

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

Sanatorio El Carmen, Salta, Servicio de Oncología y Anatomía Patológica, Hospital Zenón Santillán, Tucumán, Servicio de Oncohematología y Anatomía Patológica, Hospital Pablo Soria, Jujuy, Servicio de Oncología y Anatomía Patológica, Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba, Fundación Ars Médica, Jujuy, Fundación Investigar, Buenos Aires, Intergrupo Latinoamericano de Oncología Gastrointestinal (ILOGI), Instituto de Patología y Citodiagnóstico, Salta, Laboratorio de Patología y Citodiagnóstico Oncológico (LABCO), Salta, Laboratorio Privado de Patología, Salta, Centro de Anatomía Patológica y Citología (CEDAP), Jujuy, Argentina.

### Resumen

El objetivo fue determinar la sobreexpresión de c-MET en pacientes con cáncer biliar y analizar asociaciones con parámetros clínicos.

Este es un estudio descriptivo, longitudinal, retrospectivo y prospectivo. Se determinó la sobreexpresión por inmunohistoquímica en 58 pacientes con resultados: positivo fuerte, positivo débil y negativo. Se construyeron curvas de supervivencia global con el método de Kaplan-Meier en todos los pacientes y en subgrupos según estadio, género, origen tumoral y grado de diferenciación histológica. La diferencia en supervivencia global entre subgrupos se analizó por el método log-rank. La asociación entre sobreexpresión y grado de diferenciación se estudió por el método chi cuadrado. Las pruebas estadísticas se realizaron a dos colas con un valor de  $p < 0.05$ .

Veintinueve muestras (50%) fueron negativas, 24 (41%) positivas débiles y 5 (9%) positivas fuertes. La mediana de supervivencia fue 18.2, 11.3 y 11.7 meses en pacientes con sobreexpresión negativa, positiva débil y positiva fuerte, respectivamente. Sin embargo, la diferencia en supervivencia global entre pacientes c-MET negativos y positivos (fuerte y débil) no alcanzó significancia estadística ( $p = 0.068$ ). En los subgrupos los resultados fueron similares. La sobreexpresión se asoció al grado de diferenciación ( $p = 0.015$ ), mostrando una relación inversa; y no se correlacionó con tasa de respuesta a la quimioterapia y tiempo a la progresión. La sobreexpresión de c-MET es frecuente en cáncer biliar, se asocia al grado de diferenciación tumoral y podría tener valor pronóstico. Si la vía c-MET es importante, los fármacos inhibidores tendrían impacto en la supervivencia global.

**Palabras clave:** MET proteína, humano, neoplasias del tracto biliar, inmunohistoquímica

### Abstract

The objective was to determine the overexpression of c-MET in patients with biliary cancer and to analyze associations with clinical parameters.

This is a descriptive, longitudinal, retrospective and prospective study. Overexpression was obtained by immunohistochemistry in 58 patients, with the following results: strong positive, weak positive and negative. Overall survival curves were constructed using the Kaplan-Meier method in all patients and in subgroups according to stage, gender, tumor origin and grade of histological differentiation. The difference in overall survival between groups was analyzed by the log-rank test. The association between overexpression and grade of differentiation was studied using the chi-square method. Statistical tests were two-tailed with a  $p$  value 0.05.

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

Twenty nine samples (50%) were negative, 24 (41%) weak positive and 5 (9%) strong positive. Median survival was 18.2, 11.3 and 11.7 months in patients with negative, weak positive and strong positive overexpression, respectively. However, the difference in overall survival between negative and positive (strong and weak together) c-MET patients did not reach statistical significance ( $p$  0.068). In the subgroup analyses the results were similar. Overexpression correlated with tumor grade ( $p$  0.015), showing an inverse association; and was not associated neither with chemotherapy response rate nor with time to progression. Overexpression of c-MET is common in biliary cancer, is associated with grade of tumor differentiation and could have prognostic value. If the c-MET pathway is important, the inhibitory drugs would have an impact on overall survival.

**Key words:** MET protein, human, biliary tract neoplasms, immunohistochemistry

### Introducción

Los tumores biliares son un conjunto de neoplasias del tracto biliar (cáncer de vesícula biliar -CVB-, colangiocarcinoma intra hepático y extra hepático -CCIH y CCEH- y cáncer de ampolla de Vater -CAV-) de especial interés por las siguientes razones:

- Alta tasa de incidencia en el noroeste Argentino, entre las mayores del mundo, donde constituye la tercera causa de muerte por cáncer en el género femenino, luego del cáncer de cuello uterino y mama<sup>1</sup>. A nivel mundial, informes epidemiológicos actuales comunican un aumento en la incidencia y mortalidad de los casos de CCIH<sup>2</sup>.
- Alta letalidad, menos marcada en el CAV, debido a una evolución indolente e inespecífica que condiciona el frecuente diagnóstico en etapas avanzadas e índices bajos de supervivencia<sup>3</sup>
- Tratamientos ineficaces. La única terapia con potencial curativo es la cirugía, pero sólo está indicada en estadios tempranos y aun en estos casos las tasas de recurrencias son altas<sup>4</sup>. En tumores avanzados o recidivas, se indica quimioterapia con resultados poco alentadores: respuestas menores al 30% y una mediana de supervivencia de 9 meses, incluso con la combinación de agentes activos (fluorouracilo, gemcitabina y sales de platino)<sup>5</sup>. Diversos ensayos clínicos y metaanálisis demostraron que la quimioterapia, ha sido incapaz de lograr progresos mayores en estos pacientes<sup>6,7</sup>.
- Carencia de factores predictivos y/o pronósticos validados. Las alteraciones biogenéticas informadas, provienen de centros de alta incidencia en otros continentes (Japón y Europa central)<sup>8,9</sup>. No está demostrado que las características biológicas de estos tumores sean las mismas en diferentes regiones o etnias<sup>10</sup>. Es necesario investigar y correlacionar los datos publicados con la población proveniente de zonas de alta incidencia en nuestro país.

Para cambiar la fatalidad asociada a esta enfermedad, debemos hallar nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento. Comprender las características genéticas y moleculares de los tumores biliares permitirá definir factores pronósticos, predictivos y terapias específicas.

En la transformación maligna del cáncer biliar se implicaron múltiples genes. Diversos informes relacionaron la carcinogénesis biliar con la familia de los receptores del factor de crecimiento tirosina quinasa (TKGFR)<sup>11,12</sup>; el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)<sup>13</sup>, el factor de crecimiento del epitelio vascular (VEGF)<sup>14</sup> y c-

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

### MET<sup>15</sup>.

C-MET es un protooncogén localizado en el cromosoma 7q, que codifica un receptor de alta afinidad para el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)<sup>16</sup>. El receptor c-MET (o receptor HGF) es una estructura heterodimérica que comprende una subunidad alfa extracelular y una cadena beta conformada por una región extracelular, un dominio transmembrana y una región tirosina quinasa intracelular<sup>17</sup>. La interacción c-MET/HGF genera autofosforilación de la región tirosina quinasa de MET; lo que lleva a la activación de múltiples moléculas de señalización (Src, PI3K, Gab1, SOS, Grb2, Ras, MAPK, MEK1/2) que producen cambios celulares hacia la carcinogénesis<sup>18-20</sup>. Ensayos pre clínicos hallaron una correlación entre la amplificación de c-MET y angiogénesis, invasión, proliferación y diferenciación tumoral<sup>21-23</sup>. Esta señal interactúa con otras moléculas y vías oncogénicas como Alfa6beta4, CD44, plexina B, Fas y otros TKGFR como RON, EGFR y ErbB2<sup>24-26</sup>. En diferentes tumores, incluyendo las neoplasias biliares, se halló una co-amplificación de EGFR y c-MET, postulando una posible interacción entre ambos<sup>27,28</sup>. La sobreexpresión de c-MET se documentó en múltiples neoplasias: mama<sup>29</sup>, pulmón<sup>30</sup>, esófago<sup>31</sup>, colon<sup>32</sup>, ovario<sup>33</sup>, cerebro<sup>34</sup>, hepatocarcinoma<sup>35</sup> y cáncer biliar. Si bien existen varios trabajos acerca de la sobreexpresión de c-MET en colangiocarcinoma<sup>36</sup>, son pocas las series que han comunicado sobreexpresión en el cáncer de vesícula y sólo un ensayo estudió la correlación con la supervivencia<sup>37,38</sup>.

Existen varios métodos, ninguno estandarizado, para el estudio del gen y la proteína c-MET: sobreexpresión de la proteína c-MET por inmunohistoquímica (IHQ), amplificación del gen que codifica el receptor c-MET por hibridación fluorescente in situ (FISH), trisomía del cromosoma 7 (cariotipo) y mutaciones somáticas de c-MET; actualmente las más utilizadas son las dos primeras.

La vía c-MET es un potencial blanco terapéutico en pacientes con cáncer biliar, a través de diferentes mecanismos inhibitorios<sup>39</sup>.

- El bloqueo de la unión entre el receptor c-MET y HGF por anticuerpos monoclonales contra c-MET y/o HGF, o un fragmento soluble de c-MET que bloquea la unión a HGF.
- La inhibición de la transcripción utilizando pequeños fragmentos de ARNs de interferencia para bloquear la expresión del receptor c-MET, al unirse al sitio de su ADN codificante.
- La inhibición directa de la actividad tirosina quinasa del receptor c-MET, por la unión selectiva al dominio tirosina quinasa c-MET de una molécula que bloquee la cascada de señalización aunque se produzca la unión receptor c-MET/ligando HGF.

El Intergupo Latinoamericano de Oncología Gastrointestinal (ILOGI), ha diseñado el siguiente estudio para mejorar la comprensión de la significancia clínica de c-MET en tumores biliares. Hasta la fecha no existen informes de c-MET en pacientes con cáncer biliar que residen en la zona andina de Latinoamérica.

Los objetivos primarios de este estudio fue determinar la sobreexpresión de la proteína c-MET y la amplificación genética de c-MET, en muestras de tejidos de pacientes con diagnóstico de CVB y cáncer del tracto biliar (CTB); y analizar posibles asociaciones con la respuesta a la quimioterapia, el tiempo a la progresión tumoral (TPT) y la supervivencia global (SG).

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

Los objetivos secundarios fueron analizar posibles asociaciones con otros factores clínicos y patológicos. Comparar la prevalencia de la sobreexpresión y amplificación de c-MET entre CVB y colangiocarcinoma. Comparar la sobreexpresión con la amplificación genética de c-MET.

### Materiales y métodos

Se realizó un análisis retrospectivo (en pacientes fallecidos), prospectivo (en pacientes vivos), descriptivo y longitudinal. Durante el período 2000-2014, se evaluaron muestras de tejidos con cáncer biliar, tomadas generalmente al momento del diagnóstico, independientemente del tiempo evolutivo del tumor y del tratamiento oncológico indicado (quimioterapia, radioterapia y/o cirugía). Los datos clínicos y patológicos se obtuvieron de la base de datos de ILOGI ([www.ilogi.com.ar](http://www.ilogi.com.ar)), a la cual puede acceder sólo el médico oncólogo tratante (quien ingresó estos datos previamente) a través de una clave personal e intransferible. Las muestras embebidas en parafina fueron obtenidas de piezas quirúrgicas en su mayoría, y de biopsias (en casos irreseccables) de pacientes provenientes de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Córdoba. Los tacos de tejido fueron identificados por el oncólogo clínico con un código y enviados a la Fundación Investigar de la Ciudad de Buenos Aires, para la medición de c-MET con patólogos certificados que desconocían los datos clínicos.

Se construyeron curvas de supervivencia con los datos de SG a través del método de Kaplan- Meier en todos los pacientes y en los subgrupos clasificados según diversos factores clínicos y patológicos: género, estadio tumoral, origen del tumor biliar primario (CVB) y grado de diferenciación histológica (grado histológico 1 a 3, de mayor a menor diferenciación respectivamente). Las curvas de SG en los pacientes con y sin sobreexpresión c-MET fueron comparadas a través del test de log-rank. La asociación entre sobreexpresión de c-MET y el grado de diferenciación histológica fue estudiada con el método de chi cuadrado. Las pruebas estadísticas se realizaron a dos colas con un valor de p para significancia estadística de 0.05. Para el diseño se asumió una sobreexpresión de c-MET en el 40% de las muestras, y una probabilidad de estar vivo (SG) al año de 0.25 para los pacientes con sobreexpresión y 0.5 para aquellos sin esta anomalía. De acuerdo a estas proyecciones, se necesita una muestra de 158 pacientes para que la diferencia hallada sea estadísticamente significativa con un error de tipo I o alfa de 0.05 y un error de tipo II o beta de 0.80. Sin embargo, se decidió realizar este estudio con una muestra con menor número de pacientes para evaluar la tendencia en las curvas de SG y TPT. En caso de observar la tendencia proyectada, se procederá (en una segunda parte del estudio) a ampliar la muestra a 158 pacientes o realizar un ensayo prospectivo confirmatorio. Si los parámetros proyectados no son exactos cuantitativamente pero sí cualitativamente, deberá recalcularse el tamaño de la muestra para alcanzar un valor que sea estadísticamente significativo.

Se utilizó la clasificación de tumores malignos TNM definidos por la Unión Internacional Contra el Cáncer y la Organización Mundial de la Salud (UICC y WHO), 7ma edición. Para el análisis de SG se consideró el tiempo desde el diagnóstico tumoral hasta la muerte por cualquier causa. El TPT fue calculado desde el inicio de la quimioterapia hasta la progresión del tumor. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética, Docencia, Investigación y/o las Autoridades de los Centros de Salud participantes. Los pacientes, vivos al momento del ingreso al estudio, firmaron un consentimiento para su inclusión.

Se determinó la sobreexpresión de la proteína c-MET por IHQ. Para la tinción de IHQ con anticuerpo monoclonal de conejo (SP44) y el kit de detección Ultraview universal DAB (Ventana Medical Systems), se utilizó la plataforma

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

automatizada Benchmark GX (Ventana Medical Systems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante aplicada en secciones de 4 µm embebidas en parafina de las muestras de tejido tumoral. Dos patólogos (AIB y SS) evaluaron de forma independiente la tinción de IHQ, desconociendo los nombres o iniciales de los pacientes y desconociendo su evolución clínica.

Los resultados se consideraron c-MET positivos, cuando las células tumorales se tiñeron con localización en la membrana citoplásmica.

La interpretación de la sobreexpresión de la proteína c-MET se definió a través de: a- intensidad de la tinción celular calificada como: nula (score 0), débil (score 1), moderada (score 2) y fuerte (score 3); b- porcentaje de células teñidas: 0-5% (score 0), 6-25% (score 1), 26-50% (score 2), 51-75% (score 3), 76-100% (score 4). Para cada muestra se sumaron ambos scores y se la clasificó en tres categorías: tinción negativa (scores definitivos 0 a 2), tinción positiva débil (scores definitivos 3 a 5) y tinción positiva fuerte (scores definitivos 6 y 7).

Con respecto a la amplificación del gen c-MET, esa parte del estudio no se ha realizado aún.

### Resultados

Se enviaron 64 muestras con cáncer biliar de las cuales 58 fueron válidas para el análisis. Las características clínicas y patológicas de los pacientes se presentan en la Tabla 1. En 29 de las 58 muestras analizadas (50%) se halló tinción positiva indicando sobreexpresión de c-MET (Figura 1), de las cuales 24 (41.4%) tenían tinción positiva débil y 5 (8.6%) positiva fuerte. Veintinueve (50%) muestras mostraron tinción negativa (normal o sin sobreexpresión de c-MET).

De las 52 muestras de CVB, 25 (48%) tenían sobreexpresión de c-MET y 27 (52%) tinción negativa. De las 4 muestras de colangiocarcinoma, 2 (50%) presentaron tinción positiva y 2 (50%) no mostraron sobreexpresión c-MET.

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

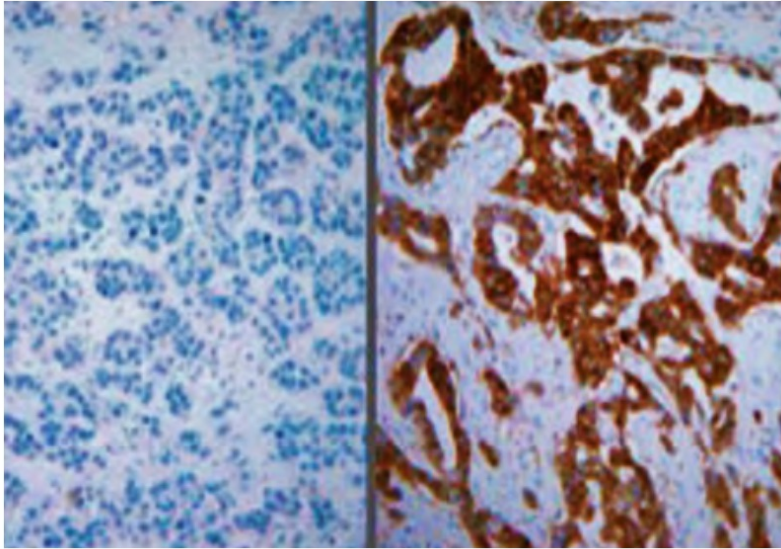
<b>Parámetros clínicos</b>	<b>Número de casos (%)</b>
<b>Edad</b>	
Media	58
Rango	37-88
<b>Sexo</b>	
Mujeres	46 (79)
Varones	12 (21)
<b>Performance Status (ECOG)</b>	
0	10 (17)
1	27 (46)
2	7 (12)
NR	14 (24)
<b>Origen Anatómico del Tumor</b>	
Cáncer de vesícula (CBV)	52 (90)
Colangiocarcinoma (CCEH y/o CCEH)	4 (7)
Indeterminado	2 (3)
<b>Grado de diferenciación</b>	
0	4 (7)
1	36 (62)
2	12 (21)
NI	6 (10)
<b>Histología</b>	
Adenocarcinoma	47 (81)
Carcinoma	4 (7)
Carcinoma escamoso	4 (7)
Carcinoma adenoescamoso	2 (3)
Carcinoma papilar	1 (2)

NI: No informado

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

**Figura 1.** Sobreexpresión c-MET. Marcación negativa (A) y positiva fuerte (B)

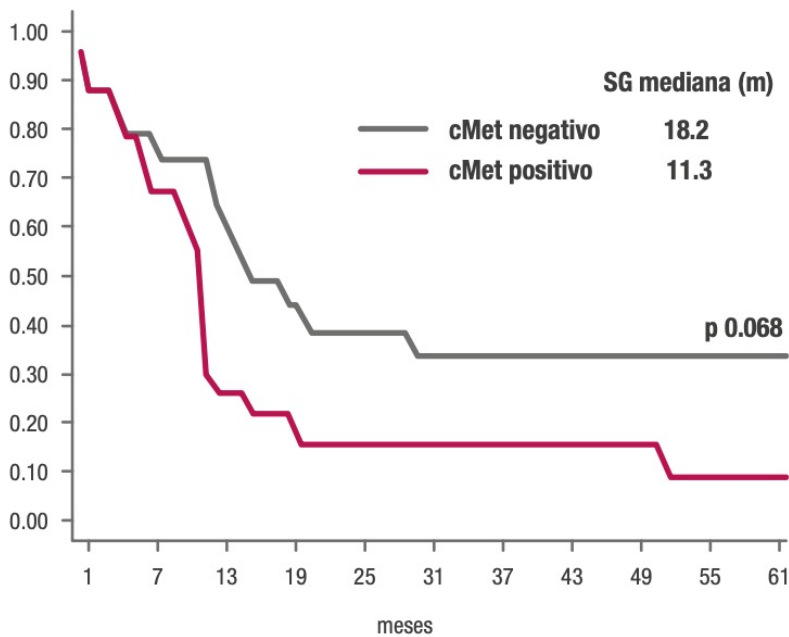


Correlación entre sobreexpresión de c-MET y factores clínico patológicos: La mediana de SG fue 18.2, 11.3 y 11.2 meses para los pacientes con tinción negativa, positiva débil y positiva fuerte respectivamente. Dado que los que presentaban tinción positiva fuerte eran solamente cinco, se estudió las diferencias en SG entre los pacientes sin sobreexpresión de c-MET (los casos denominados “negativos”) y aquellos con sobreexpresión de c-MET, comprendidos por los casos “positivos débiles” y “positivos fuertes”. La mediana de SG fue 18.2 meses para los casos negativos y 11.3 meses para los casos positivos (Figura 2), y no alcanzó significancia estadística (p 0.068).

**Figura 2.** Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en meses (m) en casos negativos y positivos de sobreexpresión c-MET (n=53)

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado



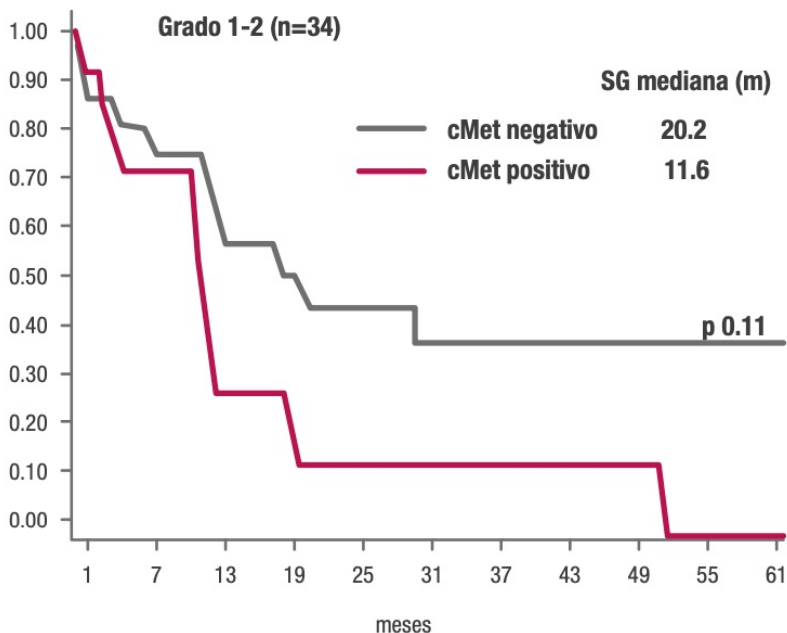
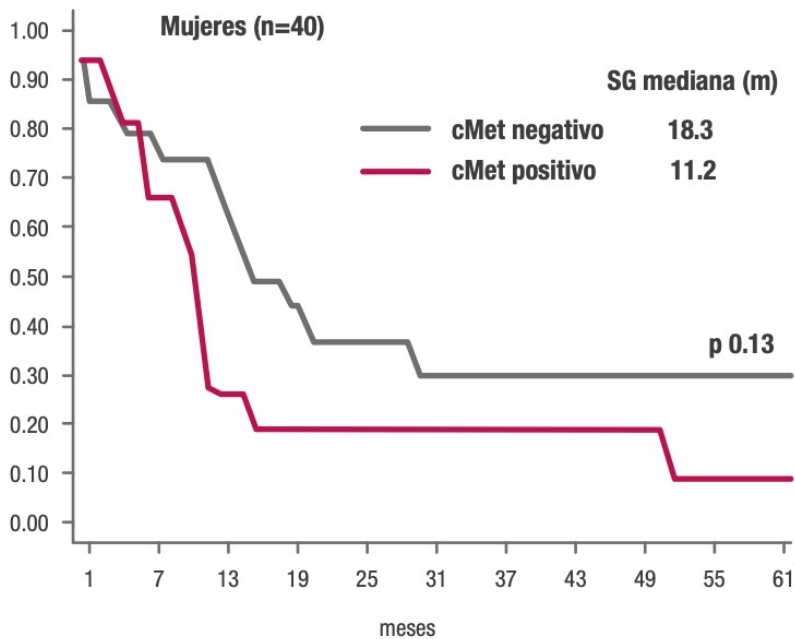
En los subgrupos analizados por género, estadio, origen anatómico y grado de diferenciación (Figura 3), las curvas de SG en los pacientes con y sin sobreexpresión c-MET fueron similares a las 1.00 curvas de SG en todos los pacientes, mostrando 0.90 mayor SG en aquellos sin sobreexpresión. Esta 0.80 diferencia no fue estadísticamente significativa.

**Figura 3.** Curvas de Kaplan-Meier para supervivencia global en casos negativos y positivos de sobreexpresión c-MET. Análisis de subgrupos por género, estadio (III y IV), origen anatómico (CVB) y diferenciación histológica (grado 1 y 2)



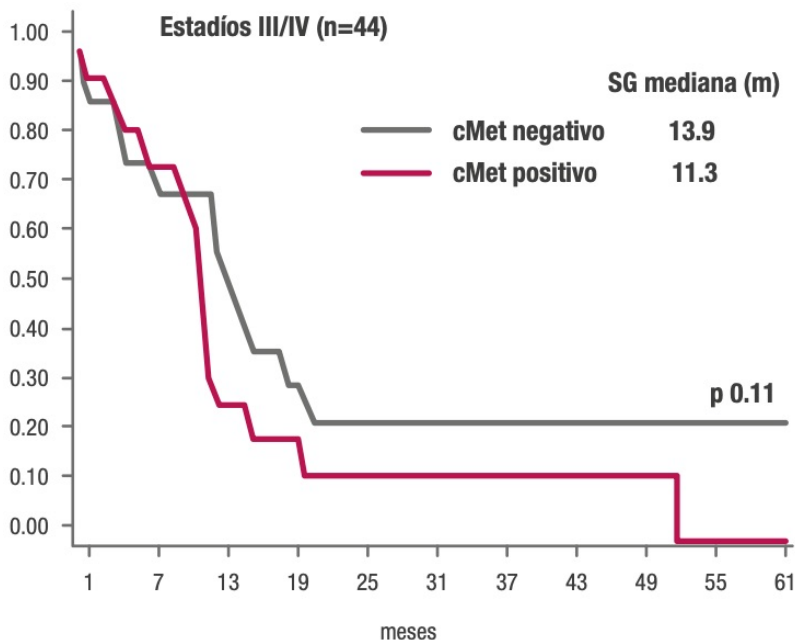
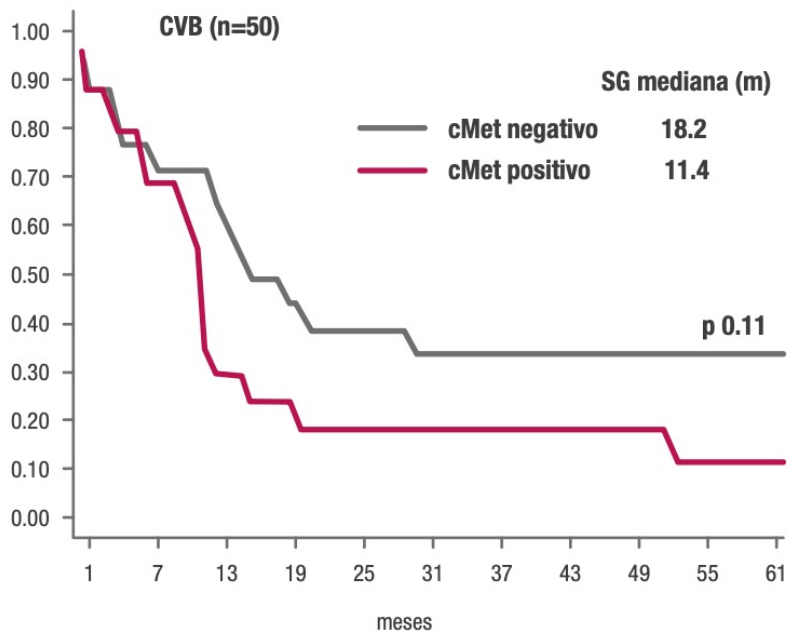
## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado



## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado



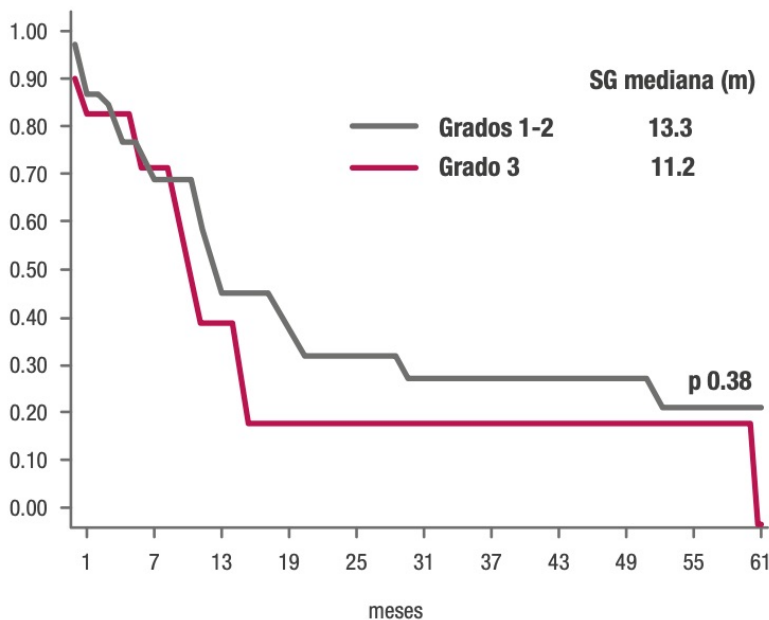
Sobre 26 muestras con tinción negativa, 2 de éstas (8%) tenían grado de diferenciación histológica 3; mientras que sobre 26 muestras con tinción positiva, 10 (38%) tenían grado de diferenciación 3. Esta posible asociación entre sobreexpresión de c-MET y grado de diferenciación histológica tumoral fue sometida a la prueba de chi cuadrado y el resultado fue positivo ( $p$  0.015). Dado que en varios modelos tumorales el grado de diferenciación histológica tiene valor pronóstico, consideramos la hipótesis que la menor SG en los casos c-MET positivo podría deberse a que éstos

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

presentaban menor grado de diferenciación tumoral. Por ello estudiamos la SG en los casos con bajo y alto grado de diferenciación (Figura 4). La SG mediana, levemente superior en casos con tumores grado 1-2 (13.3 meses), no difiere mayormente de la SG en casos con tumores grado 3 (11.2 meses,  $p$  0.38); a diferencia de los casos con tinción negativa y positiva para c-MET con medianas de SG de 18.2 y 11.3 meses respectivamente.

**Figura 4.** Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en tumores diferenciados (grado histológico 1 y 2) y poco diferenciados (grado histológico 3), ( $n=47$ )



Veintidós casos tenían evaluación de respuesta a la quimioterapia (reducción tumoral de cualquier magnitud, no atendida a criterios RECIST). La tasa de respuesta fue 46, 42 y 50% en pacientes con tinción c-MET negativa, positiva débil y positiva fuerte, respectivamente. La mediana del tiempo a la progresión tumoral (TPT) fue 3.2, 7.3 y 5.6 meses respectivamente.

El estudio de amplificación del gen c-MET no pudo ser realizado al momento del presente trabajo, por lo cual no se correlacionó con los objetivos planteados.

### Discusión

El presente trabajo mostró que la sobreexpresión de c-MET en tumores biliares de pacientes de nuestra región es frecuente, puede tener valor pronóstico, está asociada al grado de diferenciación histológica y no tiene valor predictivo de respuesta a la quimioterapia.

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

En cáncer biliar la sobreexpresión de esta proteína se ha estudiado con mayor frecuencia en colangiocarcinoma. Los resultados varían ampliamente: 21 a 58%<sup>36</sup> para CCIH y 0 a 80% para CCEH39. En series quirúrgicas la sobreexpresión c-MET no fue comunicada como factor pronóstico en CCEH pero sí en CCIH, mencionando como posible justificación variables relacionadas a la ubicación anatómica, métodos quirúrgicos y técnicas de medición empleados. Estos informes se basan en series pequeñas donde el rol de la chance es mayor.

Tres series publicaron resultados de la sobreexpresión de c-MET en CVB. Nakazawa y col.<sup>36</sup> informaron sobreexpresión de c-MET en el 5.6% de 89 casos de CVB, procedentes de Japón. Curiosamente la sobreexpresión de la proteína (por IHQ) no estaba asociada a la amplificación del gen. Wood y col.<sup>38</sup> estudiaron 25 casos de CBV en pacientes de Corea y hallaron sobreexpresión c-MET en el 74% de los casos. Heo y col.<sup>37</sup> presentaron una serie de 12 casos de CVB, procedentes de Corea, en los que la proteína c-MET estaba sobreexpresada en el 41% de ellos. Esta última serie es la única que analizó una asociación entre sobreexpresión c-MET con respuesta a la quimioterapia y supervivencia. La sobreexpresión no estaba asociada a la tasa de respuesta, ni a la supervivencia libre de progresión y SG. En las tres series la interpretación de positividad para sobreexpresión de c-MET se basó en scores diferentes al que hemos utilizado en el presente trabajo. Además, son series pequeñas (excepto la publicada por Nakazawa) y proceden de Corea y Japón, países con etnias diferentes a la nuestra, en Latinoamérica. Quizá las diferencias observadas entre las tres series entre sí y en comparación con la nuestra puedan explicarse por estas razones.

Dado que los casos con tinción positiva fuerte eran solamente cinco, decidimos agruparlos para su estudio con aquellos con tinción positiva débil. Todos los casos con tinción positiva mostraron peor SG que aquellos sin sobreexpresión de c-MET. La diferencia, sin embargo, no alcanzó significancia estadística. Es posible que esto se deba al tamaño de la muestra, aunque no podemos afirmarlo hasta analizar mayor número de casos.

El análisis de SG en pacientes con y sin sobreexpresión en subgrupos (género femenino, estadios III-IV, grado histológico 1 y 2 y CVB) no mostró diferencias en comparación con la SG en todos los pacientes, lo cual reafirma la hipótesis de c-MET como factor pronóstico, y sugiere que éste es independiente del género, estadio tumoral y grado de diferenciación histológica. En cuanto al origen anatómico, no podemos comparar los resultados entre CVB y CTV dado que este último está representado por cuatro casos solamente.

La sobreexpresión de c-MET evidenció una correlación estadísticamente significativa con el grado histológico ( $p=0.015$ ). La SG fue levemente mayor en casos con tumores con grado 1-2 respecto a tumores grado 3, pero esta diferencia fue claramente inferior a la diferencia de SG observada entre los pacientes con y sin sobreexpresión c-MET. Esto sugiere que la variable determinante de SG es la sobreexpresión c-MET y no el grado de diferenciación. Sin embargo, para confirmar esta observación deberíamos realizar una prueba multivariable, con mayor número de muestras.

La sobreexpresión de la proteína c-MET no se correlacionó con la respuesta tumoral ni con el tiempo a la progresión en pacientes tratados con quimioterapia. Esto indica que en nuestra serie, la tinción positiva para c-MET no tiene valor predictivo de respuesta a la quimioterapia.

En conclusión, nuestro estudio muestra que la sobreexpresión de c-MET puede tener valor pronóstico, e incluso ser un potencial blanco terapéutico en tumores biliares. En efecto, si la vía metabólica c-MET es decisiva para la supervivencia, invasión local, metástasis y proliferación tumoral, su inhibición tendría impacto positivo en la SG de

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

los casos con activación de esta vía manifestada por la sobreexpresión de c-MET.

**Conflicto de intereses:** Ninguno para declarar

### Bibliografía

1. Abriata MG, Roques LF, Macías G, Loria D. Atlas de Mortalidad por Cáncer en Argentina 2007-2011. Instituto Nacional del Cáncer. Ministerio de Salud de la Nación. En: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000869cnt-29-Atlas-de-mortalidadopt.pdf>; consultado el 12/8/2017.
2. Eckel F, Schmid RM. Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis of clinical trials. *Br J Cancer* 2007; 96:896-902.
3. Hezel AF, Zhu AX. Systemic therapy for biliary tract cancers. *Oncologist* 2008;13:415-23.
4. Yachimski P, Pratt DS. Cholangiocarcinoma: natural history, treatment, and strategies for surveillance in high-risk patients. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42:178-90.
5. Alberts SR, Al-Khatib H, Mahoney MR, et al. Gemcitabine, 5-fluorouracil, and leucovorin in advanced biliary tract and gallbladder carcinoma: a North Central Cancer Treatment Group phase III trial. *Cancer* 2005;103:111-8.
6. Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 2005; 16 Suppl 2:ii93-6.
7. Anderson CD, Pinson CW, Berlin J, Chari RS. Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *Oncologist* 2004; 9:43-57.
8. Wistuba II, Gazdar AF. Gallbladder cancer: Lessons from a rare tumor. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:695-706.
9. Thomas MB. Biological characteristics of cancers in the gallbladder and biliary tract and targeted therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 61:44-51.
10. Olnes MJ, Erlich R. A review and update on cholangiocarcinoma. *Oncology* 2004; 66:167-79.
11. Radaeva S, Ferreira-Gonzalez A, Sirica AE. Overexpression of c-NEU and c-MET during rat liver cholangio carcinogenesis: A link between biliary intestinal metaplasia and mucin-producing cholangiocarcinoma. *Hepatology* 1999; 29:1453-62.
12. Kiguchi K, Carbajal S, Chan K, et al. Constitutive expression of ErbB-2 in gallbladder epithelium results in development of adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:6971-6.
13. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000; 18:3651-64.
14. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, et al. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2008; 98:418-25.
15. Socoteanu MP, Mott F, Alpini G, Frankel AE. c-Met targeted therapy of cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14:2990-4.
16. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000; 19:5582-9.
17. Vigna E, Naldini L, Tamagnone L, et al. Hepatocyte growth factor and its receptor, the tyrosine kinase encoded by the c-MET proto-oncogene. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1994; 40:597-604.
18. Haura EB, Smith MA. Signaling control by epidermal growth factor and MET: rationale for cotargeting strategies in lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 4148-50.
19. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000; 19:5582-9.
20. García S, Dales JP, Charafe-Jauffret E, et al. Overexpression of c-Met and of the transducers PI3K, FAK and JAK in breast carcinomas correlates with shorter survival and neoangiogenesis. *Int J Oncol* 2007; 31:49-58.
21. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*

## Sobreexpresión de c-MET en carcinoma de vesícula y del tracto biliar: Prevalencia y correlación clínico-molecular

Gerardo Arroyo, Rodrigo Segovia, Carolina Ituarte, Sandra Rojo, Cristina Inklemona, Alejandro Salvatierra, Graciela Berlinghieri, Guillermo Bramuglia, Inés Bravo, Silvia Saucedo, Ernestina Pichelbauer, María Dionisio, Gerardo Vides Almonacid, Marcelo Montero Alvi, Sara Gonorasky, Emma Molina, Rogelio Lamas Godas, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, y Susana Rodríguez Prado

2003; 4:915-25.

22. Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* 2003; 88:408-17.
23. LeelawatK, LeelawatS, TepaksornP, et al. Involvement of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in cholangiocarcinoma cell invasion and its therapeutic inhibition with small interfering RNA specific for c-Met. *J Surg Res* 2006; 136:78-84.
24. Farazi PA, Zeisberg M, Glickman J, Zhang Y, Kalluri R, DePinho RA. Chronic bile duct injury associated with fibrotic matrix microenvironment provokes cholangiocarcinoma in p53-deficient mice. *Cancer Res* 2006; 66:6622-7.
25. Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos GK, Strom SC. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem* 2000; 275:8806-11.
26. Guo A, Villén J, Kornhauser J, et al. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:692-7.
27. Weinberger PM, Yu Z, Kowalski D, et al. Differential expression of epidermal growth factor receptor, c-Met, and HER2/neu in chordoma compared with 17 other malignancies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131:707-11.
28. Garcia S, Dales J, Charafe-Jauffret E, et al. Overexpression of c-Met and of the transducers PI3K, FAK and JAK in breast carcinomas correlates with shorter survival and neoangiogenesis. *Int J Oncol* 2007; 31:49-58.
29. Nakamura Y, Niki T, Goto A, et al. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. *Cancer Sci* 2007; 98:1006-13.
30. Herrera LJ, El-Hefnawy T, Queiroz de Oliveira PE, et al. The HGF receptor T c-Met is overexpressed in esophageal adenocarcinoma. *Neoplasia* 2005; 7:75-84.
31. Liu C, Park M, Tsao MS. Overexpression of c-met proto-oncogene but not epidermal growth factor receptor or c-erbB-2 in primary human colorectal carcinomas. *Oncogene* 1992; 7:181-5.
32. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, et al. C-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. *Cancer Res* 2007; 67:1670-9.
33. Kong DS, Song SY, Kim DH, et al. Prognostic significance of c-Met expression in glioblastomas. *Cancer* 2009; 115:140-8.
34. Suzuki K, Hayashi N, Yamada Y, et al. Expression of the c-met protooncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994; 20:1231-6.
35. Nakazawa J, Dobashi Y, Suzuki S, Fujii H, Takeda Y, Ooi A. Amplification and over-expression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancer. *J Pathol* 2005; 206: 356-65.
36. Heo MH, Kim HK, Lee H, et al. The clinical impact of c-MET over-expression in advanced biliary tract cancer (BTC). *J Cancer* 2017; 8: 1395-9.
37. Woo S, Park H, Lee H, et al. Co-expression of cox-2, c-Met and beta-catenin in cells forming invasive from of gallbladder cancer. *Cancer Res Treat* 2005; 37: 171-6.
38. Hida Y, Morita T, Fujita M, et al. Clinical significance of hepatocyte growth factor and c-Met expression in extrahepatic biliary tract cancers. *Oncol Rep* 1999; 6:1051-6.
39. Peruzzi B, Bottaro DP. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3657-60.