

Carcinoma de pulmón de células no pequeñas: caracterización inmunohistoquímica y estudio molecular del gen del receptor de EGF.

Nadina Erill¹, Anna Colomer¹, Montse Verdú², Ruth Roman¹, Anna Menoyo¹, Carlos Cordón-Cardó^{1,2,3}, Xavier Puig^{1,2}.

¹BIOPAT, Biopatología Molecular. Grup Assistència & ²HISTOPAT Laboratoris; Barcelona. ³Division of Molecular Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad por cáncer en países desarrollados, tanto en el hombre como en la mujer. Aproximadamente dos tercios de los pacientes con NSCLC debutan con enfermedad localmente avanzada o metastásica y requieren terapia sistémica. Recientemente, las terapias con inhibidores de tirosina-quinasa de molécula pequeña (TKIs gefitinib y erlotinib), que actúan contra el dominio catalítico del receptor, han abierto nuevas expectativas en el tratamiento de este tipo de tumores.

En NSCLC, el receptor de EGF, de la familia de las tirosina-quinasas, se encuentra frecuentemente sobreexpresado y activado mediante fosforilación, determinando un aumento de la actividad proliferativa del tumor y de su potencial de invasión, así como la inhibición de los procesos de apoptosis. La sobreexpresión del receptor, determinada mediante inmunohistoquímica (IHQ), no ha resultado útil para predecir la respuesta al tratamiento con gefitinib y erlotinib. Recientemente se han identificado mutaciones somáticas del gen *EGFR* en pacientes con respuesta a estas terapias. La mayoría consisten en pequeñas deleciones y mutaciones puntuales localizadas en los exones 18 al 21 del gen, que codifican el dominio tirosina-quinasa del receptor. Estas mutaciones inciden con mayor frecuencia en adenocarcinomas que en otros tipos histopatológicos, en pacientes de sexo femenino y en no fumadores, en concordancia con el perfil de pacientes con respuesta a TKIs. La incidencia de mutaciones en población occidental se sitúa entre el 10 y el 20% mientras que en poblaciones asiáticas supera el 20%.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue analizar la presencia de mutaciones en los exones 18, 19 y 21 del gen *EGFR* y su expresión, en una serie de NSCLC clasificada en base a criterios morfológicos e inmunofenotipo.

MATERIAL

Material. Se estudió una serie de 78 casos de NSCLC incluyendo 69 hombres y 9 mujeres, con edad promedio 63±10,4 años (rango 42-83). De los tumores estudiados, 70 correspondían a material de archivo y 8 se recopilaban de forma prospectiva.

Histopatología e inmunohistoquímica. El estudio morfológico se efectuó sobre tejido fijado en formol incluido en parafina, con H&E sobre secciones de 3-4 micras. Con los 70 casos de archivo se elaboró un *microarray* tisular (TMA) incluyendo 3 cilindros de 0,6 mm de cada caso. El estudio inmunohistoquímico (avidina-biotina inmunoperoxidasa) se efectuó sobre secciones de 4 micras del TMA, empleando un panel de caracterización compuesto por los anticuerpos CK7, CK20, CK5/6 (clones OV-TL12/30, Ks20.8, D5/16B4. Dako Cytomation, Denmark A/S), y TTF-1 (clon SPT24. Novocastra Lab. Ltd. Newcastle, UK). Por otra parte, se estudió sobre secciones completas de los 70 casos la expresión de *EGFR* (clon 31G7. Zymed Lab. Inc., S. Francisco, CA), estableciendo cuatro categorías: 0 (expresión nula), 1 (expresión débil), 2 (expresión moderada) y 3 (expresión intensa). Las categorías 2 y 3 se consideraron sobreexpresión. En caso de expresión heterogénea se consignó la del área más representada.

Análisis mutacional. Se obtuvo DNA genómico a partir de secciones de tejido parafinado, utilizando el método de proteinasa K y purificación féndica, tras microdissección de las áreas ricas en tejido tumoral. La identificación de mutaciones en los exones 18, 19 y 20 del gen *EGFR* se realizó mediante secuenciación cíclica fluorescente bidireccional del producto amplificado por PCR.

RESULTADOS

Caracterización histopatológica e inmunohistoquímica. Según la clasificación histopatológica inicial, basada únicamente en el patrón morfológico, la serie de casos incluidos en el TMA constaba de 42 carcinomas escamosos, 22 adenocarcinomas (incluyendo 1 carcinoma bronquioloalveolar), 3 carcinomas adenoescamosos y 3 carcinomas indiferenciados (no célula pequeña). En dos casos (carcinomas escamosos) el material obtenido en el TMA no fue representativo. De los 68 restantes, 15 (22%) fueron susceptibles de reclasificación al disponer del inmunofenotipo además del patrón morfológico (Tabla). Los 22 adenocarcinomas mostraron su perfil IHQ característico (CK7 + / CK20 - / CK5/6 - / TTF-1 +) (Figura 1A). En los tumores clasificados como carcinomas escamosos se obtuvo sólo el perfil característico (CK7 - / CK20 - / CK5/6 + / TTF-1 -) en 30 de 40 casos (Figura 1B), siete presentaron inmunofenotipo de adenocarcinoma, uno de carcinoma adenoescamoso y los dos restantes se reclasificaron como indiferenciados. También en 2 de los 3 casos con patrón microscópico de carcinoma indiferenciado (no célula pequeña), el inmunofenotipo fue de adenocarcinoma (Figura 1C).

Inmunohistoquímica de *EGFR*. Se identificó sobreexpresión de *EGFR* (categorías 2 y 3) en el 60% de los tumores estudiados (Figura 2), con mayor frecuencia en carcinomas escamosos (67,7%) que en adenocarcinomas (48,6%), en concordancia con estudios previos.

Estudio mutacional del gen *EGFR*. En nueve de las 78 muestras evaluadas no se consiguió amplificar alguno de los tres exones estudiados. Se identificaron mutaciones somáticas en el dominio tirosina-quinasa del gen de *EGFR* en 2 de los 69 tumores que pudieron ser valorados (2,9%). Ambas mutaciones se localizaron en el exón 19, correspondiendo a una deleción de 15 nucleótidos (E746_A750) y una deleción de 18 nucleótidos (L747_P753) que conlleva la inserción de una serina (Figura 3). Ambas mutaciones habían sido reportadas anteriormente en NSCLC. El análisis de tejido normal (ganglios linfáticos) confirmó el carácter de mutaciones somáticas. Morfológicamente los dos casos portadores de mutaciones correspondían un carcinoma bronquioloalveolar (1 de 2 estudiados) y un adenocarcinoma (1 de 38 estudiados). En ambos casos se trataba de pacientes de sexo femenino, lo que representa el 22% de las 9 mujeres estudiadas. Finalmente, se detectó una sustitución germinal 2754C/T en el exón 21, que no se traduce en un cambio de aminoácido (R836). Este cambio también había sido reportado previamente.

CONCLUSIONES

- El estudio inmunofenotípico del NSCLC con el panel de anticuerpos CK7, CK20, CK5/6 y TTF-1 incrementa el número de casos clasificables como adenocarcinoma.
- El 60% de NSCLC presenta sobreexpresión de *EGFR* detectada por inmunohistoquímica.
- La frecuencia de mutaciones en el gen *EGFR* encontrada en nuestra serie de NSCLC es muy baja, en consonancia con los resultados obtenidos en otras series de población occidental.
- Tanto el tipo de mutaciones de *EGFR* identificadas como el contexto clinicopatológico asociado (adenocarcinoma / carcinoma bronquioloalveolar y sexo femenino) concuerdan con resultados de estudios previos.

TABLA

Morfología	N	Morfología e inmunohistoquímica	N
Adenocarcinoma*	22	Adenocarcinoma	22
C. escamoso	40	C. escamoso	30
		Adenocarcinoma	7
		C. adenoescamoso	1
		C. indiferenciado**	2
C. adenoescamoso	3	Adenocarcinoma	3
C. indiferenciado**	3	C. indiferenciado**	1
		Adenocarcinoma	2
Total	68	Total	68

Clasificación, únicamente con morfología y según morfología e inmunohistoquímica.

* Incluye c. bronquioloalveolar (n=1).

** C. indiferenciado no célula pequeña.

FIGURAS

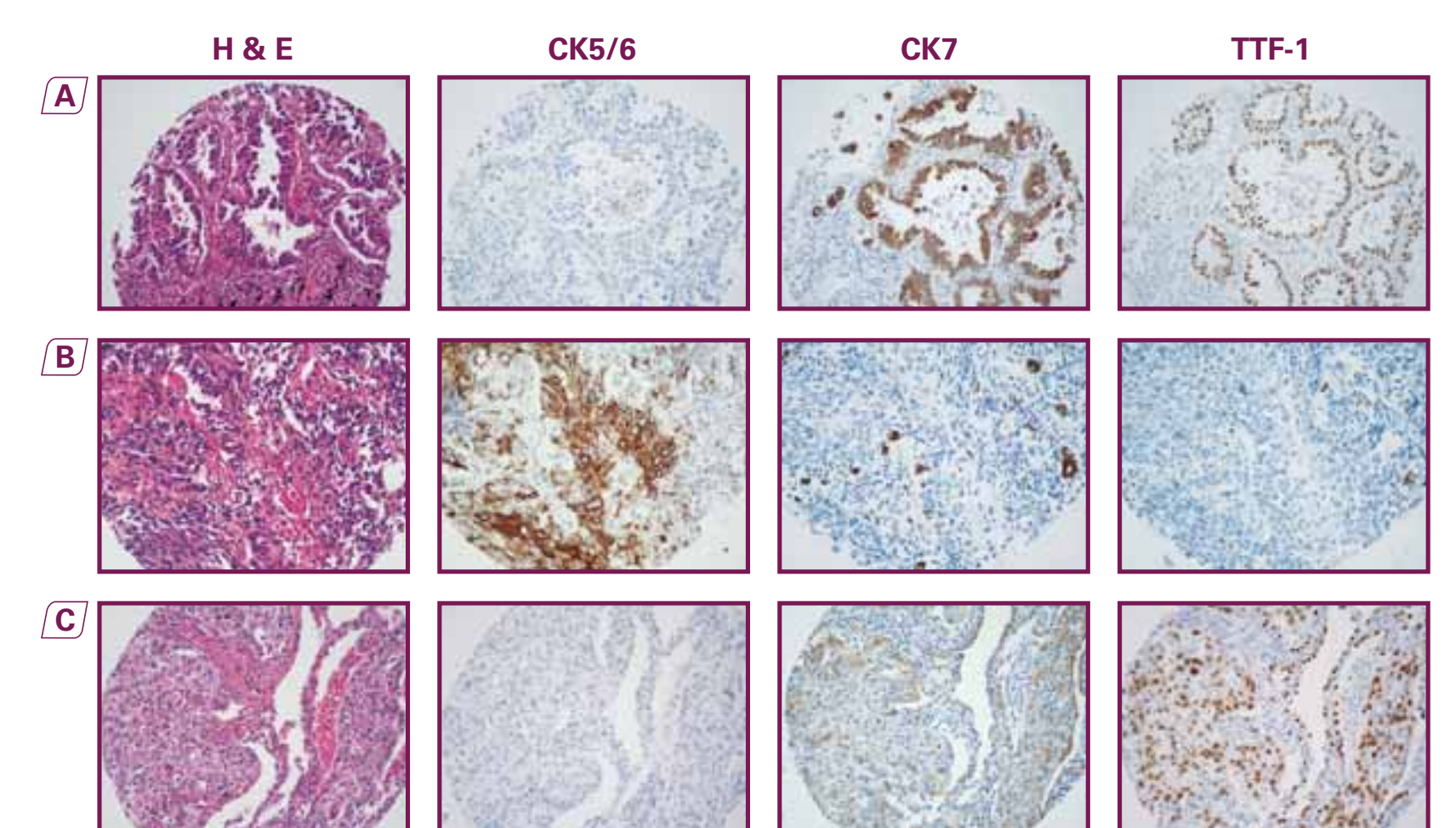


Figura 1. Ejemplos de caracterización inmunohistológica mediante el panel de anticuerpos CK7, CK5/6 y TTF-1 (x200).

A: Adenocarcinoma.

B: Carcinoma escamoso.

C: Carcinoma indiferenciado con patrón inmunohistoquímico de adenocarcinoma.

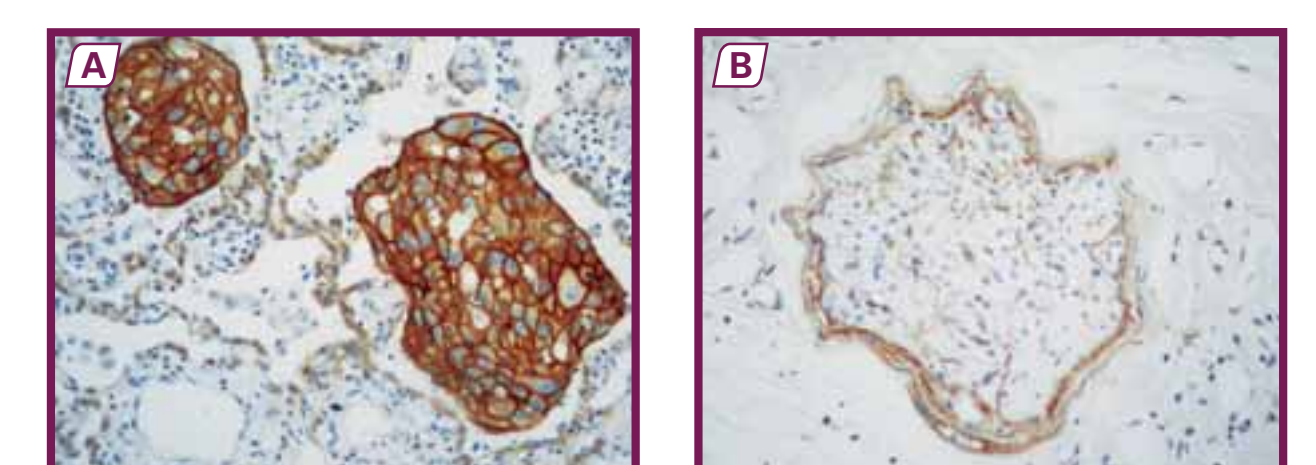
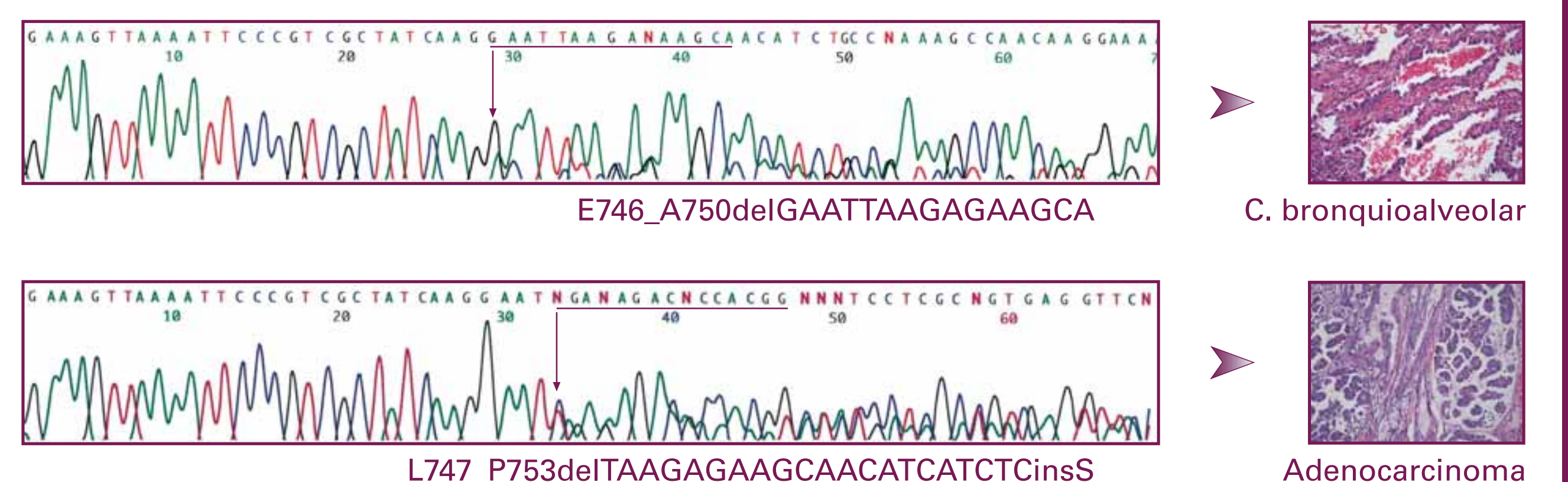


Figura 2. Ejemplos representativos de inmunohistoquímica del receptor de EGF (clon 31G7, x400).

A: Nidos de células neoplásicas con expresión intensa de membrana.

B: Nervio normal adyacente, utilizado como control interno.

Figura 3. Mutaciones identificadas en el exón 19 del gen *EGFR*.



BIBLIOGRAFÍA

- Cortes-Funes H, Gomez C, Rosell R, et al. Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2005;25:2211.
- Deeb G, Wang J, Ramnath N, et al. Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue microarray and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2004;17:430-9.
- Gown AM, Bacchi CE: Diagnostic Immunohistochemistry of Solid Tumors. Short course # 35 in 94th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology. San Antonio, Texas. 2005.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003;21:3798-807.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. *EGFR* mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. *EGFR* receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *PNAS* 2004;101:13306-11.
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:339-46.