

# Estudio del estatus genético y la expresión proteica de HER 1, HER 2 y ciclina D1 en 33 casos de carcinoma de células de Merkel mediante FISH e inmunohistoquímica en arrays tisulares

M Gilaberte<sup>1</sup>, R Salgado<sup>2</sup>, B Espinet<sup>2</sup>, F Alameda<sup>2</sup>, T Baró<sup>2</sup>, F Solé<sup>2</sup>, MT Fernández-Figueras<sup>3</sup>, P Huguet<sup>4</sup>, R Bartralot<sup>5</sup>, M Arumí<sup>6</sup>, A Ravella<sup>7</sup>, A Alomar<sup>8</sup>, C Ferrández<sup>9</sup>, S Serrano<sup>2</sup>, RM Pujol<sup>1</sup>.

Servicios de Dermatología: Hospital del Mar<sup>1</sup>, Hospital Germans Trias i Pujol<sup>9</sup>, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau<sup>8</sup>, Hospital Vall d'Hebron<sup>5</sup>, Hospital Creu Roja<sup>7</sup>. Servicios de Anatomía Patológica: Hospital del Mar<sup>2</sup>, Hospital Germans Trias i Pujol<sup>3</sup>, Hospital Vall d'Hebron<sup>4</sup>, Hospital Creu Roja<sup>6</sup>. Barcelona.

## Introducción

El carcinoma de células de Merkel (CCM) es una neoplasia cutánea primaria caracterizada por su alto grado de malignidad y una elevada tasa de recidivas locales y a distancia. Se conoce poco acerca de las posibles alteraciones genéticas y su posible implicación etiopatogénica. Presentamos los resultados del estudio del estatus genético y la expresión proteica de Her 1, Her 2 y ciclina D1 de una serie de 33 pacientes de carcinoma de células de Merkel.

## Material y métodos

Se estudiaron 36 biopsias parafinadas (33 tumores primarios y 3 metástasis) de 33 pacientes diagnosticados de tumor de Merkel entre 1983 y 2004, de 5 hospitales de Barcelona. De cada biopsia se extrajo una muestra (cilindro) de 1 mm de diámetro y se incluyeron en un array tisular. Sobre este array tisular se estudió la existencia de alteraciones citogenéticas mediante FISH (hibridación in situ con fluorescencia) de los oncogenes EGFR (Her 1), Her 2 y ciclina D1 y la expresión de EGFR (Her 1), c-ERB2 (Her 2) y ciclina D1 mediante inmunohistoquímica.

Para el estudio inmunohistoquímico se utilizaron los siguientes anticuerpos: para EGFR (EGFR pharmDx™ Kit for the Dako Autostainer, DAKO), para c-ERB2 (Human anti-rabbit c-erbB-2 DAKO Cytomation) y para ciclina D1 (Mouse Anti-Human Clone: DCS-6 DAKO Cytomation). La lectura fue realizada por un observador y se valoraron dos parámetros (en el núcleo y el citoplasma): el porcentaje (PP%) y la intensidad (I)

las células tumorales marcadas. Para valorar la intensidad se realizó una valoración semicuantitativa (0: ausencia de expresión, +: expresión leve, ++: expresión moderada, +++: expresión intensa). El PP% se puntuó como: 0 (<5%), 1 (5-25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%), 4 (>75%). Se asignó un valor multiplicativo a la intensidad (I) de 0,1, 2 y 3 para la expresión ausente, leve, moderada e intensa respectivamente. La valoración final se obtuvo multiplicando el porcentaje de células positivas (PP%) por la intensidad de la tinción (PP% x I).

Para el estudio citogenético se utilizaron las sondas: para Her 1 EGFR/CEN7, para Her 2/CEN17 y para Ciclina D1/IgH (Vysis, Downers Grove, IL). La valoración de las alteraciones citogenéticas, se realizó por un observador utilizando como controles muestras de tejido sano.

## Resultados

El estudio de las alteraciones citogenéticas (FISH) detectó (tabla 1): monosomía de Her 1 (fig.1) en el 100% de los 18 casos (biopsias) en los que se obtuvo hibridación. Respecto a Her 2, hibridaron 29/36 casos y se observó monosomía de Her2 en el 31% de los casos hibridados (9/29), ganancias en el 10.3% (3/29), polisomía en el 6.9% (2/29) y el 3.4% (1/29) mostró dos copias de HER2 y un sólo centrómero del cromosoma 17. Con Ciclina D1 hibridaron 24/36 casos y se detectaron ganancias (fig.2) en el 12.5% de los casos (3/24).

En el estudio inmunohistoquímico (tabla 2), la expresión de EGFR (Her 1) de 33/36 casos, fue negativa en el 100% en el núcleo y en el 97% en el citoplasma. La expresión de C-ERB2 (Her2) (fig.3) fue negativa en el 100% de los casos valorados (34/36) tanto en el núcleo como en el citoplasma. Se observó expresión citoplasmática de ciclina D1 (fig.4) en el 96.7% de los casos valorados (32/34). La expresión de ciclina D1 en el núcleo fue negativa en el 93% de los casos valorados.

Tabla 1. FISH. Alteraciones citogenéticas

	EGFR (HER 1)	HER 2	CICLINA D1
MONOSOMIA	100%	31%	0%
POLISOMIA	0%	6,9%	0%
GANANCIAS	0%	10,3%	12,50%

Tabla 2. Inmunohistoquímica.

	Núcleo		Citoplasma	
	+	-	+	-
EGFR (HER 1)	0%	100%	2,7%	97%
HER 2	0%	100%	0%	100%
CICLINA D1	7%	93%	96,70%	3,3%

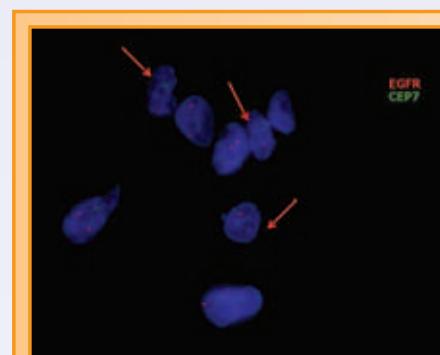


Fig.1. Monosomía de EGFR(Her 1) (FISH).



Fig.2. Ganancias de ciclina D1 (FISH).

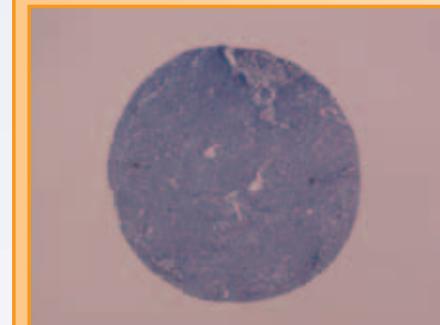


Fig.3. C-ERB2 (Her2). Expresión inmunohistoquímica negativa.



Fig.4. Ciclina D1. Expresión inmunohistoquímica positiva.

## Discusión

El carcinoma de células de Merkel o carcinoma neuroendocrino cutáneo, es un tumor maligno muy poco frecuente con un alto grado de agresividad. Se desconocen los mecanismos patogénicos y las alteraciones genéticas presentes en dicho tumor.

Dentro de la familia de los receptores de la tirosinquinasa o familia Erb B se incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, Her 1), Her 2, Her 3 y Her 4, (también llamados ErbB1, ErbB2, ErbB3 y ErbB4). Dichos receptores se han implicado en el desarrollo de varios tumores en el hombre en los que presentan una sobreexpresión debida a una amplificación génica o a un aumento de la transcripción. En humanos, se ha detectado una amplificación y/o aumento de la transcripción de EGFR (Her 1) en el glioblastoma, cáncer de mama, gastrointestinal, de vías urinarias, del aparato reproductor, carcinoma epidermoide y melanoma. Her 2 está sobreexpresado en el cáncer de mama, ovario, endometrio y el de pulmón no célula pequeña. Se conoce poco acerca de la expresión de dichos genes en el cáncer cutáneo no melanoma.

En el carcinoma de células de Merkel, existen pocos estudios de marcadores de proliferación y oncogenes. Recientemente se ha publicado un estudio en el que se valoró la expresión de EGFR y Her 2 mediante inmunohistoquímica en metástasis de melanoma, carcinoma escamoso cutáneo y carcinoma de Merkel, sin encontrarse sobreexpresión de los mismos ni en el melanoma ni en el tumor de Merkel y sí en el carcinoma escamoso cutáneo.

Hasta el momento no existen datos en la literatura de series de carcinoma de células de Merkel en los que se hayan estudiado alteraciones citogenéticas de oncogenes mediante FISH.

En nuestro estudio observamos la existencia de diferentes alteraciones citogenéticas en Her1 y Her2, sin existir correlación con la expresión proteica.

La ciclina D1 (CCND1, PRAD1, bcl-1), junto con la ciclina D2 y la ciclina D3, pertenecen a la familia de las ciclinas tipo D, las cuales se expresan en las células en fase de proliferación y son las primeras ciclinas que se expresan en la fase G1 del ciclo celular. Asimismo, participan en la inactivación de la proteína del retinoblastoma. Una alteración de la expresión de la ciclina en G1, podría causar una alteración en el control del ciclo celular y favorecer la oncogénesis.

En nuestro estudio, sólo en casos aislados, detectamos una coincidencia entre las alteraciones citogenéticas y la expresión de ciclina D1.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la existencia de alteraciones citogenéticas en EGFR (Her 1), Her 2 y ciclina D1, en el carcinoma de células de Merkel, las cuales no pudieron ser detectadas mediante inmunohistoquímica, pero sí mediante FISH. Consideramos que el estudio de EGFR (Her 1), Her 2 y ciclina D1 debería realizarse mediante FISH, ya que las alteraciones citogenéticas pasarían desapercibidas utilizando solamente métodos de inmunohistoquímica.

## Bibliografía

1. Maubec E, Duvillard P, Velasco V, Crickx B, Avril M-F. Étude immuno-histochimique de l'expression de EGFR et HER-2 dans les mélanomes, les carcinomes de Merkel et les carcinomes épidermoïdes cutanés métastatiques. Ann Dermatol Venereol 2006;133:272-8.  
2. Utikal J, Udart M, Leiter U, Kassel P, Peter RU, Krahn G. Numerical abnormalities of Cyclin D1 gene locus on chromosome 11q13 in non-melanoma skin cancer. Cancer Lett 2005;219:197-204.  
3. Krähn G, Leiter U, Kasbel P, Udart M, Utikal J, Bezold G, Peter RU. Coexpression patterns of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in non-melanoma skin cancer. Eur J Cancer 2001;37:251-259.  
4. Hussein MR, Al-Badaiwy AH, Guirgis MN. Analysis of p53 and bcl-2 protein expression in the non-tumorigenic, premalignant, and tumorigenic keratinocytic hyperproliferative lesions. J Cutan Pathol 2004; 31(10):643-51.