



# Utilidad de la inmunohistoquímica para el estudio del gen EGFR en carcinoma de pulmón.

Montse Verdú<sup>1,2</sup>, Natalia Rodón<sup>1</sup>, Ruth Román<sup>1</sup>, Beatriz García-Peláez<sup>1</sup>, Mercè Pujol<sup>1</sup>, Isabel Trias<sup>1,2,3</sup> y Xavier Puig<sup>1,2,3</sup>.

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

**Introducción:** La asociación entre mutaciones de EGFR y respuesta a terapia mediante TKIs en cáncer de pulmón, ha convertido su estudio en un requerimiento indispensable. La introducción de anticuerpos monoclonales específicos para su análisis mediante inmunohistoquímica (IHQ), técnica asequible y de bajo coste, podría facilitar su incorporación en la práctica rutinaria. El objetivo de este estudio fue determinar la utilidad de la IHQ mediante la comparación de resultados con la secuenciación y la PCR en tiempo real.

**Materiales y métodos:** Se analizaron 85 adenocarcinomas primarios de pulmón, clasificados mediante estudio microscópico e inmunohistoquímico (CK7, CK20, TTF1, p63, CK5/6 y 34βE12), (Fig 1). La presencia de mutaciones de EGFR E746\_750del en el exón 19 y L858R en el exón 21 se estudió por IHQ y se estableció el estado mutacional del gen mediante secuenciación, reevaluando los casos negativos por PCR en tiempo real, o utilizando directamente esta última técnica, especialmente si la muestra presentaba escasa representación del tumor (Fig 2, 3 i 4).

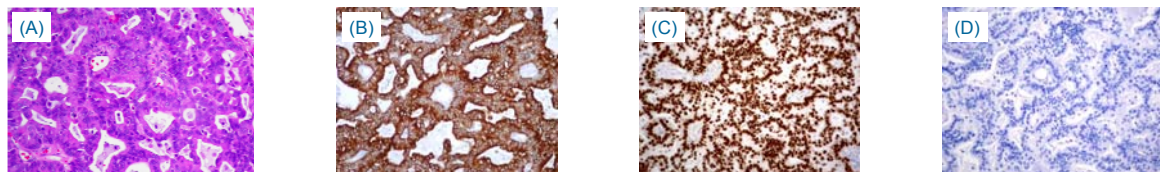


Fig 1. Adenocarcinoma de pulmón. (A) Hematoxilina, (B) CK7 positivo, (C) TTF1 positivo y (D) CK20, P63, 34βE12 y CK5/6 negativos (200x).

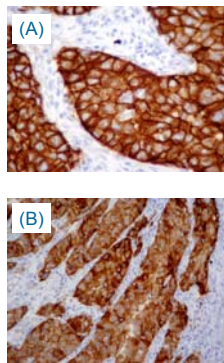


Fig 2. IHQ. (A) Anticuerpo 6B6 EGFR-del 746\_A750 exón 19. (B) Anticuerpo 42B2 EGFR-mut L858R exón 21.

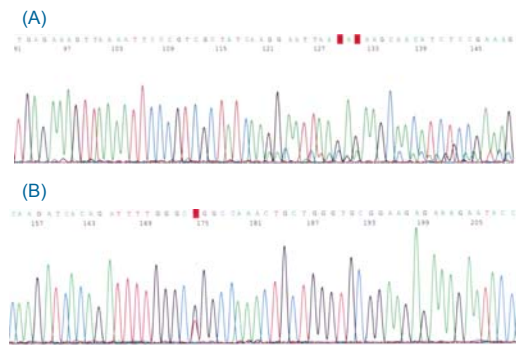


Fig 3. Secuenciación directa. (A) Delección exón 19 EGFR, 45% de las mutaciones en adenocarcinoma. Sensibilidad: 20% DNA mutado en fondo de DNA wild-type. (B) Mutación puntual L858R exón 21 EGFR, 41% de las mutaciones en adenocarcinoma. Sensibilidad: 10% DNA mutado en fondo de DNA wild-type.

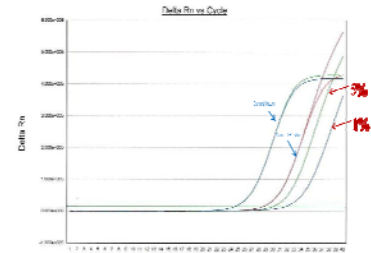


Fig 4. Therascreen® EGFR RGQ PCR Kit, PCR en Tiempo Real. Detecta 29 mutaciones del gen EGFR: G719X exón 18; 19 delecciones exón 19; 3 inserciones exón 20; T790M exón 20; S768I exón 20; L858R exón 21; L861Q exón 21. Sensibilidad: 1% DNA mutado en fondo de DNA wild-type

**Resultados:** La IHQ para la delección del exón 19 resultó negativa en 75 de los 85 casos estudiados (88%), no concluyente en 6 (7%) y positiva en 4 (5%). Los 75 negativos se confirmaron mediante ambas técnicas moleculares. Tres de los casos positivos y uno de los no concluyentes fueron positivos por secuenciación. El cuarto caso positivo por IHQ se confirmó por PCR en tiempo real, resultando también positivos para esta técnica dos de los casos no concluyentes (Tabla 1).

La IHQ para la mutación L858R del exón 21 resultó negativa en 81 de los 85 casos estudiados (95%) y positiva en 4 (5%). Los 81 negativos lo fueron también por secuenciación, mientras que la PCR en tiempo real permitió detectar la mutación en uno de ellos. Uno de los casos positivos por IHQ se confirmó por secuenciación y otros dos por PCR en tiempo real, mientras que el cuarto resultó negativo con ambas técnicas (Tabla 2).

IHQ delE746_A750 (exón 19)	DNA secuenciación delE746_A750		Total
	mutados	No-mutados	
Positivo	3	0	4 (5%)
Negativo	0	75	75 (88%)
No concluyente	1	3	6 (7%)
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>78</b>	<b>85</b>

Tabla 1. IHQ delE746\_A750 (exón 19) vs Secuenciación directa + Therascreen

IHQ L858R (exón 21)	DNA secuenciación L858R		Total
	mutados	No-mutados	
Positivo	1	1	4 (5%)
Negativo	0	80	81 (95%)
No concluyente	0	0	0
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>81</b>	<b>85</b>

Tabla 2. IHQ L858R (exón 21) vs Secuenciación directa + Therascreen

**Conclusiones:** La implementación de la IHQ para la detección de las mutaciones más prevalentes de EGFR en los laboratorios de anatomía patológica puede resultar de utilidad como técnica complementaria al estudio molecular.

De acuerdo con nuestros resultados, el anticuerpo anti-E746\_750del permitiría restringir el uso de técnicas moleculares a aquellos casos no concluyentes para IHQ (7%).

Con el anticuerpo anti-L858R en 85 casos se obtienen, respecto a la PCR en tiempo real, un falso negativo y un falso positivo.