de membrana de 19-25 residuos de aminoácidos y una porción intracelular de aproximadamente 540 residuos de aminoácidos que contiene un segmento de yuxtamembrana de 40 residuos. El dominio intracelular se conforma por una proteína de 270 residuos con actividad cinasa y una cola carboxiterminal de 230 residuos (Figura 8) (Roskoski *et al.*, 2014).

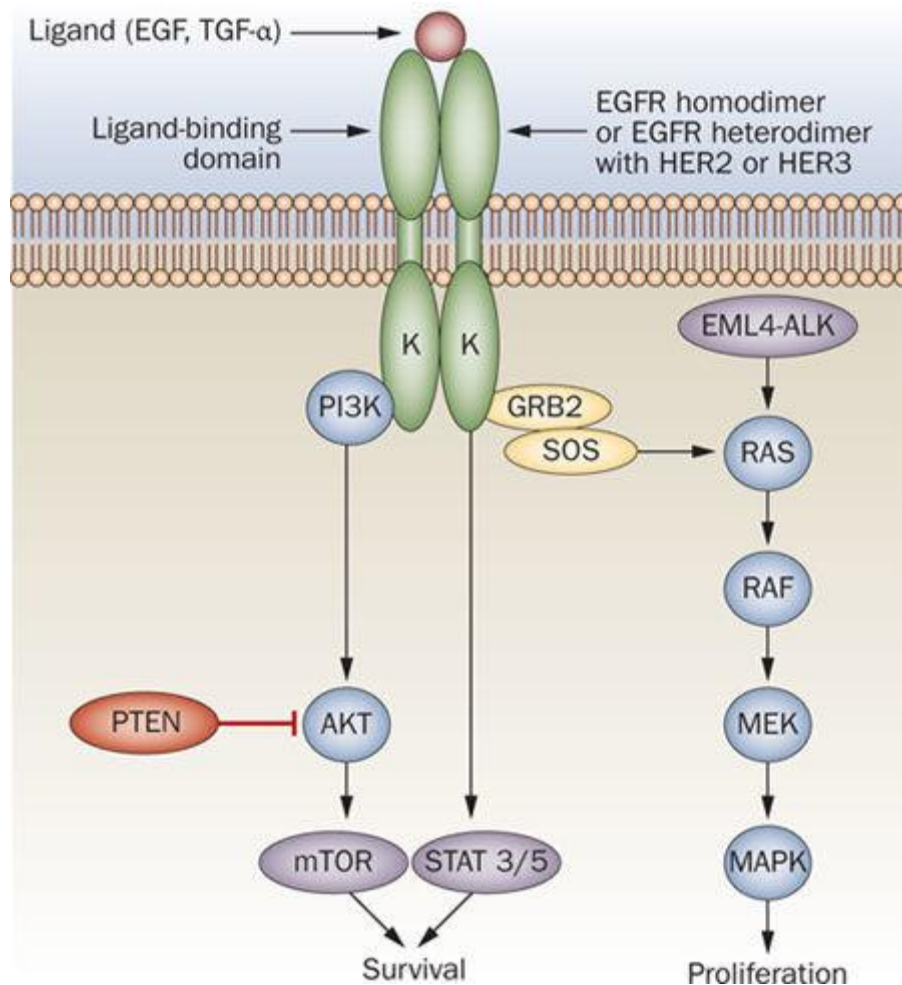
La unión ligando-receptor induce un cambio conformacional en la región extracelular provocando la exposición de un segmento del dominio dos, que participa en la dimerización (Figura 8) (Roskoski *et al.*, 2014). Este proceso induce la activación de la cinasa, formando un dímero asimétrico entre los

dominios cinasa de los receptores activados, uno de los dominios de cinasa se encarga de inducir cambios conformacionales en el dominio del otro receptor. Este evento provoca la apertura del sitio catalítico ya que se forma un puente salino entre los residuos de lisina y glutamato (Zhang *et al.*, 2006).

Una vez activado el receptor se induce la autofosforilación del dominio cinasa de *EGFR*, y los residuos de fosfotirosina que se forman actúan como un sitio de acoplamiento para varias moléculas adaptadoras como GRB2 y SOS (Figura 8) dando como resultado la transducción de señales proliferativas y la sobrevivencia a través de cascadas de señalización (Figura 9) (Stamos *et al.*, 2002).



**Figura 8. Receptor del factor de crecimiento Epidérmico (EGFR).** Panel izquierdo: Estructura Derecho: Dimerización de EGFR inducida por ligando y estados activo e inactivo de su dominio de cinasa, adaptada a partir de Zhang *et al.*, 2006.

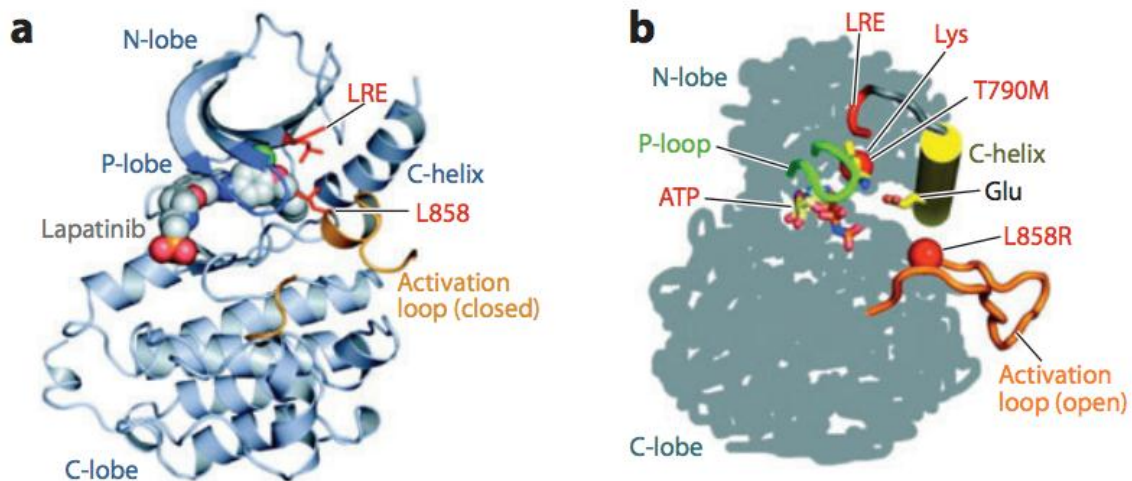


**Figura 9. Vía de señalización de *EGFR*.** *EGFR* se activa mediante la unión de un ligando (por ejemplo, EGF o TGF- $\alpha$ ) que se une al dominio extracelular del receptor. La formación de homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia ErbB, conduce a la fosforilación del dominio tirosina cinasa, que activa las vías río abajo PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/MEK/MAPK. La vía RAS/RAF/MEK/MAPK puede ser activada por la fusión de EML4-ALK. PTEN regula de manera negativa a AKT. Abreviaturas: EGF, factor de crecimiento epidérmico; GRB2, proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento; K, dominio cinasa; MAPK, proteína cinasa activada por mitógeno; mTOR, diana de rapamicina en células de mamífero; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa; PTEN homólogo de fosfatasa y tensina; SOS, factor intercambiador de nucleótidos; STAT, transductor de señal y activador de la transcripción; TGF- $\alpha$ , factor de crecimiento transformante alfa, tomada de Janku *et al.*, 2010.

El dominio de tirosina cinasa presente en *EGFR*, presenta una estructura bilobulada, los residuos 685-769 comprenden el lóbulo NH<sub>2</sub>-terminal y está formado principalmente por laminas  $\beta$  en anti paralelo y una C-hélice, mientras que el lóbulo COOH-terminal abarca los residuos 773-953 y se compone principalmente de  $\alpha$ -helicoidales. El sitio catalítico se encuentra en la hendidura formada por los dos lóbulos, este funciona como sitio de unión al ATP. En el lóbulo

NH2-terminal se encuentra un residuo de lisina, en la posición 654 que interactúa con un residuo de glutamato en posición 762, esta interacción electrostática favorece la conformación activa de la cinasa (Figura 10) (Lynch *et al.*, 2004).

La unión del ligando es el principal mecanismo que provoca la dimerización y por tanto la activación de *EGFR* (Figura 8). Sin embargo, existen otras condiciones que pueden provocar la activación como el aumento en el número de copias o las mutaciones. Existen hélices o bucles alrededor de la hendidura formada por los dos lóbulos, estos elementos se ven afectados por mutaciones las cuales reorientan su conformación permitiendo la entrada del ATP, y así mismo la activación constitutiva del receptor (Figura 10) (Nicholson *et al.*, 2001).



**Figura 10. Estructura del dominio cinasa de EGFR:** a) tipo silvestre b) mutación L858R, el bucle de activación se encuentra en posición abierta, mismo cambio que ocurre cuando el receptor se activa mediante unión de un ligando. Tomado de Santos *et al.*, 2011

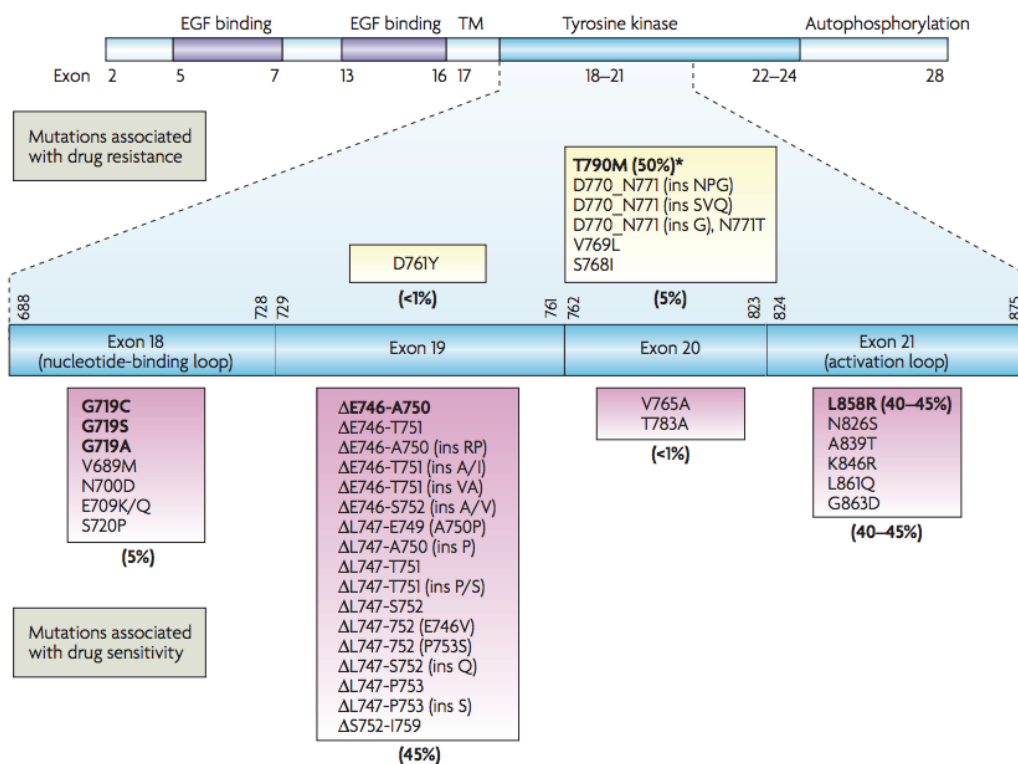
### 3.1 Mutaciones del gen *EGFR*

Las mutaciones del gen *EGFR* se han encontrado principalmente en adenocarcinoma, en personas de origen asiático, no fumadores, y en el sexo femenino (Shigematsu & Gazdar, 2006). Estas mutaciones se han descrito en distintos tipos de cáncer como: cáncer de pulmón, cáncer de las vías biliares, ovario, colorectal, de cabeza y cuello, esofágico y pancreático. Han sido reportadas en tumores de pacientes con NSCLC presentes en el 15% de poblaciones caucásicas, en el 33% de la población latinoamericana, y hasta el 60% en poblaciones asiáticas (Arrieta *et al.*, 2011).

Estas mutaciones son principalmente de origen somático y se limitan a los exones 18 al 21 que codifican para el dominio TK. Hay 3 tipos de mutaciones: deleciones, inserciones y mutaciones puntuales. Todas estas mutaciones ocurren en las estructuras encontradas alrededor de la hendidura de unión a ATP incluyendo el P-loop, la  $\alpha$ -hélice y el A-loop. Las mutaciones del exón 19 son deleciones de 3 a 8 aminoácidos, lo que genera un cambio conformacional en la hélice reguladora



del sitio activo; representan el 44% de las mutaciones siendo el tipo más predominante (Massarelli *et al.*, 2013; Shigematsu *et al.*, 2006). Las mutaciones puntuales, ocupan el segundo lugar especialmente la sustitución de un solo nucleótido L858R en el exón 21 que representa el 41% de todas las mutaciones. La mutación G719X (X indica A, C o S) en el exón 18, otra mutación puntual, que representa el 4% de todas las mutaciones. También se han encontrado duplicaciones/inserciones en el exón 20 que representan el 5% de todas las mutaciones (Figura 11) (Shigematsu *et al.*, 2006).



**Figura 11. Distribución de los exones y mutaciones de EGFR:** Dominio extracelular (unión de EGF), el dominio transmembrana (TM) y el dominio intracelular (que comprende las regiones de tirosina cinasa y de autofosforilación). Se representan las regiones ricas en cisteína en el dominio extracelular (unión de EGF, región sombreada de color púrpura) y la región de tirosina cinasa en el dominio intracelular que abarca los dominios 18-21 en donde se encuentran las mutaciones más relevantes (región sombreada de azul fuerte). Se muestran listas detallada de las mutaciones de EGFR para cada exón, que están asociadas con sensibilidad a los fármacos gefitinib o erlotinib (cajas Magenta) o resistencia (cajas amarillas). Una de las mutaciones más recurrentes recurrente es la sustitución de L858R en el exón 21, dentro del bucle de activación de EGFR, que comprende aproximadamente 40-45% de las mutaciones de EGFR. Las sustituciones de nucleótidos en el exón 18 (por ejemplo, G719C o G719S) representan el 5%, al igual que inserciones en marco en el exón 20. La mutación clínicamente más relevante es T790M en el exón 20, que se detecta en 50 % de los casos, y es una segunda mutación asociada con la resistencia adquirida a gefitinib y erlotinib. La mutación D761Y, una mutación secundaria similar a T790M, ubicada en el exón 19 de EGFR (en el límite del exón 19 y el exón 20), también se relacionadas con resistencia a gefitinib y erlotinib en células de NSCLC. Las principales mutaciones en cada clase se muestran en negrita, tomada de Sharma *et al.*, 2007.

### **3.2 Mutaciones en la población mexicana**

En México existe evidencia sobre una alta tasa de respuesta a los tratamientos con TKI del 34% lo que demuestra la presencia de las mutaciones *EGFR*. Se realizó un estudio que determinó la frecuencia de las mutaciones activadoras de *EGFR* en 5 países, México obtuvo la segunda frecuencia más alta de mutaciones (31.2%). Estos datos sugieren que la frecuencia de las mutaciones de *EGFR* en América Latina es similar a la de las poblaciones asiáticas y caucásicas donde han mostrado tener mayor prevalencia, por lo tanto se obliga la búsqueda de estas mutaciones en pacientes mexicanos con NSCLC para elegir un tratamiento óptimo en cada paciente (Arrieta *et al.*, 2011).

#### **4. Metodologías para la detección de mutaciones**

Las técnicas de detección de mutaciones son de gran importancia, pueden aplicarse en la detección temprana, en la evaluación de la enfermedad residual posterior a la cirugía o radioterapia, en la terapia dirigida o con fines de monitoreo de la terapia (Milbury *et al.*, 2009b).

Las técnicas de detección de mutaciones utilizan muestras de ADN el cual se pueden obtener a partir de tejidos tumorales, esputo, orina, heces y sangre. Todas estas muestras se componen típicamente de ADN tipo silvestre y mutante. La diferencia entre estos tipos de ADN es que el ADN mutante es proveniente del tumor y se define por la presencia de mutaciones. Por el contrario el ADN silvestre procede de células sanas en apoptosis o en muerte celular. Por ello la cantidad de ADN tipo silvestre a menudo excede la cantidad de ADN mutante, lo que dificulta la detección e identificación de los alelos mutantes (Gocke *et al.*, 2000), más aun en los estadios tempranos del cáncer de pulmón donde la frecuencia alélica mutante (FA) es menor al 0.01%, valor que representa un reto para las técnicas de detección de mutaciones (Bettegowda *et al.*, 2014).

Las muestras que provienen de esputo o heces pueden contener ADN extraño como el de bacterias, por lo que no son recomendables. El uso de sangre es preferido porque es fácil de obtener y en ella se encuentra el ADN libre circulante (cfDNA), que es ADN de doble cadena el cual se encuentra altamente fragmentado este es liberado en la sangre a partir de células tumorales, por lo tanto contiene las alteraciones moleculares a nivel global tanto del tumor como de las metástasis (Diaz & Bardelli *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2015; Snyder *et al.*, 2016).

Tradicionalmente la identificación de mutaciones se basa en el análisis de secuenciación Sanger. Sin embargo, este solo es confiable cuando los alelos mutantes existen en concentraciones superiores del 20% (Vogelstein & Kinzler *et al.*, 1999). Este grado de sensibilidad es inadecuado para detectar mutaciones somáticas de baja frecuencia alélica, como en tejidos premalignos o durante el desarrollo temprano del cáncer, en tejido post-tratamiento. Por ello es necesario desarrollar técnicas para enriquecer el ADN mutante seguido de una técnica de confirmación.

Por ello se ha desarrollado una gama de diferentes tecnologías (Tabla 2) con el objetivo de aumentar la sensibilidad analítica de la detección de mutaciones (Ogino *et al.*, 2005; Do & Dobrovic *et al.*, 2009). Sin embargo, una mayor sensibilidad generalmente se acompaña con un mayor costo y una mayor complejidad (Milbury *et al.*, 2009b). En la siguiente tabla se resumen las ventajas y desventajas de las técnicas más frecuentemente utilizadas en la detección de mutaciones.

**Tabla 2. Métodos de detección de mutaciones.**

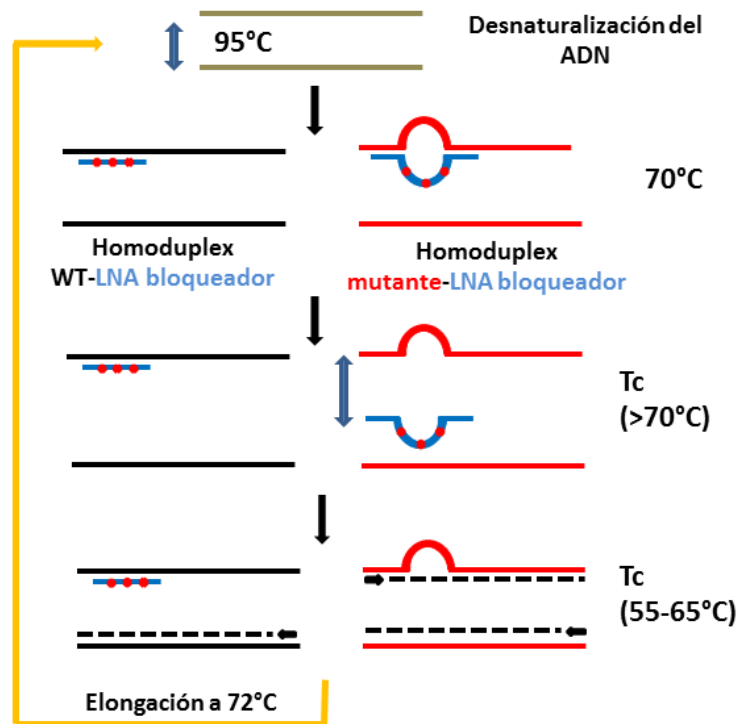
METODOLOGIA MOLECULAR	Sensibilidad (% de ADN mutado)	Ventajas	Desventajas	Referencia
PCR Alelo Especifico	10%	•No requiere equipo especial	•No detecta mutaciones desconocidas	(Endo et al., 2005)
Espectrometría de masas	1% -10%	•Análisis de más de un gen	•Requiere instrumentación de espectrometría de masas. •Solo mutaciones conocidas	(Arcila, Lau, Nafa, & Ladanyi, 2011; Brevet, Johnson, Azzoli, & Ladanyi, 2011)
PCR y Secuenciación Sanger	20-30%	•Puede detectar mutaciones desconocidas. •No requiere equipo especial. Barato	•Mucho tiempo, 2-3 días. •Trabajo intensivo. •Baja sensibilidad •Ensayo complejo	(Kimura et al., 2006; Lozano et al., 2011)
PCR and Pirosecuenciación	5-10%	•Genotipificación •Cuantifica el porcentaje de alelos mutados	•Tiempo efectuado: 2-3 días. •Requiere equipo especial. •Solo mutaciones conocidas	(Dufort, Richard, Lantuejoul, & de Fraipont, 2011)
HRM	1%	•Detecta cualquier mutación •Tiempo: 4hras	•Requiere equipamiento específico	(Borrás et al., 2011; Do, Krypuy, Mitchell, Fox, & Dobrovic, 2008; Fassina et al., 2009; Takano et al., 2007)
NGS	1–10%	•Detección de variantes de diferentes tipos	•Costoso •No detecta cambios en el número de copias ni inserciones o deleciones grandes	(Lin et al., 2014; Spencer et al., 2014; Uchida et al., 2015)
dHPLC	5%	•Tiempo: 5 horas •Más barato que Sanger •Económico •Poco tiempo de análisis	• Requiere equipamiento especial • Precisa experiencia en HPLC	(Chin et al., 2007; Cohen et al., 2006; Sueoka et al., 2007)
ARMS	1%	• Ensayo comercial disponible •Tubo cerrado •Menor tiempo (productos de PCR no procesados mediante electroforesis)	•Sólo detecta mutaciones específicas	(Ellison et al., 2010)
PNA-LNA PCR clamp	2%	• Enriquecimiento de alelos mutantes •Suprime la amplificación de alelos WT	• Requiere sondas no comerciales y caras	(H.-S. Han et al., 2012; Soh et al., 2006)
COLD-PCR	<0.1%	•Enriquecimiento de alelos mutantes •Se puede asociar con técnicas de confirmación	•Solo mutaciones conocidas	(Santis et al., 2011)
PCR digital	<0,02%	•Detección y cuantificación absoluta de alelos mutantes •Reducción en el costo de las reacciones (volumen en picolitros o nanolitros)	•Precio de la plataforma es costoso	(Isobe et al., 2015)
BEAMing	<0.1%	•Separa poblaciones genotípicas •Cuantificación absoluta	•Requiere uso de dos plataformas experimentales (PCR digital y citometría de flujo)	(Taniguchi et al., 2011)
Cobas, Therascreen	1%–3%	•Rápido •Barato •Aprobado por la FDA •Fácil	• Semicuantitativo •solo mutaciones conocidas	(Douillard et al., 2014; Goto et al., 2012; Kuang et al., 2009; Li et al., 2014; Mok et al., 2009; S. Wang et al., 2014)

Abreviaturas: ARMS: Sistema de mutación refractaria a la amplificación; COLD: Coamplificación a temperaturas de desnaturalización más bajas; dHPLC: Desnaturalización cromatografía líquida de alto rendimiento; HRM: Fusión de alta resolución; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; PNA-LNA: Ácido nucleico peptídico-ácido nucleico bloqueado; NGS: Secuenciación masiva de siguiente generación; BEAMing: Perlas, emulsión, amplificación, magnetismo.

Como se observa en la tabla 2 existen multitud de técnicas que se pueden utilizar para el análisis de mutaciones, en el siguiente apartado se resumen brevemente las utilizadas en este trabajo.

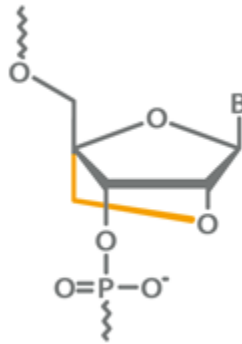
#### 4.1 E-ice-cold-PCR

Es una variante de PCR que utiliza una temperatura crítica de desnaturalización, en donde se desnaturalizan los alelos mutantes a una temperatura menor que el alelo silvestre, permitiendo de esta manera enriquecer exponencialmente el alelo mutante (Figura 12) (Milbury *et al.*, 2009b). Esta PCR utiliza un oligonucleótido de bloqueo que contiene ácidos nucleicos bloqueadores, este oligonucleótido hibrida al 100% con la secuencia silvestre (Milbury *et al.*, 2011). Los ácidos nucleicos bloqueadores, son un nucleótido modificado químicamente, el cual contienen un enlace extra que conecta el oxígeno 2' con el carbono 4' (Figura 13). Este enlace bloquea la conformación de la ribosa en una configuración 3'-endo, mejorando las propiedades de apareamiento de las bases y por lo tanto aumentando la temperatura de desnaturalización (Kaur *et al.*, 2006).



**Figura 12. Método de E-ice-cold-PCR** 1- Desnaturalización a 95°C. 2-Hibridación con la sonda bloqueadora. 3- Temperatura de desnaturalización calculada de la secuencia mutante (Tc). 4-Hibridación de los oligonucleótidos. 5-Extensión final a 72°C. Modificada de How Kit *et al.*, 2013.

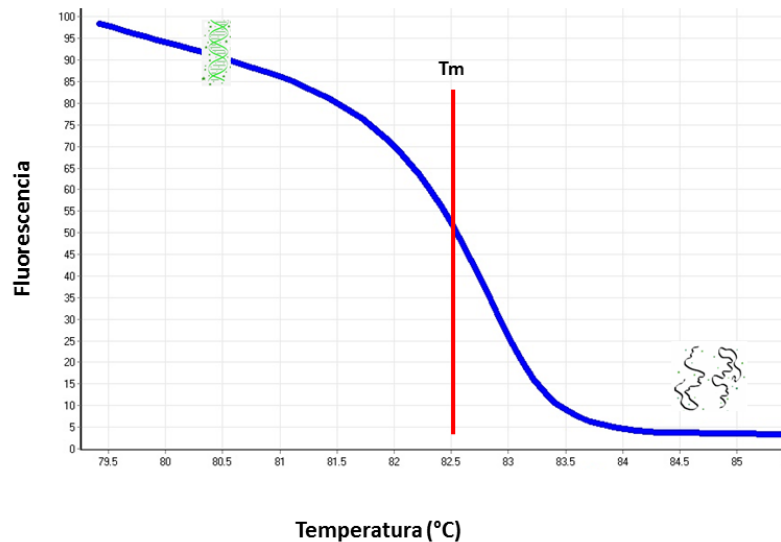
E-ice-cold-PCR es una tecnología prometedora, ya que utiliza bajas cantidades de ADN y puede hacer uso de cualquier tipo de muestras (tumor o distintos fluidos corporales como orina, esputo, cfADN). Al permitir la amplificación selectiva de las secuencia mutante se obtiene un mayor enriquecimiento, y por ende una sensibilidad mejorada ya que permite detectar alelos mutantes de baja frecuencia alélica (How Kit *et al.*, 2013; How-Kit *et al.*, 2014).



**Figura 13. Estructura de los LNA empleados en la sonda bloqueadora.** Tomada de Silaharoglu, Pfundheller, Koshkin, Tommerup, & Kauppinen, 2004.

## 4.2 Curvas de fusión de alta resolución (HRM)

HRM es un método pos PCR de genotipificación que se basa en la desnaturalización del ADN de doble cadena en presencia de un colorante intercalante fluorescente. El primer paso es un aumento gradual de la temperatura desde 50°C hasta 95°C para su desnaturalización. La transición del ADN de doble cadena a ADN monocatenario se cuantifica mediante la fluorescencia. La fluorescencia es emitida por el colorante de unión a la doble cadena de ADN, por ello de manera inicial habrá un alto nivel de fluorescencia, y disminuirá a medida que se desnaturaliza el ADN (Figura 14) (Taylor *et al.*, 2009; Borràs *et al.*, 2011).



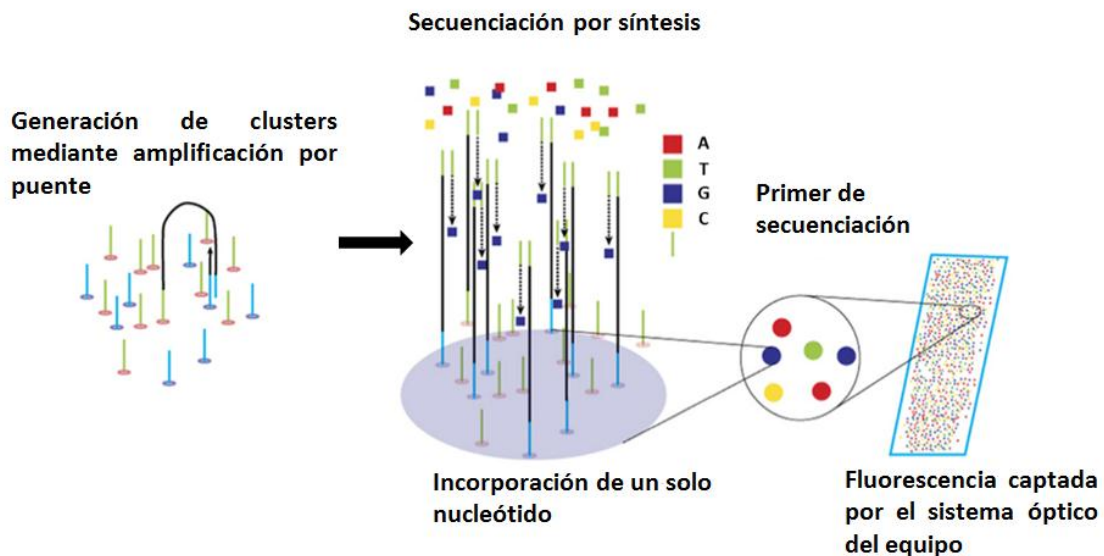
**Figura 14. Curva de disociación de alta resolución.** En la parte superior de la pendiente se grafica el valor de fluorescencia emitido por el colorante intercalado en la doble cadena, se observa que a medida que aumenta la temperatura el valor de fluorescencia disminuye.

El cambio en la fluorescencia se debe a la ruptura de los puentes de hidrogeno provocando la desnaturalización de las hebras, dando lugar a ADN monocatenario. Cada molécula de ADN tiene una temperatura de desnaturalización característica, denominada punto de fusión ( $T_m$ ). La  $T_m$  se define como la temperatura a la cual el 50% del ADN se encuentra desnaturalizado (Figura 14). Esta temperatura depende de factores como longitud de la cadena y contenido GC; y permiten diferenciar los heterodúplex mutantes y silvestres debido a la diferencias en su temperatura y por lo tanto generan perfiles de fusión distintos que permiten genotipificar las secuencias (Ririe *et al.*, 1997; Do *et al.*, 2008).

### 4.3 Secuenciación masiva en paralelo

La secuenciación en paralelo (SMP) es utilizada para determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) de una secuencia de ADN. La plataforma Illumina se basa en la secuenciación por síntesis con terminadores reversibles (Ming *et al.*, 2014).

Los primeros pasos consisten en la amplificación y preparación de bibliotecas, estas bibliotecas son depositadas en una laminilla de secuenciación, donde están dispuestos oligonucleótidos complementarios a los adaptadores de las bibliotecas. Así cada fragmento de ADN monocatenario se unirá por uno de sus extremos a los oligonucleótidos complementarios presentes en la laminilla. Posteriormente ocurre la amplificación por puente. Este proceso se repite varias veces hasta formar clústeres. En donde un cluster corresponde a una sola molécula amplificada y que representa una lectura. Al término de cada ciclo hay un lavado en donde se pierden las cadenas que no se encuentran unidas covalentemente a la laminilla. En el siguiente paso comienza la secuenciación por síntesis, donde la polimerasa empieza a incorporar un solo nucleótido a la vez, estos cuentan con un fluoróforo que emite una señal que será captada por el sistema óptico del equipo, una vez obtenida la imagen se desbloquea el carbono 3' de modo que se acepte una nueva base para continuar la reacción de secuenciación (Figura 15; Ming *et al.*, 2014).



**Figura 15. Proceso de secuenciación de Illumina.** Modificada de Ming *et al.*, 2014.



## 5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es un problema de salud pública. A nivel mundial es la primera causa de muerte por cáncer y en México ocupa el cuarto lugar. Uno de los elementos clave para el desarrollo de este tumor son las mutaciones somáticas, especialmente en proteínas con actividad de tirocina cinasa como *EGFR*. Las mutaciones en este gen son usadas como blancos terapéuticos. La determinación de una mutación patogénica permite el establecer un diagnóstico molecular y un tratamiento diana adecuado. Por lo tanto, la detección de mutaciones es crítica en el cáncer de pulmón. Por ello se requieren técnicas sensibles para detectar dichas mutaciones, incluso en etapas tempranas y en el seguimiento. Las técnicas de uso convencional sólo detectan alelos mutantes en fases avanzadas de la enfermedad y requieren del análisis invasivo del tejido tumoral. Otras desventajas de las técnicas convencionales es que no tienen la sensibilidad requerida para ser utilizadas en biopsias líquidas y requieren de un tiempo relativamente prolongado para obtener el resultado. Es por lo anterior que en el presente trabajo se implementaron técnicas con sensibilidad superior a las convencionales, que pueden ser aplicables a muestras obtenidas a partir de biopsias líquidas. Estas estrategias de análisis permitiran realizar la detección de alelos mutantes con frecuencias alélicas bajas, menores a 0.01%, las cuales han sido reportadas en biopsias líquidas en las etapas iniciales del cáncer de pulmón.

## 6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible mejorar la detección de mutaciones en *EGFR* mediante E-ice-cold-PCR, acoplándolo a metodologías de confirmación como HRM o SMP?

## **7. HIPOTESIS**

El E-ice-cold-PCR enriquece de manera selectiva los alelos mutantes del gen *EGFR*, lo cual mejora la detección de mutaciones mediante HRM y SMP.

## 8. OBJETIVOS

### General

- Implementar el método E-ice-cold-PCR para enriquecer los alelos mutantes del gen *EGFR* y mejorar la detección mediante las técnicas de confirmación HRM y SMP.

### Particulares

1. Conocer los sitios del gen *EGFR* con mutaciones de relevancia clínica que presentan mayor frecuencia.
2. Determinar si el método E-ice-cold-PCR enriquece los alelos mutantes del gen *EGFR*.
3. Evaluar la sensibilidad de la PCR y del E-ice-cold-PCR acopladas a HRM y SMP.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 9.1 Análisis bioinformático.

Se realizó un meta-análisis con base en la secuencia consenso del gen depositada en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>), donde se localizaron las mutaciones a estudiar, a partir de registros obtenidos de la base de datos COSMIC Sanger (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>; Tabla 3).

Mutaciones	Exón	Frecuencia (casos)	Posición	Mutación control
p.G719A (c.2156G>C)	18	9	719	-
p.G719S (c.2155G>A)		35	719	-
p.E709K (c.2125G>A)		18	709	-
p.E709A (c.2126A>C)		14	709	-
p.L747S (c.2240T>C)	19	12	747	-
p.T790M (c.2369C>T)	20	348	790	Si
p.L858R (c.2573T>G)	21	2166	858	Si

\*Fuente: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC): <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/06/09/2015>

### 9.2 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron 4 juegos de oligonucleótidos compatibles para PCR TD y E-ice-COLD-PCR para amplificar las regiones hipermutables del gen *EGFR* en los exónes 18,19, 20 y 21 (Tabla 4) usando las plataformas bioinformáticas primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) y OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)

Para el diseño de los oligonucleótidos (sentido y anti sentido) se utilizaron los siguientes criterios:

1. Longitud entre 18 y 24 bases.
2. Composición del contenido de G-C de 50 a 60%.
3. Temperatura (T<sub>m</sub>) promedio de los oligonucleótidos de 55 a 65° C.
4. Análisis de variaciones de un solo nucleótido
5. Diseño favorable para el uso de LNAs

Tabla 4. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de mutaciones del gen *EGFR*.

Primer	Oligo	Nombre	Longitud (pb)	Secuencia	Producto	Exón	Intervalo codón	Mutaciones
1	F	EGFR18v2F	20	CCAACCAAGCTCTCTTGAGG	148	18	696-728	p.G719A (c.2156G>C) p.G719S (c.2155G>A) p.E709K (c.2125G>A) p.E709A (c.2126A>C)
2	R	EGFR18v2R	18	TTCATGGTCTGGTGGGG				
3	F	EGFR19F	21	CACCATCTCACAATTGCCAGT	159	19	729-767	p.L747S (c.2240T>C)
4	R	EGFR19R	19	TCCTCGATGTGAGTTTCTG				
5	F	EGFR20F	18	GCCTCTCCCTCCCTCCAG	125	20	760-796	p.T790M (c.2369C>T)CGCA
6	R	EGFR20v2R	18	CAGCCGAAGGGCATGAGC				
7	F	EGFR21v2F	20	AGCCAGGAACGTACTGGTGA	107	21	840-874	p.L858R (c.2573T>G)
8	R	EGFR21v2R	20	TGCCTCCTTCTGCATGGTAT				

### 9.3 Diseño de sondas con LNA

Se diseñaron dos sondas 100% complementarias a las secuencias silvestres de los exones 20 y 21 del gen *EGFR* (Tabla 5). Cada sonda fosforilada se solapa 5pb en el extremo 3' de uno de los dos oligos de reacción para que no pueda ser extendida por la polimerasa, los LNAs se colocan dependiendo el tipo de mutación. El diseño de las sondas se realizó en la plataforma Exiqon (<https://www.exiqon.com/oligo-tools>) tomando como referencia los artículos (Tabla 5) (How Kit et al., 2013; You et al., 2006)

Tabla 5. Diseño de sondas bloqueadoras de los exones 20 y 21 del gen *EGFR*. Diseño basado en You et al., 2006.

Exón 20	<b>CTCATCAC</b> GCAGCTCATGCCCTTCGGC+ <b>T</b> +GCCTCCTG/3Phos/ Longitud: 36pb Tm con exiqon: 82° C
Exón 21	<b>GGTAT</b> TCTTTCTCTTCCGCACCCAGCAGTTTGGCC+ <b>A</b> +GCC/3Phos/ Longitud: 40pb Tm con exiqon: 80° C
El sombreado amarillo corresponde a la secuencia que hibrida con el primer; el sombreado rojo indica los sitios mutados y el signo + corresponde a la posición en donde se colocó un LNA.	

### 9.3 Cultivo celular y extracción de ADN

Se realizó un banco de células de la línea celular NCIH-1975 (ATCC® CRL 5908™) obtenida de ATCC, ya que contenía las mutaciones del gen *EGFR* p.T790M (c.2369C>T) exón 20 y p.L858R (c.2573T>G) exón 21, con base en los registros obtenidos de la base de datos COSMIC Sanger (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>) y (Sharma, Bell, Settleman, & Haber, 2007). Para ello se utilizó medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO2 como lo indica ATCC.

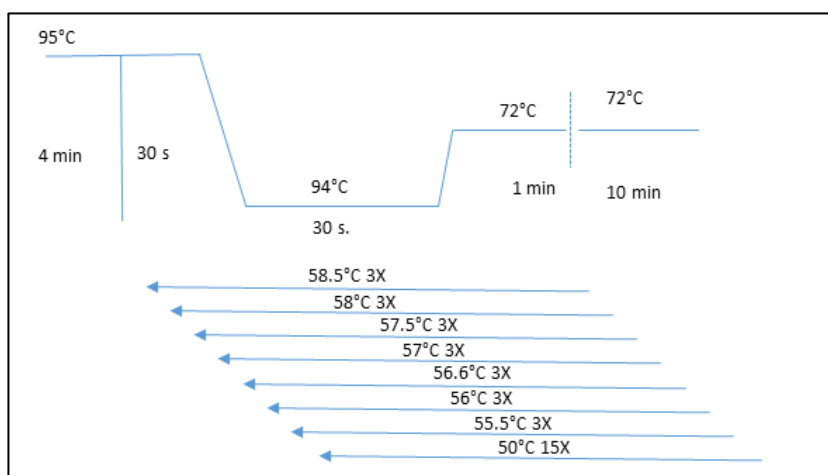
Una vez hecho el banco de células se utilizó una de las cajas de 75cm<sup>2</sup> con una confluencia del 80% para la extracción de ADN de la línea celular, y de sangre de

humano utilizando el kit de DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Cat. 69506) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se cuantificaron las 2 muestras utilizando el equipo de espectrofotometría Epoch de BioTek y se observó la integridad de las mismas por medio de geles de agarosa al 0.8%.

## 9.6 PCR

Para aumentar la especificidad en la amplificación se utilizó la variante de PCR – Touchdown que emplea distintas temperaturas de alineamiento, las cuales se van reduciendo cada 3 ciclos. Para efectos de simplicidad este método se nombrará como PCR a lo largo de esta tesis. Se amplificaron las regiones de interés utilizando las muestras de extracción de ADN como molde. La línea celular se tomó como control positivo ya que contiene las mutaciones de interés p.T790M (c.2369C>T) exón 20 y p.L858R (c.2573T>G) exón 21 y el ADN de sangre de humano como control negativo. Para cada reacción se utilizaron 25ng de DNA en un volumen final de 20µL usando el kit Taq Ready Mix PCR (KAPA taq. 1024, (Tabla 6). Se utilizó el equipo de PCR punto final T100 Thermal Cycler (BIORAD) usando el programa de amplificación que se muestra en la figura 16.

Tabla 6. Componentes de reacción PCR	
Reactivos	Volumen total (20 µL)
Buffer 2X	10 µL
Primer Forward	0.8 µL
Primer Reverse	0.8 µL
Molde (H1975) y (sangre )	1 µL
Agua libre de nucleasas	7.4 µL



**Figura 16. Programa de PCR.** El protocolo comienza con una desnaturalización a 95°C por 4 minutos, seguidamente a 95°C por 30 segundos, posteriormente comienza la etapa de alineación que consiste en un gradiente de temperaturas que va de mayor a menor, en donde cada temperatura se utiliza por 3 ciclos de PCR y posteriormente comienza la etapa de extensión a 72°C por un minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

## 9.7 E-ice-cold-PCR

Para realizar esta técnica se requiere determinar primero la temperatura crítica (T<sub>c</sub>), y conocer la concentración óptima de LNA que son puntos clave para la amplificación exponencial de la secuencia mutante.

Para determinar la T<sub>c</sub> se calculó la T<sub>m</sub> por medio de una curva de disociación o curva melting, este análisis se basa en un ciclo en donde aumenta la temperatura de manera gradual de 60°C hasta 90°C, cada incremento es de 1°C. Posteriormente se obtiene una gráfica que corresponde a la disociación de los fragmentos amplificados por captación de fluorescencia ya que contiene un colorante fluorescente de unión a ADN de doble cadena. Esta aplicación puede determinar la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) que es la temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturizado, y se identifica como el punto más alto de la curva de disociación del ADN.

El diseño experimental utilizó tres condiciones genotípicas: 1) mutante, 2) silvestre y 3) una combinación equimolar entre mutante y silvestre, en un volumen final de 20µL por reacción, utilizando el kit HRM Fast PCR (KAPA cat. KK4201); (Tabla 7). En total se realizaron 6 reacciones para cada exón, 3 de ellas corresponden al grupo con LNA, y los 3 restantes al grupo sin LNA, para comparar si el uso del LNA incrementa la T<sub>m</sub> de las secuencias. La amplificación se realizó utilizando el programa de la figura 16 haciendo uso del equipo de qPCR (Rotor Gene Q, Qiagen).

Tabla 7. Componentes de reacción para la determinación de la T <sub>c</sub>	
Reactivos	Concentración final
Agua	-
2X KAPA HRM FAST master mix	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 Mm
Primer Forward 10 µM	0.2 µM
Primer Reverse 10 µM	0.2 µM
DNA	1 ng

Una vez determinada la T<sub>m</sub> se realizó un experimento en el cual se tomaba en cuenta un intervalo de temperaturas de desnaturización por debajo de la T<sub>m</sub> calculada anteriormente. Esto se realizó con el objetivo de seleccionar temperaturas a las cuales solo se desnaturiza la secuencia mutante de manera preferencial. Además de la selección de temperaturas se utilizaron diferentes concentraciones de LNA para seleccionar de manera experimental las condiciones óptimas a las cuales se obtenía un mayor enriquecimiento de alelos mutantes e implementar estas condiciones al realizar la técnica E-ice-cold-PCR (Tabla 8)



Para ello se utilizaron las siguientes concentraciones de LNA 0, 50nM, 100nM y 150nM. Cada concentración era utilizada en cada una de las siguientes temperaturas 84.4°C, 83.9°C, 83.2°C y 82.6°C. En total se utilizaron 17 reacciones para cada exón como se muestra en la tabla 8, en un volumen final de 30µL usando el kit Taq HotStart PCR (KAPA cát. 1510; tabla 9), y 25ng totales de ADN en cada reacción, con una proporción 5% ADN mutante y 95% ADN silvestre.

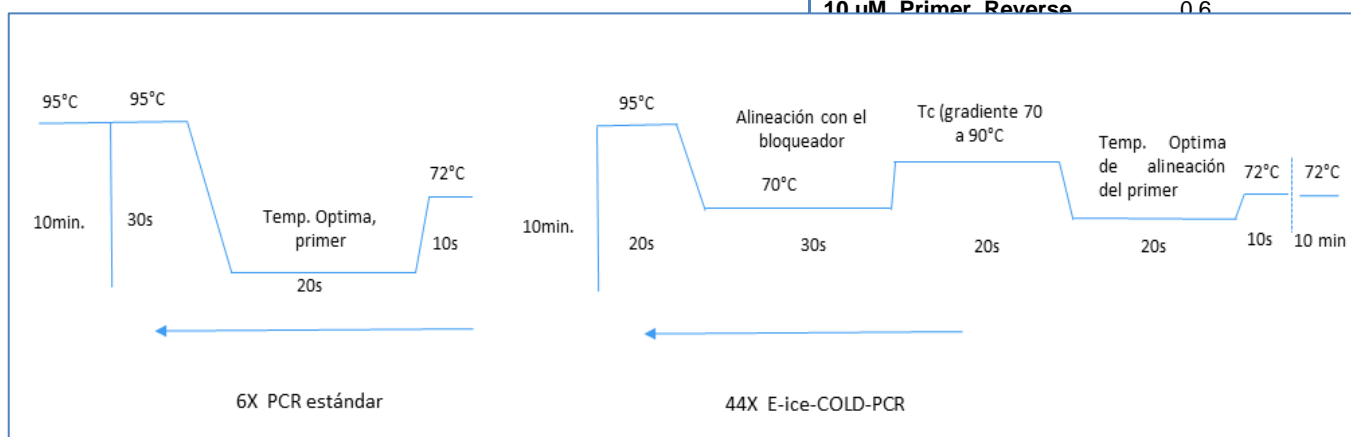
Las condiciones de amplificación se muestran en la figura 17. Este experimento se realizó por triplicado.

**Tabla 8. Determinación de la Tc y concentración de la sonda bloqueadora**

LNA	Temperaturas				--
	84.4°C	83.9°C	83.2°C	82.6°C	
0	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	--
50nM	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	--
100nM	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12	--
150nM	Tubo 13	Tubo 14	Tubo 15	Tubo 16	Tubo 17 C.N

**Tabla 9. Componentes de reacción para la determinación de la Tc y [LNA]**

Mix	30uL
5 U/µL KAPA Taq HotStart DNA Polymerase3	0.12
25 mM MgCl2	1.8
10 mM dNTP Mix	0.6
10 µM Primer Forward	0.6
10 µM Primer Reverse	0.6



**Figura 17. Programa de PCR de E-ice-cold-PCR.** Esta PCR inicia con 6 ciclos de PCR a una desnaturalización de 95°C por 30 segundos, alineación a 60°C y una extensión final a 72°C por 10 segundos. Posteriormente 44 ciclos de E-ice-Cold-PCR con una etapa de desnaturalización a 95°C por 20 segundos, posteriormente comienza la etapa de alineación con la sonda bloqueadora a 70°C, seguidamente del gradiente de temperaturas que corresponde a la Tc calculada de la secuencia tipo silvestre en donde este se desnaturaliza exponencialmente, seguidamente ocurre la hibridación con los oligonucleótidos a 60°C por 20 segundos, y una extensión a 72°C por 10 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Para evaluar el enriquecimiento de los alelos mutantes al usar la plataforma E-ice-cold-PCR se realizó un experimento en paralelo haciendo uso de la plataforma PCR (figura 16) Para cada reacción se ocuparon 25ng de ADN totales utilizando la dilución 5% mutante-95% silvestre, en un volumen final de 20µL, utilizando el kit Taq Ready Mix PCR (KAPA taq. 1024 (Tabla 6) y el equipo de PCR punto final T100 Thermal Cycler (BIORAD). Para obtener la frecuencia alélica de las dos plataformas de PCR se realizó una secuenciación masiva, los pasos para realizar esta técnica se describen en el apartado 9.11 secuenciación masiva.

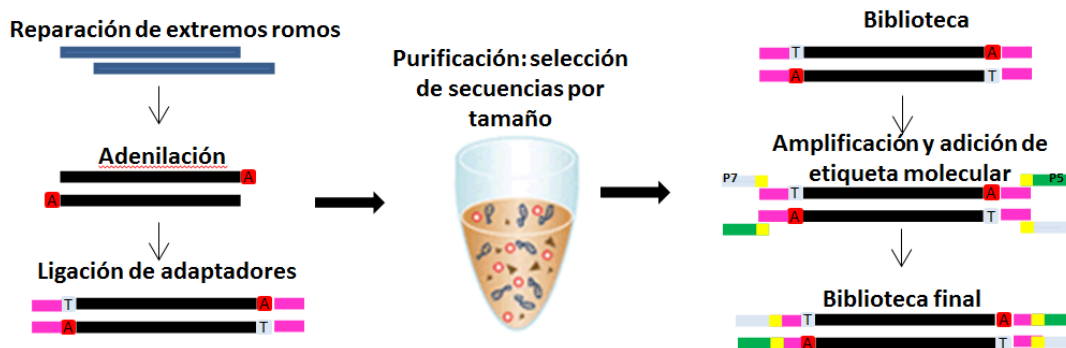
### **9.11 Secuenciación masiva en paralelo**

Para conocer la sensibilidad de las dos plataformas de PCR acopladas a secuenciación masiva, se diluyó el ADN de la línea celular H1975, en ADN tipo silvestre. Se realizaron las siguientes diluciones con las siguientes fracciones de ADN mutante 5%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%.

El enriquecimiento por amplicones se realizó utilizando la plataforma E-ice-cold-PCR, y para su comparación se hizo una amplificación por separado con la plataforma PCR-TD. Posteriormente se realizó un análisis densitométrico de las muestras amplificadas, estas se ecualizan a 20nM para después hacer una purificación por columna, posteriormente se cuantificaron en el equipo Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Cada muestra contenía alrededor de 50-80ng totales de ADN. Después de la amplificación cada muestra paso por un proceso de secado y finalmente se resuspendió en un volumen final de 10.5µl de H<sub>2</sub>O para empezar con la preparación de bibliotecas. Para la preparación de bibliotecas se utilizó el kit GeneRead Library Prep for illumina de Qiagen (cat. 180432, 180455 y 180912). Realizando el procedimiento mostrado en la figura 18.

Las bibliotecas se secuenciaron en el Miseq (Illumina) con una concentración de 11 a 12 picomolar en cartuchos de 2 x 150.

Los datos crudos (fastq) fueron analizados en la plataforma bioinformática Galaxy Project (<https://galaxyproject.org/>), usando el genoma de referencia hg19. Las secuencias fueron alineadas con BWA-MEM y visualizadas en IGV (Broad Institute).



**Figura 18. Preparación de bibliotecas de secuenciación masiva.** Primero se reparan los extremos de las secuencias de ADN amplificadas y se generan extremos romos. Posteriormente ocurre el paso de adenilación en donde una polimerasa adenina transferasa terminal añade una adenina a cada extremo, la cual será complementaria a los adaptadores. El siguiente paso es la ligación de adaptadores, estos son complementarios al primer de secuenciación. Después se purifican con perlas paramagnéticas de fase sólida, seleccionando la región de interés de acuerdo al tamaño; se eliminan los restos de reacción y productos inespecíficos. Los productos purificados se amplifican nuevamente por PCR para añadirles una etiqueta molecular, las cuales se ocuparan como puntos de identificación durante todo el proceso.

### 9.12 Análisis de fusión de alta resolución

Una vez determinada la Tc y la concentración de LNA a usar en E-ice-cold-PCR, se acoplaron las dos variantes de PCR a HRM. Los experimentos HRM se realizaron usando el equipo de qPCR (Rotor Gene Q, Qiagen). Se ocupó un ciclo de 75°C a 90°C, utilizando incrementos graduales de temperatura de 0.01 °C por segundo en cada adquisición. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Para conocer la sensibilidad de las dos plataformas de PCR utilizadas en el presente trabajo acopladas a HRM se realizaron diluciones en serie de la línea celular H1975, en ADN tipo silvestre, que corresponden a las siguientes fracciones de ADN mutante 100% 50% 5%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%. Cada reacción tenía un volumen total de 20µl con 25ng de ADN de una de las diluciones realizadas, se utilizó el kit de HRM Fast PCR (KAPA taq KK4201) (Tabla 10).

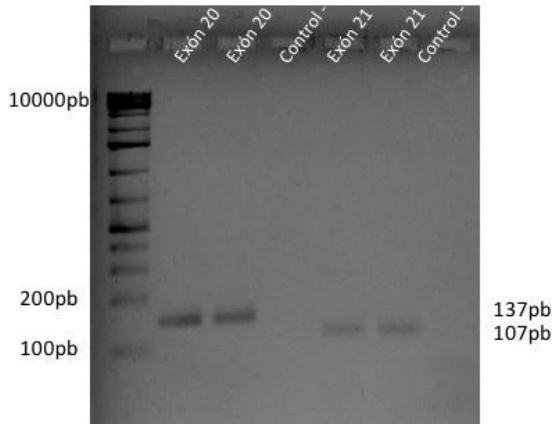
Tabla 10. Componentes de reacción HRM	
Reactivos	Concentración final
Agua	-
2X KAPA HRM FAST master mix	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 Mm
Primer Forward 10 µM	0.2 µM
Primer Reverse 10 µM	0.2 µM
<b>DNA</b>	25ng

Los datos adquiridos fueron analizados en el software Q-Rex que acompaña al equipo Rotor-Gene Q. Esto se hizo al observar las curvas normalizadas en donde se selecciona la muestra tipo silvestre como referencia para su comparación.

## 10. RESULTADOS

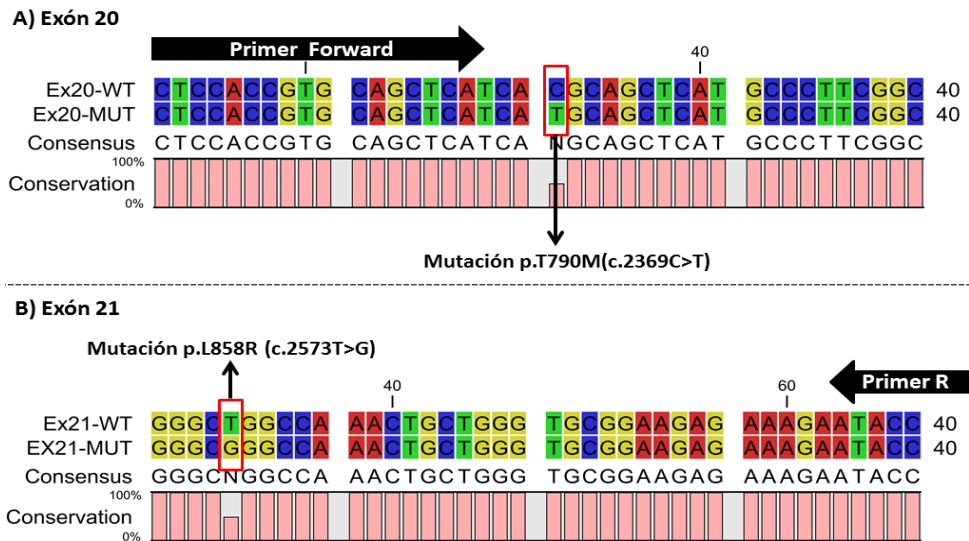
### 10.1 Amplificación del exón 20 y 21 del gen *EGFR*

Los oligonucleótidos diseñados en el presente trabajo, son específicos, como se muestra en el gel de agarosa al 0.8% utilizando el marcador de peso molecular de 1Kb. Para el exón 20 y 21 se obtuvo una banda de 137pb y 107pb, respectivamente, las cuales coinciden con el tamaño esperado en el análisis in silico (Figura 19).



**Figura 19. Verificación de la especificidad en la amplificación de los exones 20 y 21 del gen *EGFR*.** Resultado de la amplificación por PCR TD del Oligo mutante y silvestre correspondiente al exón 20 y 21 del gen *EGFR* a partir de ADN genómico. Los oligonucleótidos diseñados son específicos. Se muestra los productos de amplificación esperados 137pb para el exón 20 y de 107pb para el exón 21. En la imagen visualizamos en el carril 1 el Marcado de Peso Molecular, carril 2, y 5 corresponde al ADN extraído de la línea celular H1975, el 3 y 6 corresponde a la extracción de ADN a partir de sangre periférica, carril 4, y 7 corresponde a los controles negativos.

Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología UNAM (Figura 20)



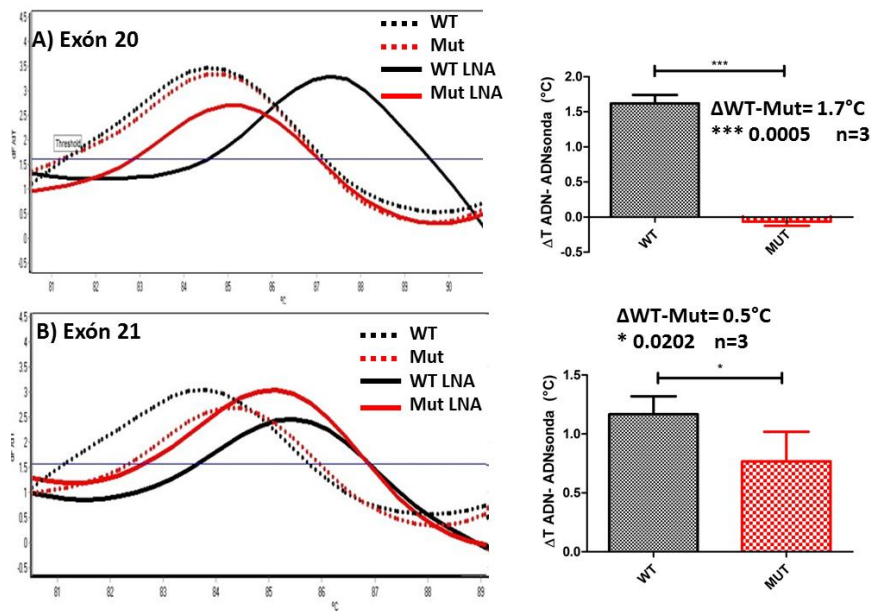
**Figura 20. Alineamiento de las secuencias mutante y silvestre de los exones 20 y 21 del gen *EGFR*.** En el cuadro rojo se muestra la mutación, las flechas corresponden a los oligonucleótidos. En los dos casos A) y B) la línea celular presenta la mutación de interés y la secuencia tipo silvestre no presenta mutaciones por lo que se puede tomar como control negativo. El diseño de los oligonucleótidos son específicos.

## 10.2 E-ice-cold-PCR

### 10.2.1 Determinación de la temperatura crítica

La temperatura calculada de las secuencias mutante y silvestre del exón 20 es de 84.0 °C y 84.2°C. Al hacer uso de la sonda con LNA la temperatura de estas secuencias aumenta a 84.3°C y 86.0°C respectivamente. Al hacer uso de la sonda con LNA la diferencia de temperaturas entre la secuencia silvestre y mutante es de 1.7 °C (Figura 21A).

Los datos obtenidos para las secuencias silvestre y mutante del exón 21 son de 83.7°C y 84.3°C. Al hacer uso de la sonda con LNA la temperatura de estas secuencias es de 85.5°C y 85°C respectivamente. La diferencia de temperaturas entre las secuencias mutante y silvestre utilizando la sonda es de 0.5°C a favor de la secuencia tipo silvestre (Figura 21B).

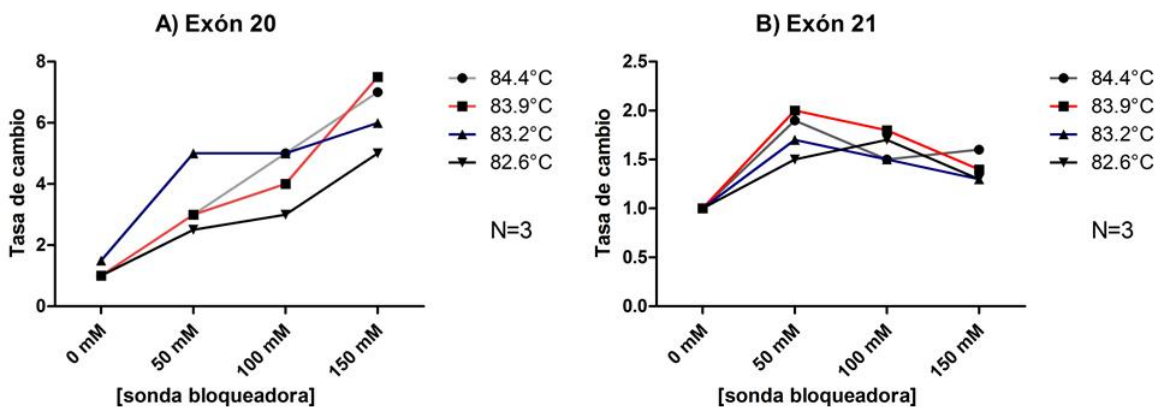


**Figura 21. Determinación de la Tm de los amplicones de los exones 20 y 21 del gen EGFR.**

Las gráficas corresponden a la disociación de las secuencias de los exones 20 y 21 usando el alelo silvestre (negro) y mutante (rojo) con sonda (línea continua) y sin sonda (línea punteada). Se observa que al hacer uso de la sonda se maximiza la diferencia de Tm entre las secuencias mutante y silvestre para ambos casos (A y B). A) Exón 20. Sin la sonda existe una diferencia mínima de la Tm entre las secuencias mutante y silvestre. La diferencia se maximiza al hacer uso de la sonda hasta 1.7°C. B) Exón 21. En la gráfica se puede observar que sin hacer uso de la sonda la Tm de la secuencia mutante es mayor que la silvestre. El uso de la sonda aumenta la Tm de la secuencia silvestre garantizando así que el alelo mutante se desnaturalice a una menor temperatura. La diferencia es de 0.5°C al hacer uso de la sonda como se puede ver en la gráfica.

### 10.2.2 Determinación de la Tc y la concentración óptima de LNA

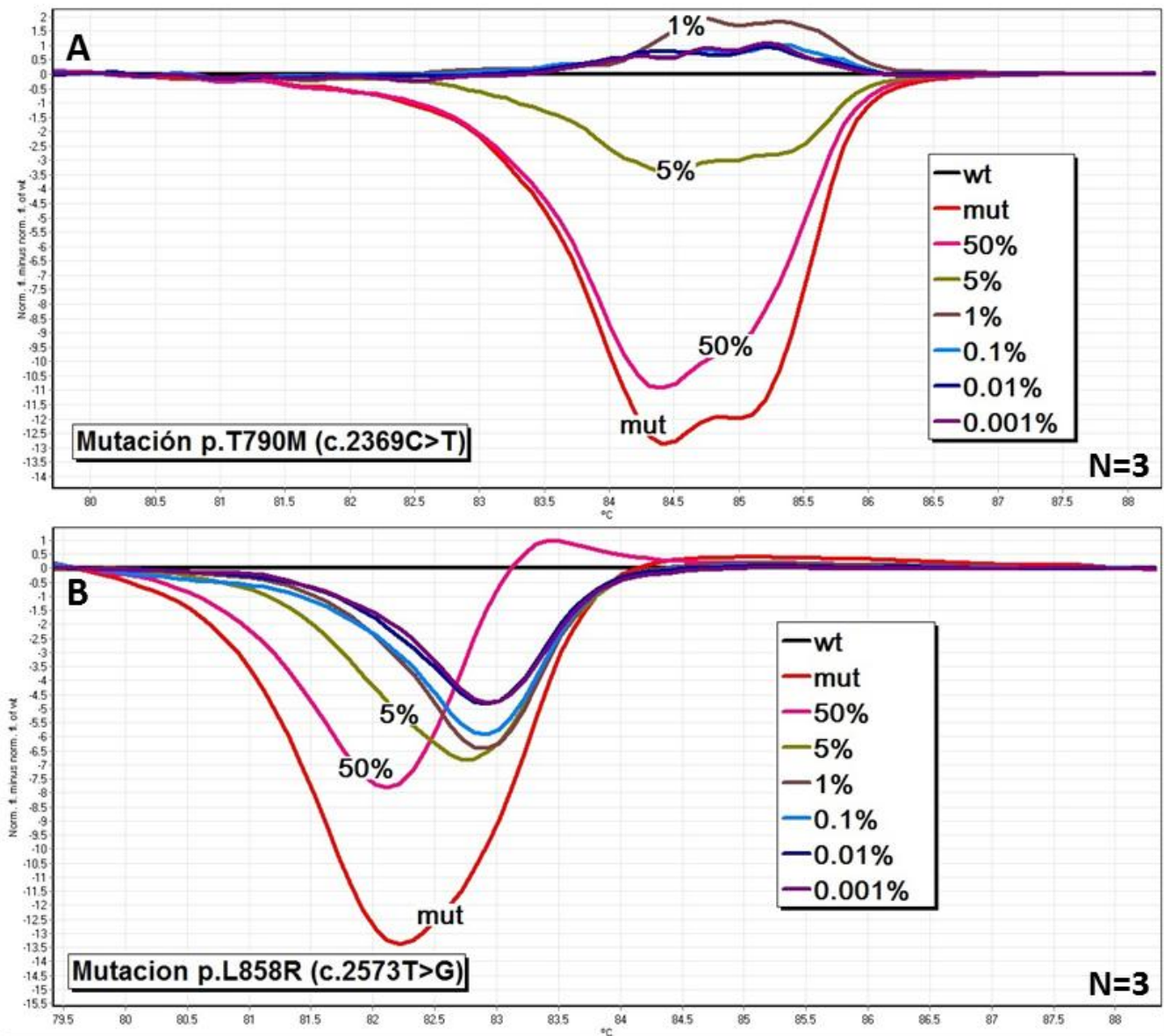
La variante de PCR TD obtiene un enriquecimiento del 2% de alelos mutantes al igual que en E-ice-Cold-PCR sin sonda. En el exón 20 usando la plataforma E-ice-Cold-PCR; la temperatura 83.9°C y la concentración de LNA de 150nM, con estas condiciones se obtiene el enriquecimiento de los alelos mutantes 7.5 que veces más en comparación con una PCR convencional. Para el caso del exón 21 tampoco se muestran diferencias entre las variantes de PCR sin el uso de LNA. Al usar E-ice-Cold-PCR, a una temperatura de 83.9°C y una concentración de LNA de 50nM se enriquecen 2 veces más que en comparación con una PCR convencional. También se observa que a medida que se incrementa la concentración de LNA el enriquecimiento disminuye, pero siempre es más elevado en comparación con una PCR de uso convencional (Figura 22)



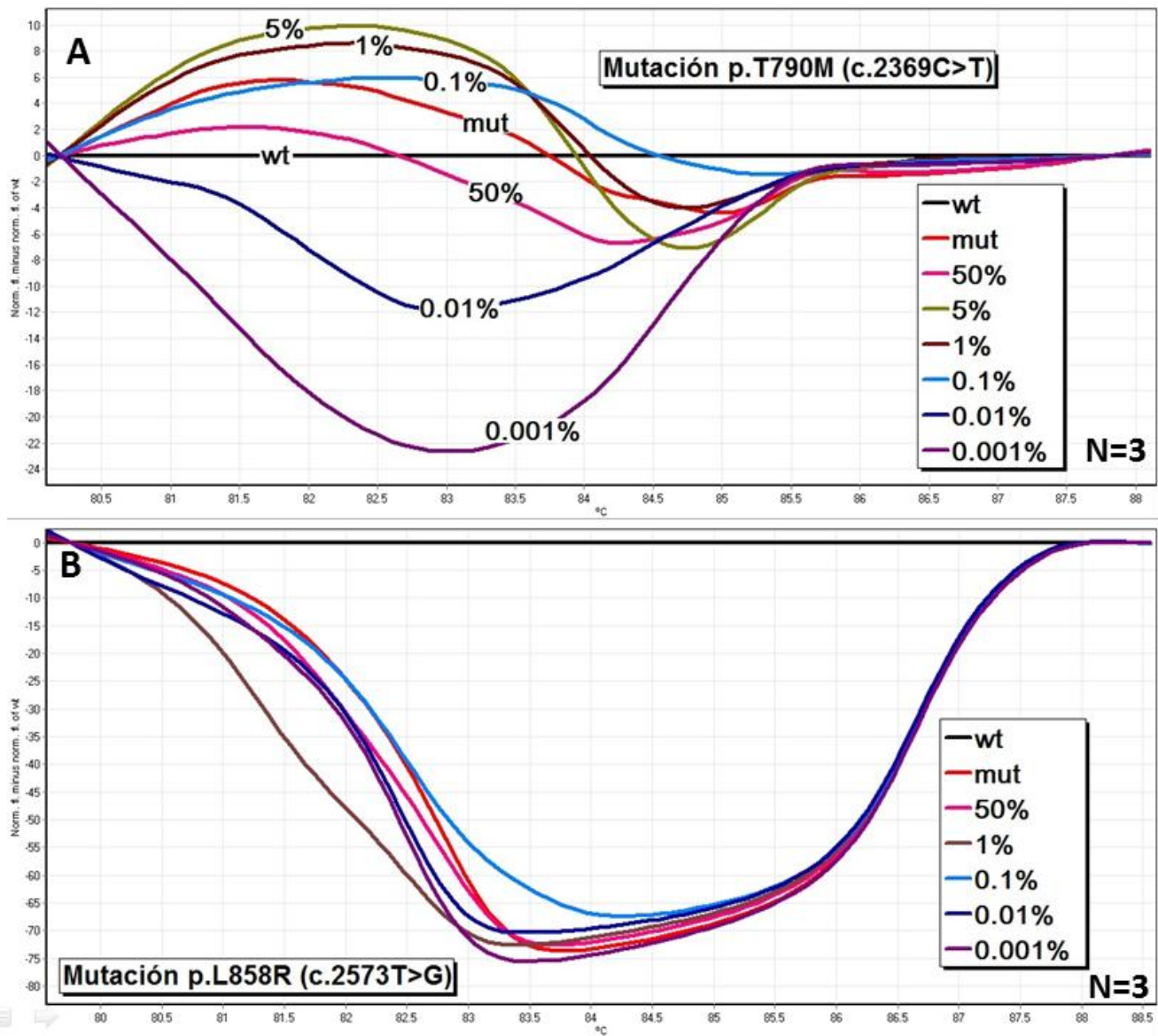
**Figura 22. Enrichimiento de alelos mutantes** La tasa de cambio corresponde a la variante de PCR Touchdown. Cada punto en la curva indica cuantas veces más se enriqueció el alelo mutante al utilizar E-ice-cold-PCR. A) Exón 20: Podemos observar que hay una dependencia de la concentración de la sonda bloqueadora. Las condiciones óptimas son la temperatura de 83.9°C y 150mM de sonda bloqueadora. B) Exón 21: Las condiciones óptimas son la temperatura de 83.9°C y 50mM de sonda bloqueadora, se observa un fenómeno de saturación. Sin embargo en ambos casos A y B al hacer uso de la sonda bloqueadora siempre se obtiene un mayor enriquecimiento de alelos mutantes en comparación con la PCR Touchdown y E-ice-cold PCR sin sonda.

### 10.3 Sensibilidad de HRM

Para definir el genotipo de las curvas de fusión de HRM se comparan con los controles mutante y silvestre, las curvas con un patrón de fusión diferente al silvestre y similar al del mutante presentan la mutación. El programa de ciclado PCR acoplado a HRM permite detectar el alelo mutante hasta la fracción del 5% de manera inicial en el exón 20 (Figura 23 A). En cuanto al exón 21 se logra obtener detección hasta la fracción 0.001% (Figura 23B). Al usar el programa E-ice-cold-PCR acoplado a HRM no se permite inferir cual es la sensibilidad de la técnica tanto para el exón 20 como en el 21 (Figura 24 A y B)



**Figura 23 HRMA usando la plataforma de PCR.** En las gráficas se muestra la diferencia entre las curvas, para ello se eligió la curva silvestre como referencia a la cual se le otorga el valor cero (WT), y se ubica como una línea horizontal. La diferencia entre cada curva y la de referencia (WT) se traza frente a la temperatura, A) Corresponde a la mutación del exón 20, se observa que las curvas 50% y 5% tienen similitud con la curva 100%mutante, por lo tanto el límite de detección es hasta 5%. B) En cuanto al 21 todas las diluciones muestran similitud con el fenotipo 100% mutante. Como se puede observar la diferencia preexistente de acuerdo a los cálculos de la Tm en ausencia de la sonda (Figura 21), Propicia poder establecer el límite de detección hasta la dilución 0.001%.



**Figura 24. HRMA usando la plataforma de E-ice-cold-PCR.** En las gráficas se muestra la diferencia entre las curvas, para ello se eligió la curva silvestre como referencia a la cual se le otorga el valor cero (WT), y se ubica como una línea horizontal. A) La diferencia entre cada curva y la de referencia (WT) se traza frente a la temperatura. No se puede inferir cuál es la sensibilidad de la técnica, debido a que la diferencia entre las curvas no es clara. Sin embargo las curvas de las diluciones 50%, 5%, 1% y 0.1% parecen tener un parentesco similar al fenotipo 100%mutante y las diluciones 0.01% y 0.001% al fenotipo 100% silvestre. B) Exón 21 todas las curvas muestran tener similitud con el genotipo 100% mutante.

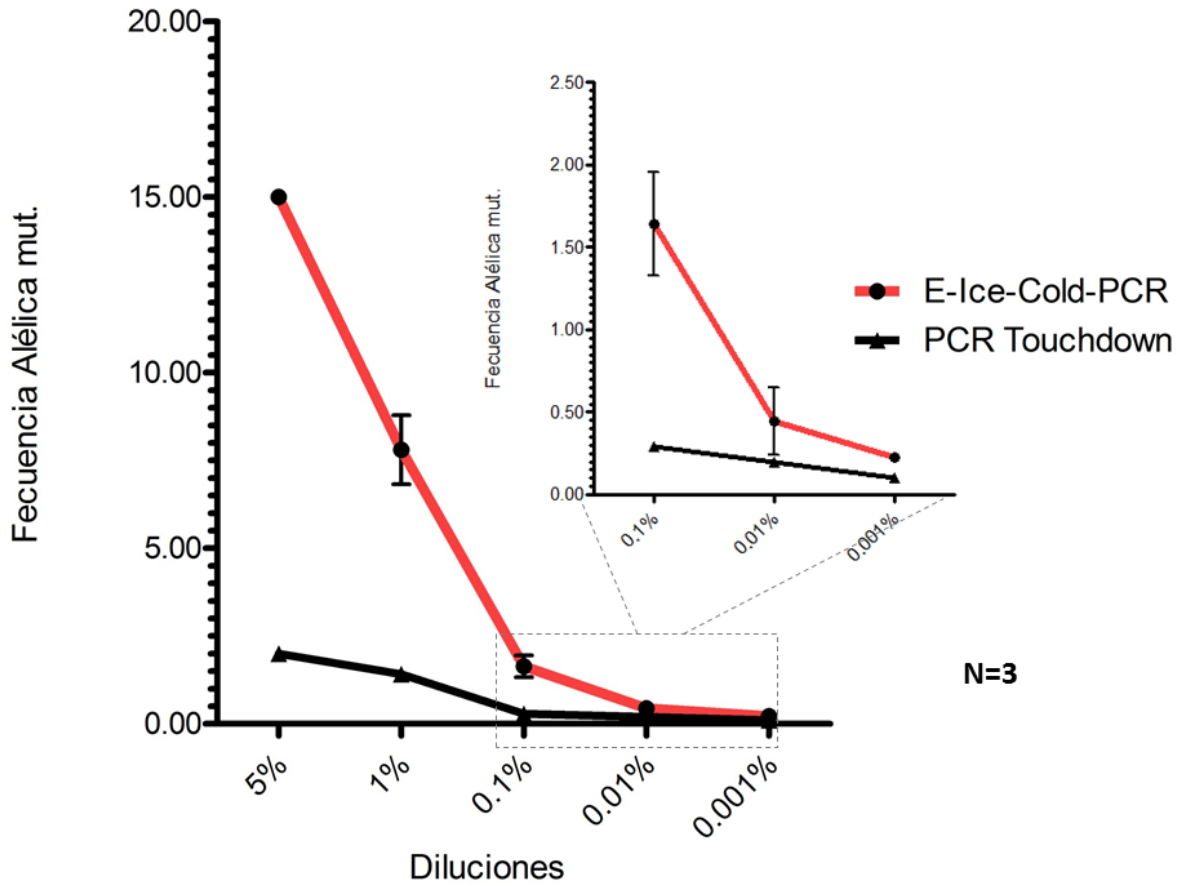


#### **10.4 Sensibilidad SMP**

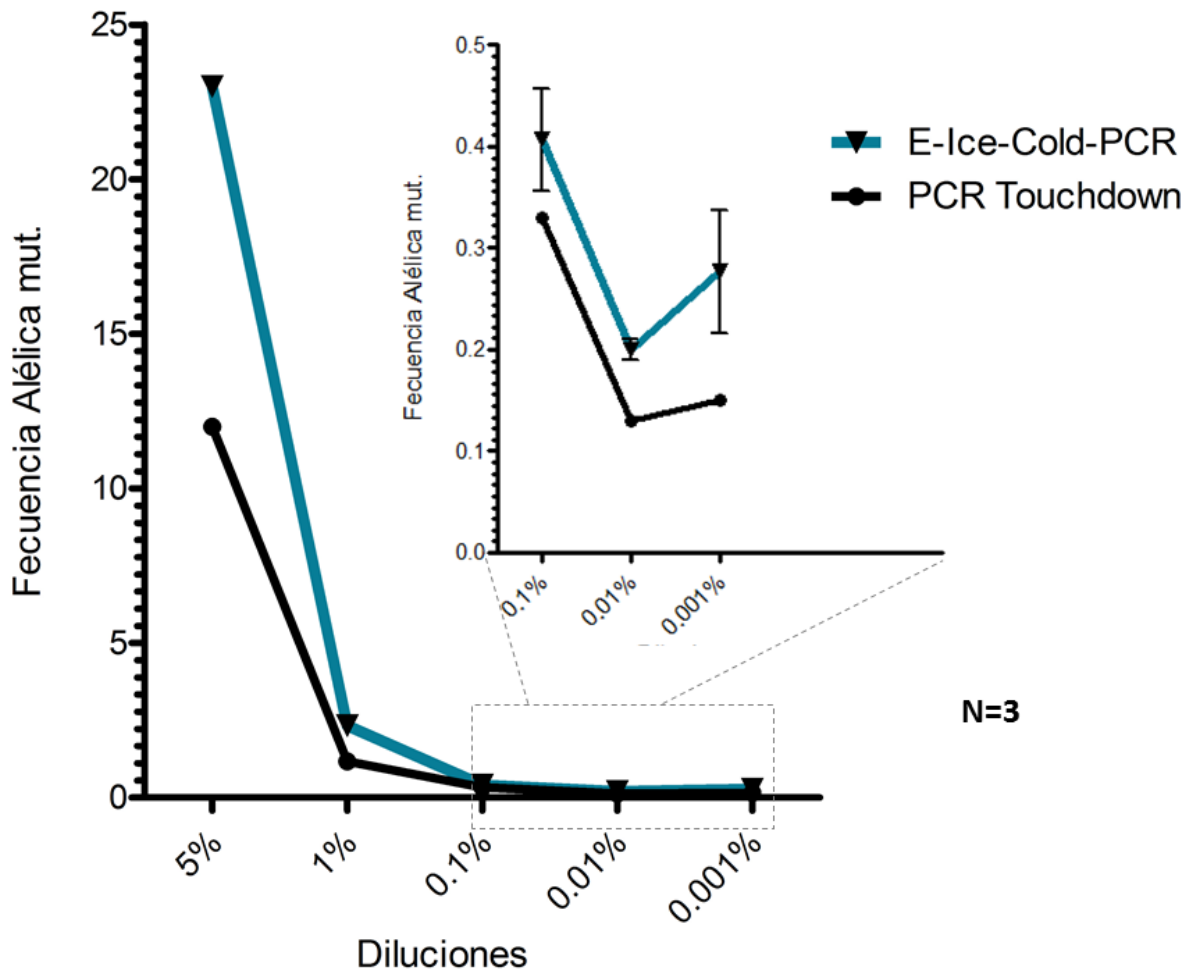
Posterior a la amplificación se realizó la SMP. Una vez analizados los datos se obtuvo el número de lecturas de los alelos silvestre y mutantes, dichas lecturas corresponden a la frecuencia alelica. Para el caso de la mutación del exón 20 en la dilución 5% se obtuvo un enriquecimiento de 7.5 veces más al usar la variante E-ice-cold-PCR en comparación con la PCR. En la dilución 1% se obtiene 5.5 veces más enriquecimiento al usar E-ice-cold-PCR en comparación con la PCR. Para la dilución 0.1% se enriquece 5.6 veces más usando E-ice-cold-PCR en comparación con la PCR y en la dilución 0.01% solo se obtiene un enriquecimiento del doble usando E-ice-cold-PCR, lo mismo que para la fracción 0.001% (Figura 25)

Con respecto al exón 21 (Figura 26) se observa que en la dilución 5% se enriquece casi dos veces más (1.9), con respecto a la PCR. En cuanto a la dilución 1% se obtienen el doble de enriquecimiento en comparación con la PCR y para la dilución 0.1% solo se obtiene un enriquecimiento de 1.21 veces más comparado con la PCR. En la dilución 0.01% se obtiene un enriquecimiento de 1.5 veces más y en la dilución 0.001% el enriquecimiento es casi del doble, 1.8 veces más en comparación con la PCR.

En conclusión los resultados indican que hay un mayor enriquecimiento de alelos mutantes al usar el programa de amplificación E-ice-cold-PCR independientemente de la fracción inicial de ADN con la mutación (Figura 25 y 26).



**Figura 25. Límite de detección de mutaciones en el exón 20 de *EGFR*.** Se grafica la frecuencia alélica de las plataformas de E-ice-Cold-PCR y PCR cada una acoplada a secuenciación masiva. Cada punto corresponde al número de lecturas obtenidas en cada dilución. Se observa que al usar la plataforma E-Ice-Cold-PCR haciendo uso de la sonda cloqueadora se logra un mayor enriquecimiento en todas las diluciones.



**Figura 26. Límite de detección de mutaciones en el exón 21 de *EGFR*.** Se grafica la frecuencia alélica de las plataformas de E-ice-Cold-PCR y PCR cada una acoplada a secuenciación masiva. Cada punto corresponde al número de lecturas obtenidas en cada dilución. Se observa que al usar la plataforma E-Ice-Cold-PCR haciendo uso de la sonda con LNA se logra un mayor enriquecimiento en todas las diluciones

## 11. DISCUSION

La activación de *EGFR* estimula la proliferación, la angiogénesis, la invasión y la supervivencia de las células cancerosas. Debido a que *EGFR* con frecuencia muta en una variedad de tumores sólidos y se cuenta con fármacos dirigidos específicamente contra las mutaciones patogénicas, éstas representan un blanco terapéutico importante para el tratamiento del cáncer (Arrieta *et al.*, 2011).

Los ITK dirigidos contra *EGFR* han demostrado aumentar significativamente las tasas de supervivencia en pacientes que presentan mutaciones patogénicas, por lo tanto dichas mutaciones *EGFR* son un biomarcador predictivo para la respuesta al tratamiento, por lo que se requiere conocer tipo de mutación de *EGFR* antes de que se determine el tratamiento (Maemondo *et al.*, 2010).

En general, la heterogeneidad intratumoral, así como la contaminación con células normales, diluye la cantidad de células tumorales portadoras de mutaciones en *EGFR*, lo cual dificulta la detección de mutaciones clínicamente relevantes, debido a que se encuentran por debajo del límite de detección de ensayos basados en PCR convencionales (<1%). Por ello se requieren métodos altamente sensibles para la detección de mutaciones somáticas en la tumorigénesis temprana y en la aparición de mutaciones de resistencia a la terapia (Milbury *et al.*, 2009b).

La secuenciación tradicional Sanger se ha considerado el estándar de oro para detectar e identificar alteraciones genéticas, sin embargo este enfoque experimental tiene limitaciones de sensibilidad importantes, ya que los alelos mutantes deben estar presentes en una proporción de al menos 10-20% para ser detectados de forma adecuada (Vogelstein & Kinzler *et al.*, 1999).

Actualmente se ha desarrollado una amplia gama de diferentes tecnologías para detección de mutaciones con el objetivo de aumentar la sensibilidad (Do & Dobrovic *et al.*, 2009; Ogino *et al.*, 2005). Las técnicas principales están basadas en PCR, y secuenciación, y cuentan con una sensibilidad de detección en un rango de 10-<0.1% (Tabla 2). No obstante, el aumento en la sensibilidad generalmente se acompaña de un mayor costo, mayor complejidad y mayor tiempo requerido para conocer el resultado (Milbury *et al.*, 2009b). La técnica de detección ideal es aquella que no compromete la sensibilidad, especificidad, tiempo y costos. Por lo tanto, en el presente trabajo implementamos un método de PCR alelo específico que permite enriquecer alelos mutantes minoritarios de forma selectiva para que puedan ser detectados mediante las tecnologías de confirmación HRM y SMP.

### **E-ice-cold-PCR**

El E-ice-cold-PCR permite el enriquecimiento selectivo de mutaciones de baja frecuencia alélica, mediante la utilización de una sonda bloqueadora que contiene algunas bases nucleotídicas modificadas, llamadas LNA. La sonda bloqueadora es

100% complementaria con todas las bases del alelo silvestre, mientras que tiene emparejamientos erróneos con los alelos mutantes. Al incluir la sonda en altas concentraciones en la mezcla de reacción, en las etapas de desnaturalización y alineamiento se producirá la hibridación de la misma con las moléculas de los alelos silvestre y mutante. El diseño de emparejamientos erróneos con el alelo mutante hace que la temperatura de desnaturalización de la sonda con dicho alelo sea menor, en comparación con la temperatura de desnaturalización de la sonda hibridada al alelo silvestre. Este es el aspecto esencial del método de E-ice-cold-PCR que permite el enriquecimiento selectivo de alelos mutantes, y, a su vez, favorece el bloqueo del alelo silvestre. Después de la etapa de hibridación, se aumenta la temperatura lo suficiente para desnaturalizar exponencialmente a los heteroduplex sonda bloqueadora y alelo mutante. A esta etapa de desnaturalización se le nombra como desnaturalización crítica ( $T_c$ ). En esta etapa el alelo silvestre permanece hibridado debido a que la sonda propicia un incremento en la  $T_m$  del alelo silvestre, mientras que el alelo mutante se desnaturaliza primero ya que su  $T_m$  es menor. Mientras más diferencia de  $T_m$  haya entre los alelos silvestre y mutante, mejor será el bloqueo del alelo silvestre y el enriquecimiento del mutante. La sensibilidad de este método depende de la técnica de conformación a la cual se acople como se muestra en los resultados (Figura 24, 25 y 26). No obstante los límites de sensibilidad son menores al 0.1%

### **Análisis bioinformático**

En este trabajo identificamos las mutaciones del gen EGFR y trabajamos con las dos mutaciones más frecuentes de relevancia clínica p.T790M (c.2369C>T) del exon 20 y p.L858R (c.2573T>G) del exón 21, de acuerdo a los registros obtenidos de la base de datos COSMIC Sanger (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>; Tabla 3).

### **Cálculo de las $T_m$**

En este trabajo se determinó experimentalmente la  $T_c$  de los alelos mutantes descritos arriba. Para ello primero se calcularon las temperaturas de desnaturalización de los alelos silvestres y mutantes (c.2369C>T, del exon 20 y c.2573T>G, del exon 21) de *EGFR* por medio de una curva de disociación. Posteriormente se calculó la  $T_m$  empleando la sonda bloqueadora en la reacción. Se encontró que el uso de la sonda bloqueadora modifica la  $T_m$  de todos los alelos analizados y se observó que la  $T_m$  de las secuencias silvestres aumentan y este aumento es significativo (Figura 21 A y B). Este resultado se debe a dos factores: (i) Complementariedad: la complementariedad de la sonda bloqueadora es del 100% con los alelos silvestres y es imperfecta con los alelos mutantes (Figura 21 A y B). (ii) Química de los nucleótidos modificados (LNA): dichos nucleótidos favorecen termodinámicamente la hibridación de bases debido al enlace extra que conecta el oxígeno 2' con el carbono 4' (Figura 12). Este enlace

propicia interacciones como fuerzas de Van der Waals además de las interacciones de puentes de hidrogeno y esto aumenta la estabilidad de hibridación (Silahtaroglu, Pfundheller, Koshkin, Tommerup, & Kauppinen, 2004).

En este sentido, encontramos que la  $T_m$  de la secuencia tipo silvestre del exón 20 es de 84.2°C y al usar la sonda bloqueadora aumenta a 86.0°C; es decir la sonda provocó un incremento de 1.8°C. Por el contrario, el alelo mutante sólo tuvo un incremento de 0.2°C, lo que demuestra que la sonda bloqueadora mejora la desnaturalización del alelo mutante y el bloqueo del alelo silvestre. De esta forma, la diferencia de temperaturas entre la secuencia mutante y silvestre es de 0.2°C de manera normal, pero si se utiliza la sonda bloqueadora se maximiza la diferencia de temperatura de desnaturalización hasta 1.7°C. Esto permite la desnaturalización selectiva del alelo mutante a la  $T_c$ .

Respecto al exón 21, la secuencia del alelo silvestre tuvo una temperatura de fusión de 83.7°C y al usar la sonda bloqueadora aumentó la  $T_m$  a 85.5°C. Hubo un incremento de 1.8°C. En este caso el alelo mutante tiene una temperatura de desnaturalización mayor que la silvestre por 0.6°C. No obstante el uso de la sonda bloqueadora propicia una diferencia de temperaturas de 0.5°C a favor de la secuencia tipo silvestre.

Colectivamente, los datos de las  $T_m$  de los exones 20 y 21 muestran que la sonda causa un mayor incremento de la temperatura de desnaturalización en los alelos silvestres. Esta diferencia de temperaturas permite a la secuencia mutante de las dos mutaciones del gen *EGFR* desnaturalizarse a una temperatura menor y amplificarse preferencialmente.

### **T<sub>c</sub> y concentración de la sonda bloqueadora**

Después del cálculo de la  $T_m$  de los alelos, se seleccionó un intervalo de temperaturas por debajo de la  $T_m$  de los alelos mutantes, para así enriquecer de manera preferencial dichos alelos (Milbury et al., 2009a).

Además de la selección de temperaturas por debajo de la  $T_m$  del alelo mutante se adicionaron diferentes concentraciones de LNA. El uso de diferentes concentraciones de sonda bloqueadora y diferentes temperaturas ayudó a conocer la  $T_c$  y la concentración óptima a utilizar en la técnica E-ice-cold-PCR (Tabla 8; Milbury et al., 2011). Los datos muestran que el exón 20 tienen un mayor enriquecimiento cuando la  $T_c$  es de 83.9°C y a la concentración óptima de sonda bloqueadora es de 150 mM (Figura 22A). Se puede observar que el enriquecimiento es dependiente de la concentración de la sonda bloqueadora, esto es porque entre más sonda bloqueadora hay en la reacción, mayor número de secuencias tipo silvestres serán bloqueadas. Para este exón se obtuvieron 5,040 lecturas por secuenciación masiva, estas representan el 15% de las lecturas

totales, obteniendo 7.5 veces más enriquecimiento de alelos mutantes en comparación con la PCR. Además podemos observar que utilizando cualquier temperatura y concentración de sonda bloqueadora en E-ice-cold-PCR siempre se obtiene un mayor enriquecimiento de alelos mutantes en comparación con la PCR (Figura 22 A).

En cuanto al exón 21 la temperatura de 83.9°C y la concentración de sonda bloqueadora de 50mM, muestran ser las condiciones óptimas a utilizar en el E-ice-cold-PCR para obtener el mayor enriquecimiento de alelos mutantes, en este caso se observa que se pierde el enriquecimiento a media que aumenta la concentración de sonda bloqueadora (Figura 22B). Se observa un fenómeno de saturación y además Inferimos que es porque la diferencia de temperaturas entre la secuencia tipo silvestre y mutante es de 0.5°C lo cual es una diferencia mínima, y propicia que los dos heteroduplex se desnaturalicen. No obstante, el uso de la sonda bloqueadora ayuda al enriquecimiento preferencial de la secuencia mutante (Figura 22B), el enriquecimiento no es tan elevado como el del exón 20 (Figura 22A), sin embargo, siempre se obtiene el doble enriquecimiento en comparación con la PCR.

Cabe resaltar que el diseño de la sonda no es sencillo, los efectos son específicos de cada secuencia, varían de acuerdo al tipo de mutación, longitud de la sonda, y proporción GC. El diseño es muy restringido incluso hay una mejor discriminación cuando el sitio de la mutación se centra en la sonda bloqueadora (You et al., 2006). La sonda del exón 21 tiene el sitio de la mutación al final lo cual podría estar afectando el enriquecimiento. Este diseño de la sonda del exón 21 no se realizó con la mutación al centro debido a que había demasiados SNPs en la secuencia, y dificultaban la posición de los oligonucleótidos. Sin embargo los resultados muestran que el uso de la sonda siempre propicia un mayor enriquecimiento del alelo mutante incluso en cualquier condición, por lo tanto para obtener un mayor enriquecimiento de alelos mutantes es necesario hacer uso de la sonda bloqueadora.

### **Comparación de E-ice-cold-PCR y PCR acoplada a HRM**

Una vez estandarizadas las condiciones a usar en la técnica E-ice-cold-PCR decidimos acoplar esta técnica a HRM para determinar el límite de detección de mutaciones, y para comprobar que E-ice-cold-PCR enriquece los alelos mutantes lo comparamos con PCR de igual forma acoplado a HRM.

Los resultados muestran que el programa de PCR muestra tener un límite de detección mediante HRM hasta la fracción del 5% de ADN mutante para el caso del exón 20 (Figura 23A). En cuanto al exón 21 el límite de detección es de 0.001% (Figura 23B).

La diferencia en cuanto al límite de detección entre el exón 20 y 21 es debido a diferencia de fusión de las secuencias. La diferencia de  $T_m$  entre las secuencias mutante y silvestre del exón 20 sin uso de la sonda bloqueadora es de  $0.2^\circ\text{C}$ , y para el exón 21 es de  $0.6^\circ\text{C}$ . El cambio en la  $T_m$  del exón 21 es relativamente grande, esto permite al equipo poder discriminar mejor las curvas de desnaturalización permitiendo tener un límite de detección hasta la fracción  $0.001\%$  del alelo mutante en comparación con las curvas del exón 20 en donde la diferencia en la  $T_m$  es mínima, y conforme la cantidad de alelos mutantes disminuye mayor dificultad tendrá el equipo para distinguir entre las secuencias a pesar de su alta resolución, y por ello solo tiene un límite de detección del  $5\%$  (Liew et al., 2004)

Los límites de detección definidos son bastante variables, estas variaciones parecen ser específicas incluso de cada tipo de mutación (Sestini et al., 2008; Takano et al., 2007). Además factores como la longitud de la secuencia, el contenido de GC, son propiedades específicas de cada secuencia y por lo tanto dan como resultado diferentes comportamientos en la curva de fusión, los cuales permitirán genotipificar las secuencias de interés.

En cuanto a los ensayos E-ice-cold-PCR acoplados a HRM para el caso del exón 20 no se puede determinar el límite de detección (Figura 24A), debido a que las curvas no muestran tener un parentesco asociado ni a la secuencia silvestre ni a la mutante, sin embargo, las diluciones  $50\%$ ,  $5\%$ ,  $1\%$  y  $0.1\%$  tienen mayor similitud hacia la secuencia  $100\%$  mutante. En cuanto al exón 21 (Figura 24B) el límite de sensibilidad es de  $0.001\%$  ya que todas las diluciones se comportan muy similar a la curva control  $100\%$  mutante y se observa que se maximiza la diferencia en comparación con la PCR. Los resultados muestran que el tipo de mutación influye en la diferenciación de las curvas para poder realizar la genotipificación (Liew et al., 2004).

HRM es más sensible que la secuenciación Sanger (Krypuy et al., 2006; Poláková; et al., 2008). Sin embargo, esta técnica requiere confirmar la mutación mediante secuenciación, lo cual es un problema porque la secuenciación tipo sanger no podría detectar fracciones tan pequeñas como las que trabaja HRM, y mediante SMP por no ser una técnica de fácil acceso dificulta el análisis de las muestras. HRM es una técnica con un gran potencial para detectar mutaciones somáticas y germinales (Borràs et al., 2011), ya que detecta mutaciones descritas como no descritas, identificándolas incluso en una pequeña fracción de alelos mutantes con un fondo de ADN tipo silvestre por lo que es un método altamente sensible como se muestra en los resultados (Borràs et al., 2011; Krypuy et al., 2006; Ma et al., 2009; Simi et al., 2008). Otra de las ventajas de esta metodología es que todo el procedimiento se realiza en el mismo tubo de PCR sin tener que manipular los productos de la reacción, por lo que disminuye el riesgo de contaminación (Reed, Kent, & Wittwer, 2007), además de ser un método rápido y



de bajo costo ya que tomando en cuenta la extracción y amplificación del ADN más el ciclo de HRM, en 4 horas podemos decir si está o no la mutación presente (Do et al., 2008).

### **Comparación E-ice-cold-PCR y PCR acoplado a SMP**

La SMP es un ensayo que permite un análisis cuantitativo. Se examinó el enriquecimiento comparando el porcentaje de alelos mutantes de *EGFR* al usar los dos programas de ciclado PCR y E-ice-cold-PCR (Figura 25 y 26). Los resultados muestran que E-ice-cold-PCR enriquece los alelos mutantes en comparación con la PCR, incluso en las diluciones correspondientes a las fracciones más pequeñas del alelo mutante. Además se establece el límite de detección de las dos plataformas de PCR acopladas a secuenciación masiva. El límite de detección de las dos variantes de PCR acopladas a SMP es de 0.001%, este límite de detección se encuentra debajo de los límites de la secuenciación tipo Sanger ya que requiere un mínimo de 10-20% de alelos mutantes como ya se había mencionado anteriormente (Vogelstein & Kinzler *et al.*, 1999). Podemos establecer este límite de detección debido a que trabajamos con mutaciones conocidas, además de que nuestras muestras fueron secuenciadas por secuenciación tipo Sanger (Figura 20). Por lo que nuestros resultados de secuenciación masiva son confiables.

Los métodos que presentan un límite de detección similar al que nosotros obtuvimos son la PCR digital y BEAMing, estos dos métodos tienen ventajas y desventajas al igual que el que usamos en el presente trabajo. El límite de detección de la PCR digital es de <0.02% de ADN mutante, este método es bastante sensible, no obstante su alta sensibilidad detecta falsos negativos y positivos, por ejemplo, los introducidos durante la etapa de amplificación, esta metodología no necesita controles, y además de realizar la detección cuantifica la cantidad de ácidos nucleicos formados durante la PCR. Sin embargo para su realización se requiere de una plataforma altamente costosa (Isobe *et al.*, 2015).

La técnica BEAMing es mucho más sensible en comparación con la mayoría de las técnicas usadas para detectar mutaciones (Tabla 2). La precisión del método se basa en la utilización de reactivos altamente costosos, los cuales minimizan la tasa de errores y aseguran la fiabilidad del método. Sin embargo, además de la plataforma de PCR digital se requiere un clímetro de flujo, lo cual lo hace un método costoso, y se requiere también de un especialista para su implementación. (Taniguchi *et al.*, 2011)

Nuestra metodología usa una etapa de amplificación la cual se puede realizar en cualquier plataforma de PCR convencional, a diferencia de las metodologías mencionadas anteriormente que requieren de equipos costosos y son complicados para su manipulación. En cuanto al ensayo de secuenciación masiva a pesar de

no ser una herramienta de fácil acceso requiere menos tiempo y es menos costosa en comparación con BEAMing y la PCR digital.

El reto de la mayoría de las técnicas de detección de mutaciones buscan poder utilizar muestras mínimamente invasivas tales como el cfADN. La detección de ADN circulante tumoral (ctDNA) derivado de tumores conlleva a grandes desafíos, en gran parte por que a menudo representa una fracción de 0.1% del cfDNA total. Esta fracción limita a las técnicas de detección convencionales por su bajo nivel de sensibilidad (Diehl *et al.*, 2008; Holdhoff *et al.*, 2009). De acuerdo al nivel de sensibilidad alcanzado en el presente trabajo nuestra metodología podría hacer uso de este tipo de muestras.

La concentración de cfDNA de pacientes con cáncer es aproximadamente 4 veces mayor que la de un paciente sano. Los pacientes sanos presentan concentraciones de 0.03 ng/μL y de uno con cáncer de pulmón es de 0.18ng/μL. Nuestro límite de detección esta una magnitud por debajo de los fracciones de ctDNA en pacientes con cáncer de pulmón (Esposito, Criscitiello, Trapani, & Curigliano, 2017). Esta metodología podría detectar mutaciones incluso en pacientes que se encuentren en etapas tempranas de la enfermedad. Además podría complementar el diagnóstico histológico de cáncer del cáncer de pulmón y en un futuro remplazar el uso de procedimientos invasivos. También podría tener aplicaciones como en la monitorización de la carga tumoral; el control de la enfermedad mínima residual; el control de la heterogeneidad tumoral y la resistencia molecular.

## 12. CONCLUSION

Se identificaron los sitios y la frecuencia de las mutaciones de relevancia clínica del gen *EGFR*.

Se implementó el método E-ice-cold-PCR para detectar mutaciones patogénicas del gen *EGFR* y este enriquece los alelos mutantes de manera preferencial de dicho gen

La sensibilidad de la PCR acoplada a HRM presenta un límite de detección del 5% para la mutación T790M del exón 20 y un límite de sensibilidad del 0.001% para la mutación L858R del exón 21 del gen *EGFR*.

La sensibilidad de E-ice-cold-PCR acoplado a HRM presenta un límite de detección del 0.001% para la mutación L858R del exón 21 del gen *EGFR* y se infiere que presenta un límite de sensibilidad del 0.1% para la mutación T790M del exón 20 de *EGFR*.

La sensibilidad de las variantes PCR y E-ice-cold-PCR acopladas a SMP presenta un límite de detección del 0.001% para detectar las mutaciones T790M del exón 20 y L858R del exón 21 del gen *EGFR*.

E-ice-cold-PCR tienen una sensibilidad que es compatible con los análisis en cáncer de pulmón de biopsia líquida o de tejido.

### **13. PERSPECTIVAS**

Comparar la sensibilidad de E-ice-cold-PCR con BEAMing y PCR digital

Evaluar las mutaciones en pacientes con cáncer de pulmón usando biopsias líquidas.

Realizar la técnica para detectar mutaciones del gen KRAS las cuales son excluyentes de las mutaciones de EGFR en pacientes con cáncer de pulmón

## 14. REFERENCIAS

- Alpert, J. B., & Naidich, D. P. (2011). Imaging of Incidental Findings on Thoracic Computed Tomography. *Radiologic Clinics of North America*, 49(2), 267–289. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2010.10.005>
- Arcila, M., Lau, C., Nafa, K., & Ladanyi, M. (2011). Detection of KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Carcinoma: Roles for High-Sensitivity Locked Nucleic Acid-PCR Sequencing and Broad-Spectrum Mass Spectrometry Genotyping. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 13(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.005>
- Arrieta, O., Campos-Parra, A. D., Zuloaga, C., Avilés, A., Sánchez-Reyes, R., Manríquez, M. E. V., ... Borbolla-Escoboza, J. R. (2012). Clinical and Pathological Characteristics, Outcome and Mutational Profiles Regarding Non-Small-Cell Lung Cancer Related to Wood-Smoke Exposure. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(8), 1228–1234. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182582a93>
- Arrieta, O., Cardona, A. F., Bramuglia, G. F., Gallo, A., Campos-Parra, A. D., Serrano, S., ... Rosell, R. (2011). Genotyping Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) in Latin America. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(11), 1955–1959. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31822f655f>
- Baker, S., Dahele, M., Lagerwaard, F. J., & Senan, S. (2016). A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Radiation Oncology*, 11, 115. <https://doi.org/10.1186/s13014-016-0693-8>
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., ... Diaz, L. A. (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science translational medicine*, 6(224), 224ra24. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>
- Borràs, E., Jurado, I., Hernan, I., Gamundi, M. J., Dias, M., Martí, I., ... Carballo, M. (2011). Clinical pharmacogenomic testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *BMC Cancer*, 11, 406. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-406>
- Brcic, L., Sherer, C. K., Shuai, Y., Hornick, J. L., Chirieac, L. R., & Dacic, S. (2012). Morphologic and Clinicopathologic Features of Lung Squamous Cell Carcinomas Expressing Sox2. *American Journal of Clinical Pathology*, 138(5), 712–718. <https://doi.org/10.1309/AJCP05TTWQTWNLTN>
- Brevet, M., Johnson, M. L., Azzoli, C. G., & Ladanyi, M. (2011). Detection of EGFR mutations in plasma DNA from lung cancer patients by mass spectrometry genotyping is predictive of tumor EGFR status and response to EGFR inhibitors. *Lung Cancer*, 73(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.10.014>
- Bubendorf, L., Lantuejoul, S., Langen, A. J. de, & Thunnissen, E. (2017). Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series “Pathology for the clinician” Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza. *European Respiratory Review*, 26(144), 170007. <https://doi.org/10.1183/16000617.0007-2017>
- Caers, J., Withofs, N., Hillengass, J., Simoni, P., Zamagni, E., Hustinx, R., & Beguin, Y. (2014). The role of positron emission tomography-computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnosis and follow up of multiple myeloma. *Haematologica*, 99(4), 629–637. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.091918>
- Cai, X., Janku, F., Zhan, Q., & Fan, J.-B. (2015). Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies. *Trends in Genetics*, 31(10), 564–575. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.06.001>
- Chin, T. M., Anuar, D., Soo, R., Salto-Tellez, M., Li, W. Q., Ahmad, B., ... Soong, R. (2007). Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Variations by Partially Denaturing HPLC. *Clinical Chemistry*, 53(1), 62–70. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.074831>
- Cohen, V., Agulnik, J. S., Jarry, J., Batist, G., Small, D., Kreisman, H., ... Chong, G. (2006). Evaluation of denaturing high-performance liquid chromatography as a rapid detection method for identification of epidermal growth factor receptor mutations in nonsmall-cell lung cancer. *Cancer*, 107(12), 2858–2865. <https://doi.org/10.1002/cncr.22331>
- Davidson, M. R., Gazdar, A. F., & Clarke, B. E. (2013). The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 5(Suppl 5), S463–S478. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.43>
- Delgado, J., Martinez, L. M., Sánchez, T. T., Ramirez, A., Iturria, C., & González-Avila, G. (2005). Lung Cancer Pathogenesis Associated With Wood Smoke Exposure. *Chest*, 128(1), 124–131. <https://doi.org/10.1378/chest.128.1.124>
- Detterbeck, F. C., Postmus, P. E., & Tanoue, L. T. (2013). The Stage Classification of Lung Cancer. *Chest*, 143(5), e191S–e210S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2354>
- Diaz, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(6), 579–586. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011>
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., ... Diaz Jr, L. A. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*, 14(9), 985–990. <https://doi.org/10.1038/nm.1789>

- Do, H., & Dobrovic, A. (2009). Limited copy number - high resolution melting (LCN-HRM) enables the detection and identification by sequencing of low level mutations in cancer biopsies. *Molecular Cancer*, 8, 82. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-82>
- Do, H., Krypuy, M., Mitchell, P. L., Fox, S. B., & Dobrovic, A. (2008). High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer*, 8, 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-142>
- Douillard, J.-Y., Ostoros, G., Cobo, M., Ciuleanu, T., Cole, R., McWalter, G., ... McCormack, R. (2014). Gefitinib Treatment in EGFR Mutated Caucasian NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(9), 1345–1353. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000263>
- Dufort, S., Richard, M.-J., Lantuejoul, S., & de Fraipont, F. (2011). Pyrosequencing, a method approved to detect the two major EGFR mutations for anti EGFR therapy in NSCLC. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 30(1), 57. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-57>
- Earle, C. C., Landrum, M. B., Souza, J. M., Neville, B. A., Weeks, J. C., & Ayanian, J. Z. (2008). Aggressiveness of Cancer Care Near the End of Life: Is It a Quality-of-Care Issue? *Journal of Clinical Oncology*, 26(23), 3860–3866. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.8253>
- Ellis, P. M., Shepherd, F. A., Millward, M., Perrone, F., Seymour, L., Liu, G., ... Bradbury, P. A. (2014). Dacomitinib compared with placebo in pretreated patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (NCIC CTG BR.26): a double-blind, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 15(12), 1379–1388. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70472-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70472-3)
- Ellison, G., Donald, E., McWalter, G., Knight, L., Fletcher, L., Sherwood, J., ... Speake, G. (2010). A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 29(1), 132. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-132>
- Endo, K., Konishi, A., Sasaki, H., Takada, M., Tanaka, H., Okumura, M., ... Fujii, Y. (2005). Epidermal growth factor receptor gene mutation in non-small cell lung cancer using highly sensitive and fast TaqMan PCR assay. *Lung Cancer*, 50(3), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.08.009>
- Esposito, A., Criscitiello, C., Trapani, D., & Curigliano, G. (2017). The Emerging Role of “Liquid Biopsies,” Circulating Tumor Cells, and Circulating Cell-Free Tumor DNA in Lung Cancer Diagnosis and Identification of Resistance Mutations. *Current Oncology Reports*, 19(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0564-y>
- Ettinger, D. S., Akerley, W., Borghaei, H., Chang, A. C., Cheney, R. T., Chirieac, L. R., ... Gregory, K. M. (2012). Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 10(10), 1236–1271. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2012.0130>
- Fassina, A., Gazziero, A., Zardo, D., Corradin, M., Aldighieri, E., & Rossi, G. P. (2009). Detection of EGFR and KRAS mutations on trans-thoracic needle aspiration of lung nodules by high resolution melting analysis. *Journal of Clinical Pathology*, 62(12), 1096–1102. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.067587>
- Gao, G., Ren, S., Li, A., Xu, J., Xu, Q., Su, C., ... Zhou, C. (2012). Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor therapy is effective as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with mutated EGFR: A meta-analysis from six phase III randomized controlled trials. *International Journal of Cancer*, 131(5), E822–E829. <https://doi.org/10.1002/ijc.27396>
- Ghosal, R., Kloer, P., & Lewis, K. E. (2009). A review of novel biological tools used in screening for the early detection of lung cancer. *Postgraduate Medical Journal*, 85(1005), 358–363. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2008.076307>
- Globocan 2012 - Home. (s/f). Recuperado el 17 de enero de 2017, a partir de <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Gocke, C. D., Benko, F. A., Kopreski, M. S., & Evans, D. B. (2000). Enrichment Methods for Mutation Detection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 906(1), 31–38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06587.x>
- Goto, K., Ichinose, Y., Ohe, Y., Yamamoto, N., Negoro, S., Nishio, K., ... Fukuoka, M. (2012). Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Status in Circulating Free DNA in Serum: From IPASS, a Phase III Study of Gefitinib or Carboplatin/Paclitaxel in Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(1), 115–121. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182307f98>
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., ... Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, nrdp20159. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.9>
- Han, H.-S., Lim, S., An, J. Y., Lee, K. M., Choe, K. H., Lee, K. H., ... Lee, O.-J. (2012). Detection of EGFR Mutation Status in Lung Adenocarcinoma Specimens with Different Proportions of Tumor Cells Using Two Methods of Differential Sensitivity. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(2), 355–364. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31823c4c1b>
- Han, J.-Y., Park, K., Kim, S.-W., Lee, D. H., Kim, H. Y., Kim, H. T., ... Lee, J. S. (2012). First-SIGNAL: First-Line Single-Agent Iressa Versus Gemcitabine and Cisplatin Trial in Never-Smokers With Adenocarcinoma of the Lung. *Journal of Clinical Oncology*, 30(10), 1122–1128. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.8456>

- Holdhoff, M., Schmidt, K., Donehower, R., & Diaz, L. A. (2009). Analysis of Circulating Tumor DNA to Confirm Somatic KRAS Mutations. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 101(18), 1284–1285. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp240>
- How Kit, A., Mazaleyrat, N., Daunay, A., Nielsen, H. M., Terris, B., & Tost, J. (2013). Sensitive Detection of KRAS Mutations Using Enhanced-ice-COLD-PCR Mutation Enrichment and Direct Sequence Identification. *Human Mutation*, 34(11), 1568–1580. <https://doi.org/10.1002/humu.22427>
- How-Kit, A., Lebbé, C., Bousard, A., Daunay, A., Mazaleyrat, N., Daviaud, C., ... Tost, J. (2014). Ultrasensitive detection and identification of BRAF V600 mutations in fresh frozen, FFPE, and plasma samples of melanoma patients by E-ice-COLD-PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(22), 5513–5520. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7975-5>
- Isobe, K., Hata, Y., Tochigi, N., Kaburaki, K., Kobayashi, H., Makino, T., ... Homma, S. (2015). Usefulness of Nanofluidic Digital PCR Arrays to Quantify T790M Mutation in EGFR-mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Genomics - Proteomics*, 12(1), 31–37.
- Jackman, D. M., Miller, V. A., Cioffredi, L.-A., Yeap, B. Y., Jänne, P. A., Riely, G. J., ... Johnson, B. E. (2009). Impact of Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutations on Clinical Outcomes in Previously Untreated Non-Small Cell Lung Cancer Patients: Results of an Online Tumor Registry of Clinical Trials. *Clinical Cancer Research*, 15(16), 5267–5273. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0888>
- Janku, F., Stewart, D. J., & Kurzrock, R. (2010). Targeted therapy in non-small-cell lung cancer—is it becoming a reality? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(7), 401–414. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.64>
- Jänne, P. A., Wang, X., Socinski, M. A., Crawford, J., Stinchcombe, T. E., Gu, L., ... Miller, V. A. (2012). Randomized Phase II Trial of Erlotinib Alone or With Carboplatin and Paclitaxel in Patients Who Were Never or Light Former Smokers With Advanced Lung Adenocarcinoma: CALGB 30406 Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 30(17), 2063–2069. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.1315>
- Jantus-Lewintre, E., Usó, M., Sanmartín, E., & Camps, C. (2012). Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 3, 21–29. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S23424>
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Jett, J. R., & Carr, L. L. (2013). Targeted Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(8), 907–912. <https://doi.org/10.1164/rccm.201301-0189PP>
- Kaur, H., Arora, A., Wengel, J., & Maiti, S. (2006). Thermodynamic, Counterion, and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes. *Biochemistry*, 45(23), 7347–7355. <https://doi.org/10.1021/bi060307w>
- Kimura, H., Fujiwara, Y., Sone, T., Kunitoh, H., Tamura, T., Kasahara, K., & Nishio, K. (2006). EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib. *British Journal of Cancer*, 95(10), 1390–1395. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603428>
- Krypuy, M., Newnham, G. M., Thomas, D. M., Conron, M., & Dobrovic, A. (2006). High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 6, 295. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-295>
- Kuang, Y., Rogers, A., Yeap, B. Y., Wang, L., Makrigiorgos, M., Vetrand, K., ... A.Jänne, P. (2009). Noninvasive Detection of EGFR T790M in Gefitinib or Erlotinib Resistant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(8), 2630–2636. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2592>
- Kwak, E. L., Bang, Y.-J., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Solomon, B., Maki, R. G., ... Iafrate, A. J. (2010). Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*, 363(18), 1693–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1006448>
- Li, X., Ren, R., Ren, S., Chen, X., Cai, W., Zhou, F., ... Zhou, C. (2014). Peripheral Blood for Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Detection in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Translational Oncology*, 7(3), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2014.04.006>
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., & Wittwer, C. (2004). Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. *Clinical Chemistry*, 50(7), 1156–1164. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.032136>
- Lin, M.-T., Mosier, S. L., Thiess, M., Beierl, K. F., Debeljak, M., Tseng, L.-H., ... Eshleman, J. R. (2014). Clinical Validation of KRAS, BRAF, and EGFR Mutation Detection Using Next-Generation Sequencing. *American journal of clinical pathology*, 141(6), 856–866. <https://doi.org/10.1309/AJCPMWGWGO34EGOD>
- Lozano, M. D., Zulueta, J. J., Echeveste, J. I., Gúrpide, A., Seijo, L. M., Martín-Algarra, S., ... Perez-Gracia, J. L. (2011). Assessment of Epidermal Growth Factor Receptor and K-Ras Mutation Status in Cytological Stained Smears of Non-Small Cell Lung Cancer Patients: Correlation with Clinical Outcomes. *The Oncologist*, 16(6), 877–885. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0155>

- Luthra, R., & Zuo, Z. (2009). COLD-PCR Finds Hot Application in Mutation Analysis. *Clinical Chemistry*, 55(12), 2077–2078. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.136143>
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., ... Haber, D. A. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 350(21), 2129–2139. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>
- Ma, E. S. K., Wong, C. L. P., Law, F. B. F., Chan, W.-K., & Siu, D. (2009). Detection of KRAS mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis. *Journal of Clinical Pathology*, 62(10), 886–891. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.063677>
- Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., ... Nukiwa, T. (2010). Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *New England Journal of Medicine*, 362(25), 2380–2388. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909530>
- Massarelli, E., Johnson, F. M., Erickson, H. S., Wistuba, I. I., & Papadimitrakopoulou, V. (2013). Uncommon Epidermal Growth Factor Receptor mutations in non-small cell lung cancer and their mechanisms of EGFR tyrosine kinase inhibitors sensitivity and resistance. *Lung Cancer*, 80(3), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.01.018>
- Milbury, C. A., Li, J., & Makrigiorgos, G. M. (2009a). COLD-PCR-Enhanced High-Resolution Melting Enables Rapid and Selective Identification of Low-Level Unknown Mutations. *Clinical Chemistry*, 55(12), 2130–2143. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.131029>
- Milbury, C. A., Li, J., & Makrigiorgos, G. M. (2009b). PCR-Based Methods for the Enrichment of Minority Alleles and Mutations. *Clinical chemistry*, 55(4), 632–640. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.113035>
- Milbury, C. A., Li, J., & Makrigiorgos, G. M. (2011). Ice -COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Research*, 39(1), e2–e2. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq899>
- Miller, V. A., Hirsh, V., Cadranet, J., Chen, Y.-M., Park, K., Kim, S.-W., ... Yang, J. C.-H. (2012). Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *The Lancet Oncology*, 13(5), 528–538. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70087-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70087-6)
- Miller, V. A., Kris, M. G., Shah, N., Patel, J., Azzoli, C., Gomez, J., ... Heelan, R. T. (2004). Bronchioloalveolar Pathologic Subtype and Smoking History Predict Sensitivity to Gefitinib in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(6), 1103–1109. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.158>
- Ming, G., Song, H., & Shin, J. (2014). Decoding neural transcriptomes and epigenomes via high-throughput sequencing. *Nature Neuroscience*, 17(11), 1463. <https://doi.org/10.1038/nn.3814>
- Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., Okamoto, I., Tsurutani, J., ... Fukuoka, M. (2010). Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 11(2), 121–128. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70364-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70364-X)
- Mok, T. S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., ... Fukuoka, M. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 361(10), 947–957. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 83(5), 584–594.
- Mollberg, N., Surati, M., Demchuk, C., Fathi, R., Salama, A., Husain, A., ... Salgia, R. (2011). Mind-mapping for lung cancer: Towards a personalized therapeutics approach. *Advances in therapy*, 28(3), 173–194. <https://doi.org/10.1007/s12325-010-0103-9>
- Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., & Harper, M. E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer*, 37, Supplement 4, 9–15. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00231-3)
- Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Yan, L., Cantor, M., Namgyal, C., ... Fuchs, C. S. (2005). Sensitive Sequencing Method for KRAS Mutation Detection by Pyrosequencing. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 7(3), 413–421.
- Paez, J. G., Jänne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., ... Meyerson, M. (2004). EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science*, 304(5676), 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>
- Parry, E. M., Gable, D. L., Stanley, S. E., Khalil, S. E., Antonescu, V., Florea, L., & Armanios, M. (2017). Germline Mutations in DNA Repair Genes in Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(11), 1673–1678. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.08.011>
- Pesch, B., Kendzia, B., Gustavsson, P., Jöckel, K.-H., Johnen, G., Pohlmann, H., ... Brüning, T. (2012). Cigarette smoking and lung cancer – relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of



- case-control studies. *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*, 131(5), 1210–1219. <https://doi.org/10.1002/ijc.27339>
- Poláková, K. M., Lopotová, T., Klamová, H., & Moravcová, J. (2008). High-resolution melt curve analysis: Initial screening for mutations in BCR-ABL kinase domain. *Leukemia Research*, 32(8), 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.01.010>
- Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597–608. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2), 154–160. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916>
- Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., ... Paz-Ares, L. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 13(3), 239–246. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70393-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70393-X)
- Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., ... Taron, M. (2009). Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(10), 958–967. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904554>
- Roskoski, R. (2014). ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 87, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.06.001>
- Ruíz-Godoy, L., Rizo Rios, P., Sánchez Cervantes, F., Osornio-Vargas, A., García-Cuellar, C., & Meneses García, A. (2007). Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer*, 58(2), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.06.007>
- Santis, G., Angell, R., Nickless, G., Quinn, A., Herbert, A., Cane, P., ... Tobal, K. (2011). Screening for EGFR and KRAS Mutations in Endobronchial Ultrasound Derived Transbronchial Needle Aspirates in Non-Small Cell Lung Cancer Using COLD-PCR. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025191>
- Santos, G. da C., Shepherd, F. A., & Tsao, M. S. (2011). EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 49–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130206>
- Sestini, R., Provenzano, A., Bacci, C., Orlando, C., Genuardi, M., & Papi, L. (2008). NF2 Mutation Screening by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography and High-Resolution Melting Analysis. *Genetic Testing*, 12(2), 311–318. <https://doi.org/10.1089/gte.2007.0096>
- Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., & Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(3), 169–181. <https://doi.org/10.1038/nrc2088>
- Shigematsu, H., & Gazdar, A. F. (2006). Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *International Journal of Cancer*, 118(2), 257–262. <https://doi.org/10.1002/ijc.21496>
- Shigematsu, H., Lin, L., Takahashi, T., Nomura, M., Suzuki, M., Wistuba, I. I., ... Gazdar, A. F. (2005). Clinical and Biological Features Associated With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 97(5), 339–346. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji055>
- Silahtaroglu, A., Pfundheller, H., Koshkin, A., Tommerup, N., & Kauppinen, S. (2004). LNA-modified oligonucleotides are highly efficient as FISH probes. *Cytogenetic and genome research*, 107, 32–37. <https://doi.org/10.1159/000079569>
- Simi, L., Pratesi, N., Vignoli, M., Sestini, R., Cianchi, F., Valanzano, R., ... Orlando, C. (2008). High-Resolution Melting Analysis for Rapid Detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA Gene Mutations in Colorectal Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 130(2), 247–253. <https://doi.org/10.1309/LWDY1AXHXUULNVHQ>
- Snyder, M. W., Kircher, M., Hill, A. J., Daza, R. M., & Shendure, J. (2016). Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell*, 164(0), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.050>
- Soh, J., Toyooka, S., Aoe, K., Asano, H., Ichihara, S., Katayama, H., ... Date, H. (2006). Usefulness of EGFR mutation screening in pleural fluid to predict the clinical outcome of gefitinib treated patients with lung cancer. *International Journal of Cancer*, 119(10), 2353–2358. <https://doi.org/10.1002/ijc.22190>
- Spencer, D. H., Tyagi, M., Vallania, F., Bredemeyer, A. J., Pfeifer, J. D., Mitra, R. D., & Duncavage, E. J. (2014). Performance of Common Analysis Methods for Detecting Low-Frequency Single Nucleotide Variants in Targeted Next-Generation Sequence Data. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 16(1), 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.09.003>
- Spiro, S. G., Tanner, N. T., Silvestri, G. A., Janes, S. M., Lim, E., Vansteenkiste, J. F., & Pirker, R. (2010). Lung cancer: Progress in diagnosis, staging and therapy. *Respirology*, 15(1), 44–50. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01674.x>
- Stamos, J., Sliwkowski, M. X., & Eigenbrot, C. (2002). Structure of the Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Domain Alone and in Complex with a 4-Anilinoquinazoline Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46265–46272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207135200>

- Sueoka, N., Sato, A., Eguchi, H., Komiya, K., Sakuragi, T., Mitsuoka, M., ... Sueoka, E. (2007). Mutation profile of EGFR gene detected by denaturing high-performance liquid chromatography in Japanese lung cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 133(2), 93–102. <https://doi.org/10.1007/s00432-006-0144-2>
- Takano, T., Ohe, Y., Tsuta, K., Fukui, T., Sakamoto, H., Yoshida, T., ... Tamura, T. (2007). Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Detection Using High-Resolution Melting Analysis Predicts Outcomes in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Gefitinib. *Clinical Cancer Research*, 13(18), 5385–5390. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0627>
- Taniguchi, K., Uchida, J., Nishino, K., Kumagai, T., Okuyama, T., Okami, J., ... Kato, K. (2011). Quantitative Detection of EGFR Mutations in Circulating Tumor DNA Derived from Lung Adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research*, 17(24), 7808–7815. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1712>
- Taylor, C. F. (2009). Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochemical Society Transactions*, 37(2), 433–437. <https://doi.org/10.1042/BST0370433>
- Team, T. N. L. S. T. R. (2011). Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *New England Journal of Medicine*, 365(5), 395–409. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102873>
- Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., ... Yankelwitz, D. (2011). International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(2), 244–285. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318206a221>
- Uchida, J., Kato, K., Kukita, Y., Kumagai, T., Nishino, K., Daga, H., ... Imamura, F. (2015). Diagnostic Accuracy of Noninvasive Genotyping of EGFR in Lung Cancer Patients by Deep Sequencing of Plasma Cell-Free DNA. *Clinical Chemistry*, 61(9), 1191–1196. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.241414>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9236–9241.
- Wang, S., Han, X., Hu, X., Wang, X., Zhao, L., Tang, L., ... Shi, Y. (2014). Clinical significance of pretreatment plasma biomarkers in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 430(Supplement C), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.12.026>
- Wang, Y., McKay, J. D., Rafnar, T., Wang, Z., Timofeeva, M. N., Broderick, P., ... Amos, C. I. (2014). Rare variants of large effect in *BRCA2* and *CHEK2* affect risk of lung cancer. *Nature Genetics*, 46(7), 736–741. <https://doi.org/10.1038/ng.3002>
- Westeinde, S. C. van't, & Klaveren, R. J. van. (2011). Screening and Early Detection of Lung Cancer. *The Cancer Journal*, 17(1), 3–10. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3182099319>
- Wu, Y.-L., Zhou, C., Liam, C.-K., Wu, G., Liu, X., Zhong, Z., ... Zuo, Y. (2015). First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Annals of Oncology*, 26(9), 1883–1889. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv270>
- Yap, T. A., & Popat, S. (2014). Toward precision medicine with next-generation EGFR inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 7, 285–295. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S55339>
- You, Y., Moreira, B. G., Behlke, M. A., & Owczarzy, R. (2006). Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Research*, 34(8), e60–e60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl175>
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., & Kuriyan, J. (2006). An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell*, 125(6), 1137–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.013>
- Zhong, L., Goldberg, M. S., Parent, M.-É., & Hanley, J. A. (2000). Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*, 27(1), 3–18. [https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(99\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(99)00093-8)
- Zhou, C., Wu, Y.-L., Chen, G., Feng, J., Liu, X.-Q., Wang, C., ... You, C. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 12(8), 735–742. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70184-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70184-X)
- Zhou, W., Ercan, D., Chen, L., Yun, C.-H., Li, D., Capelletti, M., ... Jänne, P. A. (2009). Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature*, 462(7276), 1070–1074. <https://doi.org/10.1038/nature08622>