



Receptor para el factor de crecimiento epidérmico en el cáncer de pulmón no microcítico

M. Díez^a, M.L. Maestro^b, A. Torres^c, F. Hernando^c, M.D. Ortega^d, J.A. García-Asenjo^e, A. Picardo^c, J.M. Mugüerza^a, A. Sánchez-Pernaute^c y J.L. Balibrea^c

^aServicio de Cirugía General. Hospital Universitario. Alcalá de Henares. Madrid. Servicios de ^bMedicina Nuclear, ^cCirugía General II, ^dBioquímica Clínica y ^eAnatomía Patológica. Hospital Universitario San Carlos. Madrid.

En este trabajo se estudia la concentración de receptor para el factor epidérmico de crecimiento (EGFr) en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y se analiza la relación con factores anatomopatológicos y clínicos de estas neoplasias. La concentración de EGFr en 62 muestras de tejido tumoral fue $9,9 \pm 14$ fmol/mg, superior a la encontrada en 14 muestras de tejido procedente de neumotórax espontáneo ($3,9 \pm 3,6$ fmol/mg) ($p = 0,005$). La concentración de EGFr en el tejido pulmonar no afectado por la neoplasia fue $6,5 \pm 10$ fmol/mg. En 21 (33%) casos de CPNM la concentración fue superior al nivel adoptado como umbral de normalidad (10 fmol/mg). El valor de EGFr fue superior en los carcinomas epidermoides que en los otros tipos histológicos ($p = 0,042$). No se detectó relación significativa entre nivel de EGFr y estadio TNM, grado de diferenciación e índice mitótico. La probabilidad de permanecer libre de recidiva tumoral y la supervivencia global a los 24 meses entre los sujetos que presentaron una concentración de EGFr en el tumor inferior a 10 fmol/mg fueron 34 y 40%, respectivamente. Dichas tasas para los pacientes con valores superiores al dintel fueron 20% ($p = 0,32$) y 25% ($p = 0,26$), respectivamente. Los resultados parecen indicar que el estudio de la concentración de EGFr, de forma aislada, no implica consecuencias prácticas importantes para el manejo clínico de los pacientes con CPNM intervenidos quirúrgicamente. La expresión de EGFr en CPNM se comporta como un marcador del grado de diferenciación, con implicaciones pronósticas derivadas de su relación con otros factores asociados.

Arch Bronconeumol 1994; 30: 282-286

Introducción

En los últimos años se ha dedicado gran atención a la biología del cáncer de pulmón. Cada vez hay más datos que indican que los resultados a largo plazo y la respuesta al tratamiento están basados en factores

Correspondencia: Dr. M. Díez. Servicio de Cirugía General. Hospital Universitario. Alcalá de Henares. Madrid.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda de una beca de la Fundación Salud 2000.

Recibido: 1-7-93; aceptado para su publicación: 29-10-93.

Epidermic growth factor receptor in non-small cell carcinoma of the lung

In this study we determined the concentration of epidermic growth factor receptors (EGFr) in non-small cell carcinoma of the lung (NSCCL) and analyzed its relation to the anatomical, pathological and clinical factors of these neoplasms. The concentration of EGFr in 62 tumor tissue samples was 9.9 ± 14 fmol/mg, higher than that found in 14 tissue samples from cases of spontaneous pneumothorax (3.9 ± 3.6 fmol/mg) ($p = 0.005$). EGFr concentration in lung tissue with no signs of neoplasm was 6.5 ± 10 fmol/mg. In 21 (33%) cases of NSCCL the concentration exceeded the normal threshold of 10 fmol/mg. EGFr concentration was higher in cases of epidermoid carcinoma than in other tissue samples ($p = 0.042$). No significant association was found between EGFr levels and status of tumor node metastasis, degree of differentiation and mitotic index. The probability of remaining free of tumor recurrence and of survival after 24 months among patients whose tumoral EGFr concentration was below 10 fmol/mg was 34 and 40%, respectively. The rates for patients with concentrations that exceeded the threshold were 20% ($p = 0.32$) and 25% ($p = 0.26$), respectively. The results seem to indicate that the study of EGFr concentration alone does not yield practically important information for the management of patients with NSCCL who have undergone surgery. The concentration of EGFr marks degree of differentiation in NSCCL and has prognostic implications derived from its association with other factors.

biológicos individuales a cada tumor¹. El estudio de los procesos de división celular ha conducido al descubrimiento de los factores de crecimiento. Entre éstos, el EGF (*epidermal growth factor*) es un promotor muy importante de los procesos de proliferación y diferenciación celular². Actúa mediante un mecanismo autocrino junto con el TGF-alfa (*transforming growth factor*) sobre un receptor específico en la membrana celular (EGFr)³. Se ha observado en algunos tumorales que presentan un incremento en la concentración de EGFr y se ha relacionado este hecho con un

comportamiento tumoral más agresivo, mayor actividad proliferativa, mayor frecuencia de recidivas y peor pronóstico de vida^{4,6}. Sin embargo, las publicaciones no son unánimes ya que no todos los tipos tumorales parecen comportarse de la misma manera. El EGF es una molécula con una vida media corta y que alcanza una concentración en sangre prácticamente indetectable con las técnicas disponibles habitualmente. Es más práctica la medición de EGF en orina de 24 horas (urogastrona). Sin embargo, la sensibilidad de ambos métodos para detectar variaciones en la concentración de EGF, clínicamente relevantes, es muy pequeña e inespecífica. Puesto que el control de la síntesis de esta sustancia y de su actuación está localizado en cada tejido, es biológicamente más significativa la determinación del EGFr.

En el presente estudio se determina la concentración de EGFr en la membrana celular de carcinomas pulmonares no microcíticos (CPNM) y se analiza la relación entre expresión de EGFr y aspectos anatómopatológicos (tipo histológico, estadio tumoral, grado de diferenciación, índice mitótico) y clínicos (pronóstico de supervivencia y recidiva). El objetivo es conocer si del grado de expresión de EGFr se pueden derivar consecuencias prácticas importantes para el manejo clínico de estos pacientes.

Material y métodos

Pacientes

Se incluyen en el estudio 63 pacientes (56 varones y 7 mujeres; edad media, 61 ± 9 años) intervenidos quirúrgicamente de forma consecutiva entre octubre de 1990 y julio de 1992. Ninguno había recibido quimioterapia preoperatoria. En 33 enfermos (52,3%) se diagnosticó carcinoma epidermoide, 25 (39,6%) adenocarcinoma y 5 (7,9%) carcinoma indiferenciado de células grandes⁷. Se determinó el grado de diferenciación, que fue clasificado en tres categorías (bien, moderadamente y poco diferenciado)⁸. Se analizó el índice mitótico, para ello se asignó la categoría (+) cuando se contabilizaron entre 0 y 9 mitosis por diez campos de gran aumento, (++) entre 10 y 19, y (+++) cuando se contabilizaron más de 20⁹. Se encontraban en estadio I 26 pacientes, cinco en estadio II, 20 en estadio IIIa, cinco en estadio IIIb y siete en estadio IV¹⁰. Durante el seguimiento se ha detectado recidiva tumoral en 24 enfermos entre aquellos intervenidos en estadios I, II, y IIIa. Han fallecido 28 pacientes. El seguimiento medio de los sujetos que permanecen vivos es de 16 meses.

Como grupo control se incluyen 14 pacientes intervenidos por neumotórax idiopático (10 varones y 4 mujeres; edad media, 24 ± 7 años). Todos estos fueron sometidos a resección pulmonar segmentaria y abrasión pleural.

Muestras de tejido pulmonar

Se obtuvieron muestras de tejido pulmonar durante la intervención quirúrgica. En los enfermos con CPNM se obtuvieron dos especímenes: uno del tumor y otro del tejido pulmonar no afectado, distante del cáncer un mínimo de 10 cm. En los pacientes con neumotórax espontáneo se obtuvo una muestra procedente de la región pulmonar reseçada. Una parte de las piezas obtenidas fue enviada para estudio anatómopatológico. El tejido restante se lavó en frío

TABLA I
Concentración de EGFr según el tipo de muestra analizada

Tipo de muestra	Media (fmol/mg)	DE	Mediana	Percentiles	
				25	75
Cáncer de pulmón	9,9	14	4,4	0,3	13
Pulmón no tumoral*	6,5	10	3,4	0,2	10,6
Neumotórax	3,9**	3,6	3,2	0,1	7,5

*Tejido pulmonar no afectado por el tumor y procedente de sujetos intervenidos por cáncer de pulmón. **Nivel de significación: $p = 0,005$ (cáncer de pulmón frente a neumotórax).

con abundante suero salino para retirar todo resto de tejido necrótico o moco, y tras ello fue introducido en nitrógeno líquido. El tiempo transcurrido hasta la congelación siempre fue menor de 15 min. Todas las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

Todas las determinaciones de EGFr se realizaron sobre las membranas. Para la obtención de éstas, los especímenes originales fueron pesados, pulverizados en congelación y suspendidos en búfer TRIS. La homogenización se realizó mediante tres pulsos de 15 s a 4°C . La mezcla se centrifugó a 2.000 rpm y el sobrenadante fue ultracentrifugado a $100.000 \times g$ durante 60 min. La concentración de EGFr se midió por la técnica de radioligando mediante el análisis de un solo punto marcado con ¹³¹I (Vienna Lab.) (Izasa). Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Lowry. Los resultados finales se expresan en fmol de EGFr por mg de proteína de membrana.

Análisis estadístico

Las diferencias en la concentración de EGFr fue analizada mediante los tests de Mann-Whitney (comparación entre grupos de pacientes), Wilcoxon (comparación entre muestras procedentes de un mismo paciente: muestra tumoral frente a no tumoral) y Kruskal-Wallis (comparación múltiple entre más de dos tipos de muestras). La utilización de tests no paramétricos se debió a que la distribución de los valores de EGFr no se ajustó a la normal. Se escogió como nivel dintel de normalidad de EGFr el valor de 10 fmol/mg, equivalente al percentil 95 de la concentración de EGFr en las muestras procedentes de neumotórax espontáneo. La incidencia de concentraciones de receptor elevadas (superiores al dintel) fue analizada mediante el test exacto de Fisher. La probabilidad de supervivencia o de desarrollar recidivas postoperatorias, en función de los resultados del EGFr, se analizó mediante la prueba de Kaplan-Meier. La comparación de las curvas de probabilidad se realizó mediante el test de *log-rank*. Se consideró como nivel de significación $p < 0,05$.

Resultados

La concentración de EGFr en el tejido tumoral fue de $9,9 \pm 14$ fmol/mg y de $6,5 \pm 10$ fmol/mg en el tejido pulmonar no afectado por la neoplasia en esos mismos pacientes ($p = 0,11$). La concentración en las muestras tumorales fue significativamente superior a la detectada en el tejido procedente de neumotórax espontáneo ($3,9 \pm 3,6$ fmol/mg) ($p = 0,005$) (tabla I).

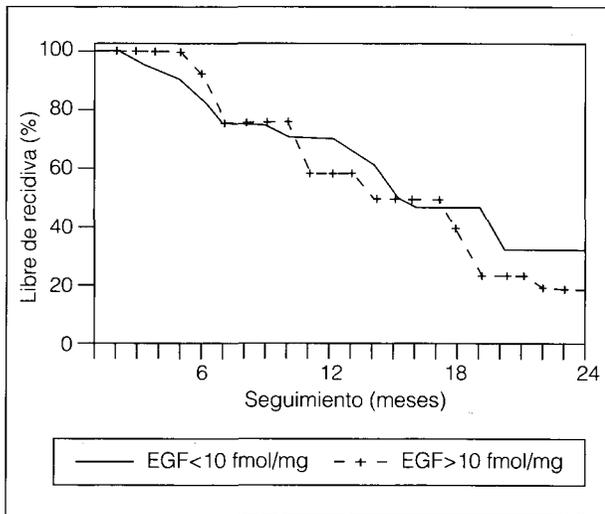
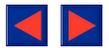


Fig. 1. Probabilidad de permanecer libre de recidiva tumoral según la concentración de EGFr en membrana. Se incluyen únicamente los pacientes en estadios I, II y IIIa.

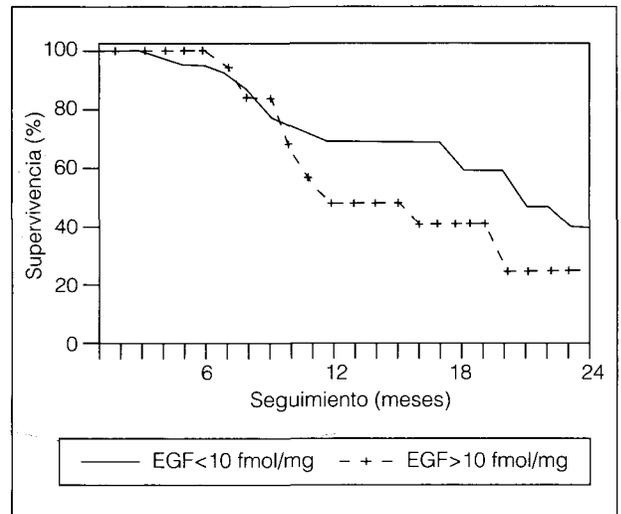


Fig. 2. Supervivencia postoperatoria según la concentración de EGFr en membrana.

No existieron diferencias significativas entre la concentración detectada en las muestras pulmonares no afectadas por el tumor y las procedentes de pacientes con neumotórax espontáneo. En 21 (33%) muestras tumorales se detectó una concentración de EGFr superior al dintel de normalidad, frente a 13 casos (20%) en el tejido no tumoral ($p = 0,07$).

La concentración de EGFr en los carcinomas epidermoides ($13,9 \pm 17,9$ fmol/mg) fue significativamente superior a la detectada en los otros tipos histológicos ($p = 0,042$). También lo fue el tanto por ciento de sujetos con valores de EGFr superiores al *cut-off* (45,5%) ($p = 0,03$) (tabla II). Para analizar los resultados en relación con el estadio tumoral, y dado el número limitado de casos recogidos, se agruparon los pacientes en tres categorías: estadios I-II, estadio IIIa y estadios IIIb-IV. No se detectaron diferencias significativas entre dichas categorías ($p = 0,36$).

No existieron diferencias significativas en la concentración de EGFr según el grado de diferenciación (tabla III). Tampoco existieron diferencias significativas en la concentración de EGFr según el índice mitótico (tabla III).

La probabilidad de permanecer libre de recidiva tumoral a los 24 meses de seguimiento, entre los pacientes intervenidos en estadios TNM I, II o IIIa, con concentración de EGFr en el tumor inferior a 10 fmol/mg, fue de 34% frente a 20% entre los pacientes con valores superiores al dintel ($p = 0,32$) (fig. 1). La supervivencia global a los 24 meses tras la cirugía entre los enfermos cuyos tumores presentaron una concentración de EGFr inferior a 10 fmol/mg fue de 40% frente al 25% entre los sujetos con niveles superiores ($p = 0,26$) (fig. 2).

Discusión

Parece existir acuerdo en que el número de receptores para EGF está aumentado en el tejido tumoral del CPNM con respecto al tejido normal y que esta situación es especialmente significativa en el carcinoma epidermoide sobre los otros tipos histológicos¹¹⁻¹⁶. Nuestros resultados así lo confirman, de hecho la concentración de receptor en el tejido neoplásico (media, 12,3; mediana, 3,2; rango intercuartil, 0,3 y 13) coincide con las observaciones previas publicadas por

TABLA II
Concentración de EGFr según el tipo histológico y el estadio tumoral

Tipo de muestra	Media (fmol/mg)	DE	Mediana	Percentiles 25-75	Número de casos > <i>cut-off</i> (%)
Tipo histológico					
Epidermoide (n = 33)	13,9*	36,6	8	1,4-16,8	15 (45,5)
Adenocarcinoma (n = 25)	5,4	7,9	1,8	0-8,6	5 (20)
Células grandes (n = 5)	5,5	4,6	4,7	2,3-9,2	1 (20)
Estadio TNM					
I, II (n = 31)	14,6	36	4,9	0-13,8	9 (29)
IIIa (n = 20)	12,8	17,2	4,7	1,4-11,3	7 (35)
IIIb, IV (n = 13)	7**	6,8	3,4	1,4-13	5 (38)

*Nivel de significación: $p = 0,042$ (epidermoide frente a adenocarcinoma y carcinoma de células grandes).

**Nivel de significación: $p = 0,36$ I, II, IIIa frente a IIIb, IV.



TABLA III
Concentración de EGFr según el grado de diferenciación

Tipo de muestra	Media (fmol/mg)	DE	Mediana	Percentiles 25-75	Número de casos > cut-off (%)
Grado de diferenciación					
Bien (n = 10)	10,9	21	6,9	0,3-16	3 (30)
Moderadamente (n = 27)	11,7	15	9,6	1,4-16,3	13 (48)
Pobrememente (n = 23)	6,4*	8,7	2,9	0,7-9,2	4 (17)
Índice mitótico					
(+) (n = 15)	9,9	18	1,45	0,1-14,5	5 (33,3)
(++) (n = 24)	11,3	16	3,3	0,6-13,8	9 (37,5)
(+++)(n = 18)	7,7**	8	4,4	1,6-11,3	5 (27,7)

(+): ligero. (++): moderado. (+++): interno. *Nivel de significación: $p=0,13$ bien y moderadamente diferenciado frente a poco diferenciado.
**Nivel de significación: $p=0,41$ (+) y (++) frente a (+++).

Hwang¹⁷, Veale¹⁸ y por Dittadi¹³. En este último estudio se utilizó un dintel de 12,5 fmol/mg, muy similar al empleado en nuestro trabajo.

Sin embargo, no se sabe todavía cuál es el significado de la sobreexpresión de EGFr en el CPNM, y lo que es más importante, si de dicha situación se pueden deducir consecuencias prácticas en estos pacientes. En tumores de mama se ha relacionado la sobreexpresión de EGFr con una mayor actividad proliferativa, aneuploidía, mayor capacidad de metastatización y peor pronóstico de vida⁴⁻⁶. Se ha afirmado que esta situación proporciona a las células tumorales una capacidad de crecimiento y proliferación independiente. No sabemos realmente si esas observaciones son también válidas para el CPNM. No todos los tipos celulares responden de igual manera al EGF; además, la respuesta es dependiente de la dosis y puede variar según el momento del ciclo celular².

En un reciente estudio retrospectivo, basado en el análisis de inmunofluorescencia sobre 152 casos de CPNM, los tumores teñidos positivamente eran en su mayoría carcinomas epidermoides bien diferenciados, de tamaño tumoral inferior, y mostraron un curso postoperatorio más benigno¹¹. En las conclusiones finales de ese estudio se cuestiona la trascendencia práctica del papel que ocupa el EGFr en el comportamiento biológico del CPNM y se atribuye el efecto sobre la evolución a la relación entre EGFr y grado de diferenciación. Por el contrario, otros estudios atribuyen rasgos histológicos de mal pronóstico y un peor curso postoperatorio a los tumores epidermoides que expresan niveles elevados de EGFr^{14,16}. Nuestros datos parecen indicar que el estudio de la expresión de EGFr no implica consecuencias prácticas importantes para el manejo clínico de los pacientes con CPNM intervenidos quirúrgicamente. No encontramos relación con el índice mitótico, ni con el estadio TNM, ni con el grado de diferenciación. Además, no encontramos diferencias significativas entre la probabilidad de supervivencia y recidiva tumoral a corto plazo entre los casos con elevada expresión de EGFr frente a aquellos otros con niveles inferiores al dintel.

El 67% de los CPNM mostraron una concentración de EGFr inferior al dintel, es decir, dentro del rango propio del tejido no tumoral. En principio, se debe

pensar que en los tumores con baja expresión de EGFr, la proliferación celular tumoral no depende en gran medida de la estimulación autocrina de EGF y TGF-alfa¹¹, sino que deben estar implicados otros mecanismos. En nuestra opinión, la sobreexpresión de EGFr en el CPNM puede ser simplemente un factor secundario, como marcador del grado de diferenciación tumoral. La respuesta al EGF parece ser diferente en cada tipo de tejido y las alteraciones que motivan la proliferación celular tumoral desordenada son también múltiples. Se ha descrito que la sobreexpresión de EGFr en el cáncer de mama es un marcador de pérdida de diferenciación y que por ello proporciona información de carácter pronóstico sobre el curso de la enfermedad¹⁹.

Posiblemente, la principal aplicación práctica de este tipo de estudios sea la de identificar los tumores con elevada expresión de EGFr. Se piensa que éstos dependen de la estimulación autocrina de EGF y TGF-alfa y por ello sería posible intentar en ellos el bloqueo terapéutico de esa vía de la proliferación celular. En el National Cancer Institute de EE.UU. se ha iniciado un ensayo con el tratamiento de carcinomas epidermoides con sobreexpresión de EGFr mediante anticuerpos monoclonales dirigidos frente al EGFr²⁰. Los resultados iniciales que se han dado a conocer son prometedores, los tumores con alta expresión de EGFr captan el anticuerpo marcado, aunque el índice de respuestas al tratamiento todavía es muy bajo.

Las interacciones entre los factores de crecimiento y los mecanismos de control de la proliferación celular son complejas². Posiblemente la determinación del EGFr de forma aislada sea una medida muy pobre y sea necesario tener en cuenta otros factores de crecimiento, oncogenes y datos del ciclo celular. Es preciso analizar un mayor número de casos y con una mayor perspectiva de la evolución postoperatoria, para saber cuál es la implicación clínica asociada a la sobreexpresión de EGFr en el CPNM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carney DN. Lung Cancer Biology. Eur J Cancer 1991; 27: 369-372.



2. Burgess AW. Epidermal growth factor and transforming growth factor alfa. *Br Med Bull* 1989; 45: 401-424.
3. Carpenter G, Zendejui JG. Epidermal growth factor, its receptor and related proteins. *Exp Cell Res* 1986; 164: 1.
4. Spitzer E, Grosse R, Kunde D, Schmidt HE. Growth of mammary epithelial cells in breast cancer biopsies correlated with EGF binding. *Int J Cancer* 1987; 39: 279.
5. Sainsbury JRC, Farndon JR, Needham GK, Malcom AJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence and of death from breast cancer. *Lancet* 1987; 1: 1.398-1.402.
6. Moe RE, Moe KS, Porter P, Gown A, Ellis G, Tapper D. Expression of Her-2/neu oncogene protein product and epidermal growth factor receptors in surgical specimens of human breast cancers. *Am J Surg* 1991; 161: 580-583.
7. WHO. *Histological Typing of Lung Tumors*. (2.^aed.) Ginebra, 1981.
8. Carter D, Eggleston JL. Tumors of the lower respiratory tract. En: *Atlas of tumor pathology*. Serono Series. Pt 17. AFIP. Washington DC: 1980.
9. Mooi WJ, Addis BJ. Carcinoma of the Lung. En: Corrin B, editor. *The Lungs*. Edimburg. Filadelfia: Churchill Livingstone 1990: 341-372.
10. Mountain CF. A new International Staging system for lung cancer. *Chest* 1986; 89 Supl: 225-231.
11. Dazzi H, Hasleton PS, Thatcher N, Barnes DM, Wilkes S, Swindell R, Lawson RAM. Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in non-small cell lung cancer. Use of archival tissue and correlation of RGF-R with histology, tumor size, node status and survival. *Br J Cancer* 1989; 59: 746-749.
12. Handler FJ, Ozanne BW. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest* 1984; 74: 647-651.
13. Dittadi R, Gion M, Pagan V, Brazzale A, Del Maschio O, Bargossi A, Busetto A, Bruscaignin G. Epidermal growth factor receptor in lung malignancies. Comparison between cancer and normal tissue. *Br J Cancer* 1991; 64: 741-744.
14. Gorgoulis V, Aninos D, Mikou P, Kanavaros P, Karameris A, Joordanoglou J, Rasidakis A, Veslemes M, Ozanne B, Spandidos DA. Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 1992; 12: 1.183-1.187.
15. Berger MS, Gullick WJ, Greenfield C, Evans S, Addis BJ, Waterfield MD. Epidermal growth factor receptors in lung tumors. *J Pathol* 1987; 152: 297.
16. Veale D, Asheroft T, Marsh C, Gigson GJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1987; 55: 513-516.
17. Hwang DL, Tay YC, Lin SS, Lev-Ran A. Expression of epidermal growth factor receptors in human lung tumors. *Cancer* 1986; 58: 2.630-2.263.
18. Veale D, Kerr N, Gigson GJ, Harris AL. Characterization of epidermal growth factor receptor in primary human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 1.313-1.317.
19. Nicholson S, Richard J, Sainsbury C. Epidermal growth factor receptor: results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup. *Br J Cancer* 1991; 83: 146-150.
20. Divgi CR, Welt S, Kris S, Real FX, Yeh SD, Gralla R, Merchant B, Schweighart S, Unger M, Larson SM. Phase I and imaging trial of indium 111-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 97-104.