



Estudio molecular del gen EGFR en adenocarcinoma pulmonar: Valor añadido de la PCR a tiempo real.

Ruth Román^{1*}, Natalia Rodón^{1*}, Montse Verdú^{1,2}, Beatriz García-Peláez¹, Mercè Pujol^{1,2,3} y Xavier Puig^{1,2,3}

¹BIOPAT. Biopatología Molecular, SL, Grup Assistència, Barcelona; ²Histopat Laboratoris, Barcelona; ³Hospital de Barcelona, SCIAS, Grup Assistència, Barcelona.

* Contribución equivalente

INTRODUCCIÓN:

Las mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se correlacionan con respuesta a inhibidores del dominio tirosina quinasa (TKIs) y aumento de la supervivencia. La necesidad de establecer con exactitud el estado mutacional de EGFR y el hecho de que en la gran mayoría de casos de cáncer de pulmón el material tisular disponible es muy limitado, ha potenciado la aparición de técnicas de alta sensibilidad, como la basada en la amplificación por PCR a tiempo real, que permite alcanzar una sensibilidad del 1-5% de copias de DNA mutadas. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de la PCR a tiempo real para detectar mutaciones en una serie de adenocarcinomas (AC) previamente considerados no mutados mediante secuenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La serie consta de 64 adenocarcinomas primarios de pulmón cuyo tipo histológico fue establecido mediante estudio microscópico e inmunohistoquímico (CK7, CK20, TTF1, p63, CK5/6 y 34βE12) (Fig 1). Se asignó el subtipo histológico mixto a aquellos casos en los que ninguno de los patrones presentes representaba el 50% de la muestra.

La presencia de mutaciones de EGFR se determinó mediante secuenciación por Sanger de los exones 19, 20 y 21. Los casos no mutados se estudiaron adicionalmente por PCR a tiempo real con el kit Therascreen® EGFR RGQ diseñado para detectar 29 mutaciones del gen EGFR. La sensibilidad real de ambas técnicas se comprobó con diluciones al 20%, 10%, 5% y 1% de las líneas celulares en parafina EGFR ($\Delta E746-A750/+$) y EGFR (+/+) (Horizon Diagnostics).

RESULTADOS:

La secuenciación por Sanger permitió detectar mutaciones de EGFR en 8 casos (12.3%). El uso de la PCR a tiempo real detectó 4 nuevos casos con mutaciones, incrementando el número de casos mutados a 12 casos (18.8%).

El subtipo histológico más prevalente en el grupo con mutaciones de EGFR es el lepidico no mucinoso, presente en 8 de éstos 12 casos (66.7%) (Tabla 1).

La secuenciación por Sanger detecta un máximo de un 10% de ADN mutado de líneas celulares en parafina, mientras que la PCR a tiempo real puede alcanzar una sensibilidad del 1% (Fig 2).

CONCLUSIONES:

La incorporación de la técnica de PCR a tiempo real incrementa notablemente la detección de mutaciones del gen EGFR.

El empleo de técnicas de alta sensibilidad para la detección de mutaciones de EGFR en adenocarcinoma de pulmón es especialmente recomendable en casos con patrón lepidico o con poca representación tumoral.

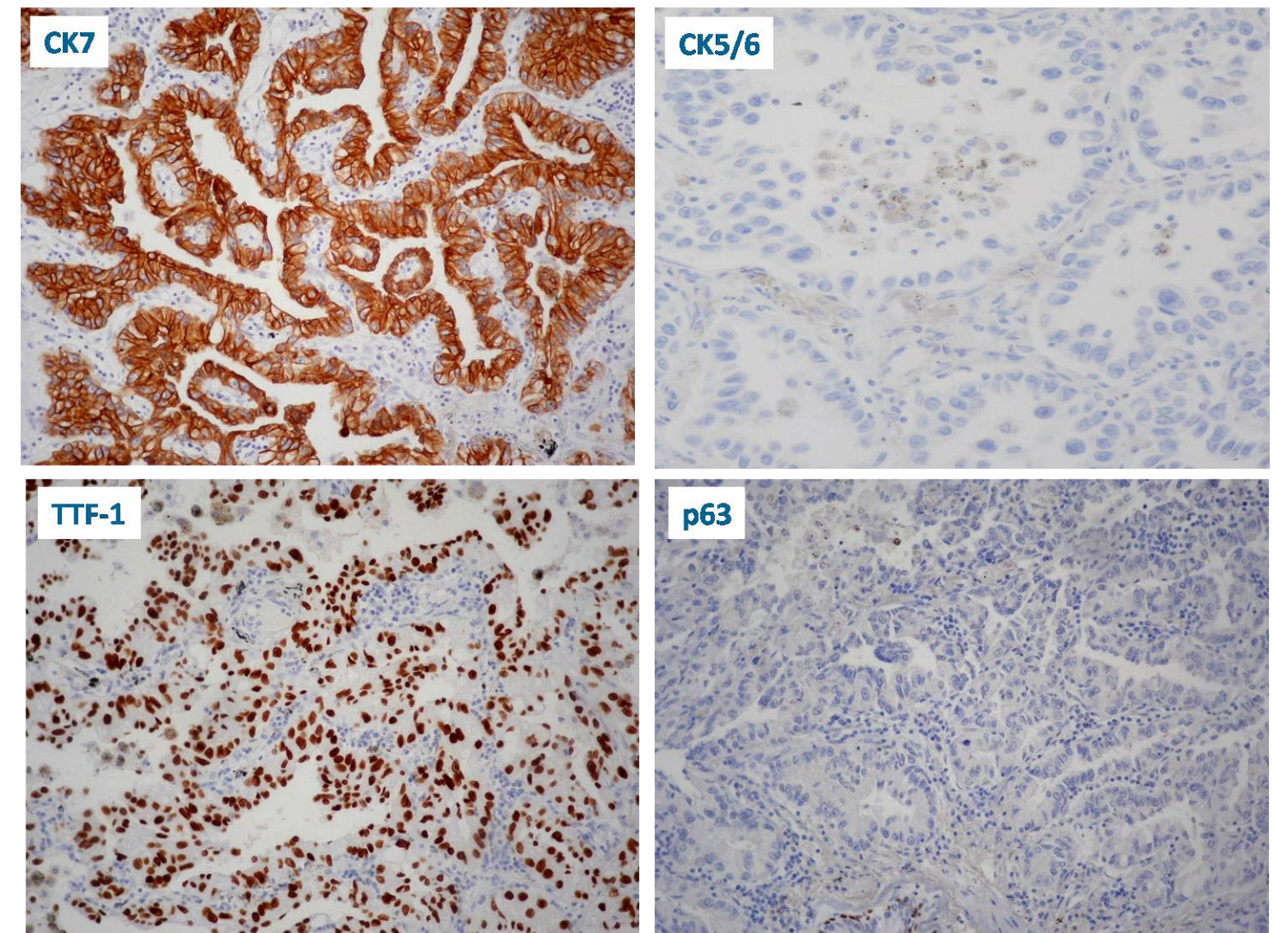


Fig1. Perfil inmunohistoquímico característico de AC de pulmón: CK7 positivo, TTF1 positivo, CK5/6 negativo y p63 negativo (x200).

Subtipos histológicos de AC (n=64)	Mutación de EGFR	
	Sanger	Therascreen
Lepídico no mucinoso (n=18)	4	4
Lepídico mucinoso (n=1)	-	-
Lepídico mixto (n=1)	-	-
Acinar (n=14)	1	-
Papilar (n=1)	-	-
Micropapilar (n=1)	-	-
Sólido (n=17)	2	-
Mixto (n=11)	1	-

Tabla 1. Detección de mutaciones de EGFR en los distintos subtipos de AC mediante secuenciación y/o PCR a tiempo real.

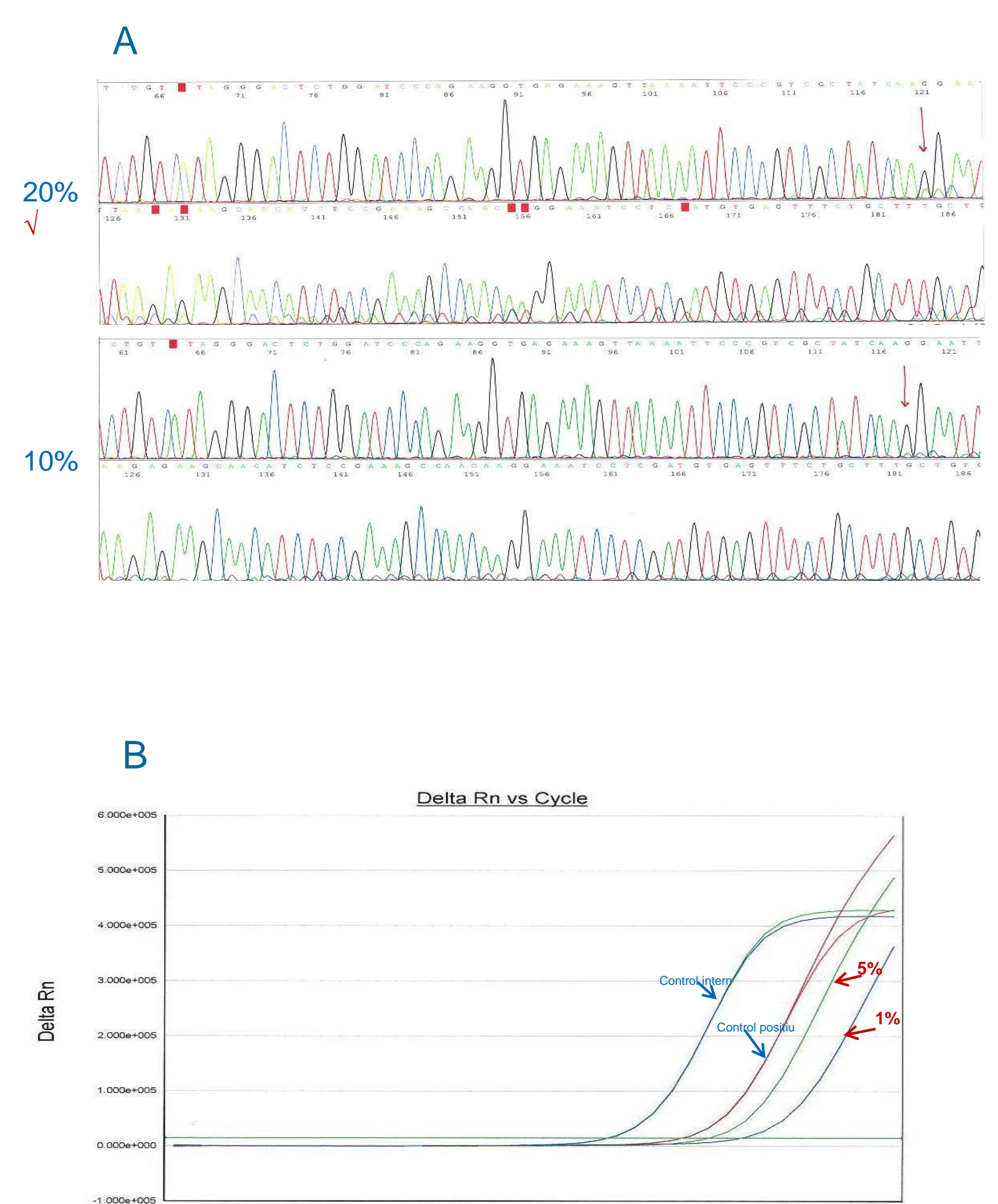


Fig 2. Detección mediante secuenciación (A) y PCR a tiempo real (B) de diluciones al 20%, 10%, 5% y 1% de ADN de líneas celulares en parafina EGFR ($\Delta E746-A750/+$) y EGFR (+/+).