

INVESTIGACIÓN CLÍNICA APLICADA

ALTERACIONES MOLECULARES EN LOS CARCINOMAS EPIDERMOIDES DE LA OROFARINGE

J. P. RODRIGO TAPIA*, C. SUÁREZ NIETO*, P. SÁNCHEZ LAZO***, S. RAMOS ***, E. COTO**, V. ÁLVAREZ**, I. ÁLVAREZ ÁLVAREZ****, L. A. GARCÍA GONZÁLEZ*, J. A. MARTÍNEZ SÁNCHEZ****

* SERVICIO DE ORL Y ** LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR. HOSPITAL CENTRAL DE ASTURIAS.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. UNIVERSIDAD DE OVIEDO- INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS. *SERVICIO DE ORL. HOSPITAL DE LEÓN.

RESUMEN

En la mayoría de los estudios sobre alteraciones moleculares en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello no se realiza distinción entre las diferentes localizaciones de esta área. El objetivo de este estudio es describir las alteraciones moleculares propias de los carcinomas epidermoides de la orofaringe. Se estudian 29 carcinomas de orofaringe con un seguimiento mínimo de 36 meses. Las alteraciones moleculares analizadas fueron: la amplificación de la región 11q13 (en los 29 casos) y de los oncogenes MYC y ERBB1 (en 22 casos); la integración del virus del papiloma humano (HPV) tipos 6b y 16 (en 22 casos); las pérdidas de heterocigosidad de los genes

p53 y NAT2 (en 12 y 13 casos informativos, respectivamente); y el contenido celular de ADN (en 13 casos). Las alteraciones más comunes fueron las pérdidas de heterocigosidad de los genes p53 (67% de los casos) y NAT2 (54%), seguidas de la amplificación de 11q13 (49%). La amplificación del ERBB1 se encontró en el 14% de los casos, y la del MYC en sólo un caso (5%). El 23% de los casos presentaban integración del HPV. De los 13 casos analizados 9 (69%) eran aneuploides. La única alteración con posible significado pronóstico fue la amplificación de 11q13, con tendencia a asociarse con una mayor frecuencia de metástasis ganglionares y de recidiva tumoral.

PALABRAS CLAVE: Carcinoma epidermoide. Orofaringe. Oncogenes. Genes supresores de tumores.

ABSTRACT

MOLECULAR ALTERATIONS IN OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS

In most of the studies about molecular alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck there is not distinction between the different subsites of this area. The objective of this study is to describe the molecular alterations in squamous cell carcinomas of the oropharynx. Twenty-nine oropharyngeal carcinomas, with a minimum follow-up of 36 months, were studied. The molecular alterations analyzed were: the amplification of 11q13 region (in the 29 cases), and the MYC and ERBB1 oncogenes (in 22 cases); the integration of Human Papillomavirus (HPV) types 6b and 16 (in 22 cases); the loss of heterozygosity (LOH) of p53 and N-acetyl-

transferase-2 (NAT2) gene (in 12 and 13 informative cases, respectively); and the cellular DNA content (in 13 cases). The most frequent alterations found were the LOH at p53 (67%), and NAT2 (54%) locus, followed by 11q13 amplification (49%). ERBB1 amplification was found in 14% of the cases, and MYC amplification only in one (5%). Integration of the HPV was found in 23% of the cases. Nine (69%) of the 13 analyzed cases were aneuploid. The only alteration with a prognostic significance was 11q13 amplification that showed a tendency to be associated with a higher frequency of nodal metastases and tumor recurrence.

KEY WORDS: Squamous cell carcinoma. Oropharynx. Oncogenes. Tumor suppressor genes.

Correspondencia: Juan Pablo Rodrigo Tapia. C/ Fernández Ladreda 32 Esc. A 4ºB. 33011 Oviedo. E-mail: jrodrigo@seorl.org

Fecha de recepción: 4-4-2000

INTRODUCCIÓN

El cáncer surge de la proliferación clonal de una población de células que van acumulando alteraciones genéticas de una forma progresiva¹. Se han identificado una amplia variedad de genes implicados en el desarrollo y progresión tumorales en diferentes tipos de cánceres. Estas alteraciones genéticas presentan diferentes patrones según el tipo de tumor y la localización del mismo (por ejemplo, cáncer colorrectal, de mama, de pulmón, de vejiga, etc.), lo que podría explicar su diferente comportamiento biológico y clínico.

En los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, se han identificado también varios genes asociados con el desarrollo y progresión de estos tumores^{2,3}. En la mayoría de los estudios, se considera como un único tipo a todos los carcinomas epidermoides de la cabeza y el cuello. Sin embargo, aunque constituyen una entidad histopatológica, estos carcinomas se comportan de forma diferente según las diferentes localizaciones en esta área. Esto se refleja en las diferencias en los patrones de crecimiento, comportamiento clínico y pronóstico. Esta variabilidad en el comportamiento según la localización sugiere diferentes propiedades tumorales intrínsecas, y sería de esperar que las alteraciones genéticas responsables de esas propiedades reflejasen dichas diferencias. No obstante, las circunstancias anatómicas locales también han de tenerse en cuenta.

Por otra parte, las posibles implicaciones pronósticas de las alteraciones genéticas pueden verse influidas por el mayor o menor peso relativo de cada localización en

los diferentes estudios. Son por tanto necesarios estudios de localizaciones aisladas para poder extraer conclusiones pronósticas.

El objetivo de este estudio es describir las alteraciones genéticas en los carcinomas epidermoides de una localización específica, como es la orofaringe. Para ello, se han escogido algunas de las alteraciones más frecuentes descritas en la literatura^{2,3}, y de las que ya tenemos experiencia en su estudio: la amplificación de los oncogenes MYC, ERBB1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico), CCND1 (ciclina D1), FGF3 y FGF4 (relacionados con el factor de crecimiento fibroblástico), y EMS1 (cortactina); las pérdidas de heterocigosidad de los genes p53 y N-Acetiltransferasa-2 (NAT2); la integración del virus del papiloma humano (HPV); y el contenido celular de ADN. Además, se intenta establecer el posible valor pronóstico de dichas alteraciones en esta localización específica.

MÉTODOS

Pacientes

Se estudian 29 pacientes con carcinoma epidermoide de orofaringe intervenidos entre 1992 y 1995. En todos los casos se trataba de tumores primarios que no habían recibido tratamiento previamente. Todos los pacientes fueron intervenidos con intención curativa, y en todos ellos se obtuvieron márgenes quirúrgicos libres de neoplasia (se excluyeron previamente los que tuvieran márgenes afectados). En 19 casos se administró radioterapia postoperatoria (en general, se administró a los casos localmente avanzados y/o con metástasis ganglionares). Todos los pacientes eran varones, con una media de edad de 55,2 años (rango entre 38 y 74 años). Todos ellos tenían antecedentes de consumo habitual de tabaco y alcohol. Las características clínico-patológicas de los pacientes se muestran en la tabla 1. Los pacientes fueron estadificados según la clasificación de la Unión Internacional Contra el Cáncer (4^a Edición).

Obtención de las muestras y extracción del ADN

Las muestras tumorales fueron obtenidas en el momento de la intervención quirúrgica, congeladas inmediatamente y conservadas a -70°C hasta su procesamiento. Simultáneamente se obtuvo sangre periférica del paciente, manteniéndose a 4°C hasta la extracción del ADN de los leucocitos, lo cual se realizaba antes de 24 horas de la extracción.

El ADN de las muestras tumorales y de la sangre periférica fue obtenido siguiendo protocolos convencionales⁴.

Tabla 1: Características clínico-patológicas de los pacientes estudiados

Característica	Número de casos (%)
Estadio pT	
T1	1 (3)
T2	5 (17)
T3	8 (28)
T4	15 (52)
Estadio pN	
N0	9 (31)
N1	3 (10)
N2	14 (48)
N3	3 (10)
Estadio de la enfermedad	
I	1 (3)
II	1 (3)
III	6 (21)
IV	21 (73)
Grado de diferenciación	
Bien diferenciado	15 (52)
Moderadamente diferenciado	12 (41)
Pobremente diferenciado	2 (7)

Análisis de la amplificación oncogénica

El estudio de la amplificación de los oncogenes MYC, ERBB1, y los localizados en la región 11q13 (CCND1, FGF3, FGF4 y EMS1), se realizó mediante la PCR diferencial, tal como se describió previamente⁵. Brevemente, en cada reacción de PCR se emplearon simultáneamente dos pares de oligonucleótidos, uno para amplificar el gen a estudio y el otro para el gen de referencia, localizado en el mismo cromosoma que el primero. De esta manera

se evitan los falsos positivos debidos a duplicaciones cromosómicas. Como controles negativos se empleó ADN extraído de tejidos normales obtenidos en cirugía no oncológica (amigdalectomías). Los controles positivos se obtuvieron mezclando ADN de tejidos normales con cantidades conocidas de un fragmento del gen a estudio previamente amplificado por PCR, de manera que se podían simular diferentes grados de amplificación. De cada reacción de PCR, 10 µl fueron sometidos a electroforesis en geles de Agarosa al 3%. Las bandas correspondientes a

Tabla 2: Resultados de las alteraciones genéticas estudiadas y evolución de los pacientes

Paciente	Edad	Estado	Diferenciación	CCND1	FGF3	FGF4	EMS1	ERBB1	MYC	P53	NAT2	HPV	Ploidía	Evolución
1	68	T4N3	M	-	-	-	+	-	-	-	-	-	A	MOC, 14 m
2	63	T4N2	M	-	-	-	+	+	-	-	-	-	A	MT, 15m
3	46	T3N2	M	-	+	+	-	-	-	-	-	-	A	VST, 73m
4	70	T2N2	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	MOC, 3m
5	44	T3N1	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	MT, 11m
6	54	T4N1	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT, 9 m
7	54	T4N2	B	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	MT, 3 m
8	43	T2N2	P	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	MT, 30 m
9	38	T4N2	B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	D	VST, 68 m
10	53	T3N2	B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	A	MT, 6 m
11	63	T3N0	B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	D	MOC, 1 m
12	63	T4N3	B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D	MT, 16 m
13	63	T4N2	M	+	-	-	+	-	-	+	-	-	A	MT, 7 m
14	49	T2N2	M	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	MT, 19 m
15	51	T4N0	P	-	-	-	-	-	-	+	-	-	A	MOC, 21 m
16	42	T4N2	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT, 18 m
17	62	T3N2	B	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	MT, 14 m
18	42	T2N1	B	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	MT, 9 m
19	57	T4N2	M	-	-	-	-	-	-	+	-	+	A	VST, 55m
20	53	T4N2	B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	D	MOC, 7 m
21	71	T3N0	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MT, 16 m
22	64	T3N0	B	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	VST, 38 m
23	63	T3N0	M	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	MT, 6 m
24	74	T4N2	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MOC, 1 m
25	72	T4N0	B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	MT, 28 m
26	42	T2N0	B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	VST, 36 m
27	48	T4N0	M	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	VST, 43 m
28	42	T4N3	M	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	MT, 7 m
29	48	T1N0	B	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	MOC, 29 m

Diferenciación histológica: B, bien diferenciado; M, moderadamente diferenciado; P, pobremente diferenciado. El signo positivo (+) indica la existencia de amplificación oncogénica, de pérdida de heterocigosidad, o de integración del HPV. El signo negativo (-) indica la ausencia de amplificación oncogénica, de pérdida de heterocigosidad, o de integración del HPV. Ploidía: D, diploide; A, aneuploide. Evolución de paciente: VST, vivo sin tumor; MT, muerto con el tumor; MOC, muerto por otra causa sin evidencia de tumor

Tabla 3: Relación entre las diferentes alteraciones genéticas, los parámetros clínico-patológicos, y la evolución de la enfermedad

	Estadio T		Estadio N		Recidiva*	
	T1-T3	T4	N0	N+	No	Sí
CCND1						
Amplificado	2 (40%)	3 (60%)	1 (20%)	4 (80%)	0	5 (100%)
No amplificado	12 (50%)	12 (50%)	8 (33%)	16 (67%)	4 (21%)	15 (79%)
P	0,93		0,95		0,65	
FGF3/FGF4						
Amplificados	5 (63%)	3 (37%)	2 (25%)	6 (75%)	2 (25%)	6 (75%)
No amplificados	9 (43%)	12 (57%)	7 (33%)	14 (67%)	2 (13%)	14 (87%)
P	0,60		0,98		0,84	
EMS1						
Amplificado	2 (29%)	5 (71%)	2 (29%)	8 (89%)	0	7 (100%)
No amplificado	12 (55%)	10 (45%)	10 (36 %)	18 (64%)	9 (37%)	15 (63%)
P	0,44		0,75		0,52	
ERBB1						
Amplificado	1 (17%)	2 (33%)	1 (17%)	5 (83%)	1 (25%)	3 (75%)
No amplificado	5 (33%)	6 (40%)	7 (47%)	8 (53%)	3 (27%)	9 (73%)
P	0,95		0,94		1	
p53						
Pérdida alélica	4 (50%)	4 (50%)	3 (37%)	5 (63%)	1 (14%)	6 (86%)
No pérdida alélica	2 (50%)	2 (50%)	1 (25%)	3 (75%)	0	2 (100%)
P	0,54		0,82		0,47	
NAT2						
Pérdida alélica	5 (71%)	2 (29%)	3 (43%)	4 (57%)	1 (14%)	6 (86%)
No pérdida alélica	2 (25%)	4 (75%)	1 (17%)	5 (83%)	1 (25%)	3 (75%)
P	0,41		0,67		0,71	
HPV						
Positivo	3 (60%)	2 (40%)	1 (20%)	4 (80%)	1 (25%)	3 (75%)
Negativo	8 (47%)	9 (53%)	3 (18%)	14 (82%)	2 (14%)	12 (86%)
P	0,9		0,59		0,80	
Ploidía						
Diploides	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (33%)	2 (67%)
Aneuploides	4 (44%)	5 (56%)	1 (11%)	8 (89%)	2 (25%)	4 (75%)
P	0,96		0,84		0,45	

* Se incluyen las recidivas loco-regionales y las metástasis a distancia. Los casos muertos por otra causa o perdidos fueron eliminados del análisis.

los productos de la PCR fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta, fotografiadas con una película Polaroid 667, y cuantificadas mediante técnicas de análisis de imagen (Bio Image, Millipore).

Análisis de las pérdidas alélicas en genes supresores de tumores

Las pérdidas alélicas o pérdidas de heterocigosidad (LOH) del gen p53 (localizado en 17p13) fueron estudiadas mediante el análisis de marcadores microsatélites intragénicos al locus p53, también tal como se describió previamente⁶. Los microsatélites (dinucleótidos repetidos)

fueron amplificados mediante PCR, y los productos de esta fueron separados mediante electroforesis en geles de acrilamida al 6%. En el caso del gen de la N-acetiltransferasa-2 (NAT2, localizado en 8p21-23) el estudio se realizó mediante el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen⁷. Los fragmentos del NAT2 donde asientan los polimorfismos de restricción fueron amplificados mediante PCR; los productos de la PCR fueron digeridos con enzimas específicos (KpnI para el polimorfismo del nucleótido 481 y TaqI para el del nucleótido 590) y sometidos a electroforesis en geles de acrilamida al 6%. Tanto en el caso del p53 como en el del NAT2, los geles fueron secados y autorradiografiados. Los patrones autorradiográficos fueron analizados

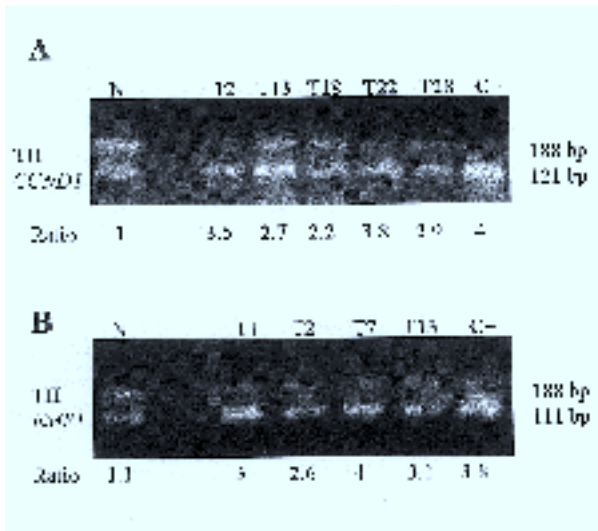


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR diferencial de los genes CCND1 (A) y EMS1 (B). El gen control empleado en este caso fue el de la tirosina-hidroxilasa (TH). N representa los controles con ADN de tejido normal, C+ los controles positivos, y bp pares de bases.

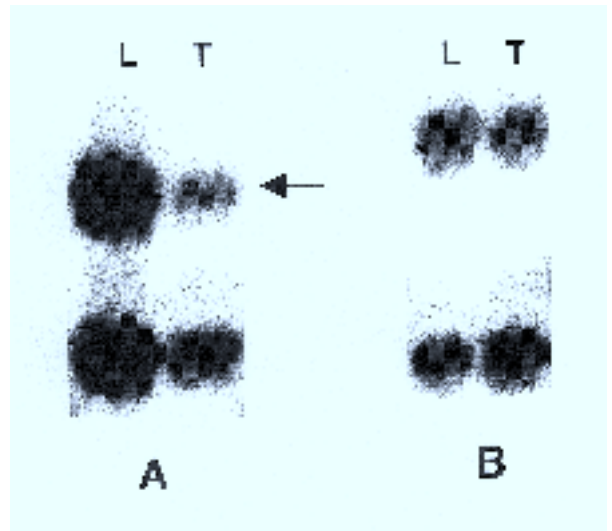


Figura 2. Autorradiografía de la electroforesis en gel de acrilamida de los productos de la PCR empleada para amplificar los marcadores microsatélites de los locus p53 en un caso con pérdida de heterocigosidad (A) y otro normal (B). La flecha indica la reducción de la señal correspondiente a uno de los alelos en el ADN tumoral (T) comparado con el ADN de sangre periférica (L).

mediante densitometría, y se consideró como pérdida de heterocigosidad una reducción en la señal de más del 80% en uno de los alelos de la muestra tumoral.

Análisis de la integración del HPV

La integración del virus del papiloma humano (en concreto los tipos 16 y 6b) en las células tumorales se estudió mediante la detección del genoma vírico por PCR⁸. Se amplificaron los genes E6 y L1 de los HPV-6b y 16 con cebadores específicos para los mismos. Como control positivo utilizamos el ADN vírico, clonado en el plásmido bacteriano pBR322. El control negativo en cada caso consistió en mezclas de reacción en las que se omitió el ADN. El ADN amplificado se visualizó mediante electroforesis en un gel de Agarosa al 2%. Comparando las bandas obtenidas con el control positivo y marcadores de tamaño molecular identificamos los casos positivos, es decir, aquellos que contenían el ADN del virus. La ausencia de detección del gen L1, que sólo está presente cuando el virus se está replicando activamente, indica los casos en que el HPV está integrado en el genoma celular, y que no se trata de una infección.

Análisis del contenido celular de ADN

Tras la disgregación mecánica de las muestras tumorales en PBS, éstas fueron filtradas por una malla de nylon de 100 µm y posteriormente centrifugadas. El sedimento

obtenido fue digerido con tripsina durante 10 min, filtrado por una malla de nylon de 50 µm y teñido con yoduro de propidio. Las muestras así preparadas fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson). Como controles de contenido normal (diploide) de ADN fueron empleados linfocitos humanos normales. El contenido de ADN de las muestras tumorales fue establecido por comparación con el de los controles normales, empleando el Índice de ADN, que fue calculado como la razón entre los picos G0/G1 del histograma de ADN del tumor y de los controles (el pico G0/G1 representa las células que no se encuentran sintetizando ADN). Por definición el Índice de ADN del control normal es de 1, considerándose por tanto diploides las muestras con Índice de ADN igual a 1. Índices de ADN superiores a 1 fueron considerados aneuploides. Los residuos, núcleos y agregados celulares que no pudieron filtrarse fueron eliminados instrumentalmente.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el test de chi-cuadrado, con la corrección de Yates cuando era preciso, con la ayuda del programa informático Stat View II (Abacus Concepts) en un ordenador MacIntosh IIci (Apple Computer). Los pacientes fueron seguidos un mínimo de 36 meses. Los valores de $P \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

En la tabla 2 se muestran los resultados de las alteraciones moleculares estudiadas en los 29 casos y la evolución de los pacientes. La amplificación de los oncogenes localizados en la región 11q13 (CCND1, FGF3, FGF4, y EMS1) fue estudiada en los 29 casos, hallándose amplificado al menos uno de ellos en el 49% de los casos (13/29 casos). Específicamente, el gen CCND1 se halló amplificado en 5 casos (17%), el FGF3 en 8 casos (28%), el FGF4 en 4 casos (14%), y el EMS1 en 7 casos (24%). En la mayor parte de los casos estos genes se hallan coamplificados, especialmente los genes FGF3 y FGF4 (al ser los más próximos en el amplicón 11q13). La amplificación de los oncogenes ERBB1 y MYC fue estudiada en 22 casos, hallándose amplificados en el 14% (3/22 casos) y el 5% (1/22 casos) respectivamente. De los 29 casos, 12 eran informativos (heterocigotos) para el gen p53, presentando pérdida de heterocigosidad 8 de ellos (67%). Trece casos eran informativos para el gen NAT2, habiendo pérdida de heterocigosidad en el 54% de ellos (7 casos). En 22 casos se analizó la integración del HPV, hallándose la misma presente en 5 casos (4 casos con el tipo 6b y 1 con el tipo 16). En 7 de los casos se disponía de información de todas las alteraciones genéticas estudiadas, existiendo al menos 1 de las mismas en todos ellos (1 alteración en 2 casos, 2 alteraciones en otros 2, 2 alteraciones en otros 2 más, y 6 en otro). En trece casos se estudió el contenido celular de ADN, siendo 4 de ellos diploides (31%) y 9 aneuploides (69%). En las figuras 1 y 2 se muestran ejemplos representativos de los resultados de la PCR diferencial y de los análisis de pérdida de heterocigosidad.

La relación entre las alteraciones genéticas estudiadas y los diferentes parámetros clínico-patológicos se resume en la tabla 3 (la amplificación de los genes FGF3 y FGF4 se considera simultáneamente al hallarse coamplificados en la mayoría de los casos). Debido al tamaño de la muestra, las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ningún caso, pero sí se pueden apreciar ciertas tendencias. En cuanto al tamaño del tumor (estadio T), la amplificación oncogénica muestra una tendencia a esta asociación con estadios avanzados. En las otras alteraciones estudiadas no se apreció relación con el tamaño tumoral, observándose incluso que las pérdidas de heterocigosidad del NAT2 eran más frecuentes en los estadios iniciales. Los casos con amplificación de los genes de la región 11q13 mostraron una mayor incidencia de metástasis ganglionares. No presentaron relación con el estadio ganglionar las otras alteraciones genéticas analizadas.

De los 29 pacientes, 23 fallecieron: 16 por el tumor y 7 por otras causas no relacionadas con este (tabla 2). Seis pacientes permanecen vivos y sin evidencia de enfermedad entre 36 y 73 meses (media, 52,1 meses). Los

pacientes que fallecieron por causas no relacionadas con el tumor fueron excluidos del análisis de las recidivas tumorales. De los 22 pacientes restantes, 18 (83%) presentaron recidiva (16 casos con recidivas locoregionales y 2 con metástasis a distancia). El análisis estadístico no muestra ninguna correlación entre las alteraciones genéticas aisladas y las recidivas tumorales (tabla 3), aunque la amplificación de los genes CCND1 y EMS1 presenta una clara tendencia a asociarse con un peor pronóstico, aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas, nuevamente debido a un insuficiente número de casos con amplificación.

DISCUSIÓN

Dado que el comportamiento clínico de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello depende notablemente de su localización, es cuestionable incluir a todas las localizaciones dentro de una sola entidad. La diferente agresividad de los tumores originados en distintas localizaciones podría ser debida, además de a factores anatómicos locales, a diferencias en las alteraciones moleculares existentes en cada localización. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre alteraciones genéticas en los carcinomas de cabeza y cuello no hacen distinción entre las diferentes localizaciones, siendo escasos los trabajos sobre localizaciones aisladas, y más aún los que analizan varias alteraciones simultáneamente. Nuestros resultados muestran que la frecuencia de las alteraciones genéticas estudiadas es semejante, a las encontradas en estudios previos que incluían todas las localizaciones de la cabeza y el cuello^{2,3}.

La amplificación de la región 11q13 se ha descrito en el 20-50% de los carcinomas de cabeza y cuello⁹⁻¹⁴, siendo la activación oncogénica más frecuente en estos carcinomas. Nuestra tasa de amplificación (el 49% de los casos) es concordante con estos estudios. Esta elevada frecuencia de amplificación de la región 11q13 podría explicar en parte la agresividad de los tumores de esta localización, al haber sido relacionada en varios trabajos con la presencia de metástasis ganglionares, mayor agresividad local y una superior incidencia de recidivas tumorales^{11,12,15}.

El oncogen MYC se ha encontrado amplificado en los carcinomas de cabeza y cuello con frecuencias que oscilan entre el 4 y el 15%¹⁶⁻¹⁸. En nuestro estudio hallamos únicamente un caso amplificado (5%). Se ha descrito que la amplificación del MYC se asocia a estadios locales avanzados, tal como sucedía en nuestro caso.

El oncogen ERBB1, que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se ha encontrado amplificado entre el 7 y el 25% de los casos según las series^{5,16,19-21}. Al igual que sucedía en los casos anteriores, la frecuencia hallada en nuestro estudio (14%) es concor-

dante con estas cifras. La amplificación de este gen se asoció además en nuestro trabajo con estadios locales avanzados (aunque no llegó a ser estadísticamente significativa), lo cual ya habíamos descrito en un estudio más amplio sobre todas las localizaciones⁵.

El porcentaje de casos que presentan pérdida de heterocigosidad del p53 en nuestro estudio (8/12, 67%) se encuentra en el rango de lo descrito en la literatura para los carcinomas de cabeza y cuello en general, aproximadamente la mitad de los cuales presentan esta alteración^{6,22-26}. Al igual que en nuestro estudio, estos trabajos previos no han demostrado una asociación entre la inactivación del p53 y las características clínico-patológicas del tumor. Tampoco se ha descrito una asociación con el pronóstico, lo cual es congruente con el papel atribuido al gen p53 en la carcinogénesis de cabeza y cuello: el gen p53 participaría en los estadios iniciales de la transformación maligna, no favoreciendo la progresión de los carcinomas ya establecidos²⁷.

El gen NAT2 se halla localizado en la región cromosómica 8p21-23, la cual se ha encontrado frecuentemente deletada en los carcinomas de cabeza y cuello^{22,23,28-30}. La enzima codificada por este gen (la N-acetiltransferasa-2) metaboliza las aminas aromáticas, actuando así como detoxificante de diversos carcinógenos, como los del tabaco, funcionando como enzimas de fase II. La disminución de la capacidad metabólica de estas enzimas se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar carcinomas de cabeza y cuello en individuos fumadores⁷. Esto podría explicarse por un mayor riesgo de sufrir mutaciones en los oncogenes y genes supresores de tumores en estos individuos con una capacidad detoxificadora reducida. De esta forma, el gen NAT2 se comportaría como un gen supresor de tumores, siendo candidato a ser uno de los posibles genes supresores de tumores localizados en la región 8p21-23. En este trabajo hemos hallado la pérdida de heterocigosidad del NAT2 en el 54% de los casos, lo cual descarta que se deba a pérdidas genéticas aleatorias debidas a inestabilidad cromosómica generalizada (se consideran como tales las inferiores al 20%).

El virus del papiloma humano (HPV) ha sido hallado en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello con una frecuencia variable en los estudios hasta ahora realizados, que va del 10% al 80%, aunque en las series con mayor número de pacientes el porcentaje de casos positivos se encuentra alrededor del 20%^{7,31-33}. En este trabajo encontramos una frecuencia de integración del gen E6 de los HPV 16 y 6b del 23%, en concordancia por tanto con lo previamente descrito. También en concordancia con estos trabajos, la integración del HPV no se correlacionó con los parámetros clínico-patológicos.

Con relación al significado pronóstico de estas alteraciones genéticas, hemos hallado un posible significado pronóstico únicamente a dos de ellas: la amplificación de los genes

CCND1 y EMS1 se asocia con una mayor frecuencia de recidivas tumorales (100% en los casos con amplificación). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente por un insuficiente número de casos con amplificación. La amplificación de la región 11q13, en la cual se localizan estos genes, ha sido previamente relacionada con un peor pronóstico en los carcinomas de cabeza y cuello^{11,12}. Sin embargo, dichos estudios previos no han analizado la diferente contribución de los genes presentes en el amplicón 11q13 al pronóstico. Actualmente se acepta que los oncogenes activos de dicha región son precisamente estos dos: el CCND1 (que codifica la ciclina D1) y el EMS1 (que codifica la cortactina, una proteína del citoesqueleto). La amplificación del CCND1 ha sido relacionada con un peor pronóstico en algunos estudios que analizaban dicho gen aisladamente^{15,34}, sin embargo no ha habido estudios que analizaran el gen EMS1 de forma individual. La función normal de las proteínas codificadas por los genes CCND1 y EMS1 explicaría su papel oncogénico cuando se desregulan y su posible significado pronóstico. Así, la amplificación de la ciclina D1 favorecería la proliferación celular por sus efectos en el punto de control G1/S del ciclo celular, mientras que la de la cortactina estaría implicada en el potencial metastásico e invasivo de las células por sus efectos sobre el citoesqueleto y las estructuras de adhesión celular³⁵. No obstante son necesarios estudios con un mayor número de casos para confirmar estos hallazgos.

En cuanto al porcentaje de tumores aneuploides hallado en nuestro estudio (69%) es igualmente concordante con los descritos previamente, que variaban del 48% al 76%³⁶⁻⁴⁰. Sin embargo, la relación de la ploidía con el pronóstico ha mostrado resultados variables. Así, algunos autores señalan un peor pronóstico para los pacientes con tumores aneuploides^{36,38}, mientras que otros hallan resultados opuestos, con una mayor tasa de metástasis y un peor pronóstico para los tumores diploides^{37,40}. Nuestros resultados muestran que los tumores con contenido aneuploide de ADN tienden a presentar más metástasis ganglionares y mayor número de recidivas, si bien las diferencias obtenidas no fueron significativas, probablemente debido al pequeño número de casos.

En conclusión, estos resultados confirman la teoría de que múltiples alteraciones genéticas son necesarias para la progresión del cáncer. Son necesarios estudios más amplios de localizaciones aisladas (como por ejemplo en este caso la orofaringe) para tratar de identificar el patrón de estas alteraciones que pueda ser aplicable al tratamiento de estos tumores, tanto desde el punto de vista pronóstico como para diseñar nuevas terapias.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo en el laboratorio de los autores ha sido financiado por el FIS con las ayudas 94/0400 y 97/1092.

REFERENCIAS

- 1.- Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49: 3713-3721
- 2.- Lazo PS, Rodrigo JP. Mecanismos moleculares del cancer. Bases moleculares de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. En "Libro del Año de Otorrinolaringología 1998". C. Suárez, Ed. Ed. Saned, Madrid, 1998. Pp 9-30.
- 3.- Oh Y, Mao L. Biomarkers in head and neck carcinoma. *Curr Opin Oncol* 1997; 9: 247-256.
- 4.- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY (USA). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 5.- Rodrigo JP, Ramos S, Lazo PS, Álvarez I, Suárez C. Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2004-2010.
- 6.- González MV, Pello MF, López-Larrea C, Suárez C, Menéndez MJ, Coto E. Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1043-1049.
- 7.- González MV, Álvarez V, Pello MF, Menéndez MJ, Suárez C, Coto E. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *J Clin Pathol* 1998; 51: 294-298.
- 8.- Álvarez I, Lazo PS, Ramos S, Rodrigo JP, Núñez F, Suárez C. Using polymerase chain reaction to Human Papillomavirus in oral and pharyngolaryngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol* 1997; 18:375-381.
- 9.- Williams ME, Gaffey MJ, Weiss LM, Wilczynski SP, Schuurig E, Levine PA. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg* 1993; 119: 1238-1243.
- 10.- Fortin A, Guerry M, Guerry R, et al. Chromosome 11q13 gene amplifications in oral and oropharyngeal carcinomas: no correlation with subclinical lymph node invasion and disease recurrence. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1609-1614.
- 11.- Alavi S, Namazie A, Calcaterra TC, Wang MB, Srivatsan ES. Clinical application of fluorescence in situ hybridization for chromosome 11q13 analysis in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1999; 109: 874-879.
- 12.- Meredith SD, Levine PA, Burns JA, et al. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 790-794.
- 13.- Muller D, Millon R, Liderau R, et al. Frequent amplification of 11q13 DNA markers is associated with lymph node involvement in human head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1994; 30B: 113-120.
- 14.- Muller D, Millon R, Velten M, et al. Amplification of 11q13 DNA markers in head and neck squamous cell carcinomas: correlation with clinical outcome. *Eur J Cancer* 1997; 33A: 2203-2210.
- 15.- Akervall JA, Michalides RJAM, Mineta H, et al. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* 1997; 79: 380-389.
- 16.- Leonard JH, Kearsley JH, Chenevix-Trench G, Hayward NK. Analysis of gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1991; 48: 511-515.
- 17.- Merritt WD, Weissler MC, Turk BF, Gilmer TM. Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 116: 1394-1398.
- 18.- Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S, Álvarez I, Suárez C. MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 504-507.
- 19.- Irish JC, Bernstein A. Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1993; 103: 42-52.
- 20.- Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, et al. Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 1989; 59: 559-562.
- 21.- Rikimaru K, Tadokoro K, Yamamoto T, Enomoto S, Tsuchida N. Gene amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1992; 14: 8-13.
- 22.- Li X, Lee NK, Ye YW, et al. Allelic loss at chromosomes 3p, 8p, 13q, and 17p associated with poor prognosis in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1524-1529.
- 23.- Ransom DT, Leonard JH, Kearsley JH, et al. Loss of heterozygosity studies in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck* 1996; 18: 248-253.
- 24.- Gleich LL, Li YQ, Biddinger PW, et al. The loss of heterozygosity in retinoblastoma and p53 suppressor genes as a prognostic indicator for head and neck cancer. *Laryngoscope* 1996; 106:1378-1381.
- 25.- Nogueira CP, Dolan RW, Gooley J, et al. Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1998; 108: 345-350.
- 26.- Gleich LL, Li YQ, Wang X, Stambrook PJ, Gluckman JL. Variable genetic alterations and survival in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125:949-952.
- 27.- Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488-2492.
- 28.- El-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, Luna MA, Goepfert H, Huff V. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 2656-2659.
- 29.- Scholnick SB, Haughey BH, Sunwoo JB, et al. Chromosome 8 allelic loss and the outcome of patients with squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1676-1682.
- 30.- Wu CL, Roz L, Sloan P, et al. Deletion mapping defines three discrete areas of allelic imbalance on chromosome arm 8p in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20: 347-353.
- 31.- Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H, et al. Detection of Human Papillomavirus DNA in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas by Polymerase Chain Reaction. *Laryngoscope* 1990; 100:647-650.
- 32.- Niedobitek G, Pitteroff S, Herbst H, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in carcinomas of the palatine tonsil. *J Clin Pathol* 1990; 43:918-921.
- 33.- Ishibashi T, Matsushima S, Tsunokawa Y, et al. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 116: 294-298.
- 34.- Nogueira CP, Dolan RW, Gooley J, et al. Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1998; 108: 345-350.
- 35.- Schuurig E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes – a review. *Gene* 1995; 159: 83-96.
- 36.- Holm LE. Cellular DNA amounts of squamous cell carcinomas of the head and neck region in relation to prognosis. *Laryngoscope* 1982; 92:1064-1069.
- 37.- Goldsmith MM, Cresson DS, Postma DS, Askin FB, Pillsbury HC. Significance of ploidy in laryngeal cancer. *Am J Surg* 1986; 152: 396-402.
- 38.- Guo YC, DeSanto L, Osetinsky GV. Prognostic implications of nuclear DNA content in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 100: 95-98.
- 39.- El-Naggar AK, Lopez-Varela V, Luna MA, Weber RA, Batsakis JG. Intratumoral DNA content heterogeneity in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 118:169-173.
- 40.- Burgio DL, Jacobs JR, Maciorowski Z, Alonso MM, Pietraszkiewicz H, Ensley JF. DNA ploidy of primary and metastatic squamous cell head and neck cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 118: 185-187.