

DetECCIÓN inmunohistoquímica del receptor del factor de crecimiento epidérmico: revisión de algunos aspectos técnicos relacionados

Immunohistochemical detection of the epidermal growth factor receptor: review of some related technical aspects

Lic. Rancés Blanco Santana, MsC. Mercedes Cedeño Arias, Dr. Enrique Rengifo Calzado

Departamento de Control de la Calidad, Laboratorio de Ensayos de Reconocimiento y Actividad Biológica. Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: En los últimos años la inmunohistoquímica (IHQ) se ha convertido en el método más usado en la determinación de la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (REGF). La falta de control de algunos aspectos técnicos durante su determinación en muestras de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, como por ejemplo, la fijación tisular y el procesamiento de las muestras, la elección de un método adecuado de reanimación antigénica, el empleo de diferentes anticuerpos anti-REGF y sistemas de detección, a llegado a tal punto que la confiabilidad y reproducibilidad de la detección inmunohistoquímica de la sobreexpresión del REGF está siendo fuertemente cuestionada.

Objetivo: La estandarización de estos procedimientos constituye una de las metas más perseguidas actualmente, con el objetivo de continuar empleando la sobreexpresión del REGF por IHQ como criterio de elección y predictor de la respuesta al tratamiento, sin necesidad de recurrir a técnicas más complejas para su detección, disminuyendo en gran medida a la variabilidad intra e interlaboratorios.

Métodos: Revisión y determinación de la pertinencia en el control de la técnica investigativa y viabilidad de la misma.

Conclusiones: La determinación de la sobreexpresión del REGF por IHQ continúa siendo el método más empleado actualmente como predictor de la respuesta a la terapia contra el receptor. La heterogeneidad de las muestras, la falta de

estandarización de los procedimientos inmunohistoquímicos empleados, la existencia de numerosos protocolos con un mismo fin, así como otras fuentes de variabilidad, han conducido a la obtención de resultados poco confiables y reproducibles.

Palabras clave: estandarización, inmunohistoquímica (IHQ), receptor del factor de crecimiento epidérmico (REGF).

ABSTRACT

Background: In recent years, immunohistochemistry (IHC) has become the most widely used method in determining the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR). The lack of control of some technical aspects during their determination in formaldehyde fixed and paraffin embedded tissue such as tissue fixation and sample processing, the choice of a suitable antigen retrieval method, the use of different anti-EGFR antibodies and the detection systems have come to the point that the reliability and reproducibility of the immunohistochemical analysis of EGFR overexpression is being seriously questioned.

Objective: The standardization of these procedures is one of most pursued goals at present, with the aim to continue using EGFR overexpression by IHC as selection criteria and predictor of treatment response, without resorting to most complex techniques for its detection, greatly diminishing the intra and inter laboratory variation.

Methods: A review and determination of the relevance in the control of the investigative technique and its feasibility was made.

Conclusions: The determination of EGFR overexpression by IHC continues being the most used method at present as predictor of the response to the therapy against the receptor. The heterogeneity of the samples, the lack of standardization of the most used immunohistochemical procedures, the existence of several protocols with the same goal, as well as other sources of variability have led to obtaining hardly reliable and reproducible results.

Key words: standardization, immunohistochemistry (IHC), epidermal growth factor receptor (EGFR).

INTRODUCCIÓN

La inmunohistoquímica (IHQ) es un método de inmunolocalización que permite detectar una gran variedad de antígenos celulares y tisulares, basada en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a sus antígenos correspondientes.¹ Actualmente este método permite la identificación de numerosas moléculas que constituyen blancos terapéuticos en el tratamiento del cáncer y facilita el estudio de su localización histológica y su correlación con los parámetros morfológicos. Por estos motivos la IHQ ha permitido a los oncólogos el desarrollo de estrategias terapéuticas individuales, logrado respuestas clínicas significativas en pacientes portadores de una gran variedad de tumores malignos.²⁻⁴

Durante los últimos años otro miembro de la familia de receptores erbB, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (REGF), se convirtió en una de las moléculas más atractivas en el diseño de las nuevas terapias antitumorales.⁵⁻⁷ Con el advenimiento de estas terapias dirigidas contra el REGF, los ensayos clínicos han incrementado el empleo de la IHQ,⁸ con la finalidad de seleccionar a los pacientes que probablemente responderán a ellas. Sin embargo, la calidad de la determinación del REGF mediante técnicas de IHQ se encuentra limitada por varios factores técnicos, que establecen diferencias en los procedimientos empleados para este fin. Estos factores son responsables, en gran medida, de los altos niveles de variabilidad intra e inter-laboratorios reportados.

Uno de los primeros indicios de la falta de estandarización de los procedimientos empleados en la detección del REGF por IHQ lo constituyó las diferencias reportadas en los niveles de expresión del receptor de un estudio a otro (Ej. carcinomas de cabeza y cuello, pulmón y cáncer colorrectal).⁹⁻¹⁴

Desde que el EGFR pharmDxTM fue aprobado por la FDA como el kit diagnóstico para la detección de la expresión del REGF, con la finalidad de elegir a los pacientes con cáncer colorrectal a la terapia con el cetuximab, este método se convirtió rápidamente en el estándar internacional en el inmunodiagnóstico del receptor. Sin embargo, pacientes cuyos tumores resultaron negativos al REGF por IHQ lograron respuestas clínicas significativas a la terapia con el cetuximab y panitumumab, similares a aquellos cuyos tumores fueron clasificados como positivos.¹⁵⁻¹⁹ Interessantemente, se ha reportado que ante un caso REGF negativo o débilmente positivo es posible aumentar los niveles de expresión detectables por IHQ haciendo algunas modificaciones en el kit de referencia. Aumentar el tiempo de incubación con el anticuerpo primario y/o cambiar el método de reanimación antigénica empleado (digestión enzimática con proteinasa K por horno de microondas) logra revertir el resultado inicial, convirtiendo muestras de tumores REGF negativos en positivos.²⁰

Por estos motivos resulta imprescindible lograr un procedimiento óptimo de inmunotinción que permita una correcta la identificación y evaluación de esta molécula diana, ya que los resultados actuales están influyendo negativamente en la toma de decisiones terapéuticas. En este trabajo se muestra una revisión de varios de los aspectos técnicos que más influyen en la falta de reproducibilidad actual de la IHQ, así como algunas sugerencias para su estandarización.

EL REGF COMO BLANCO DE LAS TERAPIAS ANTITUMORALES

El receptor del factor de crecimiento epidérmico es una glicoproteína de membrana de 170 kDa que consiste en un dominio extracelular de unión a ligando, una región transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa.²¹ Los dos ligandos naturales más importantes del REGF son el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor transformante de crecimiento alfa (TGF-). Estos ligandos se unen al dominio extracelular del REGF causando la auto o transfosforilación del dominio intracitoplasmático adyacente, provocando además la activación de la actividad tirosina quinasa intracelular. La fosforilación inicia señales de transducción que regulan la división, la proliferación y la diferenciación celular.^{22,23}

El REGF se encuentra expresado en la membrana plasmática de las células epiteliales normales aproximadamente entre 20 000 y 200 000 moléculas por célula, llegando a alcanzar en muchos tumores malignos, 2 millones de moléculas de receptor por célula.²¹ Entre los tumores que sobreexpresan el REGF se incluyen el carcinoma de pulmón de células no pequeñas, los carcinomas de cabeza y cuello, tumores colorrectales, adenocarcinomas de la mama y gliomas, entre otros.^{13,24-27} La

sobreexpresión de REGF confiere ventajas de crecimiento y alto índice de metastización, baja sobrevida, pobre respuesta a la quimioterapia y a la hormonoterapia y el desarrollo de resistencia a agentes citotóxicos, lo que generalmente correlaciona con una rápida progresión de la enfermedad. Aunque la sobreexpresión del REGF como indicador de mal pronóstico aún es controversial.^{13,14,24,28,29}

En la actualidad se han abierto varias estrategias de inhibición de la cascada de señalización del REGF, basadas en el conocimiento de su papel y el de sus ligandos en el crecimiento y desarrollo de diferentes tipos de tumores epiteliales.⁶ Entre ellas se encuentran el empleo de moléculas inhibitoras de la actividad tirosina quinasa,⁵ las vacunas³⁰ y el bloqueo de la unión del ligando al receptor mediante el uso de anticuerpos monoclonales (AcMs).⁷ Dentro de este grupo las más experimentadas son el empleo de los inhibidores de la actividad tirosina quinasa y los AcMs, algunos de los cuales ya se encuentran registrados para el tratamiento de tumores humanos de origen epitelial con sobreexpresión del REGF.

LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN LA DETECCIÓN DEL REGF

En la actualidad se emplean un gran número de métodos para la detección y cuantificación de la expresión del REGF en tejidos humanos normales y tumorales.^{3,13,27,29,31} De ellos, la determinación de la expresión del REGF mediante IHQ constituye probablemente el método más apropiado para este fin, ya que permite la observación microscópica del tipo celular, niveles de expresión del receptor y su distribución. Sin embargo, su estandarización se ha encontrado tradicionalmente limitada, por la existencia de un gran número de parámetros o factores que comprenden tres grandes áreas o fuentes de variabilidad y que se pueden dividir en: (1) factores pre-analíticos (fijación y procesamiento tisular) que constituyen causas de heterogeneidad de las muestras, (2) factores analíticos (reanimación antigénica, anticuerpos anti-REGF, sistemas de detección) que aumentan o disminuyen la sensibilidad y especificidad del procedimiento técnico y (3) factores post-analíticos (interpretación y reporte de los resultados) los cuales dependen en gran medida del grado de experiencia del analista.³²⁻³⁴ La optimización y estandarización de la IHQ es posible siempre que se controlen estrictamente los parámetros anteriormente mencionados.

El empleo generalizado de la IHQ se debe fundamentalmente a: (1) la relativa simplicidad del método, (2) la rapidez con que se pueden obtener los resultados y (3) que el equipamiento necesario se encuentra, comúnmente, disponible en la mayoría de los laboratorios de histopatología. En muchos de estos laboratorios la expresión de esta molécula puede ser determinada en cortes de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, sin necesidad de recurrir al empleo de tejidos frescos, lo que facilita, además, la evaluación de muestras de tejidos archivadas. Otro de los factores que apoya el empleo de la IHQ en la detección del REGF es que, con excepción de los gliomas,^{27,35} la correspondencia entre la sobreexpresión del receptor y la amplificación génica aún genera controversias, debido a que posiblemente este no constituye el mecanismo principal de su sobreexpresión,^{26,36,37} por lo que generalmente no es necesario el empleo de métodos más engorrosos, como por ejemplo la hibridación *in situ* y la reacción de la polimerasa en cadena.

Los resultados obtenidos mediante técnicas de IHQ constituyen uno de los criterios determinantes para la selección de los pacientes a los tratamientos dirigidos contra el REGF, por lo que resulta imprescindible el control de algunos factores críticos ya mencionados, con el objetivo de asegurar la veracidad de los resultados obtenidos. Lo

cual permitiría una mejor evaluación de la relación del REGF con la sobrevida de los pacientes, así como de su potencial valor predictivo de respuesta al tratamiento.

FIJACIÓN

La fijación constituye un paso esencial en la evaluación morfológica de las muestras de tejidos. Este proceso es necesario para preservar adecuadamente los componentes de las células y los tejidos, para prevenir la autólisis y el desplazamiento de los constituyentes celulares, para proteger el material celular contra los efectos de los siguientes pasos del procesamiento y para facilitar las coloraciones convencionales y la IHQ.³⁸ Aún no existe un fijador para las técnicas de IHQ que resulte útil para todos los propósitos, pues cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas en dependencia, entre otros aspectos, de la naturaleza de la molécula a evaluar.

En la actualidad existen muy pocos artículos que estudien el efecto de diferentes fijadores en la preservación del REGF y su detección mediante técnicas de IHQ. Aunque la correlación de la expresión de esta molécula en muestras de tejido en fresco y fijadas en formol e incluidas en parafina ha sido previamente reportada.³⁹ En el año 2004 Atkins y otros evaluaron la influencia de diversos fijadores con respecto a la preservación de la morfología y a la calidad e intensidad de la expresión del REGF y su relación con el tiempo de almacenamiento de las láminas cortadas. En este estudio se emplearon una serie de fijadores simples y compuestos variando su concentración y tiempo de fijación. Los resultados fueron satisfactorios para varios fijadores entre los que se encuentran el formol al 4 % y al 10 % por 24 h, formol tamponado al 4 % por 24-48 h, AFA (ácido acético/formol/alcohol) y bouin por 24 h y el Pen-Fix (Richard Allen Scientific; Kalamazoo, MI) por 4 h; no se encontraron diferencias significativas en términos de inmunotinción en los tres primeros meses de realizada la técnica.³² En un estudio similar Penault-Llorca y otros, en el año 2006, tampoco encontraron diferencias en la inmunotinción del REGF empleando formol, AFA y bouin.³³ Estos resultados pueden constituir una de las causas por la que generalmente todos los procedimientos inmunohistoquímicos para la determinación de la expresión de REGF, se encuentran descritos para tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, aun cuando el resto de los fijadores estudiados, son empleados actualmente en los laboratorios de anatomía patológica y muestran una u otra ventaja para las técnicas de IHQ.

Es bien conocido que la interacción del formol con las proteínas tisulares modifica la estructura de la proteína de tal forma que su reacción con el anticuerpo es imposible o en el mejor de los casos difícil de realizarse.⁴⁰ Por estos motivos, en la fijación con formol se deben tener en cuenta diversos factores, tales como: la calidad y concentración del fijador, el pH, la temperatura, tamaño de la muestra de tejido, relación muestra/fijador y el tiempo de fijación. Sin embargo, a nuestro parecer durante mucho tiempo se ha subestimado el impacto de la fijación en la preservación del REGF. Una prueba de ello es que numerosos artículos no reportan las condiciones de fijación empleadas,^{13,24-27} lo que pudiera enmascarar, en parte, la ausencia de procedimientos estándares de fijación tisular para la evaluación de la expresión del REGF. Sin embargo, es bien conocido que sin el estricto control de todos los factores anteriormente mencionados, los antígenos de origen proteico, como el REGF, pueden quedar alterados de forma irreversible, lo que conduciría a resultados poco confiables.

REANIMACIÓN ANTIGÉNICA

La detección del REGF por IHQ, después de la fijación con formol, depende fundamentalmente del restablecimiento de la estructura tridimensional de la proteína

a su estado nativo o a un estado muy cercano al mismo.^{41,42} Los anticuerpos anti-REGF reconocen epítopes específicos localizados en una configuración espacial particular dentro de la molécula proteica. Es importante señalar que el reconocimiento del antígeno, por el anticuerpo, depende de la estructura del mismo.⁴³

El pre-tratamiento de las muestras con enzimas proteolíticas (reanimación antigénica enzimática) en la determinación de la expresión del REGF constituye en la actualidad el método más empleado para este fin, aunque presenta varias limitaciones como: (1) la sobredigestión de los tejidos produce alteraciones morfológicas y pérdida de la expresión del receptor, debido a la susceptibilidad de dicho antígeno a la digestión enzimática, (2) una digestión insuficiente resulta en un falso negativo y (3) la selección de una enzima u otra puede variar dramáticamente los niveles de expresión del REGF, contribuyendo grandemente a la variabilidad inter-ensayos e inter-laboratorios.

Entre las enzimas que con mayor frecuencia se emplean se encuentran la pepsina,²⁹ pronasa² y la proteinasa K³⁷ y diferentes protocolos en los cuales se han variado la concentración de la enzima, el tiempo de digestión y la temperatura de incubación. Estas enzimas restauran la inmunorreactividad del receptor, pero con el inconveniente de que cada una presenta diferentes niveles de recuperación antigénica y diferentes tiempos de digestión.⁴⁴ En la actualidad, las enzimas proteolíticas han jugado un papel menos importante en las técnicas inmunohistoquímicas, aunque para el caso del REGF continúan siendo el método de elección, fundamentalmente la proteinasa K, la cual forma parte de juego de reactivos más empleado para la evaluación de la expresión del REGF por IHQ.⁴⁵

Sin embargo, con el advenimiento de la reanimación antigénica inducida por calor, muchos autores la han introducido en la determinación del REGF. A este procedimiento tradicionalmente se le han adjudicado numerosas ventajas sobre la reanimación antigénica enzimática, entre las que se encuentran: (1) mayor preservación de la morfología del tejido, (2) se pueden emplear menores concentraciones del anticuerpo anti-REGF y (3) en algunos casos se pueden obtener una mayor reproducibilidad. Entre las desventajas fundamentales están: (1) si las láminas portaobjetos no presentan un recubrimiento adecuado y/o los cortes no son lo suficientemente finos, estos se desprenden por acción del calor, (2) un sobrecalentamiento de las preparaciones produce una pérdida irreversible de la inmunorreactividad del receptor y (3) el empleo de soluciones y procedimientos de reanimación antigénica inadecuadas resulta en una disminución y/o en cambios en los patrones de expresión del REGF (Ej. inmunotinción citoplasmática y nuclear). A pesar de estas desventajas muchos laboratorios emplean la reanimación antigénica inducida por calor para la detección del REGF,^{14,24,27} a lo que se suma el empleo de un amplio rango de procedimientos para este fin entre los que se pueden mencionar: diferentes equipos para la inducción de altas temperaturas (Ej. horno de microondas, olla de presión, baño histológico), diferentes tiempos en los ciclos de calentamiento-enfriamiento y el empleo de diferentes tampones de reanimación (Ej. composición química, molaridad, pH).

Todas estas diferencias en los métodos de reanimación antigénica, ya sean enzimáticos o inducidos por calor, limitan severamente la veracidad y reproducibilidad inter-laboratorios de los resultados inmunohistoquímicos.

ANTICUERPOS ANTI-REGF Y SISTEMAS DE DETECCIÓN

Actualmente existen numerosos anticuerpos y juegos de reactivos comerciales para la determinación de la expresión del REGF tanto en tejidos frescos como en tejidos

fijados en formol e incluidos en parafina (Ej. Clon H11 y EGFR pharmDx kit, Dako; clon 31G7, Zymed; clon 3C6, Ventana; AcM ior egf/r3; Centro de inmunología Molecular, Cuba). Muchos de estos AcMs se emplean en la evaluación de la expresión del receptor como criterio de inclusión en ensayos clínicos o para el tratamientos con algunos de los productos biotecnológicos disponibles contra el sistema EGF/REGF. Sin embargo, el uso indistintamente de anticuerpos anti-REGF requiere de un estudio para determinar la especificidad de cada uno, su nivel de sensibilidad y su patrón de reconocimiento. Es importante mencionar que en el año 2005 el panel canadiense de consenso sobre la determinación del REGF en el cáncer colorrectal recomendaron el empleo indistintamente de la mayoría de los anticuerpos mencionados anteriormente, siguiendo un mismo protocolo en todos los laboratorios y especificando en el reporte anatomo-patológico el anticuerpo anti-REGF empleado.⁴⁶ Sin embargo, solo un año después otros investigadores demostraron algunas desventajas de la IHQ en la evaluación de la expresión del REGF empleando los mismos anticuerpos recomendados.⁴⁷ Entre estos anticuerpos existen diferencias que radican fundamentalmente en el nivel de afinidad, especificidad, capacidad de reconocimiento y patrón de inmunomarcaje. Aunque han sido reportados resultados comparables al emplear el sistema EGFR PharmaDx kit y el clon 31G7,⁴⁸ otros autores han encontrado resultados diferentes.⁴⁹

Por otra parte, uno de los objetivos más perseguidos en las técnicas de IHQ es el empleo de sistemas de detección más sensibles y que resulten en menores tiempos de incubación, reduciendo además los costos por análisis.^{1,50} Sin embargo, la gran variedad de sistemas de detección disponibles actualmente y que se emplean en la determinación de la expresión del REGF presentan diferencias en cuanto a especificidad y a la sensibilidad de la reacción. Los sistemas de detección de varios pasos, empleados tradicionalmente, presentan varias desventajas, como por ejemplo: (1) los protocolos consumen mayor cantidad de tiempo, (2) usualmente tienen menor poder de amplificación y (3) mayores dificultades en la estandarización. Por el contrario los sistemas de detección introducidos en los últimos años, usando polímeros sintéticos, permiten realizar procedimientos inmunohistoquímicos en solo dos pasos, con números mayores de moléculas de enzima, lo que constituye un incremento en la intensidad de la señal, con un mayor poder de penetración en los tejidos debido a su menor tamaño. Sin embargo, estos sistemas son mucho más costosos, en general son menos estables, quizás debido a su presentación comercial, y no se encuentran disponibles en la mayoría de los laboratorios de anatomía patológica.

Estos factores son responsables, en parte, de la gran variedad de procedimientos directos e indirectos y de los numerosos sistemas de detección que se emplean actualmente para la evaluación del REGF.^{13,14,27,35-39} Adicionalmente, se conoce que cuando los niveles de expresión del REGF son bajos, como resultado del empleo de procedimientos de fijación y/o de reanimación antigénica inadecuados, la tendencia de los laboratorios es a usar mayores concentraciones del anticuerpo primario, a aumentar los tiempos de incubación e incluso a cambiar el sistema de detección, decisiones que indudablemente incrementan la falta de reproducibilidad de la determinación.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La evolución del diagnóstico inmunohistoquímico desde el simple conteo de las células positivas y negativas hasta la gradación de la intensidad de la inmunotinción, acorde con escalas arbitrarias, ha permitido una mejor estratificación así como una mejor selección de los pacientes candidatos a recibir tratamientos dirigidos contra el REGF. Sin embargo, esta decisión se encuentra limitada vez por los niveles de expresión del

REGF logrado tras el procedimiento inmunohistoquímico así como por el carácter subjetivo del análisis de los resultados, debido entre otros aspectos a la naturaleza semicuantitativa de la técnica.

Una de las causas principales de la heterogeneidad y de la falta de reproducibilidad en la evaluación del REGF lo constituye, entre otros factores, la ausencia de estándares internacionales bien definidos donde se combinen la intensidad de la reacción, con el patrón de inmunotinción y el porcentaje de las células tumorales marcadas, así como la ausencia de una línea de corte precisa entre la expresión normal del REGF y su sobreexpresión.³⁴ A pesar del paso de avance que constituyó el sistema de evaluación de los resultados desarrollado por Dako (EGFR pharmDx kit) para determinar la inclusión de pacientes al tratamiento con el AcM cetuximab,⁴⁵ actualmente co-existen una gran variedad de sistemas para la evaluación y gradación de la sobreexpresión del REGF, en las cuales se varía fundamentalmente el porcentaje de células positivas.^{13,14,24,35,39} Adicionalmente, aun existen diferencias en cuanto a la evaluación del patrón y de la localización del REGF. Mientras en algunos estudios se reporta solamente la inmunorreactividad localizada en la membrana plasmática de las células tumorales,^{13,26} en otros se tienen en cuenta ambos, el marcaje de membrana y el citoplasmático.^{24,35} Es de destacar, que según nuestra experiencia la localización citoplasmática del REGF en ocasiones está estrechamente relacionada con la difusión del receptor producto de procedimientos inadecuados de fijación tisular y/o de reanimación antigénica. Estas diferencias responden fundamentalmente a la falta de un estándar internacional para la evaluación de la expresión de REGF por IHQ ya que la variabilidad entre observadores, empleando el sistema de gradación desarrollado por Dako, ha sido considerada no significativa por algunos autores.^{19,48}

Actualmente, se realizan numerosos esfuerzos para reducir de alguna manera la subjetividad del análisis de los resultados de la IHQ, logrando una mayor correspondencia entre los niveles de expresión del receptor y el reporte final. Entre estas alternativas se encuentra el desarrollo de sistemas automatizados de medición y análisis de la expresión del REGF a través de imágenes microscópicas. Alentadores resultados han sido reportados empleando esta tecnología. Se han logrado resultados similares al comparar el sistema de gradación semicuantitativo de Dako (EGFR pharmDx kit) con el sistema de análisis automatizado de imágenes ACIS II (ChromaVision Medical Systems, Inc., San Juan Capistrano, CA), usando dos anticuerpos monoclonales anti-REGF diferentes.⁴⁸ Además se ha reportado un incremento en la especificidad, exactitud y precisión de la técnica inmunohistoquímica al emplear la tecnología de análisis cuantitativo computarizado (AQUA, del inglés Automated Quantitative Analysis technology).⁴ A pesar de que estos sistemas no son capaces de distinguir el tejido normal del tumoral, estos aumentan la reproducibilidad de los resultados de la IHQ ya que se elimina la variabilidad entre observadores y la incapacidad de estos de determinar pequeñas variaciones en la intensidad de la reacción. Estos factores dependen entre otras cosas de la experiencia de los analistas, de la calidad de la preparación histológica y del número de láminas a ser evaluadas.

La determinación de la sobreexpresión del REGF por IHQ continúa siendo el método más empleado actualmente como predictor de la respuesta a la terapia contra el receptor. La heterogeneidad de las muestras, la falta de estandarización de los procedimientos inmunohistoquímicos empleados, la existencia de numerosos protocolos con un mismo fin, así como otras fuentes de variabilidad, han conducido a la obtención de resultados poco confiables y reproducibles. Estas diferencias en los resultados inmunohistoquímicos constituye una de las causas fundamentales que ha apoyado el criterio de emplear métodos más costosos, laboriosos y menos accesibles como alternativas para la evaluación de la expresión del REGF. Sin embargo, el estricto control de los factores técnicos abordados en este trabajo contribuye al empleo de procedimientos debidamente estandarizados, elevando de esta forma, el valor pronóstico y predictivo de la determinación de la expresión del REGF por IHQ.

RECOMENDACIONES

(1) Elevar la calificación de los analistas, ya que los mismos deben poseer conocimientos sobre la manipulación, fijación, procesamiento e inclusión de las muestras de tejido, sobre los métodos de reanimación antigénica, sobre la sensibilidad y especificidad de los distintos anticuerpos y sistemas de detección con que disponen, así como de su impacto en la evaluación de resultados y en la terapéutica del paciente. (2) El control de aspectos técnicos durante la manipulación de las muestras antes de la fijación (Ej. el tiempo que realmente transcurre antes de la fijación química, condiciones y temperatura de transportación), durante la fijación (tiempo y temperatura de fijación, concentración y pH del fijador) y durante el procesamiento automático del tejido y su inclusión en parafina (Ej. calidad de los reactivos empleados, tiempo de procesamiento, temperatura de la parafina de infiltración y de inclusión), evitando de esta forma la heterogeneidad de las muestras. (3) El empleo de un único método de reanimación antigénica que constituya un patrón de referencia internacional y que resulte adecuado y válido para la determinación de dicho receptor, eliminando el empleo de una batería de procedimientos de reanimación antigénica, que tiene como objetivo igualar la intensidad de la inmunotinción bajo condiciones variables de fijación y procesamiento tisular. (4) La simplificación y la correcta selección de los anticuerpos y reactivos en general involucrados en el procedimiento de inmunotinción, empleando fundamentalmente los clones de anticuerpos anti-REGF mejor caracterizados y disponibles por diversas casas comerciales, así como sistemas de detección con niveles de sensibilidad y amplificación comparables. (5) El desarrollo y comercialización de materiales y métodos de referencia por los productores de los reactivos para IHQ, así como la adopción de estándares internacionales de interpretación de los resultados, donde se combinen la intensidad de la reacción, con el patrón de inmunotinción y el porcentaje de las células tumorales marcadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2011;691:83-96.
2. Kollmannsberger C, Schittenhelm M, Honecker F, Tillner J, Weber D, Oechsle K, et al. A phase I study of the humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody EMD 72000 (matuzumab) in combination with paclitaxel in patients with EGFR-positive advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Annals of Oncology.* 2006;17(6):1007-13.
3. Rojo F, Gracias E, Villena N, Cruz T, Corominas JM, Corradino I, et al. Pharmacodynamic Trial of Nimotuzumab in Unresectable Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A SENDO Foundation Study. *Clin Cancer Res.* 2010;16(8):2474-82.
4. Mascaux C, Wynes MW, Kato Y, Tran C, Reyna Asuncion B, Zhao JM, et al. EGFR Protein Expression in NonSmall Cell Lung Cancer Predicts Response to an EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor- A Novel Antibody for Immunohistochemistry or AQUA Technology. *Clin Cancer Res.* 2011;17(24):7796-807.
5. Uramoto H, Mitsudomi T. Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatment for patients with lung cancer. *Br J Cancer.* 2007;96(6):857-63.

6. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med.* 2008; 358(11):1160-74.
7. Ramakrishnan MS, Eswaraiyah A, Crombet T, Piedra P, Saurez G, Iyer H, et al. Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal for treatment of tumors of epithelial origin. *mAbs.* 2009; 1(1):41-8.
8. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 2001; 37(Suppl 4):S9-15.
9. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2001; 23(2):147-59.
10. Meert AP, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Lafitte JJ, Mascaux C, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir. J* 2002; 20(4):975-81.
11. Lee HJX. The potential predictive value of cyclooxygenase-2 expression and increased risk of gastrointestinal hemorrhage in advanced non-small cell lung cancer patients treated with erlotinib and celecoxib. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(7):2088-94.
12. Mariezkurrena XA, Guimerá JA, Rodríguez JW, Weisman R, Ongkeko W. Immunohistochemistry study of EGFR expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2005; 56(4):143-6.
13. Yarom N, Marginean C, Moyana T, Gorn-Hondermann I, Birnboim HC, Marginean H, et al. EGFR expression variance in paired colorectal cancer primary and metastatic tumors. *Cancer Biol Ther.* 2010; 10(5):416-21.
14. Mohammadi G, Jamialahmasi K, Lary S, Chaffarzadegan K. Expression of membranous epidermal growth factor receptor in colorectal adenocarcinoma and it's correlation with clinicopathological features. *Pak J Biol Sci.* 2011; 14(5):357-62.
15. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351(4):337-45.
16. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol.* 2004; 22(7):1201-8.
17. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 2005; 23(9):1803-10.
18. Huertas Fernández MJ, Rodríguez Mateos ME, Gómez Reina MJ, Martínez Bautista MJ, Sánchez Martínez I. Treatment with cetuximab in metastatic colorectal cancer patients who do not express the epidermal growth factor receptor. *Farm Hosp.* 2007; 31(5):264-9.
19. Saltz LB. Biomarkers in colorectal cancer: added value or just added expense. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008; 8(3):231-3.

20. Derecskei K, Moldvay J, Bogos K, Timar J. Protocol Modifications Influence the Result of EGF Receptor Immunodetection by EGFR pharmDx™ in Paraffin-Embedded Cancer Tissues. *Pathology Oncology Research*. 2006;12(4):243-6.
21. Díaz A, Lage A. Terapias con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico: acercando el futuro. *Biotecnología Aplicada*. 2007;24:1-9.
22. Pal SK, Pegram M. Epidermal growth factor receptor and signal transduction: potential targets for anti-cancer therapy. *Anticancer Drugs*. 2005;16(5):483-94.
23. Ferguson KM. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys*. 2008;37:353-73.
24. Li F, Liu Y, Chen H, Liao D, Shen Y, Xu F, et al. EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features» *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:27.
25. Sarkis SA, Abdullah BH, Abdul Majeed BA, Talabani NG. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis. *Head Neck Oncol*. 2010;2:13.
26. Shawarby MA, Al-Tamimi DM, Ahmed A. Very low prevalence of epidermal growth factor receptor (EGFR) protein expression and gene amplification in Saudi breast cancer patients. *Diagn Pathol*. 2011;6:57.
27. Rong Y, Belozerov VE, Tucker-Burden C, Chen G, Durden DL, Olson JJ, et al. Epidermal Growth Factor Receptor and PTEN Modulate Tissue Factor Expression in Glioblastoma through JunD/Activator. *Cancer Res*. 2009;69(6):2540-9.
28. Laimer K, Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Brunhuber T, Fong D, et al. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Oral Oncol*. 2007;43(2):193-8.
29. Vilorio-Petit A, Rengifo-Calzado E. Antiepidermal growth factor receptor antibody: immunohistochemistry. En: MA Hayat, ed. *Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization on human carcinomas*. Elsevier Academic Press. 2005;8:79-101.
30. García B, Neningen E, de la Torre A, Leonard I, Martínez R, Viada C, et al. Effective inhibition of the epidermal growth factor/epidermal growth factor receptor binding by anti-epidermal growth factor antibodies is related to better survival in advanced non small-cell lung cancer patients treated with the epidermal growth factor cancer vaccine. *Clin Cancer Res*. 2008;14(3):840-6.
31. Spaulding DC, Spaulding BO. Epidermal growth factor receptor expression and measurement in solid tumors. *Semin Oncol*. 2002;29(14):45-54.
32. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Storkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(7):893-901.
33. Penault-Llorca F, Cayre A, Arnould L, Bibeau F, Bralet MP, Rochaix P, et al. Is there an immunohistochemical technique definitively valid in epidermal growth factor receptor assessment? *Oncol Rep*. 2006;16(6):1173-9.

34. Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR. The Biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(12 Pt 2):4227-32.
35. Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, Eberhard DA, Jelluma N, Arvold ND, et al. Epidermal Growth Factor Receptor, Protein Kinase B/Akt, and Glioma Response to Erlotinib. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(12):880-7.
36. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(3):262-71.
37. Liang Z, Zhang J, Zeng X, Gao J, Wu S, Liu T. Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2010;10:376.
38. Miller RT, Swanson PE, Wick MR. Fixation and Epitope Retrieval in Diagnostic Immunohistochemistry: A Concise Review with Practical Considerations. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000;8(3):228-35.
39. Torp SH, Bringedal K, Dalen A. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptor in human high-grade astrocytomas a comparison between frozen and paraffin sections. *J Exp Clin Cancer Res.* 2005;24(1):89-92.
40. Montero C. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 2003;51(1):1-4.
41. Sompuram SR, Vani K, Hafer LJ, Bogen SA. Antibodies immunoreactive with formalin-fixed tissue antigens recognize linear protein epitopes. *Am J Clin Pathol.* 2006;125(1):82-90.
42. Sompuram SR, Vani K, Messana E, Bogen SA. A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. *Am J Clin Pathol.* 2004;121(2):190-9.
43. Shi SR, Cote RJ, Taylor C. Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives. *J Histochem Cytochem.* 2001;49(8):931-7.
44. Taylor CR, Shi SR, Cote RJ. Antigen retrieval for immunohistochemistry. Status and need for greater standardization. *Appl Immunohistochem.* 1996;4:144-66.
45. Dako Cytomation. EGFR pharmDx™ Package Insert Carpinteria, CA. Dako; 2004.
46. Banerjee D, Guha AK, Guindi MM, Haliotis T, Hanna W, Jass JR, et al. Best Practice Standards for EGFR Testing in Colorectal Cancer in Canada. Canadian Consensus Panel on EGFR Testing in Colorectal Cancer. 2005.
47. Kersting C, Packeisen J, Leidinger B, Brandt B, Von Wasielewski R, Winkelmann W, et al. Pitfalls in immunohistochemical assessment of EGFR expression in soft tissue sarcomas. *J Clin Pathol.* 2006;59(6):585-90.
48. Bhargava R, Chen B, Klimstra DS, Saltz LB, Hedvat C, Tang LH, et al. Comparison of two antibodies for immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor expression in colorectal carcinomas, adenomas, and normal mucosa. *Cancer.* 2006;106(8):1857-62.

49. Tse C, Treaba DO, Goldstein LC, Kandalft PL, Barry TS, Gown AM. Sensitivity of immunohistochemical detection of EGFR could impact patient eligibility for anti-EGFR therapy. *Journal of Clinical Oncology. ASCO Annual Meeting Proceedings* 2005;23(16S):3607.

50. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, et al. The EnVisionTM+ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMateTM, CSA, LABC, and SABC Techniques. *J Clin Pathol.* 1998;51(7):506-11.

Recibido: 14 de agosto de 2012.

Aprobado: 22 de diciembre de 2012.

Rancés Blanco Santana. Laboratorio de Ensayos de Reconocimiento y Actividad Biológica, Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba. Correo electrónico: rances@cim.sld.cu