

Evaluación inmunohistoquímica del receptor del factor de crecimiento epidérmico en la enfermedad renal poliquística autosómica dominante: Estudio de dos casos.

Immunohistochemical assessment of epidermal growth factor receptor in autosomal dominant polycystic kidney disease: Study of two cases.

Niurys de-Castro-Suárez*, Rancés Blanco-Santana**, Mercedes Cedeño-Arias**, José M. Dávalos-Iglesias***, Raymed Bacallao-Méndez***, Leyanis Rodríguez-Vera*, Mayra Ramos-Suzarte**

RESUMEN

Introducción: La ausencia de tratamientos eficaces para la enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ERPAD) conduce a los investigadores a la búsqueda de otras alternativas. La evidencia de varios estudios en modelos murinos y humanos de la ERPAD, ha demostrado el importante papel del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR: siglas en inglés) y de la actividad incrementada de la tirosina quinasa del receptor en el desarrollo de la hiperplasia en el epitelio quístico, con la formación y crecimiento de quistes renales resultantes. El objetivo de este estudio fue evaluar la distribución tisular del EGFR en la ERPAD.

Material y métodos: Se estudiaron biopsias renales de cuatro pacientes con diagnóstico de ERPAD y dos de riñón normal, fijadas en formol e incluidas en parafina. El EGFR se detectó por inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo monoclonal (AcM) ior egf/r3 murino.

Resultados: No se observó reactividad con este AcM en las muestras de tejido normal; sin embargo, en las muestras de ERPAD, el EGFR estaba incrementado y localizado en la superficie apical de las células quísticas.

Conclusiones: Estos resultados ratifican el papel significativo del EGFR en el desarrollo de la ERPAD. Además, posibilitaron el diseño de un ensayo clínico fase I con el AcM nimotuzumab (versión humanizada del ior egf/r3) en pacientes con esta patología.

Palabras clave: receptor del factor de crecimiento epidérmico; anticuerpo monoclonal; enfermedades renales quísticas; inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Introduction: The lack of effective treatment to autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) has led researchers to search others alternatives. The evidence from several studies on murine and human models of ADPKD, has demonstrated the significant roll of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the increased receptor tyrosine kinase activity in promoting hyperplasia in cystic epithelia, with formation and growth of resultant renal cysts. The aim of this study was to evaluate the tissue distribution of the EGFR in ADPKD.

Material and methods: Renal biopsies of four patients with ADPKD and two of normal kidney in formalin-fixed, paraffin embedded samples were studied by immunohistochemistry using murine monoclonal antibody (mAb) ior egf/r3 to detect the EGFR. In normal kidney no reactivity of this mAb was observed. In contrast, in specimens of ADPKD, the EGFR was increased and located on apical cystic cells surface.

Results: No reactivity was observed with this mAb in the samples of normal tissue; however, in the samples of ADPKD, EGFR was increased and localized in the apical surface of the cystic cells.

Conclusions: These results support a meaningful role for the EGFR in the development of ADPKD. Furthermore, they made it possible to design a phase I clinical trial with mAb nimotuzumab (humanized version of ior egf/r3) in patients with this pathology.

Key words: receptor, epidermal growth factor; monoclonal antibody; kidney diseases, cystic; immunohistochemistry.

* Laboratorio de Biofarmacia, Departamento de Farmacología y Farmacia Clínica. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. República de Cuba.

** Centro de Inmunología Molecular. República de Cuba.

*** Instituto Nacional de Nefrología. República de Cuba.

Correspondencia: Niurys de-Castro-Suárez. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Avenida 23 No. 21425 e/214 y 222. La Coronela, Isla, ciudad de la Habana. República de Cuba. C.P. 13600.

Correo electrónico: niurys@ifal.uh.cu amaranthfan@gmail.com

RECIBIDO: 20 de mayo de 2015

ACEPTADO: 01 de septiembre de 2015

INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ERPAD) constituye la más frecuente de las enfermedades renales hereditarias, con una incidencia de 1/500 a 1/1000 por cada nacido vivo, afectando de 4 a 6 millones de personas en todo el mundo.^(1,2) Se ha encontrado en todos los continentes y en todos los grupos raciales y étnicos. Está definida como una enfermedad incurable, que evoluciona lenta y progresivamente, con aumento del tamaño y número de los quistes renales, que destruyen el parénquima renal hasta alcanzar la insuficiencia renal avanzada entre los 30 y 50 años de edad. Este deterioro funcional puede ser favorecido por complicaciones frecuentes de la enfermedad, como son, hipertensión arterial, infecciones urinarias y litiasis renal.⁽³⁾

La evidencia de varios estudios realizados en modelos murinos y humanos de la ERPAD confiere un papel significativo al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR: siglas en inglés) y a la actividad aumentada de la tirosina quinasa del receptor en la promoción de la hiperplasia en los epitelios quísticos, con la formación y agrandamiento de quistes renales resultantes.^(4,5,6) Experimentos en animales, especialmente en ratones, demostraron que la inhibición de las tirosinas quinasas de la familia de los receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF: siglas en inglés) es capaz de disminuir el crecimiento de los quistes y con ello el volumen renal total, con un enlentecimiento de la progresión de la enfermedad.^(4,5)

La ausencia de tratamientos eficaces para la ERPAD conduce a los investigadores a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, como es el caso del EGFR.⁽⁴⁾ En estudios preclínicos, el bloqueo de este receptor, usando inhibidores de la actividad tirosina quinasa, atenúa de manera significativa el desarrollo de la enfermedad.^(4,7) El objetivo del presente trabajo fue evaluar la distribución tisular del EGFR en la ERPAD, el cual podría ser un posible blanco molecular terapéutico de esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de tejido.

Se seleccionaron 4 muestras de riñón (corteza), fijadas en formol e incluidas en parafina, con diagnóstico de ERPAD, procedentes del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto de Nefrología (La Habana, Cuba). Adicionalmente, se emplearon 2 muestras de corteza renal normal. Estas últimas se obtuvieron del Departamento de Medicina Legal del Hospital Clínico-Quirúrgico "Amalia Simoni" (Camagüey, Cuba) durante la necropsia de fallecidos en accidentes violentos o por muerte clínica. En todos los casos las muestras de tejido se tomaron después de recibir la aprobación de los comités de ética de las instituciones de salud mencionadas anteriormente.

Anticuerpos Monoclonales anti-EGFR.

Se empleó el anticuerpo monoclonal (AcM) ior egf/r3 (5 mg/mL) desarrollado en el Centro de Inmunología Molecular (La Habana, Cuba). Este AcM se obtuvo mediante la inmunización de ratones Balb/c con una fracción purificada del EGFR procedente de placenta humana. El ior egf/r3 es una IgG2a murina que reconoce con alta afinidad ($K_d=10^{-9}$ M) un epítopo localizado en el dominio extracelular del EGFR humano y es capaz de inhibir la unión del EGF con su receptor.^(8,9) El producto ensayado, ior egf/r3®, se corresponde a la formulación comercializada por la firma CIMAB S.A., Cuba.

Imunohistoquímica.

La detección inmunohistoquímica del EGFR se realizó de acuerdo con el procedimiento inmunoenzimático indirecto, descrito previamente por Viloría-Petit y Rengifo-Calzado.⁽¹⁰⁾ Brevemente, se realizaron cortes de 5 µm de espesor de cada muestra de riñón normal y ERPAD y se colocaron en las láminas portaobjetos a razón de dos cortes por lámina. Se incubaron durante 30 minutos a 70°C, se desparafinaron en xileno y rehidrataron con etanol de diferentes grados sucesivamente. Para inhibir la peroxidasa endógena se empleó una solución de Metanol-Peróxido de Hidrógeno al 0,03%. Después de la reanimación antigénica inducida por calor, tanto las muestras de riñón normal como de ERPAD se incubaron con el AcM ior egf/r3 a una dilución de 1:20 durante 1 hora. Las láminas se lavaron con TBS 1X (Tampón de Tris salino) por 5 minutos, posteriormente se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón biotinilado dilución 1:100 (Dako, E0354) y el complejo avidina-biotina/peroxidasa 1:100 (Dako E0355). La actividad enzimática se reveló con 3,3-diaminobencidina (DAB) (Dako, K3465) durante 10 minutos hasta observar un color pardo-café en la zona del tejido que presenta el antígeno (EGFR) y se contrastó con Hematoxilina de Mayer (Dako, S2020).

Como control positivo se emplearon cortes de un adenocarcinoma de colon de positividad conocida para el EGFR. Como control negativo, se usó la sustitución del AcM ior egf/r3 por el tampón de lavado (TBS 1X). Adicionalmente, se tomó como control negativo interno de cada tejido la ausencia de tinción o la reactividad tisular débil del AcM ior egf/r3 en las células epiteliales de la cápsula de Bowman (corpúsculo renal).⁽¹¹⁾

Evaluación de la tinción.

La presencia de coloración pardo-café (DAB) localizada en la membrana plasmática y/o en el citoplasma de las células epiteliales se consideró como positivo. Los cortes de tejidos empleados como controles negativos se aceptaron si sólo mostraban la tinción azul, característica del contraste con Hematoxilina de Mayer. La intensidad de la reacción se estimó cualitativamente y se expresó como: 0 (negativo), 1 (tinción débil), 2 (tinción moderada) y 3 (tinción intensa). Adicionalmente, se seleccionaron áreas representativas de cada corte empleando 100x de magnificación y en ellas se estimó el por ciento de células marcadas. El por ciento de células marcadas se multiplicó por la intensidad de la reacción y se obtuvo una escala inmunohistoquímica de 0-300. Esta escala se agrupó de la siguiente forma: 0 (0), 1 (1-100), 2 (101-200) y 3 (201-300).

Todas las observaciones se realizaron en un microscopio de campo claro (Olympus, BX51) con los aumentos de 100, 200 y 400x (ocular 10x con lentes objetivos de 10, 20 y 40x, respectivamente). Las láminas histológicas fueron analizadas por dos observadores expertos (RB y MC).

RESULTADOS

Muestras de tejido normal.

No se evidenció la presencia del EGFR en el corpúsculo renal ni en los tubos contorneados proximales y distales en las muestras de riñón normal evaluadas (0/2) (tabla 1, figura 1A y B).

Muestras de ERPAD.

De las cuatro biopsias de riñón con diagnóstico de ERPAD evaluadas en este estudio, dos resultaron no útiles por presentar abundante

Evaluación Inmunohistoquímica. Enfermedad renal.

CUADRO 1. Inmunorreactividad del AcM ior egf/r3 en la ERPAD.

Diagnóstico Histopatológico	Intensidad*	% Células positivas	Score**
Riñón normal 1	0	0	0
Riñón normal 2	0	0	0
ERPAD 1	3	100	3
ERPAD 2	3	100	3

Leyenda: ERPAD, *Enfermedad Renal Poliquistica Autónoma Dominante*. * La intensidad de la reacción se estimó cualitativamente y se expresó como: 0 (negativo), 1 (tinción débil), 2 (tinción moderada) y 3 (tinción intensa). ** Score: El por ciento de células marcadas se multiplicó por la intensidad de la reacción y se obtuvo una escala inmunohistoquímica de 0-300. Esta escala se agrupó como "Score": 0 (0), 1 (1-100), 2 (101-200) y 3 (201-300).

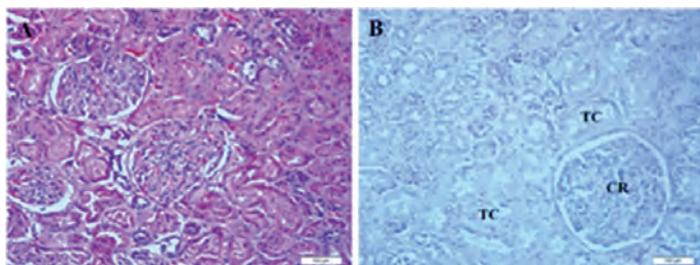


FIGURA 1. Microfotografías de corteza renal normal. A: Coloración con Hematoxilina y Eosina. B: Inmunotinción con el AcM ior egf/r3. Note: Ausencia de reconocimiento de este AcM en el corpúsculo renal (CR) y en los tubos contorneados (TC). Contraste con Hematoxilina de Mayer. Barra blanca = 100 µm.

tejido adiposo y elementos vasculares, lo cual interfería en la determinación del EGFR. Los casos que resultaron útiles para el estudio inmunohistoquímico fueron reconocidos intensamente por el AcM ior egf/r3 (2/2) (tabla 1).

La inmunotinción se observó como un precipitado finamente granular y se localizó principalmente en la membrana plasmática de las células que cubren las estructuras quísticas y con menor intensidad en el citoplasma de las mismas (figuras 2 y 3). La reactividad del AcM ior egf/r3 fue más intensa en la superficie apical de las células que recubren los quistes renales (figuras 2B y 3B).

No se evidenció reconocimiento de este AcM en el epitelio de la cápsula de Bowman (corpúsculo renal) (figura 2C). Tampoco se observó reactividad del AcM ior egf/r3 en los cortes de tejido incubados con el tampón de lavado (TBS 1X) (figuras 2D y 3D).

DISCUSIÓN

Aunque la ERPAD afecta fundamentalmente a los riñones con un deterioro de la función renal, muchos autores la califican como un

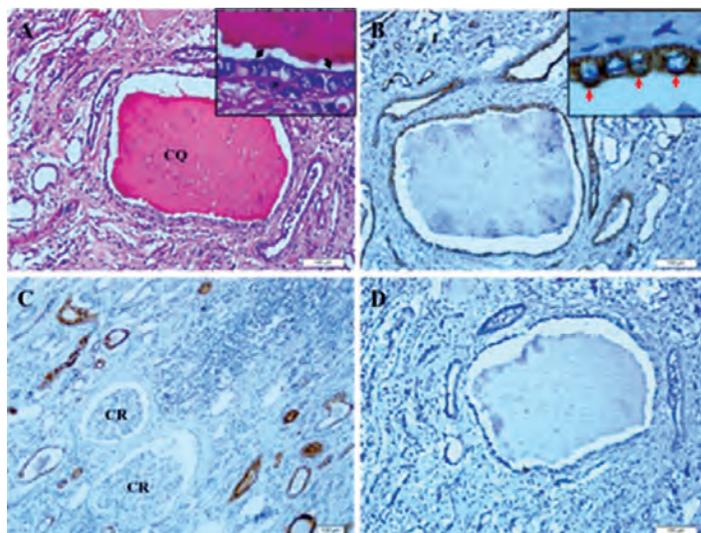


FIGURA 2. Microfotografías de ERPAD. A: Coloración con Hematoxilina y Eosina. Note: Presencia de estructura quística. CQ: Contenido del quiste. Flechas negras: Pared del quiste. B-D: Inmunotinción con el AcM ior egf/r3. B: Observe reactividad intensa del AcM ior egf/r3 en la membrana plasmática y en el citoplasma de las células de las paredes de los quistes renales. Se evidenció una tinción más intensa en el borde apical de dichas células (Flechas rojas). C y D: Ausencia de reconocimiento de este AcM en el corpúsculo renal (CR) y en el control negativo, respectivamente. Contraste con Hematoxilina de Mayer. Barra blanca = 100 µm.

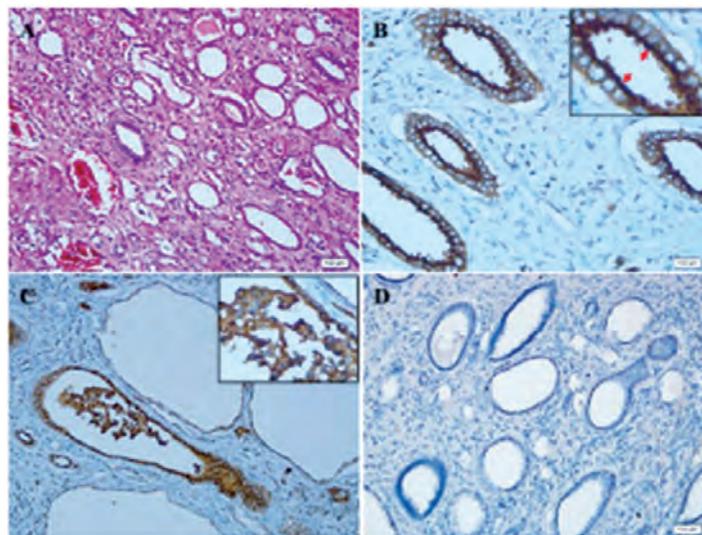


FIGURA 3. Microfotografías de ERPAD. A: Coloración con Hematoxilina y Eosina. B-D: Inmunotinción con el AcM ior egf/r3. B: Observe reactividad intensa del AcM ior egf/r3 en la membrana plasmática y en el citoplasma de las células de las paredes de los quistes renales. Esta reacción fue más intensa en el borde apical de dichas células (Flechas rojas). C: Grupo de células epiteliales renales EGFR positivas en el interior de un tubo contorneado dilatado. D: Ausencia de reconocimiento del AcM ior egf/r3 en la muestra de tejido empleada como control negativo. Contraste con Hematoxilina de Mayer. Barra blanca = 100µm

trastorno multisistémico.^(3,12) Está definida como una enfermedad incurable, de evolución lenta y progresiva, cuyo único tratamiento, actualmente, está dirigido a la prevención de las complicaciones a las que suele conducir y, de ser posible, a retardar la progresión de la insuficiencia renal.^(3,13) Actualmente no existe una terapia en humanos que ralentice o prevenga la formación de los quistes y el crecimiento de los riñones.

El proceso de quistogénesis se ha estudiado ampliamente en la ERPAD. Se demostró *in vitro* que el EGF tiene un efecto mitógeno sobre el epitelio tubular quístico; además, se encontró que el epitelio renal quístico presenta alteraciones tanto cuantitativas (incremento) como cualitativas (localización errada) del EGFR.⁽¹⁴⁾ La localización apical, el incremento y la hiperactividad del EGFR, unido a la secreción apical del EGF y otros ligandos dentro de los lúmenes quísticos, crean un lazo proliferativo autocrino/paracrino en los epitelios de la ERPAD.⁽⁶⁾

La inmunoterapia pasiva para las enfermedades malignas asociadas al sistema EGF/EGFR, que emplean AcMs contra el EGFR, fue objeto de muchas investigaciones. En estos estudios se demostró que el reconocimiento específico del receptor por el anticuerpo inhibe la unión de sus ligandos, lo que produjo un efecto inhibitorio de la estimulación mitogénica de las células involucradas en la enfermedad.⁽¹⁵⁾

En este trabajo, el reconocimiento inmunohistoquímico del AcM ior egf/r3 demostró que el EGFR se encuentra incrementado y localizado principalmente en la superficie apical de las células que recubren los quistes renales, aunque se detectó una tinción citoplasmática adicional. Los resultados de este estudio coinciden con reportes previos acerca de las alteraciones en la distribución y en los niveles de inmunodetección del EGFR en la ERPAD.^(4,6) Este es el primer estudio donde se emplea el AcM ior egf/r3 para el reconocimiento del EGFR en una enfermedad no oncológica, específicamente en la ERPAD.

Por otra parte, la actividad tirosina quinasa del receptor aumentada favorece la hiperplasia de los epitelios quísticos, con la formación y agrandamiento de los quistes renales resultantes.⁽⁵⁾ Experimentos en animales, especialmente en ratones y ratas, demostraron que la inhibición de las tirosinas quinasa del receptor es capaz de disminuir el crecimiento de los quistes y con ello el volumen renal total, con un enlentecimiento de la progresión de la enfermedad.^(4,5)

En reportes previos, otros investigadores propusieron como blancos novedosos para el tratamiento de esta enfermedad al EGFR. Sin embargo, las sugerencias no están dirigidas al bloqueo de la unión del ligando EGF con el receptor, sino al bloqueo de la actividad aumentada de la tirosina quinasa del receptor, por ejemplo el SKI-606, un inhibidor de la actividad de la quinasa Src.⁽¹⁶⁾

Sobre la base de los conocimientos que existen sobre el papel del EGFR en la fisiopatología de la ERPAD, así como los resultados obtenidos con el AcM nimotuzumab (hR3) (contraparte humanizada del ior egf/r3) como inhibidor de la función del EGFR en terapias contra el cáncer⁽¹⁷⁻²⁰⁾, los autores de este estudio proponen el desarrollo de una nueva propuesta terapéutica en humanos; en la cual se emplee por primera vez un AcM para el tratamiento de la ERPAD, específicamente el AcM nimotuzumab cuyo blanco sea el bloqueo de la unión del EGF con su receptor, el EGFR.

Actualmente, está en curso un ensayo clínico Fase I con este AcM, para conocer la seguridad de la administración de este fármaco, la dosis adecuada para esta nueva aplicación, la farmacocinética, así como la posible respuesta terapéutica al mismo, en pacientes con ERPAD.

CONCLUSIONES

La búsqueda de terapias eficaces para tratar la ERPAD conduce a que los investigadores dedicados al estudio de la misma se centren en blancos moleculares como es el caso del EGFR. Actualmente, los resultados que se han reportado sobre la inhibición del EGFR para esta enfermedad se realizaron en modelos experimentales (ratones: bpk y orpk y en ratas Han: SPRD) mediante el empleo de inhibidores de la actividad tirosina quinasa del receptor. Estos estudios demostraron que este tipo de bloqueo del EGFR atenúa de manera significativa el desarrollo de la enfermedad. El EGFR, en las muestras analizadas, fue reconocido con elevada afinidad por el AcM murino ior egf/r3. El AcM nimotuzumab reconoce selectivamente al dominio extracelular de la proteína HER 1 (EGFR), uniéndose al receptor con similar afinidad que su parental murino, el AcM murino ior egf/r3. Por estas razones, los autores consideran que el sistema del EGF podría ser un blanco potencial para el tratamiento de la ERPAD, empleando el AcM nimotuzumab como inhibidor de la actividad del EGFR.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al Dr. en C. Agustín Lage y al Dr. en C. Enrique Rengifo Calzado por permitir la realización de este estudio, así como a la Técnico Milagros Frómata y a la Lic. Idania Suárez por el procesamiento técnico de las muestras y por la revisión de la redacción del manuscrito, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB. Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2143-2160.
2. Wilson PD. Mechanisms of disease: Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med*. 2004; 350:151-64.
3. Chang Ming-Yang, Ong ACM. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Recent Advances in Pathogenesis and Treatment. *Nephron Physiol* 2008; 108:p1-p7. abstract
4. Richards WG, Sweeney WE, Yoder BK, Wilkinson JE, Woychik RP et al. Epidermal Growth Factor Receptor Activity Mediates Renal Cyst Formation in polycystic Kidney Disease. *J. Clin. Invest.* 1998;101:935-939.
5. Sweeney WE Jr., Hamahira K, Sweeney J, García-Gatrell M, Frost P et al. Combination treatment of PKD utilizing dual inhibition of EGF-receptor activity and ligand bioavailability. *Kidney Int.* 2003; 64:1310-1319.
6. Wilson SM, Amsler K, Hyink DP, Li X, Lu W et al. Inhibition of HER-2(neu/ ErbB2) restores normal function and structure to polycystic kidney disease (PKD) epithelia. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)* 2006; 1762: 647-655.
7. Sweeney WE Jr, Chen Y, Nakanish K. Treatment of polycystic kidney disease with a novel tyrosine kinase inhibitor. *Kidney Int.* 2000;57:33-40.
8. Fernández A, Pérez R, Macías A, Velandia A, Álvarez I, Ramos M et al. Generation and characterization of anti-EGFR antibodies. *Interferon y Biotecnología* 1989; 6:289-98.
9. Fernandez A, Spitzer E, Pérez R, Boehmer FD, Eckert K, Zschiesche W et al. A new monoclonal antibody for detection of the EGF-R in Western Blot and paraffin embedded tissue sections. *J Cell Biochem* 1992; 49: 157-65.
10. Vilorio-Petit A, Rengifo-Calzado E. Antiepidermal growth factor receptor antibody: Immunohistochemistry. In: *Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas*. M.A. Hayat ed, vol.3, Elsevier Academic Press, 2005; 8:79-101.
11. Cedeño M, Rengifo CE, Rengifo Calzado E, Romero Y, Rodriguez T. Immunohistochemical Evaluation of H-R3 a Novel Humanized Monoclonal Antibody That Neutralizes the EGF-receptor. *Appl Immunohistochem Mol Morpho* 2007;15(2).
12. Johnson AM, Gabow PA. Identification of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease at highest risk for end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:1560.
13. Bisceglia M, Galliani CA, Senger C, Srallone C, Sessa A. Renal cystic diseases: A review. *Adv Anat Pathol.* 2006;13:26-56.
14. Ramírez AE, Fernández C, Narváez D, Teneud L. Expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico en biopsias renales de pacientes con nefronoptosis del adolescente. *Nefrología* 2010; 30(5):518-21.
15. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(14):2787-2799.
16. Belibi FA, Edelstein CL. Novel targets for the treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010 March ; 19(3): 315-328.
17. Crombet T, Torres O, Neninger E, Catala M, Rodríguez N, et al. Phase I clinical evaluation of a neutralizing monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2003; 16 (1):93-101.
18. Dell KM, Nemo R, Sweeney WE, Levin JI, Frost P, Avner ED. A novel inhibitor of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme ameliorates polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2001; 60:1240-1248.
19. Discafani CM, Carrol M, Floyd MB Jr, Hollander IJ, Husain Z, Johnson BD, et al. An irreversible inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase with in vivo activity by N-[4-[(3-bromophenyl)amino]-6-quinazoliny]-2-butynamide (CL-387,785). *Biochem Pharm* 1999; 57:917-925.
20. Sweeney WE, Jr, Chen Y, Nakanish K et al. Treatment of polycystic kidney disease with a novel tyrosine kinase inhibitor. *Kidney Int.* 2000; 57:33-40.