



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Estudi de les alteracions genètiques i moleculars implicades en el carcinoma escatós oral

Tesi Doctoral presentada per
Gemma Martín i Ezquerra

Per aspirar al grau de Doctora en Medicina

Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona

Director: Ramon M Pujol i Vallverdú

Tutor: Agustí Toll i Abelló

2011

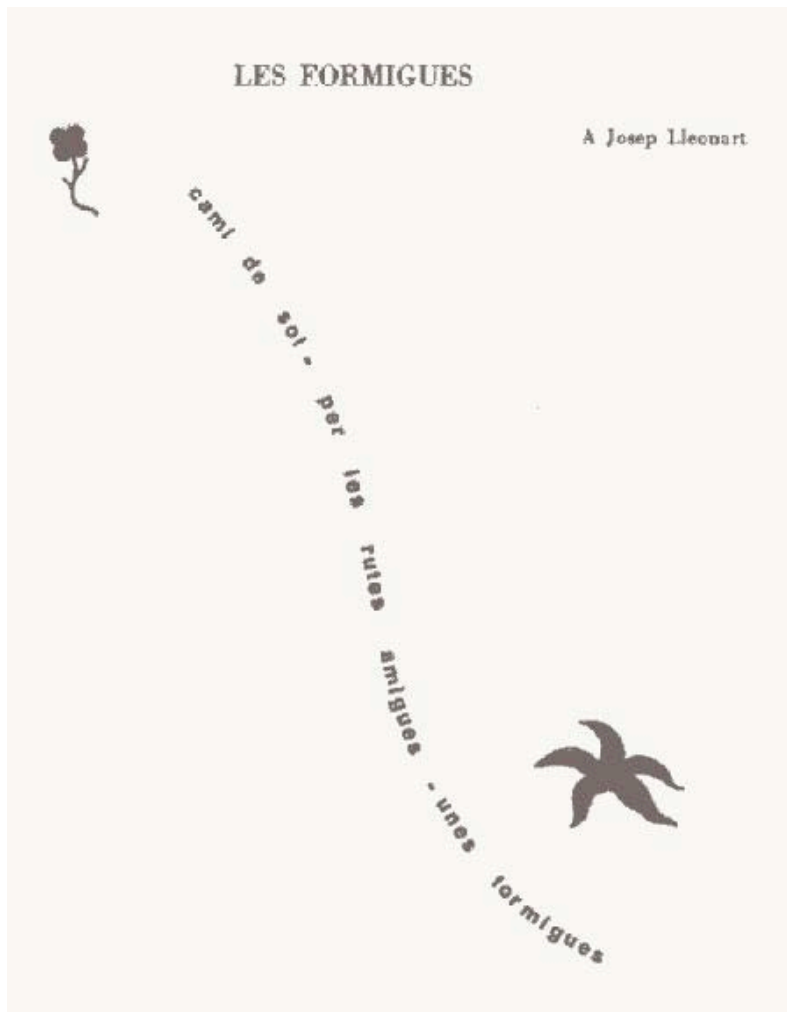
El Dr. Ramon M Pujol Vallverdú, Professor Titular de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap del Servei de Dermatologia de l'Hospital del Mar de Barcelona, certifica:

Que la memòria que duu per títol "Estudi de les alteracions genètiques i moleculars implicades en el carcinoma escatós oral", presentada per Gemma Martín i Ezquerra, llicenciada en Medicina per la Universitat de Barcelona, per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia, ha estat realitzada sota la meua direcció. Havent-la considerada finalitzada, n'autoritzo la presentació per a ésser jutjada pel tribunal escaient.

I per a què així en quedi constància als efectes oportuns, signo la present a Barcelona, el 10 d'abril del 2011.

Dr. Ramon M Pujol Vallverdú

Professor Titular de Medicina



Cal·ligrama de Joan Salvat-Papasseit

Als meus pares, Vicenç i Carme, i a la meva germana Marta,
perquè tot el que he assolit és gràcies a ells

AGRAÏMENTS

La realització d'aquest treball no hagués estat possible sense l'ajuda, col·laboració i entrega desinteressada de molts companys i companyes, alguns ja amics, que em van engrescar en aquest projecte. Poso per escrit alguns dels sentiments sentits durant el període en què aquest treball ha pres forma:

En primer lloc, vull mostrar el meu respecte i agraïment pel Dr. Ramon Pujol, que em va atorgar la confiança de treballar amb ell i que m'ajuda cada dia a ser millor dermatòloga.

Com a tutor d'aquesta tesi he gaudit del Dr. Agustí Toll. Valoro els seus consells, correccions, discussions, i sobretot, els ànims en els moments de dubte.

A la Blanca Espinet i Rocío Salgado, que m'han ensenyat a gaudir de la citogenètica, i m'han guiat en aquest camí tortuós del FISH. Sense elles, aquest projecte no hagués pogut ni imaginar-se.

A la Montse Gilaberte, per les estones compartides al laboratori i el seu suport.

A tots els membres del servei de Dermatologia de l'Hospital del Mar: Dr. Fernando Gallardo, Dra. Anna Giménez, Dra. Júlia Sànchez, Dr. Josep Herrero, Dra. Sònia Segura, Dr. Xavier Jeremías, Dr. Mariano Vélez, Dra. Jose Tribó, Dra. Marta Ferran, Dra. Bet Parera, Dr. Alex Fernández, Dra. Imma Gil i Dra Estela Martínez. He après tantes coses amb ells! No em puc imaginar un equip millor.

A tots els membres del servei de Patologia i Citogenètica de l'Hospital del Mar, que han hagut de resoldre les meves preguntes i dificultats tècniques. Vull agrair especialment el suport de la Marta Salido, la Teresa Baró, la Belén Lloveras i la Bea Belosillo; ha estat un luxe gaudir del seu suport!

Al Dr. Manuel Sánchez-Regaña, que em va ensenyar el rigor en la medicina i a estimar la dermatologia. Faig extensiu l'agraïment a la Rosa Ojeda, el Jaume Massana i l'Enrique Herrera, pel lloc que ocupen al meu cor; i a la resta d'adjunts i amics del Sagrat Cor.

A la Nayra, sempre present.

I finalment, al Cèsar, el millor metge que conec, i amb el que tinc la sort de compartir els dies.

PRESENTACIÓ

La present Tesi Doctoral s'estructura seguint les directrius de la normativa per a la presentació de tesis doctorals, aprovada pel consell del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Els estudis que conformen aquesta Tesi Doctoral pertanyen a una mateixa línia d'investigació, destinada a avaluar la presència i implicació de diverses alteracions genètiques i moleculars en la patogènia del carcinoma escatós oral.

Els resultats d'aquests estudis han aportat informació rellevant en aquest camp, i han estat recollits en 2 articles originals publicats a revistes internacionals, amb un índex d'impacte global de 6,66.

INDEX

PRESENTACIÓ	pàg. 11
1. ABREVIATURES	pàg. 15
2. RESUM	pàg. 17-19
3. INTRODUCCIÓ	pàg. 21-39
3.1. Generalitats del Carcinoma Escatós Oral	pàg. 21-22
3.2. El cicle cel·lular normal	pàg. 23-25
3.3. Alteracions genètiques descrites en el CEO	pàg. 26-28
3.4. Tècniques utilitzades per al diagnòstic d'alteracions genètiques	pàg. 29-36
3.5. Micromatriu de teixits	pàg. 37-39
4. HIPÒTESI I OBJECTIUS	pàg. 41-42
5. MATERIAL I MÈTODES	pàg. 43-52
5.1. Material	pàg. 43-45
5.2. Mètodes	pàg. 46-52
5.2.1. Micromatriu de teixits	pàg.46
5.2.2. Estudi Immunohistoquímic	pàg. 47-50
5.2.3. Estudi per Hibridació in situ fluorescent	pàg. 50-51
5.2.4. Anàlisi estadística	pàg. 52
6. RESULTATS	pàg. 53-69
7.DISCUSSIÓ	pàg. 71-84

8.LIMITACIONS	pàg. 85-87
9. CONCLUSIONS	pàg. 89-90
10. PRESENTACIONS A CONGRESSOS	pàg. 91
11. PREMIS	pàg. 93
12. BIBLIOGRAFIA	pàg. 95-107
13. ANNEXES	
Annex I: Protocol tècnica immunohistoquímica en mostres en parafina	pàg. 108-109
Annex II: Protocol tècnica de FISH sobre mostres en parafina	pàg. 110-112
Annex III: Publicació 1 ^a	pàg. 113-118
Annex IV: Publicació 2 ^a	pàg. 118-124

1. ABREVIATURES

CEO: Carcinoma escatós oral

CDK: quinases depenents de ciclina

HCG: *comparative genomic hybridization*, hibridació genòmica comparada

Col: col·laboradors

FISH: hibridació in situ fluorescent

IHQ: immunohistoquímic/a

LKO: leucoplàsia oral

LPO: líquen pla oral

TMA: micromatriu de teixits

VPH: virus del papil·loma humà

2. RESUM

Introducció i objectius

L'oncogènesi en la cavitat oral és deguda a l'acumulació d'alteracions genètiques, epigenètiques i metabòliques, que ocasionen un procés de transformació gradual des d'una mucosa oral normal a una mucosa displàsica, i posteriorment a un carcinoma escatós invasiu, normalment com a resultat de l'exposició a diversos factors ambientals (begudes alcohòliques, tabac, virus del papil·loma humà, etc.). El nombre d'alteracions cromosòmiques sembla que augmentaria durant la progressió del càncer. S'han descrit diferents alteracions citogenètiques en el carcinoma escatós oral (CEO) que inclouen anormalitats del cromosoma Y, l'activació de proto-oncogens com ciclina D1 (*CCND1*), *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2)*, *neuro/glioblastoma derived oncogene homolog-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)*, *RAS p21 protein activator (RAS)*, *epidermal growth factor receptor (EGFR)* i la inactivació de gens supressors tumorals com *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)* i tumor protein p53 (*TP53*).

L'objectiu de l'estudi que presentem és la descripció de les alteracions genètiques i d'expressió proteica de *CCND1*, *MYC*, *EGFR*, *CKS1B*, *ERBB2* i el supressor tumoral *TP53* en mostres de CEO i metàstasis ganglionars i comparar-ho amb mucosa oral sana, amb lesions inflamatòries orals (liquen pla oral [LPO]) i lesions pre-malignes com la leucoplàsia oral (LKO).

Mètodes

Hem inclòs 108 mostres de biòpsies corresponents a 14 mucoses orals normals, 51 mostres de CEO, 14 metàstasis ganglionars, 13 LPO i 16 LKO, amb les quals hem construït dos micromatrius de teixits (TMA). Hem recollit diverses variables clínicopatològiques de cada cas i s'ha procedit a l'estudi mitjançant immunohistoquímica i per hibridació in situ fluorescent (FISH) dels marcadors d'interès.

Resultats

El **primer treball** recull les troballes per FISH i immunohistoquímica dels oncogens i gens supressors *CCDN1*, *MYC*, *EGFR*, *ERBB2* i *TP53*. Es demostren polisomies, amplificacions i pèrdues de *TP53* en una proporció significativament major en les mostres de CEO primaris i metastàtics, amb correlació amb l'expressió proteica dels seus productes. La presència de dos o més anomalies genètiques en els *loci* estudiats és exclusiva de les mostres de CEO primaris i metastàtics.

El **segon treball** mostra els resultats de l'estudi de l'estat genètic i proteic de *CKS1B*. Aquest apareix sobreexpressat en CEO primari i metastàtic de forma significativa, fet que es correlaciona amb la infraexpressió de p27 i sobreexpressió de SKP2. L'estudi per FISH també mostra guanys (polisomies i amplificacions) de 1q21.

Conclusions

El present treball mostra que l'expressió augmentada de diversos marcadors moleculars pot ocórrer en totes les fases de la carcinogènesi oral. Les aberracions genètiques detectades per FISH s'observen freqüentment en les lesions malignes, rarament en les lesions de leucoplàsia i excepcionalment en patologia benigna inflamatòria. Aquest fet dóna suport al rol de *CKS1B*, *MYC*, *TP53*, *CCDN1*, *ERBB2* i *EGFR* en la patogènia del CEO. Així, les mostres de CEO acumulen més alteracions que les mostres pre-malignes i les benignes, tant a nivell proteic com genètic, fet que resta en acord amb la bibliografia.

En les nostres mostres tumorals hem detectat múltiples anomalies, que afecten tant a oncogens com a gens supressors tumorals, conduint a un cicle cel·lular aberrant. Aquest fet és indicatiu de la inestabilitat cromosòmica i multiclonalitat que caracteritza aquests tumors sòlids.

3. INTRODUCCIÓ

3.1 Generalitats del carcinoma escatós oral (CEO)

Dins de les malalties neoplàsiques de la cavitat oral, el carcinoma escatós oral (CEO) representa més del 90% de les neoplàsies en aquesta localització. És l'onzena neoplàsia més freqüent, amb una incidència de 390.000 nous casos cada any, dels quals almenys dos terços apareixen en pacients de sexe masculí (www.iarc.fr). L'àrea mundial amb una incidència més alta de CEO és la Melanèsia amb xifres que varien de 31,5 per 100.000 en homes i 20,2 per 100.000 en dones. Les taxes en homes són més altes a l'Europa oriental (11,3 per 100.000), sud d'Europa (9,2 per 100.000), Àsia central i del sud (12,7 per 100.000), Sud-àfrica (11,1 per 100.000), i Austràlia/Nova Zelanda (10,2 per 100.000). En dones, la incidència és relativament alta en el Sud-est asiàtic (8,3 per 100.000). Aquests patrons reflecteixen la prevalença de factors de risc específics, tal com l'hàbit tabàquic i l'abús d'alcohol a l'Europa oriental, el sud d'Europa i Sud-àfrica, i la masticació de bètel a Àsia i Melanèsia. L'alta proporció de casos d'Austràlia es deuen a la presència de càncer de llavi relacionat amb l'exposició solar. Entre els factors de risc, també s'ha suggerit l'existència d'alguna predisposició genètica, a causa del fet que la majoria de la població exposada a aquests factors no desenvolupa càncer oral, així com el fet que existeixen casos esporàdics de tumors orals ocorreguts en adults joves i no usuaris de tabac i alcohol. Així en aquesta malaltia resulta d'importància

conèixer els mecanismes pels quals els factors mediambientals i genètics modifiquen les cèl·lules normals i les transformen en canceroses.

El CEO representa una malaltia amb una mortalitat i morbiditat significatives, amb baixa supervivència i pronòstic desfavorable, malgrat la quantitat de recerca i els avenços aconseguits en el camp de l'oncologia. Les taxes de mortalitat romanen inalterades (Parkin DM i col., 2005) i la incidència sembla estar en augment. Actualment, en termes pràctics, els factors pronòstics consensuats en el CEO inclouen l'estadi de diagnòstic, el gruix tumoral, l'existència de marges lliures post-ressecció, i, en cas d'afectació ganglionar, la presència d'extensió extracapsular. En el futur, el millor coneixement en la biologia molecular tumoral pot permetre la incorporació i aplicació de nous paràmetres en l'avaluació pronòstica i abordatge terapèutic de la malaltia.

3.2 El cicle cel·lular normal

3.2.1. Fases del cicle cel·lular

Les cèl·lules estimulades per proliferar passen de forma cíclica a través d'una sèrie de fases denominades globalment cicle cel·lular. La proliferació cel·lular implica la divisió de la cèl·lula, fenomen precedit de la mitosi (fase M), en la qual els cromosomes es condensen i s'organitzen en el fus mitòtic, que acabarà segregant les cromàtides homòlogues en els pols oposats. La mitosi suposa el 10% de la durada total del cicle i al final la mateixa la cèl·lula mare s'ha dividit en dues cèl·lules filles amb idèntica dotació cromosòmica. Entre dues mitosis consecutives es defineix un període de temps, anomenat interfase, en el qual se succeeixen, al seu torn, tres fases seqüencials: G1, S i G2. Durant la fase S, també anomenada fase de síntesi, té lloc la duplicació del material cromosòmic. Les fases G1 i G2 són períodes de durada variable en els quals la cèl·lula es prepara per a la duplicació de l'ADN (fase G1) o per a la mitosi (G2). La fase G1 és especialment important per a la regulació del cicle, ja que en ella s'integren els diferents estímuls extracel·lulars que impliquen la decisió de continuar proliferant o no. En aquesta fase es defineix un període de temps proper a la transició G1-S denominat punt de restricció R, a partir del qual la cèl·lula adquireix el compromís de dividir-se, entra en la fase S i progressa al llarg del cicle cel·lular fins a completar-lo, ja refractària als estímuls externs.

En situacions d'absència de factors de creixement, les cèl·lules més diferenciades poden aturar-se en estat diploide en el període G0 del cicle cel·lular. Algunes d'elles podran ser estimulades a entrar de nou en cicle i replicar-se mentre unes altres no tornaran a fer-ho mai.

3.2.2. La regulació del cicle cel·lular: ciclines i quinasas dependents de ciclines

La progressió a través del cicle cel·lular resulta de l'activació seqüencial i ordenada de diversos elements que juguen un paper determinant en les transicions G1/S i G2/M. Aquesta maquinària reguladora del cicle cel·lular està composta per dos tipus de proteïnes: les ciclines i les quinasas dependents de ciclina (CDK). Les ciclines poden classificar-se segons el seu patró d'expressió i activitat en ciclines mitòtiques i ciclines de fase G1. Les ciclines A i B (B1 i B2) constitueixen les denominades ciclines mitòtiques i desenvolupen la seva funció en les fases S, G2 i M. Així, la ciclina A és necessària per a l'inici de la síntesi de l'ADN i les ciclines B controlen el pas a través de la fase M. La regulació de la transició entre les fases G1 i S és més complexa i està regulada per les ciclines D (D1, D2 i D3) i I, anomenades globalment ciclines de fase G1. Les ciclines D se sintetitzen a l'inici de la fase G1 en resposta a agents externs que promouen l'entrada en cicle. La ciclina I s'expressa al final de G1 i és necessària per a l'inici de la fase S. Les CDK que s'uneixen a les ciclines formant complexos en els quals la quinasa és la subunitat catalítica i la ciclina la subunitat reguladora. En mamífers, quatre CDK s'expressen amb nivells significatius i exerceixen un paper clau en la regulació del cicle: CDK1, 2, 3 i 4. Cada CDK s'associa a una o diverses ciclines de forma específica i realitza la seva funció en un punt concret del cicle cel·lular (Figura 1).

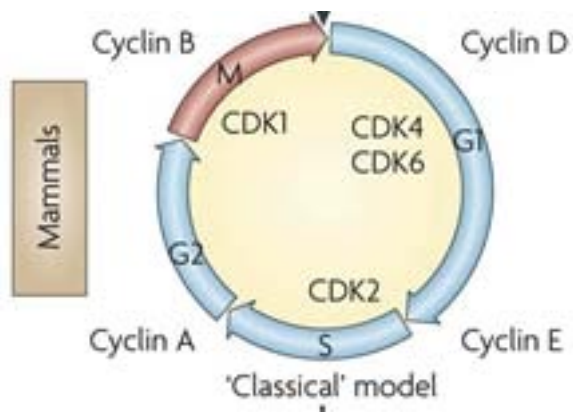


Figura 1: Model simplificat del cicle cel·lular normal en mamífers. De Malumbres i Barbacid. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews Cancer 2009;9:153-66

3.3 Alteracions genètiques descrites en el CEO

L'oncogènesi en la cavitat oral és deguda a l'acumulació d'alteracions genètiques, epigenètiques i metabòliques, que ocasionen un procés de transformació gradual des d'una mucosa oral normal a una mucosa displàsica, i a carcinoma invasiu (Califano i col., 1996), normalment en relació a l'exposició a diversos agents ambientals com a begudes alcohòliques, tabac i virus del papil·loma humà (Forastiere i col., 2001). El nombre d'alteracions cromosòmiques sembla que augmentaria durant la progressió tumoral. Així, la leucoplàsia oral presenta menys alteracions que el CEO, el qual tindria menys alteracions en fases precoces que en fases evolucionades.

L'oncogènesi de la cavitat oral s'explica pel que anomenem la teoria del camp de cancerització, segons la qual una alteració genètica ocorre en una àrea inicial de la mucosa oral, que prolifera fins a un estat pre-maligne. Canvis genètics addicionals produiran la progressió cap a carcinoma en certs individus. Aquesta teoria se sustenta en l'observació que el càncer oral es desenvolupa de forma multifocal, amb àrees de més infiltració envoltades per zones displàsiques sense infiltració. Les àrees que envolten el tumor solen presentar atípia citològica sense complir criteris de carcinoma escatós. Així mateix, no rarament es desenvolupen segones neoplàsies o recurrències en els pacients afectes d'aquests tumors. La teoria de camp de cancerització també s'aplica a altres neoplàsies, i s'ha postulat per explicar el model d'oncogènesi del

carcinoma escatós cutani. Baakhuis i col (2005) han proposat un model de progressió del CEO que s'iniciaria per una alteració genètica en una cèl·lula progenitora de la capa basal de la mucosa; subseqüentment, es formaria una placa que estaria formada per la cèl·lula progenitora i les seves cèl·lules filles que comparteixen la mateixa alteració d'ADN. El canvi següent es produiria per l'addició d'alteracions genètiques que substituirien l'epiteli normal i s'expandirien.

La inestabilitat genòmica reflexa la predisposició i susceptibilitat del genoma a adquirir múltiples alteracions. Les alteracions numèriques dels cromosomes, anomenades aneuploidies, són freqüentment descrites en casos de CEO i també en lesions premalignes. S'han descrit diferents alteracions citogenètiques en el CEO que inclouen l'alteració del cromosoma Y, l'activació de proto-oncogens com *CCND1*, *MYC*, *RAS*, *EGFR* i la inactivació de gens supressors tumorals com *TP16* i *TP53*. Els cariotips de les cèl·lules de CEO contenen diverses anomalies numèriques i estructurals, com la presència de translocacions equilibrades i no equilibrades, delecions, cromosomes dicèntrics i amplificacions gèniques (Reshmi i col., 2004). L'alteració de l'expressió de diferents proteïnes ha estat també estudiada amb resultats diversos.

Existeixen referències que indiquen que més del 90% de CEO tenen com a mínim una anomalia que afecta els gens del retinoblastoma (*Rb*), de la ciclina D1 o de *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A*) (Garnis i col., 2005).

La proliferació cel·lular té un cert significat pronòstic en el CEO: una activitat proliferativa alta sol implicar un mal pronòstic. Diversos estudis han objectivat que un elevat índex de proliferació cel·lular avaluat mitjançant l'expressió immunohistoquímica nuclear per Ki67/MIB-1 té una correlació pronòstica en el CEO (Brinkman i col., 2006)

3.4 Tècniques utilitzades per al diagnòstic d'alteracions genètiques

Existeixen diferents tècniques per a l'anàlisi d'alteracions cromosòmiques en les lesions neoplàsiques, com el CEO, que detallem a continuació:

3.3.1 Anàlisi del cariotip

L'anàlisi de cariotip en les neoplàsies hematològiques sovint mostra aberracions cromosòmiques altament específiques i recurrents que s'associen amb el fenotip (Chen i col., 2002). En el cas dels tumors sòlids, els estudis citogenètics són molt més escassos degut a la dificultat d'obtenir cèl·lules tumorals dels teixits i aconseguir que entrin en divisió (Varella-Garcia i col., 2003). Jin i col., (1999) van utilitzar cultius cel·lulars per detectar anomalies cromosòmiques en 12 carcinomes escatosos primaris cutanis, i van trobar anomalies numèriques en -2, -4, -8p, -9, -11, -13, -14, -18, -21, -X, -Y, +1q, +7, i +8q. Aquestes dades cariotípiques són comparables a troballes en altres carcinomes, incloent el carcinoma de cap i coll (Mitelman i col., 2011). Altres anomalies no infreqüents inclouen rearranjaments estructurals de les regions centromèriques dels cromosomes 1, 5, 8, i 9, amb la formació de isocromosomes i(1p), i(1q), i(5p), i(8q), i(9p), i i(9q) i delecions cromosòmiques i translocacions de tot un braç. Lese Martin i col. (2008) estudien 31 línies cel·lulars de CEO, en les que utilitzen diferents tècniques per a la caracterització de les seves alteracions genètiques. Aquests autors varen practicar un anàlisi de cariotip (Figura 2), i varen detectar delecions que afecten els braços dels cromosomes 3p, 4q, 8p i el

18, i guanys de 3q, 7p, 9q i en els cromosomes 19 i 20. L'anomalia més freqüentment detectada corresponia a l'amplificació de 11q13.

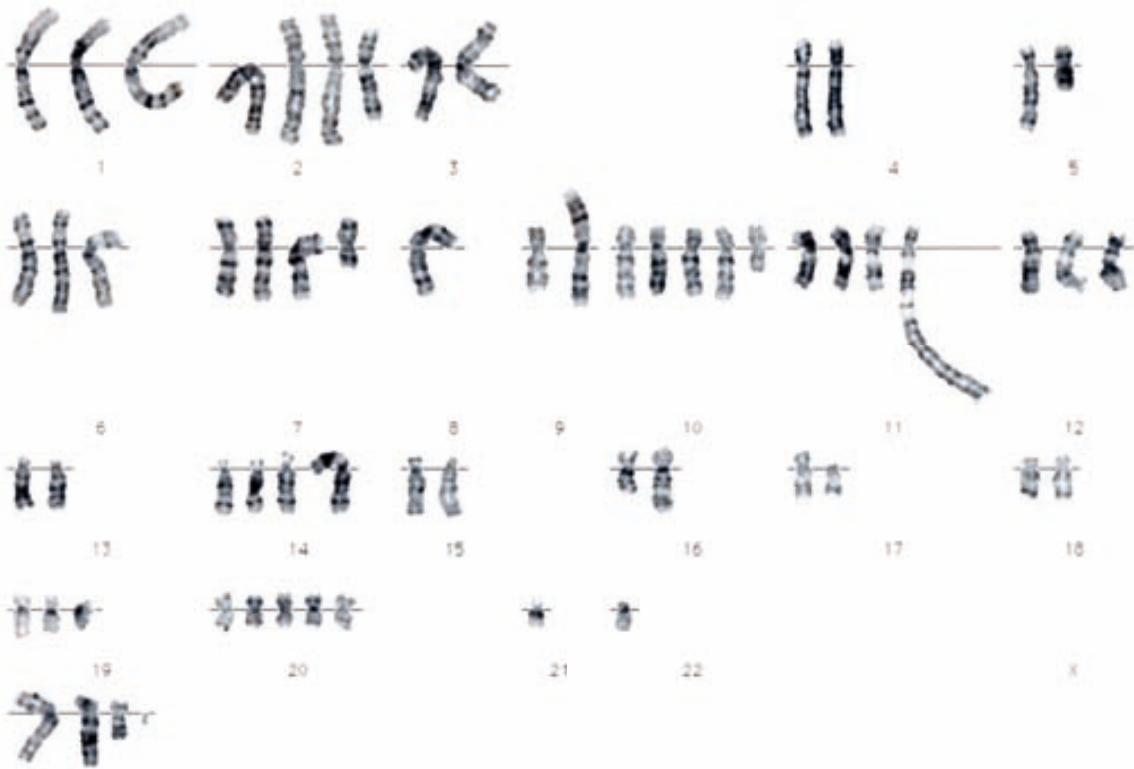


Figura 2: Exemple d'anàlisi de cariotip d'una línia cel·lular de CEO. De Lese Martin C, Reshmi S, Ried T et al. Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma. Examination of 31 cell lines and review of the literature. Oral Oncol 2008; 44:369-382

3.3.2 FISH interfàsica

La tècnica d'hibridació in situ (HIS) permet la detecció i localització de seqüències específiques d'ADN sobre cromosomes metafàsics o nuclis interfàsics usant sondes específiques marcades radioactivament (Pardue i Gall, 1969) o amb substàncies no radioactives. La modificació de la tècnica que fa servir sondes no radioactives i permet detectar la hibridació observant-la en un microscopi de fluorescència s'ha anomenat hibridació in situ fluorescent o FISH, de l'anglès *fluorescence in situ hybridization* (Pinkel i col., 1986; Anastasi i col., 1991; Price, 1993). Una de les principals aplicacions de la HIS com a tècnica complementària a la citogenètica convencional és el fet que les sondes reconeixen la seva regió homòloga no només en cromosomes metafàsics sinó també en nuclis interfàsics (Cremer i col., 1986; Hopman i col., 1988; Pérez-Losada i col., 1991; Lalkin i col., 1993; Que i col., 1993). Aquest fet ha donat lloc a l'anomenada "citogenètica interfàsica", aplicable en aquells casos on la proliferació de cèl.lules neoplàsiques és baixa i per tant, és difícil l'obtenció de metafases, com en el cas de la leucèmia limfàtica crònica o dels tumors sòlids.

Segons el tipus d'alteració cromosòmica que vulguem identificar serà més adequat utilitzar un o altre tipus de sonda:

- Les sondes centromèriques estan formades per seqüències repetitives d'ADN que hibriden amb l'ADN de la regió centromèrica del cromosoma. Aquestes sondes permeten detectar alteracions cromosòmiques numèriques tant sobre metafases com sobre nuclis en interfase (citogenètica interfàsica). L'ús d'aquest tipus de sondes ens permetrà valorar la presència o absència d'alteracions numèriques (principalment monosomies i trisomies) sense

necessitat de disposar de cèl·lules en divisió (per exemple, en la LLC-B s'utilitza la sonda centromèrica del cromosoma 12 per a detectar la trisomia 12).

- Les sondes de pintat cromosòmic estan formades per una bateria de sondes de seqüència única marcades amb el mateix color, que conjuntament hibriden amb la totalitat d'un cromosoma. Aquest tipus de sondes permeten visualitzar tant alteracions numèriques com estructurals sobre metafases, però no es poden utilitzar sobre nuclis en interfase. Són molt útils per a desxifrar cariotips amb alteracions estructurals complexes o amb cromosomes marcadors.
- Les sondes de locus específic, també anomenades de seqüència única, són seqüències d'ADN homòlogues a una regió genòmica corresponent a una banda cromosòmica o a un gen específic. Aquest tipus de sonda permet detectar alteracions numèriques i estructurals (inversions, delecions, translocacions...) tant en metafase com en interfase. Són molt útils quan es vol estudiar una regió molt concreta del genoma.

Les cèl·lules diploides normals mostraran dues còpies de cada seqüència d'ADN (excloent les seqüències dels cromosomes sexuals) fet que permet la detecció d'aberracions numèriques. Existeixen diversos estudis focalitzats en les alteracions cromosòmiques en el CEO per FISH, els resultats dels quals seran comentats en la discussió del present treball (pàgina 59).

3.3.3 Hibridació Genòmica Comparada (HGC)

La tècnica d'hibridació genòmica comparada (HGC), també anomenada HCG (de l'anglès, comparative genomic hybridization), és una tècnica citogenètica-molecular que permet detectar alteracions numèriques de seqüències d'ADN concretes (pèrdues, delecions, guanys i amplificacions) en un teixit tumoral. Aquesta tècnica es fonamenta en la hibridació in situ d'un ADN tumoral i d'un ADN control marcats amb fluorocroms de colors diferents sobre metafases normals. Una vegada realitzada la hibridació, les variacions numèriques en l'ADN tumoral es quantifiquen mitjançant el coeficient d'intensitat de fluorescència entre l'ADN tumoral i l'ADN normal. La HGC té utilitat en l'anàlisi de canvis numèrics de seqüències d'ADN en tumors sòlids i en aquelles neoplàsies hematològiques amb un índex de proliferació baix, ja que per a realitzar l'esmentada tècnica no cal tenir cèl.lules en divisió, sinó només el seu ADN. Així, aquesta tècnica és molt útil en aquells casos que presenten cariotips complexes amb cromosomes marcadors, amplificacions gèniques extracromosòmiques (dobles diminuts) doble diminuts i regions de tinció homogènia. Val a dir que només es detecten canvis presents en una proporció alta de cèl.lules tumorals (mínim 50%), i que aquesta tècnica no permet detectar alteracions de tipus equilibrat que no comportin guanys o pèrdues de material genètic (translocacions equilibrades, inversions, etc.) (Houldsworth i Chaganti, 1994; Kallioniemi i col., 1994; Parente i col., 1997; Bentz i col., 1998).

En l'estudi de Lese Martin i col. (2008) es detecten les mateixes alteracions descrites amb l'anàlisi de cariotip, i s'identifiquen a més a més tres àrees d'amplificació a 13q21→q22, 14q21→q24 i 19q13.1→qter. Es detecten també amplificacions gèniques extracromosòmiques (dobles diminuts) de la regió 13q21-q22.

3.3.4 Micromatrius d'hibridació genòmica comparada (array HCG)

Aquesta tècnica permet augmentar la resolució de detecció d'alteracions del HCG clàssic de 50-75 kb fins a 1-3 MB, segons la plataforma. En comptes d'hibridar la mostra d'ADN tumoral sobre cromosomes normals, en la micromatriu de HCG s'utilitzen clones d'ADN conegut, dipositades sobre una plataforma d'hibridació (Cai i col., 2002). És una tècnica que permet una detecció més ràpida i acurada de les regions genòmiques implicades en el càncer (Oostiander i col., 2004).

3.3.5 Estudis de pèrdua d'heterozigositat

Es tracta d'una tècnica per al despistatge de cèl·lules tumorals per a regions amb pèrdua genètica basat en marcadors de microsatèl·lits amb un elevat nombre de polimorfismes. Es comparen al·lels del tumor i mostres de ADN normal del mateix individu. La pèrdua d'un al·lel en el teixit tumoral que sigui present en el control normal identifica regions delecionades (Happle, 1999). Es pressuposa que en aquestes regions poden existir gens supressors de tumors

que siguin claus en el desenvolupament tumoral (Imreh i col., 2003). En el CEO, diversos estudis han utilitzat aquesta tècnica per a la descripció d'alteracions genètiques (Ohta i col., 2009), detectant-se alteracions dels gens *TP16* i *TP53* en gairebé un 70 i 40% de tots els càncers orals respectivament, així com de la via del retinoblastoma (Soni i col., 2005).

3.3.6 Cariotip espectral (SKY)

Les tècniques de *Spectral Karyotyping* (SKY) i *multicolor-FISH* (M-FISH) utilitzen una bateria de sondes de pintat cromosòmic, marcades amb cinc fluorocroms, que permeten la classificació dels 24 cromosomes humans a partir de set colors diferents (Schröck i cols, 1996). El M-FISH utilitza un programari que permet la detecció i la discriminació de 27 sondes diferents que hibriden alhora sobre les metafases. El SKY, en canvi, utilitza un programari més complex que escaneja les preparacions després de la hibridació sobre metafases i utilitza per identificar els cromosomes la visualització de l'espectre de fluorocromos predefinit per a cada cromosoma. En els dos casos, el resultat de la hibridació permet visualitzar simultàniament cada parell cromosòmic d'un color diferent.

Les tècniques de M-FISH i SKY són molt útils per determinar de forma inequívoca cariotips complexos i cromosomes no identificables amb les tècniques de bandeig (cromosomes marcadors). Aquestes tècniques presenten una limitació en aquelles patologies amb un índex de proliferació cel·lular baix a causa de la necessitat de realitzar l'estudi sobre cèl·lules en divisió. Així mateix, aquestes tecnologies no permeten el reconeixement d'alguns punts de

trencament, com aquells associats amb delecions, insercions i addicions que afecten al mateix cromosoma (marcat tot ell del mateix color) i translocacions de petita mida (inferiors a 500-1500 Kb), pels quals és necessari utilitzar sondes de locus específic. Des de l'aparició d'aquestes tècniques de M-FISH han aparegut nombroses publicacions on es demostra que incrementen la interpretació del cariotip convencional i ajuden al diagnòstic de neoplàsies hematològiques (Veldman i cols, 1997; Rowley i cols, 1999; Bayani i cols, 2002; Mrozek i cols, 2002; Tchinda i cols, 2004).

3.5 Micromatrius de teixits (TMA)

El 1997, Juhan Kononen i col. (1998) van promulgar la idea de traslladar les micromatrius d'ADN als teixits per a valorar dianes moleculars en diverses mostres de tumors de forma paral·lela. És l'anomenada micromatriu de teixits (TMA). Es tracta de recol·locar teixits des de blocs histològics de parafina convencionals a un bloc final, que contindrà una mostra de cada un dels blocs originals, amb un total de cent fins a mil mostres per bloc i lamineta.

Els TMAs han estat dissenyats, doncs, per a l'estudi optimitzat del teixit, de manera que ens permet practicar diferents estudis (histologia, detecció proteica per immunohistoquímica, detecció d'ADN per FISH, detecció de RNA per mRNA ISH) sobre les cèl·lules tumorals.

La majoria de TMAs es dissenyen sobre teixit parafinat i fixat en formol. Es construeixen a partir de la retirada d'un cilindre de 0,6 a 2 mm de diàmetre del bloc original, que sigui representatiu de l'àrea d'interès del tumor. Mitjançant un aparell de elaboració de matrius ("*arrayer*"), el cilindre es col·loca en el bloc receptor, el qual permetrà la recepció de fins a 1000 cilindres sempre ordenats. De cada TMA resultant en podem obtenir fins a 300 seccions consecutives de 5 micròmetres de gruix, que permeten realitzar els estudis abans esmentats. Es recomana la pràctica d'una tinció amb hematoxilina eosina d'una lamineta cada 25 seccions per tal de detectar els cilindres que han perdut representació tumoral.

Recentment, s'ha introduït la pràctica de TMAs a partir de teixit congelat, fet que permet la detecció de certs antígens que no han estat compromesos per la fixació amb formol (Schoenberg i col., 2001).

La principal limitació de la tècnica és el volum tissular, ja que els cilindres tenen una mida limitada, usualment de 0,6 a 1 mm, fet que no permet la representació completa del teixit tumoral. En tumors molt heterogenis aquest fet és d'importància. Per evitar aquesta limitació s'han utilitzat cilindres més grans, de fins 2 mm de diàmetre. Aquesta tècnica és més adequada quan cal estudiar diferents àrees en un mateix tumor però malmet el bloc original i permet una incorporació limitada de cilindres en el bloc receptor.

El fet és que els TMAs han de ser utilitzats amb una finalitat de recerca ja que permeten augmentar la potència estadística dels estudis, optimitzant els recursos i el temps. Les seccions tissulars grans són utilitzades en la clínica amb una finalitat diagnòstica (Rahakrishnan i col., 2008).

Finalment, la realització d'un TMA és llarga i requereix de la pràctica adequada de tots els passos per evitar la pèrdua de cilindres o la mala selecció del cilindre representatiu del tumor original. Existeixen micromatrius prefabricades i automatitzades que simplifiquen aquesta problemàtica.

4. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Entre els factors responsables de la patogènia del CEO hi trobem l'acumulació d'errors genètics, l'activació d'oncogens i la inactivació de gens supressors de tumors. L'estudi de les alteracions citogenètiques en el CEO mitjançant la tècnica de FISH i d'expressió proteica mitjançant la tècnica d'IHQ, correlacionades amb variables clíniques i histopatològiques, pot aportar informació addicional a la utilitzada en la pràctica clínica, que ens ajudi a comprendre el complex procés de la carcinogènesi.

4.1 Objectius

Els objectius del present estudi són:

- 1- Descriure les alteracions genètiques i d'expressió proteica de *CCND1*, *MYC*, *EGFR*, *CKS1B*, *ERBB2* i *TP53* en mostres de CEO primari i metastàtic mitjançant les tècniques de FISH i IHQ.
- 2- Comparar els resultats obtinguts mitjançant la tècnica de FISH amb sondes específiques dels gens estudiats i l'expressió proteica avaluada mitjançant immunohistoquímica
- 3- Avaluar la presència d'alteracions genètiques i d'expressió proteica de *CCND1*, *MYC*, *EGFR*, *CKS1B*, *ERBB2* i *TP53* en mostres de lesions

premalignes (leucoplàsia oral) i mostres de lesions inflamatòries (liquen pla oral).

4- Comparar els resultats obtinguts amb un grup de variables clíniques i d'evolució del CEO.

5- Determinar si l'existència d'alguna de les troballes, per FISH i/o IHQ, és específica de patologia maligna.

5. MATERIAL I MÈTODES

5.1 Material

Hem inclòs un total de 108 biòpsies a estudi de les quals 14 corresponen a mostres de mucosa oral normal, 51 a mostres de CEO, 14 a metàstasis ganglionars, 13 a LPO i 16 a LKO. Les mostres provenien de l'arxiu dels Serveis de Patologia de l'Hospital del Mar, l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, de Barcelona, i del Consorci Sanitari Parc Taulí, de Sabadell, obtingudes durant el període de gener de 1989 fins a desembre de 2007.

L'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital del Mar, IMIM.

Seguint un protocol clínic sistemàtic, varen ser revisades un grup de diferents dades clíniques de cada pacient (Taula 1). Per cada mostra es van recollir les dades d'un grup de diferents paràmetres clinico-patològics. Aquestes dades s'especifiquen a la Taula 2.

Taula 1: Característiques clíniques dels pacients inclosos en l'estudi

	Grup de malalts amb CEO N=51	Grup de malalts amb LKO N=16	Grup de malalts amb LPO N=13
Edat mitja	65 (43-92)	65 (43-90)	70 (45-94)
H/D	41/10	9/7	7/6
Hàbit tabàquic	31 (66%)	16 (100%)	6 (43%)
Abús d'alcohol	24 (51%)	5 (31%)	1 (7%)
Liquen pla	3 (6%)	1 (6%)	-
erosiu	2	1	3
reticulat	1	0	10

Taula 2: Característiques clinicopatològiques dels pacients amb CEO

Paràmetres clinico-patològics	Nº de mostres (n = 51) / (%)
Estadi tumoral *	
T1	6 (12%)
T2	23 (49%)
T3	5 (11%)
T4	13 (28%)
Localització	
Llengua	21 (41%)
Sòl de la boca	11 (21)
Marge alveolar	3 (6%)
Trígon retromolar	5 (10%)
Mucosa jugal	5 (10%)
Úvula	4 (8%)
Paladar dur	2 (4%)
Estadi limfàtic *	
N0	29 (62%)
> o igual a N1	18 (38%)
Grau *	
Ben diferenciat	12 (25%)
Moderadament diferenciat	28 (60%)
Mal diferenciat	7 (15%)
Recurrència *	
Sí	16 (34%)
No	31 (66%)
Mort per la malaltia *	
Sí	13 (27%)
No	34 (73%)

*Faltaven dades en 4 casos

5.2 Mètodes

5.2.1 Micromatriu de teixits

Es varen construir dues micromatrius de teixits segons les directrius de Kononen i cols (1998).

Una secció de cada bloc va ser tenyida amb hematoxilina-eosina per a definir les àrees més representatives de cada tumor. Dos cilindres de 1 mm de diàmetre foren extrets d'aquestes àrees i inclosos en la parafina receptora utilitzant un aparell elaborador de micromatrius de teixits ("*tissue microarrayer*") (Beecher Instruments, Silver Spring, USA).

5.2.2 Immunohistoquímica

L'estudi immunohistoquímic (IHQ) es va realitzar utilitzant el DakoThechMate Immunostainer (Dako-Cytomation, Glostrup, Denmark), seguint el protocol establert. Les tincions IHQ es van desenvolupar pels següents anticossos primaris: c-myc, ciclina D1, EGFR, erbb2, CKS1B, p27, SKP2 i p53. En la Taula 3, es detallen les característiques dels anticossos avaluats.

Taula 3: Antígens utilitzats en l'estudi

Antigen	Anticòs primari: M/P	Dilució
C-myc	M (Dako, Glostrup, Denmark)	1:50
P53	M D07 (Novocasta, Newcastle, UK)	1:50
Ciclina D1	M P2D11F11 (Dako, Glostrup, Denmark)	1:10
EGFR	M EGFR pharm Dx (Dako, Glostrup, Denmark)	D
p27	M (BD Biosciences, Philadelphia PA,USA)	1:100
CKS1B	M (Zymed Inc, Life Technologies, Carlsbad, USA)	1:50
SKP2	M (Santa Cruz, USA)	1:25
ERBB2	P Herceptest (Dako, Glostrup, Denmark)	D

D: pre-diluit; M: monoclonal; P: policlonal

La tinció IHQ va ser avaluada per almenys dos observadors independents que no coneixien l'evolució de la malaltia en cada cas. Es va avaluar l'àrea de tinció (de 0 a 100%) i la intensitat de la mateixa (0-1-2-3, en una escala analògica).

Com a punts de tall per a la interpretació de les tècniques IHQ, es van emprar els mateixos paràmetres utilitzats majoritàriament en les referències bibliogràfiques d'articles que avaluen la seva expressió en mostres de CEO:

1.- Per a la ciclina D1, p53 i ERBB2 es va utilitzar el límit del 10% de cèl·lules tumorals per considerar una mostra com a positiva o negativa (> 10% positiva; < o igual 10% negativa) (Bova i col., 1999; Canoz i col., 2006).

2.- La tinció de MYC es va interpretar com: 0=negativa, 1=positivitat <10% de cèl·lules tumorals, 2=positivitat entre el 10 i 50%, 3= positivitat >50% de cèl·lules tumorals. Tant la tinció nuclear com la citoplasmàtica foren considerades igualment positives (Schleger i col., 2002).

3.- L'expressió de EGFR va ser avaluada en la base de l'àrea afecta i la intensitat de la tinció de les membranes cel·lulars, que es va classificar en una escala de quatre punts: 0 (sense tinció o tinció inferior al 10% de cèl·lules), 1 (tinció dèbil, homogènia o clapejada en >10% de cèl·lules tumorals); 2 (tinció moderada en >10%); 3 (tinció intensa en >10%) (Gamboa-Dominguez i col., 2004). Per a la simplificació de l'anàlisi estadístic, només els resultats superiors o iguals a 2 foren considerats positius.

4.- L'expressió IHQ de CKS1B va ser valorada segons el percentatge de cèl·lules tumorals que presentaven tinció nuclear. A l'hora d'establir el nivell de significació de l'expressió de CKS1B en les mostres tumorals, es va utilitzar com a llindar el càlcul resultant de la mitja més tres desviacions estàndards trobades en les 10 mostres controls de mucosa sana. D'aquesta manera, la positivitat o la presència de sobreexpressió per CKS1B va ser considerada quan més del 60% de nuclis tumorals exhibien la tinció.

5.- Per a la interpretació de l'expressió de p27, es va considerar com a positiva la tinció nuclear i va ser classificada com a baixa expressió (quan la tinció era

positiva en $\leq 5\%$ dels nuclis), moderada (del 5 al 30%) o alta (si $>30\%$ dels nuclis estaven tenyits).

5.2.3 Hibridació in situ fluorescent (FISH)

Mitjançant la tècnica de FISH, es va estudiar l'estat dels gens *CKS1B*, *TP53*, *CCND1*, *CMYC*, *ERBB2* i *EGFR*.

Per a cada un dels gens excepte la *CCDN1* i *CKS1B* es va utilitzar una sonda de dos colors: el gen a estudiar estava marcat amb Spectrum Orange (taronja) i la regió centromèrica corresponent estava marcada amb Spectrum Green (verd). En el cas de de la sonda per *CCDN1* no es va utilitzar sonda centromèrica de control per motius propis del disseny de la sonda comercial (Taula 4). Totes les sondes utilitzades eren d'Abbot Molecular, Abbot Park, IL, USA.

Per a l'estudi de l'estat genètic de *CKS1B* per FISH es va haver de fabricar la sonda de FISH específica. Es va utilitzar la clona del BAC RP11-139I14 que mapeja el locus de *CKS1B* en el cromosoma 1q21.2, obtinguda del Children's Hospital Oakland Research Institute library (Oakland, CA, USA). L'ADN s'isolà amb el protocol del kit Qiagen plasmid MIDI. L'ADN es va marcar amb el kit de translació nick (Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA) amb Spectrum Green (Abbott Molecular). La localització citogenètica de tots els BACs va ser verificada per hibridació de cromosomes normals en metafase (G-banding amb DAPI invers). A més a més, es va afegir una sonda centromèrica per al cromosoma 1 (CEP 1 (D1Z5) SpectrumOrange™ Probe, Abbott Molecular) per a la distinció entre polisomia o amplificació.

En els estudis de FISH amb les sondes de *CKS1B*, *CCND1*, *ERBB2* i *EGFR*, en els que esperàvem trobar guanys i/o amplificacions, es van analitzar 100 cèl·lules per cas estudiat. En canvi, en els estudis amb la sonda *TP53* es van comptar 200 nuclis, ja que en aquest cas esperàvem detectar delecions.

Les mostres de mucosa oral normal es van utilitzar com a controls negatius i d'aquesta manera es va establir el valor llindar d'aberració, com la mitja de falsos positius més tres desviacions estàndards, tal i com es mostra en la Taula 5.

Els patrons anormals de FISH inclouen monosomies (un senyal a estudi i un senyal per a la regió centromèrica), amplificacions (proporció entre el senyal a estudi/senyal centromèric superior a 2 per cèl·lula) i polisomies (tres o més senyals a estudi i senyals centromèrics).

Taula 4: Característiques de les sondes comercials utilitzades en el FISH

Gen estudiat	Locus	Sonda centromèrica control
<i>CCND1</i>	11q13	-
<i>EGFR</i>	7p12	D7Z1
<i>MYC</i>	8q24.12	D8Z2
<i>ERBB2</i>	17q11	D17Z1
<i>TP53</i>	17p13	D17Z1

De Abbot Molecular, Abbot Park, IL, USA

Taula 5: Valors llindar utilitzats en la tècnica de FISH calculats a partir de les mostres de mucosa sana

	Valors llindar		
	Deleció	Polisomia	Amplificació
<i>TP53</i>	20%	NA	NA
<i>ERBB2</i>	NA	3%	0%
<i>EGFR</i>	NA	9%	6%
<i>MYC</i>	NA	0%	4%
<i>CCND1</i>	NA	18%*	

NA: no aplicable * No es va poder distingir entre amplificació i polisomia ja que no es va utilitzar sonda centromèrica.

5.2.4 Anàlisi estadística

La relació entre variables categòriques va ser avaluada mitjançant els test de Chi-quadrat o exacte de Fisher. Un valor de p inferior de 0,05 va ser considerat estadísticament significatiu. Les anàlisis es van realitzar amb el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

6. RESULTATS

6.1 Estudi immunohistoquímic

6.1.1 Estudi IHQ de EGFR, ERBB2, P53, MYC, CCDN1

En la mucosa aparentment normal, l'expressió de tots els marcadors immunohistoquímics utilitzats era negativa o restringida a la membrana basal; amb l'excepció de EGFR. EGFR es mostrava sobreexpressat en el 62% de mostres de mucosa sana, amb una variació que anava des del 10% de cèl·lules basals tenyides fins el 100% de cèl·lules positives per mostra (mitjana 56%, desviació estàndard 40.7).

Les mostres de LKO i LPO presentaven majoritàriament una tinció lleu de les oncoproteïnes estudiades. Cap mostra expressava MYC. P53 estava sobreexpressada en només el 9% de LKO i el 17% de mostres de LPO. Contràriament, una alta expressió de p53, MYC, CCDN1, CKS1B i EGFR es detectava en el grup de CEO i metàstasis limfàtiques. Existien diferències estadísticament significatives entre l'expressió dels diferents marcadors estudiats en el grups objecte d'estudi (taula 6).

Existien en la sèrie sis mostres en què no es va poder demostrar la sobreexpressió de cap marcador, i que corresponien totes a mostres no tumorals.

Totes les mostres que mostraven almenys dues alteracions immunohistoquímiques corresponien a mostres de CEO.

Taula 6: Resultats de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes estudiades en els diferents grups

Proteïna	% sobreexpressió					P
	CEO	Metàstasis linfàtiques	LKO	LPO	Mucosa sana	
p53	60%	80%	9%	17%	0%	<0.0001
MYC	30%	50%	0%	0%	0%	0.009
ERBB2	62%	71%	42%	18%	12%	0.006
Ciclina D1	80%	100%	23%	41%	12%	<0.0001
EGFR	91%	70%	53%	63%	62%	0.016
CKS1B	77%	46%	0%	0%	Control	<0.0001

6.1.2 Estudi IHQ de CKS1B, SKP2 i P27

En el cas de CKS1B, les mucoses sanes es van utilitzar per conèixer el nivell de significació en mucosa oral d'aquesta tinció de manera que es considerà significatiu la presència de més del 60% de nuclis de cèl·lules positius per mostra (mitja + 3 desviacions estàndards).

Com s'aprecia en la taula 6, no es mostrava tinció per sobre el llindar establert en cap mostra de LPO i LKO. Es detectava tinció per CKS1B, en canvi, en 39

de 51 (77%) mostres de CEO i en 6 de 14 (46%) mostres de metàstasis limfàtiques. La sobreexpressió de CKS1B en mostres malignes era significativament major que en mostres benignes ($p < 0.001$).

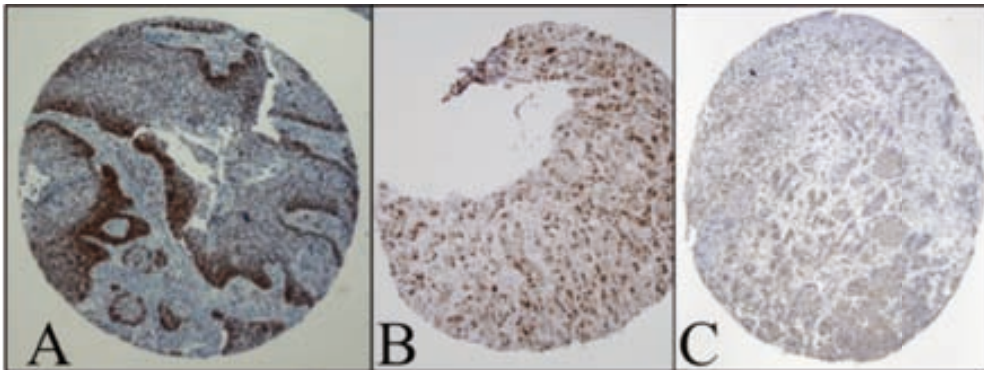
P27 tenia el nucli de les cèl·lules de les capes més altes de l'epiteli, essent negativa en les capes més baixes, en tots els casos de mucosa normal, i en els casos de LPO i LKO. En tots aquests casos es mostrava tinció de moderada a alta. Per contra, en les mostres de CEO i metàstasis limfàtiques, la seva expressió era baixa en 30 de 49 mostres (61.2%). Existia correlació estadísticament significativa ($p = 0.0013$) entre la sobreexpressió de CKS1B i la infraexpressió de p27 (taula 7). La sobreexpressió de CKS1B s'observava en el 31.2% dels casos amb baixa expressió de p27 vs el 15.6% dels casos amb moderada-alta expressió de p27 (figura 4). L'expressió de SKP2 estava confinada a les capes basals en la mucosa oral normal i en les mostres de LPO. En 7 de 9 mostres de LKO (77.7%) mostraven només tinció de capes basals. Quaranta-vuit de 51 (94%) mostres de CEO i metàstasis limfàtiques mostraven tinció per SKP2 moderada-alta.

Taula 7 : Correlació entre l'expressió de CKS1B i p27.

		Expressió CKS1B	
		Baixa	Alta
Expressió P27	Baixa	12.3%	31.2%
	Moderada i alta	41%	15.5%

P =0.0013

Figura 4: Cilindres corresponents a biòpsies de CEO que mostren (A) alta expressió de CKS1B, (B) alta expressió de Skp2 i (C) baixa expressió de p27 (abscència de tinció nuclear)



6.1.3 Correlació IHQ i paràmetres clinicopatològics

Es va correlacionar la sobreexpressió/infraexpressió de les diferents oncoproteïnes estudiades amb un conjunt de paràmetres clinicopatològics (grau histològic, mida tumoral, presència d'adenopaties, exitus per la malaltia o recidiva després de tractament) (taula 8).

Existia associació significativa entre la sobreexpressió de MYC i la mida tumoral gran (T3+T4) i presència d'extensió limfàtica. La correlació entre la sobreexpressió de MYC i el risc de mort associada a CEO era propera a la significació.

Taula 8: Correlació entre la sobreexpressió de les proteïnes estudiades i variables clinico-patològiques.

<i>Proteïnes</i>	% sobreexpressió				
	Grau I+ II vs III	T1+T2 vs T3+T4	N0 vs N1-3	Recidiva No vs Sí	Exitus No vs Sí
P53 <i>p</i>	61% / 43% 0.43	48% / 56% 0.896	58% / 62% 0.896	52% / 70% 0.298	57% / 58% 0.944
MYC <i>p</i>	58%/ 60% 1	44%/ 85% 0.01	44%/ 85% 0.01	64%/ 50% 0.394	50%/ 89% 0.056
ERBB2 <i>P</i>	0/0 1	0/0 1	0/0 1	0/0 1	0/0 1
Ciclina D1 <i>p</i>	37.5%/ 42.8% 1	39%/ 43% 0.772	38%/ 44% 0.691	38%/ 53% 0.576	45%/ 31% 0.376
EGFR <i>P</i>	84%/100% 1	92.6%/88.2% 0.634	89%/93% 1	86.6%/100% 0.290	90.9%/90.9% 1
CKS1B <i>P</i>	85% / 100% 1	82% / 94% 0.373	88% / 85% 1	88% / 84% 1	90% / 80% 0.584

6.2 Estudi per FISH

6.2.1 Estudi per FISH dels gens de *EGFR*, *ERBB2*, *TP53*, *MYC*, *CCND1*

En el present estudi es detectaven alteracions numèriques (pèrdues de *TP53*, guanys de *MYC*, *CCND1* i *ERBB2*, i amplificacions de *EGFR*) en una proporció major en el grup de CEO i metàstasis limfàtiques que en les mostres de LPO i LKO. Aquestes diferències eren estadísticament significatives. No es van detectar diferències en la presència de polisomies de EGFR entre els diferents grups (taula 9).

En l'estudi de les LKO i els LPO, la presència d'alteracions per FISH va ser excepcional. En les mostres de LPO no es va veure cap alteració. Només una mostra que corresponia a leucoplàsia oral va mostrar polisoma de *ERBB2*; una altra va mostrar amplificació de *ERBB2* (aquests dos casos mostraven només un 5% de cèl·lules aberrants) i una tercera va mostrar guanys de *CCND1*. Les mostres de CEO mostraven en canvi múltiples aberracions.

La presència d'almenys dues aberracions detectades per FISH era exclusiva de mostres de CEO. En canvi, l'existència d'una anormalitat genètica isolada no predia si la mostra corresponia al grup tumoral o al no tumoral.

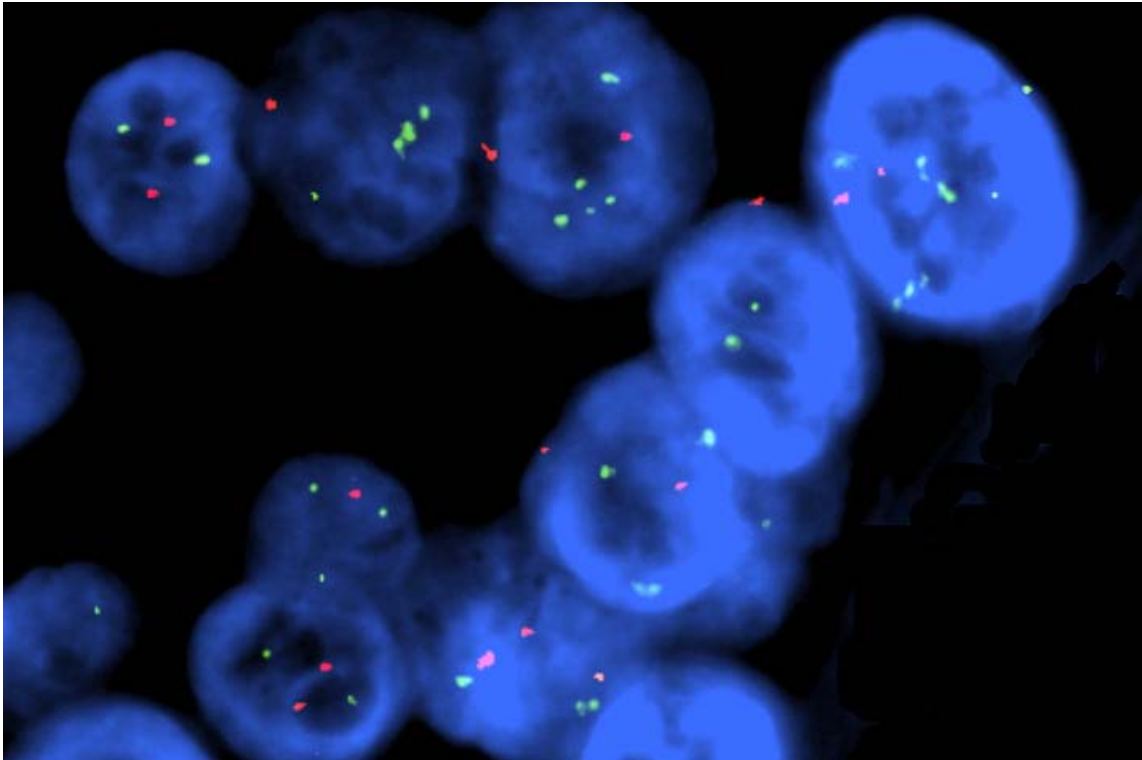
Taula 9: Troballes per FISH dels gens *EGFR*, *ERBB2*, *TP53*, *MYC*, *CCDN1*

Alteracions cromosòmiques	Resultats				
	Mostres amb l'alteració/Mostres analitzades (%)				
	CEO	Metàstasis limfàtiques	LKO	LPO	p
Pèrdua <i>TP53</i>	21/37(56.8%)	2/10 (20%)	0/5(0%)	0/8(0%)	0.001
Polisomies <i>MYC</i>	19/33(57.6%)	8/13(61.5%)	0/11(0%)	0/4(0%)	<0.001
Amplificacions <i>MYC</i>	26/32(81.3%)	9/11(81.8%)	0/11(0%)	0/4(0%)	<0.001
Polisomies <i>ERBB2</i>	25/40(62.5%)	10/11(90.9%)	1/11(9.4%)	0/8(0%)	<0.001
Amplificacions <i>ERBB2</i>	30/40(75%)	5/12(41.7%)	1/11(9.1%)	0/8(0%)	<0.001
Guany <i>CCDN1</i>	31/37(83.8%)	8/11(72.7%)	1/7(14.3%)	0/12(0%)	<0.001
Polisomies <i>EGFR</i>	3/39(7.7%)	2/12(16.7%)	0/9(0%)	0/11(0%)	0.492
Amplificacions <i>EGFR</i>	21/38 (55.3%)	9/11(81.8%)	1/10(10%)	0/11(0%)	<0.001
Polisomies <i>CKS1B</i>	18(46%)	5(33%)	1 (14%)	1(10%)	0.036
Amplificacions <i>CKS1B</i>	21(53%)	5(33%)	1 (14%)	0 (0%)	0.002

6.2.2 Estudi per FISH del gen *CKS1B*

L'estudi per FISH del gen de *CKS1B* va mostrar amplificacions en el 53% de mostres de CEO i el 33% de metàstasis ganglionars (figura 5). Aquesta alteració també es podia detectar en el 14% de mostres de LKO i en cap cas de LPO. Les polisomies del gen (trisomies, tetrasomies, or més extracromosomes) es detectaven en el 46% de CEO, el 33% de metàstasis limfàtiques, el 14% de LKO i el 10% de LPO. Les diferències, tant en amplificacions com en guanys, entre els diferents grups estudiats van ser estadísticament significatives (taula 9).

Figura 5: Nuclis de cèl·lules d'una biòpsia de CEO en la que s'aprecia majoritàriament més senyals verdes que vermelles per cada nucli, indicatiu d'amplificacions de *CKS1B*.



6.2.3 Correlació de les troballes per FISH i paràmetres clinicopatològics

No es va detectar correlació entre els paràmetres clinicopatològics estudiats i la presència d'alteracions cromosòmiques (taula 10).

Taula 10: Correlació entre paràmeters clinicopatològics i alteracions cromosòmiques detectades per FISH

Alteracions cromosòmiques	% anormalitat				
	Grau I+ II vs III	T1+T2 vs T3+T4	N0 vs N1-3	Recidiva No vs Sí	Exitus No vs Sí
Pèrdua TP53	56.7% vs 57.4	45.5% vs 73.3%	59.1% vs 53.3%	58.3% vs 53.8%	50% vs 72.7%
<i>P</i>	1	0.176	0.729	0.793	0.285
Polisomies MYC	51.9% vs 83.3%	50% vs 69.2%	54.2% vs 66.7%	54.5% vs 63.6%	57.7% vs 57.1%
<i>P</i>	0.209	0.275	0.698	0.719	1
Amplificacions MYC	80.8% vs 83.3%	78.9% vs 84.6%	78.3% vs 88.9%	72.7% vs 100%	76% vs 100%
<i>P</i>	1	1	0.648	0.142	0.296
Amplificacions ERBB2	70.6% vs 100%	66.7% vs 87.5%	69.2% vs 12%	74.1% vs 76.9%	70% vs 90%
<i>P</i>	0.307	0.263	0.446	1	0.401
Polisomies ERBB2	58.8% vs 83.3%	54.2% vs 75%	69.2% vs 50%	63% vs 61.5%	66.7% vs 50%
<i>P</i>	0.381	0.318	0.231	1	0.457
Guanyes CCND1	80% vs 100%	78.3% vs 92.9%	82.6% vs 85.7%	86.4% vs 80%	84.6% vs 81.8%
<i>P</i>	0.571	0.376	1	0.670	1
Polisomies EGFR	6.3% vs 14.3%	4% vs 14.3%	3.8% vs 15.4%	12.5% vs 0%	6.9% vs 10%
<i>P</i>	0.457	0.289	0.253	0.271	1
Amplificacions EGFR	48.4% vs 85.7%	50% vs 64.3%	46.2% vs 41.7%	56.5% vs 53.3%	50% vs 70%
<i>P</i>	0.104	0.393	0.796	0.847	0.460
Amplificacions CKS1B	69% vs 66%	68% vs 69%	73% vs 66%	73% vs 61%	72% vs 66%
<i>P</i>	1	1	0.714	0.708	1
Polisomies CKS1B	55% vs 66%	54% vs 61%	61% vs 50%	62% vs 42%	61% vs 44%
<i>P</i>	0.680	0.686	0.537	0.268	0.451

6.3 Correlació entre resultats de les troballes per IHC i per FISH

La correlació entre les troballes d'alteracions genètiques per FISH i d'expressió estan resumides a la taula 11 i es mostren en les figures de la 6 a la 10. En el cas de l'estat de *CKS1B*, *CCND1* i *MYC* es va detectar correlació estadísticament significativa entre la presència de guanys genètics i la sobreexpressió de la proteïna.

Taula 11: Correlació entre troballes per FISH i IHQ

Correlació entre pèrdues de <i>TP53</i> and acúmulo de p53			
		IHC	
		P53 expressió normal	P53 acúmulo
FISH	<i>TP53</i> normal	9 (50%)	13(50%)
	<i>TP53</i> pèrdua	9 (50%)	13 (50%)
p=1			
Correlació entre guanys de <i>MYC</i> i sobreexpressió de <i>MYC</i>			
		IHC	
		<i>MYC</i> expressió normal	<i>MYC</i> sobreexpressió
FISH	<i>MYC</i> normal	14 (36.8%)	24 (63.2%)
	<i>MYC</i> guanys	0 (0%)	12 (100%)
p=0.012			
Correlació entre guanys de <i>CCND1</i> i sobreexpressió de ciclina D1			
		IHC	
		Cyclin D1 expressió normal	Cyclin D1 sobreexpressió
FISH	<i>CCND1</i> normal	23 (54.8%)	2 (10%)
	<i>CCND1</i> guanys	19 (45.2%)	18 (90%)
p=0.001			
Correlació entre guanys de <i>EGFR</i> i sobreexpressió de <i>EGFR</i>			
		IHC	
		<i>EGFR</i> expressió normal	<i>EGFR</i> sobreexpressió
FISH	<i>EGFR</i> normal	8 (66.7%)	4 (33.3%)
	<i>EGFR</i> guanys	26 (49.1%)	27 (50.9%)
p=0.270			

Figura 6: Mostra de CEO que mostra (A) sobreexpressió de c-MYC i (B) polisomia del cromosoma 8 (tres senyals verdes i tres vermelles)

?

?

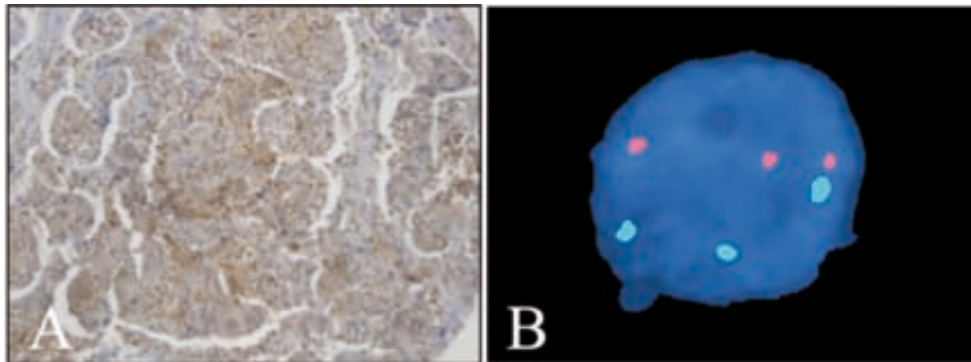


Figura 7: Mostra de CEO on destaca (A) acúmulo de p53 per IHQ i (B) pèrdues (una senyal vermella i dues verdes) de 17p13 per FISH

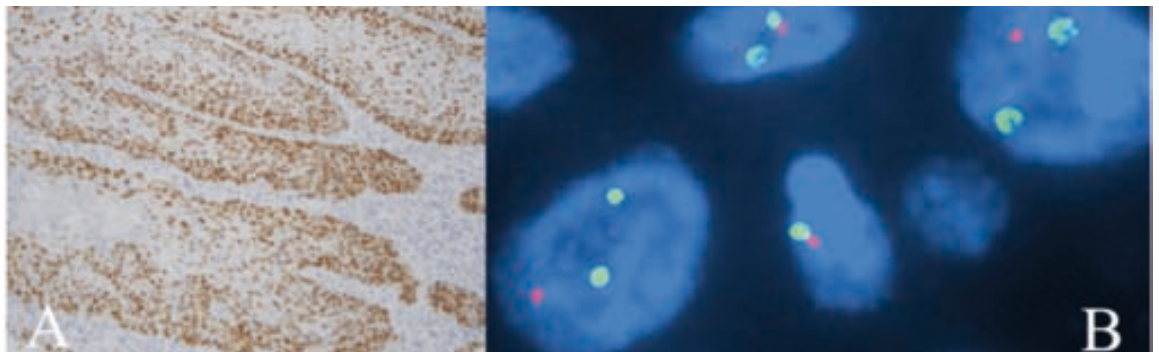


Figura 8: Mostra de CEO on apareix (A) sobreexpressió de Ciclina D1 i (B) múltiples còpies de 11q13 (senyals vermelles) per FISH

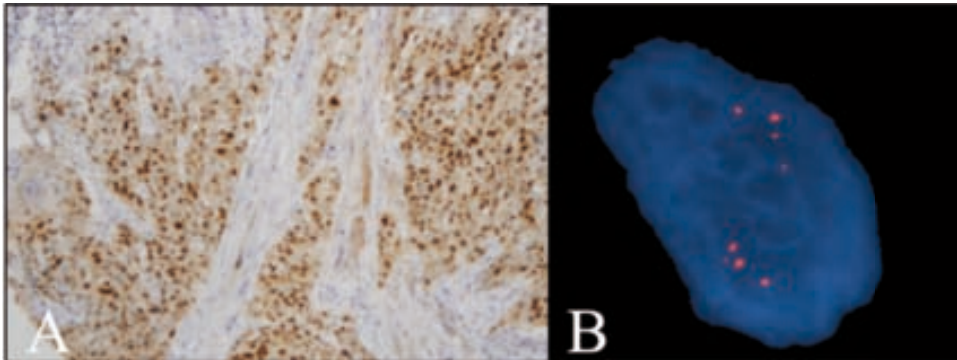


Figura 9: Mostra de CEO que mostra (A) sobreexpressió de EGFR i (B) amplificació de 7p12 (dues senyals verdes i 3 senyals vermelles)

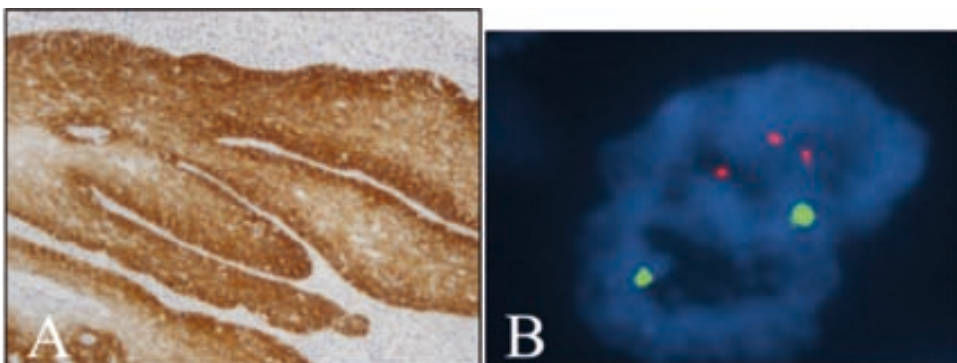
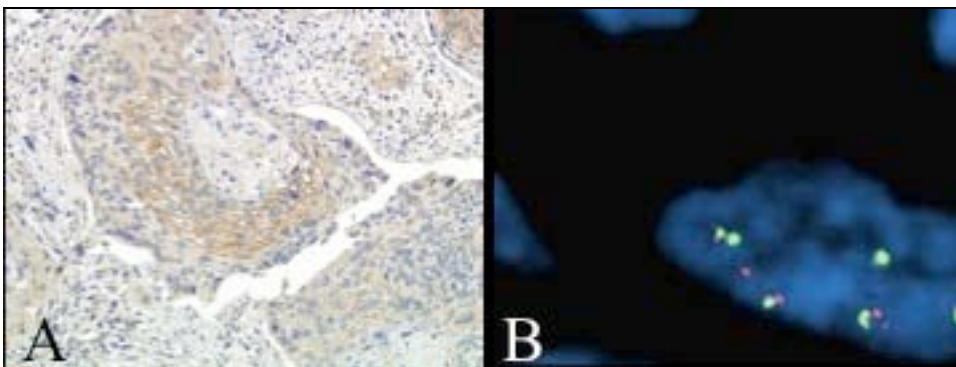


Figura 10: Mostra de CEO que mostra (A) sobreexpressió de ERBB2 (reforç membrana citoplasmàtica) i (B) amplificació de *ERBB2* (cinc senyals verdes i tres senyals vermelles)



7. DISCUSSIÓ

Existeix un gran número de marcadors moleculars potencials que s'han relacionat amb el pronòstic del CEO, un fet que il·lustra la complexitat dels esdeveniments que condueixen a la progressió del procés de carcinogènesi. La presència de clons cel·lulars citogenèticament independents és una característica de les cèl·lules del CEO que pot ser indicativa de carcinogènesi multiclonal i de la inestabilitat cromosòmica subjacent.

El control del cicle cel·lular és complex i comprèn diverses proteïnes que interactuen entre sí i juguen un paper important en el seu control. Les alteracions de gens implicats en la replicació de l'ADN poden donar lloc a un fenotip mutant, que proporcionaria un mecanisme per a la selecció de cèl·lules amb un índex de proliferació més elevat. Diferents gens supressors de tumors estan implicats en el control de la replicació de l'ADN i la mitosi. Oncogens com *EGFR*, *ERBB2*, *CCND1* i *VEGF* indueixen la proliferació aberrant, alterant els punts de control del cicle cel·lular a nivell de G-S, G-M i M. Actuen inhibint el procés d'apoptosi i augmenten la supervivència cel·lular en condicions desfavorables.

S'han realitzat diversos estudis de FISH en el CEO i s'ha demostrat la presència de certes aberracions genètiques, com són els guanys de *CCND1*, *MYC*, *EGFR* i *ERBB2*, i les pèrdues de *TP53*, amb resultats discordants en termes

d'associació amb els patrons d'expressió de la proteïna i del seu significat pronòstic.

El nostre estudi confirma que les anomalies genètiques detectades per FISH són poc freqüents en les lesions precursors i extremadament infreqüents en les lesions inflamatòries benignes, mentre que són comuns en lesions tumorals. Per contra, l'augment d'expressió de diversos marcadors moleculars pot ocórrer en totes les fases de la carcinogènesi oral, incloent les lesions premalignes orals.

Revisem a continuació el paper de alguns d'aquests marcadors moleculars en el CEO:

7.1 Estat de la proteïna de MYC i el gen *MYC* (locus 8q24.12)

MYC és una proteïna que s'uneix al nucli de la cèl·lula i té una activitat reguladora del cicle. La sobreexpressió de MYC s'ha relacionat amb un mal pronòstic en múltiples neoplàsies, incloent carcinomes de cap i coll, mama, colon i tracte genital (Dang i col., 1999; Liao i col., 2007). En la sèrie de Freier i col. (2003a), la sobreexpressió de MYC era més freqüent en tumors faringis i laringis que en el CEO, de forma similar amb el que succeeix amb la ciclina D1. Eversole i Sapp (1993) varen demostrar que la sobreexpressió apareixia de

forma precoç en el CEO. En l'estudi de Tsuzuki i col. (2005), la sobreexpressió de MYC no s'associava amb mal pronòstic ni a disminució de la supervivència. En el nostre estudi, MYC se sobreexpressava en el 30% de CEO i en el 50% de metàstasis ganglionars, però no en la resta de mostres. La sobreexpressió de MYC es correlacionava amb el mida tumoral i la presència de metàstasis ganglionars, i era marginalment significativa en relació al risc de mort per la malaltia. En la nostra sèrie, MYC apareix com un marcador de progressió.

La presència de guanys genètics a la regió 8q24.12~q24.13 ha estat descrita en diversos tumors com el carcinoma escatós pulmonar (Kang i col., 2008), tumors ovàrics (Dimova i col., 2006) i limfomes, entre altres. Rodrigo i col. (1996) varen estudiar les amplificacions de *MYC* en 59 mostres de CEO per PCR, mostrant amplificacions en el 11% de les mostres. En el nostre estudi la presència de guanys de *MYC* era molt més freqüent, en el 81% de CEO i el 81% de metàstasis ganglionars, i es correlacionava amb la presència de sobreexpressió proteica.

7.2 Estat de la proteïna p53 i del gen *TP53* (locus 17p13)

La proteïna p53 respon a diversos senyals de dany i estrès cel·lular, de manera que regula diferents gens que indueixen l'aturada del cicle cel·lular, l'apoptosi, la senescència i la reparació de l'ADN (Yin i col., 2003). Les mutacions de *TP53* s'han descrit en diferents càncers humans, de manera que la proteïna resultant es incapaç d'unir-se a l'ADN i es perd la seva capacitat supressora. Així doncs, *TP53* és considerat un gen supressor clau que s'inactiva principalment per presentar delecions o mutacions sense sentit en més de la meitat de càncers humans (Strano i col., 2007).

En el cas del CEO, s'ha demostrat que p53 està sobreexpressada en relació a la presència de displàsia de la mucosa oral (Santos-Garcia i col., 2005), i les seves mutacions han estat descrites com un esdeveniment precoç en la carcinogènesi oral (Boyle i col., 1993). De forma similar, en els carcinomes de cap i coll s'ha descrit alta freqüència de mutacions de *TP53* i acumulació de la proteïna (Johnoson i col., 1999). Hartig i cols (2000) varen estudiar 31 tumors linguals i van trobar delecions en el 84% de les mostres. Aquest fet concorda amb els nostres resultats, en què el gen *TP53* es troba deleccionat en el 56% de CEO i en el 20% de metàstasis ganglionars, sense aparèixer alterat en cap cas benigne.

Sorprenentment, en el nostre estudi, no vàrem trobar correlació entre les troballes d'IHQ i de FISH, fet que pot ser degut a la dificultat de la interpretació de la tinció de p53 per IHQ (Cruz i col., 2002), així com a la possible presència d'altres mecanismes que expliquin la sobreexpressió de la proteïna (delecions i/o mutacions).

7.3 Estat de la proteïna Ciclina D1 i del gen *CCND1* (locus 11q13)

La sobreexpressió de ciclina D1 promou la proliferació cel·lular per la desregulació de la maquinària de control del cicle cel·lular; activa Cdk 4 i 6, que indueixen la hiperfosforilació del gen del retinoblastoma que condueix a una pèrdua del control del punt de restricció (Ewen i col., 2004), fent que la cèl·lula passi de la fase G1 a la S.

En l'estudi de Burnworth i cols. (2006), l'expressió de ciclina D1 és baixa en pell normal i està sobreexpressada en tumors cutanis, degut a amplificació gènica. En els articles referents a carcinomes de cap i coll es troben resultats variables. La seva sobreexpressió s'ha correlacionat amb un comportament més agressiu del tumor (Michalies i col., 1997; Kuo i col., 1999). Bova i cols. (1999) van demostrar una correlació de la sobreexpressió de ciclina D1 amb variables de pronòstic clínic. En canvi, en l'estudi de Freier i cols. (2003), no es va demostrar aquesta relació, i la sobreexpressió de ciclina D1 era un fenomen més propi dels tumors faringis que dels CEO.

En el nostre estudi, la ciclina D1 es troba sobreexpressada en el 80% de mostres de CEO i metàstasis ganglionars. No es detecta correlació amb paràmetres clinicopatològics.

L'amplificació de la regió 11q13 pot afectar diversos gens. Entre aquests, el gen de *CCDN1* sembla crucial ja que la ciclina D1 està constantment sobreexpressada quan el gen està amplificat (Weinberg, 1995). L'estat genètic del gen de *CCND1* en CEO i carcinomes de cap i coll ha estat estudiat per

diversos autors (Myamoto i col., 2002; Myo i col., 2005; Namazie i col., 2007;

Uzawa i col., 2007). En la bibliografia es detecten anomalies del gen que varien entre un 30% i 49% de mostres de CEO, i s'associen a mal pronòstic i malaltia avançada. En la nostra sèrie, vàrem detectar una alta proporció d'alteracions gèniques, en el 83% de mostres de CEO i el 72% de metàstasis ganglionars amb correlació amb la IHQ .

7.4 Estat de la proteïna EGFR i del gen *EGFR* (locus 7p12)

La família del receptor de creixement HER consisteix en quatre receptors de superfície cel·lular, incloent el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR, c-erb-1/HER1), c-erbB-2 (HER2/neu), c-erbB-3 (HER3) and c-erbB-4 (HER4). EGFR és un receptor important implicat en les vies de senyalització que modulen la proliferació i supervivència de les cèl·lules cancerígenes. La sobreexpressió d'EGFR s'ha observat en diversos tumors, incloent el CEO (Kuttan i col., 1997; Nouri i col., 2000). La seva significació pronòstica està en discussió. En el treball de Diniz-Freitas i cols (2007), la sobreexpressió no es relacionava amb el pronòstic. Prèviament, Kusakawa i cols. (1996) van correlacionar la sobreexpressió amb l'estadi tumoral avançat, l'estadi patològic avançat, i amb la incidència de metàstasis cervicals. En el present estudi, l'expressió d'EGFR no s'associava a cap de les variables descrites. La sobreexpressió es detectava en el 91% de mostres de CEO i el 53% de LKO. De forma interessant, el 63% de mostres de LPO també mostraven sobreexpressió, fet que no havia estat descrit anteriorment.

Les mutacions del gen EGFR s'han associat a una diversitat de neoplàsies, com gliomes, carcinoma pulmonar de no cèl·lules petites, carcinomes d'ovari i pròstata. És d'extrem interès en la patogènesi del càncer ja que està disponible un anticòs monoclonal contra la proteïna EGFR (cetuximab) que bloqueja l'activitat del receptor i s'utilitza en el tractament de certs tumors (Burtness i col., 2005). Chung i cols. (2006) demostren que en el 58% de les mostres de carcinoma escatós de cap i coll existeix un augment de còpies del gen *EGFR*.

Chiang i cols. (2008) estudien específicament CEO i mostren guanys genètics en el 33% de mostres. En la nostra sèrie, els guanys es detecten en el 55% de CEO i el 81% de metàstasis ganglionars; per bé que no existia correlació amb les troballes IHQ.

7.5 Estat de la proteïna ERBB2 i del gen *ERBB2* (locus 17q11)

ERBB2, també conegut com HER2/neu o c-erbB-2, és una proteïna amb activitat tirosinquinasa, homòloga al receptor de creixement epidèrmic. Actua estimulant la proliferació cel·lular. En diverses neoplàsies s'ha detectat l'augment dels nivells de la proteïna ERBB2 en cèl·lules i/o sèrum, com en el càncer de mama, ovari, pròstata, estómac, pàncrees, fetge i colon (Tolmachev i col., 2008). En casos de carcinoma escatós de cèrvix, s'ha relacionat la sobreexpressió de ERBB2 amb la severitat histològica de la lesió (Carreras i col., 2007). Guzzi i cols (2002) van estudiar els nivells de ERBB2 en el plasma de pacients amb LPO, LKO i controls i es van detectar diferències entre les mostres de leucoplàsies i els controls. De totes maneres, en la bibliografia existeixen resultats discordants en l'expressió de ERBB2 en carcinomes de cap i coll, i l'expressió varia segons la sèrie entre el 0 i el 50% de les mostres tumorals (Field i col., 1992; Craven i col., 1992; Khan i col., 2002; Fong i col., 2008; Freier i col., 2003a). En la nostra sèrie, la sobreexpressió es detecta en el 62% de CEO primaris, el 42% de OLK i el 18% de mostres de LPO.

L' ampliació d'*ERBB2* s'ha observat en diverses neoplàsies, com el càncer de mama (Pauletti i col., 1996), endometri (Saffari i col., 1995), pròstata, estómac (Ishikawa i col., 1997) i carcinoma esofàgic (Sato-Kuvawara i col., 2009). Khan i col. (2002) varen ser els primers que van confirmar l'amplificació d'*ERBB2* en casos de CEO amb sobreexpressió d'*ERBB2*. La presència de guanys genètics, englobant amplifacions i polisomies, s'apreciava en el 90% de metàstasis ganglionars i en el 75% de mostres de CEO.

En la nostra sèrie existeix correlació entre les troballes per FISH i les troballes IHQ, encara que la concordança entre ambdós resultats no és constant. De totes maneres, és més freqüent trobar la proteïna sobreexpressada sense amplificació o polisomia del gen implicat, com succeeix en les mostres de líquen pla o mostres sanes. Aquest fet és probablement degut a mecanismes post-transduccionals. Sauter i col. (2009) revisen els diferents tests per la detecció de *ERBB2* i conclouen que les dades actuals indiquen que l'estudi de *ERBB2* per FISH és més fiable que la IHQ degut a què la interpretació d'aquesta presenta un cert grau de subjectivitat que pot portar a una major inexactitud.

7.6 Estat de la proteïna CKS1B i el gen *CKS1B* (locus 1q21.2)

El gen de *CKS1B* està ubicat a la regió cromosòmica 1q21.2, que està amplificada en diferents tumors sòlids (Chu i col., 2001), inclòs el carcinoma escatós de cap i coll (Bockmuhl i col., 2002). La proteïna CKS1B (subunitat 1B de la protein-quinasa regulatòria CDC28) actua com una proteïna adaptadora que promou la ubiquitinització de p27, i induïx la seva degradació. De forma similar a CKS1B, SKP2 (proteïna 2 quinasa associada a la fase S) també induïx la degradació de p27. La sobreexpressió de CKS1B i SKP2 es correlaciona, per tant, amb la infraexpressió de p27 (Matsuda i col., 2003). Diferents estudis han correlacionat la pèrdua de p27 amb el caràcter agressiu de diferents neoplàsies, com les de mama, pròstata, carcinoma hepatocel·lular, colo-rectal i pulmonar (Inui i col., 2003; Shapira i col., 2004). La pèrdua de p27 també s'ha relacionat amb la resistència a fàrmacs, fet que pot tenir cert interès terapèutic (Abukhdeir i col., 2008).

Referent a l'expressió de CKS1B, la nostra sèrie mostra sobreexpressió en el 77% de les mostres de CEO i en el 46% de les metàstasis ganglionars, i per contra no s'observa expressió en les mostres de LKO, LPO i mucosa sana (únicament es podia detectar tinció de membrana en les cèl·lules de la capa basal). En la nostra sèrie s'ha observat una correlació entre la sobreexpressió de CKS1B, la infraexpressió de p27 i la sobreexpressió de SKP2 (fig. 9). L'estat genètic de *CKS1B* ha estat estudiat per FISH i s'han detectat amplificacions del

gen en el 53% de mostres de CEO i el 33% de metàstasis ganglionars (figura 10). Aquesta alteració només es trobava en el 14% de LKO i en cap cas de LPO. La presència de polisomies també era una troballa freqüent, que afectava el 46% de mostres de CEO, el 33% de metàstasis ganglionars, el 14% de LKO i el 10% de mostres de LPO. Existeix una correlació estadísticament significativa entre l'expressió de *CKS1B* i la presència de guanys, tant de polisomies com amplificacions gèniques.

Kitajima i cols (2004) han estudiat l'expressió de *CKS1B* en 63 casos de CEO i han detectat sobreexpressió en el 62% dels casos, amb resultats paral·lels als del nostre estudi. Aquest és el primer estudi, però, que aborda l'estat genètic de *CKS1B*, i demostra que les amplificacions d'aquest gen són freqüents en aquest tipus de tumor. La sobreexpressió de *CKS1B* pot ser atribuïda, per tant, a la presència de polisomies del cromosoma 1 o a amplificacions de 1q21.2.

Alguns dels marcadors proposats no han estat validats en estudis posteriors i la seva utilitat ha estat motiu de controvèrsia pels resultats contradictoris obtinguts en diferents estudis. En alguns casos el número de pacients inclosos en els estudis inicials és reduït, i a vegades s'inclouen grups força heterogenis, especialment en la localització dels tumors. També s'ha apuntat que existeix certa variabilitat intratumoral en l'expressió dels marcadors, i per tal d'evitar aquest fenomen s'hauria de realitzar un mostreig múltiple d'un mateix tumor.

La progressió tumoral és un fenomen multifactorial i per tal d' assolir una idea aproximada del procés dinàmic de la carcinogènesi i fer un abordatge pronòstic adequat, cal avaluar múltiples marcadors. Desafortunadament, la introducció de marcadors biològics a la pràctica clínica diària ha estat lenta i bastant ineficaç, amb manca d'estudis clínics que avaluïn la seva utilitat real i facilitin la seva aplicació definitiva. A més a més, la dispersió de dades publicades complica la comprensió acurada i integral de l'escena clínica (Massano i col., 2006).

8. LIMITACIONS DE L'ESTUDI

La citogenètica s'ha aplicat de forma extensa en la recerca oncològica, amb resultats variables. Així, en el camp de l'Hematologia, la citogenètica és actualment essencial per al diagnòstic, pronòstic i seguiment en les neoplàsies d'aquest camp. Aquesta tècnica ha permès entendre la patogènia de la majoria de discràsies sanguínies. En el cas dels tumors sòlids, però, la citogenètica ha mostrat certes limitacions en detectar múltiples alteracions en les mostres tumorals, que són, en general, poc específiques i que afecten tant a diversos oncogens com a gens supressors tumorals. En aquest escenari, la disfunció del cicle cel·lular és conseqüència de l'alteració en múltiples vies de senyalització. Aquests canvis sembla que siguin una conseqüència no específica d'una gran inestabilitat cromosòmica i carcinogènesi multiclonal, i les aberracions úniques sembla que tinguin poc impacte en la patogènia de la malaltia.

La tècnica de TMA permet l'escaneig simultani de múltiples mostres tumorals per al seu estudi genètic i molecular. Permet, doncs, l'estudi de l'expressió proteica i genètica amb tots els mètodes que tenim sobre teixit parafinat. La seva utilitat en la recerca oncològica, i específicament en l'àrea dels CEO (Freier i col., 2003b; Radhakrishnan i col., 2008), ha estat demostrada.

Aquesta tècnica, però, no permet l'anàlisi de la distribució dels antígens, fet que podria ser d'interès per diferenciar i comparar l'expressió de certs marcadors moleculars en la part més central del tumor i en la part més perifèrica. Les diferències en la distribució dels antígens en els tumors poden tenir interès en tumors heterogenis i hem de recordar que la naturalesa pròpia del CEO fa que

sigui un tumor multifocal i que és probable que existeixin aquestes diferències. Aquest fet podria explicar els resultats dispars de la bibliografia. Aquesta és la major limitació de la tècnica.

La pèrdua de cilindres en el TMA no es un fenomen rar. El procés de digestió, els rentats i la pròpia configuració del TMA que inclou cilindres de diferents llargades ho facilita. En el present estudi no ha estat infreqüent i ens ha limitat l'anàlisi en profunditat, especialment de les mostres ganglionars.

Per altra banda, cap de les mostres de OLK incloses mostraven displàsia severa, fet que pot explicar les poques troballes a nivell genètic que mostren aquest grup de malalts.

Fóra interessant l'estudi de l'evolució de la malaltia en un mateix pacient, és a dir, comparar mostres de leucoplàsia, CEO i metàstasi d'un mateix cas. Aquesta comparació podria posar de manifest l'addició d'alteracions citogenètiques i d'expressió proteica a mesura que la malaltia avança. Aquest treball ha estat concebut de forma retrospectiva per la qual cosa no hem disposat de les mostres adequades per dur a terme aquesta aproximació, que hagués requerit un temps de recollida de mostres major.

Així mateix, i per últim, cal remarcar que la presència del virus del papil·loma humà (VPH) no ha estat estudiada. La detecció de VPH en mostres de CEO ha estat analitzada amb anterioritat amb resultats variables (Miller i col., 2001). A

laringe i faringe, algunes sèries troben un percentatge alt d'infecció pel VPH, mentre que els tumors de la cavitat oral sembla que tenen incidències més baixes d'infecció (Termine i col., 2008). L'efecte carcinogènic del VPH ha estat relacionat amb l'efecte de les seves proteïnes E6 i E7, que produeixen degradació de p53 i inactivació de pRB, amb pèrdua de control del cicle cel·lular. La detecció per IHQ de p16 ha demostrat ser un marcador fiable per a la detecció de displàsia a nivell del cèrvix, on la proteïna està freqüentment sobreexpressada arran de la infecció per subtipus oncogenics del VPH (Klaes i col., 2001). Fregonesi i col. (2003) varen demostrar una associació forta entre la sobreexpressió de p16 i la infecció amb VPH d'alt risc en lesions orals. Tanmateix, la seva utilitat està en debat.

9. CONCLUSIONS

- 1- En el present estudi es detecten guanys genètics en els *loci* que afecten els gens de *CCND1*, *MYC*, *EGFR*, *CKS1B*, *ERBB2* i pèrdues del *TP53*, tant en mostres de CEO primari com metastàtic.
- 2- Describim la presència de sobreexpressió de ciclina D1, *MYC*, *ERBB2*, *EGFR*, *CKS1B* i p53, tant en mostres de CEO primari com metastàtic.
- 3- Hem demostrat una associació significativa entre la sobreexpressió de ciclina D1, *MYC*, *CKS1B* i *ERBB2* i el guany genètic dels gens corresponents.
- 4- Existeixen diferències significatives en la presència de les alteracions genètiques descrites per FISH entre patologia maligna (CEO i metàstasis limfàtiques), i, patologia premaligna (leucoplàsia) i inflamatòria (liquen pla oral), a excepció de la presència de polisomies en *EGFR*.
- 5- Existeixen diferències significatives en la presència de sobreexpressió de les proteïnes estudiades mitjançant IHQ entre patologia maligna (CEO i

metàstasis limfàtiques) vs patologia premaligna (leucoplàsia) i inflamatòria (liquen pla oral), a excepció de la sobreexpressió d'EGFR, per bé que apareix sobreexpressat en una proporció superior en mostres tumorals.

- 6- No hem pogut demostrar l'existència de correlació entre les aberracions detectades per FISH i una sèrie de paràmetres clínico-patològics recollits (mida tumoral, afectació limfàtica, grau de diferenciació, presència de recurrència i mort per la malaltia).

- 7- Hem detectat una correlació significativa entre la sobreexpressió de MYC i la mida tumoral i el risc de desenvolupar metàstasi limfàtica.

- 8- En el present estudi, la sobreexpressió de dues oncoproteïnes o l'alteració genètica en dos *loci* alhora en una mateixa mostra són exclusives de les mostres de CEO.

10. PRESENTACIONS A CONGRESSOS

- G. Martín-Ezquerra, R. Salgado, A. Toll, J. Manresa, F. Alameda, B. Espinet, MP. Garcia-Muret, Ramon M Pujol. Estudio comparativo de la expresión de p53, HER2, EGFR, ciclina D1, p16, pRB en carcinoma escamoso oral, leucoplasia, liquen plano y mucosa sana mediante inmunohistoquímica y técnica de microarrays. XXXVI Congreso Nacional de Dermatología, Barcelona 11-14 de juny de 2008. Comunicació oral.
- A Toll, G. Martín-Ezquerra, R. Salgado, M. Yébenes. T. Baro, F. Alameda, B. Espinet, R. Pujol. Caracterización del estatus de CKS1B en el carcinoma escamoso oral mediante inmunohistoquímica e hibridación in situ fluorescente. XXXVII Congreso Nacional de Dermatología y Venerología, Madrid, 17-20 juny del 2009. Comunicació Oral.
- G. Martín-Ezquerra, A Toll, R. Pujol. Carcinoma espinocelular: situación en el siglo XXI; XXXVIII Congreso Nacional de Dermatología, Málaga, 26-29 Maig del 2010. Conferència com a convidat.
- G. Martín-Ezquerra, R. Pujol. Genetic aberrations in squamous cell carcinomas. 22nd World Congress of Dermatology, Seul, Korea, 24-29 de maig del 2011. Conferència com a convidat.

11. PREMIS

1.- L'article "*Multiple genetic copy number alterations in oral squamous cell carcinoma: study of MYC, TP53, CCND1, EGFR and ERBB2 status in primary and metastatic tumours*", va ser premiat amb l'accèsit del premi Miguel Armijo, otorgat al 39è Congrés de Dermatologia i Veneorologia, Santiago de Compostela, 11 de juny del 2011

2.- La comunicació oral "*Caracterización del status de CKS1B en carcinoma escamoso oral mediante inmunohistoquímica e hibridación in situ fluorescente*" dels autors A.Toll, G. Martín-Ezquerra, R. Salgado, M. Yébenes, T. Baró, F. Alameda, B. Espinet, R. Pujol va ser premiada com la millor comunicació oral del 37è Congrés de Dermatologia i Veneorologia, Madrid, maig del 2009.

12. BIBLIOGRAFIA

Abukhdeir AM, Park BH. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* 2008;10:e19.

Anastasi J, Vardiman JW, Rudinsky R, Patel M, Nachman J, Rubin CM, Le Beau MM. Direct correlation of cytogenetic findings with cell morphology using in situ hybridization: an analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991;77:2456-66

Bayani J, Squire JA. Spectral karyotyping. *Methods Mol Biol* 2002;204:85-104.

Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:172-5.

Bockmuhl U, Schlununs K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I. Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes and Cancer* 2002;33:29-35.

Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, Jensen MJ, Morgan GJ, Hughes CJ, Sutherland RL. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res* 1999;5:2810-9.

Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Eby YJ, Ruppert JM, Sidransky D. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53:4477-80.

Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Head and neck cancer: molecular

carcinogenesis. *Ann Oncol* 2005;16:249-50.

Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2006;18:228-33.

Burnworth B, Popp S, Stark HJ, Steinkraus V, Bröcker EB, Hartschuh W, Birek C, Boukamp P. Gain of 11q/cyclin D1 overexpression is an essential early step in skin cancer development and causes abnormal tissue organization and differentiation. *Oncogene* 2006;27:4399-412.

Burtness B. The role of cetuximab in the treatment of squamous cell cancer of the head and neck. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5:1085-93.

Cai WW, Mao JH, Chow CW, Damani S, Balmain A, Bradley A. Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. *Nat Biotechnol* 2002;20:393-6.

Califano, Riet, Westra. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field characterization. *Cancer Res* 1996;56:2488-92.

Canoz O, Ozkan M, Arsav V, Er O, Coskun S, Soyuer S, et al. The Role of c-erbB-2 expression on the survival of patients with small-cell luna cancer. *Lung* 2006;284:267-72.

Carreras R, Alameda F, Mancebo G, García-Moreno P, Mariñoso ML, Costa C, Fusté P, Baró T, Serrano S. A study of Ki-67, c-erbB2 and cyclin D-1 expression in CIN-I, CIN-III and squamous cell carcinoma of the cervix. *Histol Histopathol* 2007;22:587-92.

Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: clinical implications. *Am J Med Genet* 2002;115:130-41.

Chiang WF, Liu SY, Yen CY, Lin CN, Chen YC, Lin SC, Chang KW. Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number amplification with neck lymph node metastasis in areca-associated oral carcinomas. *Oral Oncology* 2008;44:270-6.

Chu L, Pettaway W, Liang J. Genetic abnormalities specifically associated with varying metastatic potential of prostate cancer cell lines as detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;127:161-7.

Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Netterville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24:4170-6.

Craven JM, Pavelic ZP, Stambrook PJ, Pavelic L, Gapany M, Kelley DJ, Gapany S, Gluckman JL. Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma. *Anticancer Res* 1992;12:2273-6.

Cremer T, Landegent J, Brockner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 1986;74:346-52.

Cruz I, Snijders PJ, Van Houten V, Vosjan M, Van der Waal I, Meijer CJ. Specific p53 immunostaining patterns are associated with smoking habits in patients with oral squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 2002;55:834-40.

Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999;19:1-11.

Dimova I, Raitcheva S, Dimitrov R, Doganov N, Toncheva D. Correlations between c-myc gene copy-number and clinicopathological parameters of ovarian tumours. *Eur J Cancer* 2006;42:674-9.

Diniz-Freitas M, García-Caballero T, Antúnez-López J, Gándara-Rey JM, García-García A. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2007;13:285-90.

Eversole LR, Sapp J. MYC oncoprotein overexpression in oral precancerous and early cancerous lesions. *Oral Oncology Eur J Cancer* 1993; 29:131-5.

Ewen ME, Lamb J. The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. *Trends Mol Med* 2004;10:158-62.

Field JK, Spandidos DA, Yiagnosis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM. C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1992;12:613-9.

Fong Y, Chou SJ, Hung KF, Wu HT, Kao SY. An investigation of the differential expression of Her2/neu gene expression in normal oral mucosa, epithelial dysplasia, and oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2008;71:123-27.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidranski D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001;345:1890-900.

Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR, Soares CP. p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1291-7.

Freier K, Bosch FX, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Lichter P, Joos S, Hofele C. Distinct site-specific oncoprotein overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: a tissue microarray analysis. *Anticancer Res* 2003;23:3971-7.

Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Bosch FX, Lichter P, Hofele C. Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:1179-82.

Gamboa-Dominguez A, Dominguez-Fonseca C, Quintanilla-Martinez L, Reyes-Gutierrez E, Green D, Angeles-Angeles A, Busch R, Hermannstädter C, Nährig J, Becker KF, Becker I, Höfler H, Fend F, Lubber B. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Mod Pathol* 2004;17:579-87.

Garnis C, Rosin MP, Zhang L, Lam WL. Alteration of AKAP220, an upstream component of the Rb pathway, in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2005;116:813-19.

Guzzi G, Corsi MM, Pallotti F, La Porta CA, Spadari F. HER-2/neu expression in plasma and biopsy of patients with oral lichen planus in comparison to leukoplakia. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20:1027-28.

Happle R. Loss of heterozygosity in human skin. *J Am Acad Dermatol* 1999;41:143-64.

Hartig G, Zhang J, Voytovich GM, Newton M, Chen A, Collins SP, Wu SQ. Fluorescent in situ hybridization evaluation of p53 gene deletions at a tumor interface of lingual carcinoma. *Laryngoscope* 2000;110:1474-8.

Hopman AH, Wiegant J, Tesser GI, Van Duijn P. A non-radioactive in situ hybridization method based on mercurated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligands. *Nucleic Acids Res* 1986;14:6471-88.

Houldsworth J, Chaganti RS. Comparative genomic hybridization: an overview. *Am J Pathol* 1994;145:1253-60.

Imreh S, Klein G, Zabarovsky ER Search for unknown tumor-antagonizing genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:307-21.

Inui N, Kitagawa K, Miwa S, et al. High expression of CKS1B in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:978-84.

Ishikawa T, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T, Ooi A. Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1997;151:761-8.

James LA. Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J Pathol* 1999;187:385-95.

Jin Y, Martins C, Jin C, Salemark L, Jonsson N, Persson B, Roque L, Fonseca I, Wennerberg J. Nonrandom karyotypic features in squamous cell carcinomas of the skin. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;26:295-303.

Johnson NW, Warnakulasuriy S, Tavassoli M. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. *Eur J Cancer Prev* 1996;5:5-17.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;10:231-43.

Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Jung SS. Gain of the EGFR gene located on 7p12 is a frequent and early event in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Genetics Cytogenetics* 2008; 184:31-7.

Khan AJ, King BL, Smith BD, Smith GL, DiGiovanna MP, Carter D, Haffty BG. Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:540-8.

Kitajima S, Kudo Y, Ogawa I, Tatsuka M, Kawai H, Pagano M, Takata T. Role of Cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas: cooperation with Skp2 in promoting p27 degradation. *Am J Pathol* 2004;165:2147-55.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-84.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-7.

Kuo MY, Lin CY, Chiang CP. Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with quid chewing -related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1999;28:165-9.

Kusukawa J, Harada H, Shima I, Sasaguri Y, Kameyama T, Morimatsu M. The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32:217-21.

Kuttan NA, Bhakthan NM. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinomas: overexpression, localization and therapeutic implications. *Indian J Dent Res* 1997;8:9-18.

Lalkin A, Lishner M, Gaber E, Manor Y, Fejgin M, Ravid M, Amiel A. In situ hybridization: a simple and sensitive method for detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;70:21-4

Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2000;7:143-64.

Malumbres M i Barbacid J. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 2009;9:153-66

Martin CL, Reshmi SC, Ried T, Gottberg W, Wilson JW, Reddy JK, Khanna P, Johnson JT, Myers EN, Gollin SM. Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma: examination of 31 cell lines and review of the literature. *Oral Oncol* 2008;44:369-82.

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:67-76.

Matsuda T, Inoue H, Nishida K, et al. Cyclin-dependent kinase 1 ene expresión is associated with poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9; 5693-8.

Michalides RJ, Van Veelen N, Kristel PMP, Hart AAM, Loftus BM, Hilgers FJM, alm AJM. Overexpression of cyclin D1 indicates poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg* 1997; 123:497-502.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622-35.

Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2011). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>"

Miyamoto R, Uzawa N, Nagaoka S, Nakakuki K, Hirata Y, Amagasa T. Potential marker of oral squamous cell carcinoma aggressiveness detected by fluorescence in situ hybridization in fine-needle aspiration biopsies. *Cancer* 2002;95:2152-9.

Mrozek K, Heinonen K, Theil KS, Bloomfield CD. Spectral karyotyping in patients with acute myeloid leukemia and a complex karyotype shows hidden aberrations, including recurrent overrepresentation of 21q, 11q, and 22q. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:137-53.

Myo K, Uzawa N, Miyamoto R, Sonoda I, Yuki Y, Amagasa T. Cyclin D1 gene numerical aberration is a predictive marker for occult cervical lymph node metastasis in TNM Stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 2005;104:2709-16.

Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Ghamohammadi M, Gornbein JA, Calcaterra TC, Slamon DJ, Wang MB, Srivatsan ES. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope* 2002;112:472-81.

Nouri AM, Thompson C, Cannell H, Symes M, Purkiss S, Amirghofran Z. Profile of epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in human malignancies: effects of exposure to EGF and its biological influence on established human tumour cell lines. *Int J Mol Med* 2000;6:495-500.

Ohta S, Uemura H, Matsui Y, et al. T, Danenberg K, Danenberg PV, Tohnai I, Kubota Y. Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:81-91.

Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 2004;66:488-95.

Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969; 60:600-4.

Parente F, Gaudray P, Carle GF, Turc-Carel C. Experimental assessment of the detection limit of genomic amplification by comparative genomic hybridization

CGH. *Cytogenet Cell Genet* 1997;78:65-8.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.

Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996; 4;13:63-72.

Pérez Losada A, Woessner S, Solé F, Caballn MR, Florensa L. Selective chromosome painting using in situ hybridization. *Sangre (Barc)* 1993;38:151-4.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:2934-8.

Price CM. Fluorescence in situ hybridization. *Blood Rev* 1993;7:127-34.

Que TH, Marco JG, Ellis J, Matutes E, Babapulle VB, Boyle S, Catovsky D. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood* 1993;82:571-5.

Radhakrishnan R, Solomon M, Satyamoorthy K, Martin LE, Lingen MW. Tissue microarray – a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med* 2008; 37:166–76.

Reshmi S, Saunders W, Kudla D, Ragin C, Gollin S. Chromosomal instability and marker chromosome evolution in oral squamous cell carcinoma. *Genes, Chromosomes Cancer* 2004;41:38-46.

Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S, Alvarez I, Suarez C. MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:504-7.

Rowley JD, Reshmi S, Carlson K, Roulston D. Spectral karyotype analysis of T-cell acute leukemia. *Blood* 1999;93:2038-42.

Saffari B, Jones LA, el-Naggar A, Felix JC, George J, Press MF. Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB2) in endometrial cancers: correlation with overall survival. *Cancer Res* 1995;55:5693-8.

Santos-García A, Abad-Hernández MM, Fonseca-Sánchez E, Cruz-Hernández JJ, Bullón-Sopelana A. Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:5-8.

Sato-Kuwabara Y, Neves JI, Fregnani JH, Sallum RA, Soares FA. Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using Fluorescence in situ Hybridization (FISH) and immunohistochemistry. *BMC Cancer* 2009;9:6.

Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009;27:1323-33.

Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U. c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. *Mod Pathol* 2002;15:462-9.

Schoenberg Fejzo M, Slamon DJ. Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA and Proteins. *Am J Pathol* 2001;159:645-50.

Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999;5:1966-75.

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494-7.

Shapira M, Ben-Izhak O, Bishara B et al. Alteration in the expression of the cell cycle regulatory protein CKS1B in colorectal carcinoma. *Cancer* 2004; 100:1615-21.

Soni S, Kaur J, Kumar A, et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology* 2005;68:314-25.

Strano S, Dell'Orso S, Mongiovi AM, Monti O, Lapi E, Di Agostino S, Fontemaggi G, Blandino G. Mutant p53 proteins: between loss and gain of function. *Head Neck* 2007;29:488-96.

Tchinda J, Neumann TE, Volpert S, Berdel WE, Bochner T, Horst J. Characterization of chromosomal rearrangements in hematological diseases using spectral karyotyping. *Diagn Mol Pathol* 2004;13:190-5.

Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 2008;19:1681-90.

Tolmachev V. Imaging of HER-2 overexpression in tumors for guiding therapy. *Curr Pharm Des* 2008;14:2999-3019.

Tsuzuki H, Sunaga H, Ito T, Narita N, Sugimoto C, Fujieda S. Reliability of platelet-derived endothelial cell growth factor as a prognostic factor for oral and oropharyngeal carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131:1071-8.

Uzawa N, Sonoda I, Myo K, Takahashi K, Miyamoto R, Amagasa T. Fluorescence in situ hybridization for detecting genomic alterations of cyclin D1 and p16 in oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2007;110:2230-9.

Varella-Garcia M. Molecular cytogenetics in solid tumors: laboratorial tool for diagnosis, prognosis, and therapy. *Oncologist* 2003;8:45-58.

Veldman T, Vignon C, Schröder E, Rowley JD, Ried T. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet* 1997;15:406-10.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323-30.

Yin Y. p53 kingdom, a new prospect for its control mechanism and apoptotic defense. *Cell Cycle* 2003;2:279-80.

ANNEX I

PROTOCOL PER A LA TINCIÓ D'IMMUNOHISTOQUÍMICA SOBRE MOSTRES EN PARAFINA

Kits utilitzats:

Kit Flex + (Dako, Glostrup, Denmark)

1. Desparafinar les laminetes i hidratar

- Xilol 3x10 min
- 100% Etanol 2x5 min
- 70% Etanol 1x5 min
- Esbandir amb aigua destil·lada

2. Desemmascament d'antígens (si cal) amb PTlink solució de desemmascament pH Low o pH High (Dako, Glostrup, Denmark), segons l'anticòs (en l'estudi de EGFR es realitza amb l'enzim proteinasa K, seguint les instruccions del Kit).

3. Rentat en TBS-T (1X) durant 5 minuts a temperatura ambient

Inici del procés automatitzat amb Autostainer plus Link 48 (Dako)

4. Bloquejar la peroxidasa endògena amb peròxid d'hidrogen al 3% durant 10 minuts a temperatura ambient

5. Rentat en TBS-T (1X) 3x5min

6. Dilució de l'Anticòs primari i incubació durant 30 minuts 7. Rentat en TBS-T (1X) 3x5min

7. Incubació amb anticòs secundari unit a peroxidasa durant 20 minuts (Envision + Flex)

8. Rentat en TBS-T (1X) 3x5min

9. Revelat amb substrat cromogen: substrat cromògen H₂O₂-Tetrahidroclorur de 3,3-Diaminobenzidina (DAB)

10. Esbandir amb aigua destil·lada 3x5min
11. Contrast amb hematoxilina de Mayer
12. Esbandir amb aigua.
13. Deshidratar
 - Etanol 100% 3x1min
 - 3x1min xilol
14. Muntatge amb DPX

ANNEX II

PROTOCOL PER A LA REALITZACIÓ DE LA TÈCNICA DE FISH SOBRE MOSTRES EN PARAFINA

DIA 1

Preparació del tall

- Tallar el bloc d'estudi en seccions de 2-4µm i muntar-lo sobre un portaobjectes silanitzat(carregat positivament perquè s'adhereixi la mostra).
- Col·locar els portaobjectes de mitja hora a tota la nit en estufa a 65°C (fins que la parafina plori).

Desparafinar els portes

- Xilol 10 min. (3 vegades)
- Etanol 100% 5 min. (2 vegades)
- Etanol 80% 5 min.
- Etanol 70% 5 min.
- H2O destil·lada

Conservar els portaobjectes en H2O destil·lada fins al seu pretractament. (Si no es va a realitzar immediatament guardar en nevera).

Pretractament amb EDTA-Microones

- Col·locar els portes en un recipient amb tampó EDTA i incubar durant 3 tandes de 7 – 5 – 7 minuts en microones (Màxima Potència).
- Evitar que la solució EDTA bulli. En aquest cas, parar el microones i deixar refredar. Continuar amb els minuts restants d'incubació quan la solució s'hagi refredat.
- Col·locar els portaobjectes en un coplin amb aigua destil·lada.

NOTA: El temps de EDTA s'ha d'ajustar al microones utilitzat.

Tractament amb pepsina

- Precalear la càmera humida a 37°C i preparar les següents solucions:
- Solució 0.1mm de HCl (Pepsina, SIGMA, P7012):
10 ml H₂O
100 µl HCl 1M
5 µl pepsina (100 mg/ml)
- Solució de STOP:
50 ml PBS 1X
2.5 ml MgCl₂ 1M (100 ml aigua destil·lada + 20.33 g MgCl₂; Merck, art. 5833)

- Col·locar 40 µl de la solució amb pepsina en un cobreobjectes de 24x40 mm o deixar caure el portaobjectes.
- Incubar 30 min en una càmera humida en una estufa a 37°C. El temps es pot allargar a 45 minuts si no s'aconsegueix una bona digestió.
- Retirar el cobreobjectes acuradament i introduir els portes en la solució de STOP durant 5 min.
- Rentar en aigua destil·lada.
- Assecar els portes.

Preparació de la sonda

- Si la sonda no ve preparada per a la hibridació directa barrejar en un eppendorf a temperatura ambient:
- 3.5 µL de tampó d'hibridació
- 0.5 µL de sonda
- 1 µL d'aigua destil·lada dins d'un eppendorf estèril
- Fer un spin de la barreja.
- Col·locar els 5 µL de la barreja de la sonda sobre el portaobjectes.
- Tapar amb un cobreobjectes net de 20x20 mm i segellar amb cola (FixoGum Ruber Cement, Marabu, REF.LK-071A) o parafilm.

Desnaturalització-Hibridació

- Encendre el hibridador.
- Seleccionar el programa a utilitzar. Utilitzarem les següents temperatures:
- Melting: 80°C, 5 min.
- Hybridization: 37°C, 30 h.
- Col·locar en les ranures dels costats del hibridador paper humit per mantenir la humitat durant el procés d'hibridació.
- Col·locar el portaobjectes en la superfície (vigilar que els portaobjectes quedin ben col·locats i toquin en tota la seva superfície la placa).

DIA 2

Rentats post-hibridació

- Posar el bany a 45°C i col·locar les solucions de rentat.
- 3 coplins amb formamida 50%
- 1 coplin amb 2xSSC
- 1 coplin amb 2xSSC/0.1% NP-40
- Eliminar suaument la cola (o parafilm) i començar els rentats:
- Realitzar 3 rentats en formamida 50% durant 10' a 45°C.
- Realitzar 1 rentat en 2xSSC durant 10' a 45°C.
- Realitzar 1 rentat en 2xSSC/0.1% NP-40 durant 5' a 45°C.

Contratinció

- Sobre el portaobjectes, encara humit, col·locar 7µL de DAPI II (AbbottMolecular, ref. 53232-804831) i un cobreobjectes damunt. Assecar l'excés de DAPI II amb un paper absorbent fins que el cobreobjectes no es mogui.
- Mantenir les preparacions a -20°C en una caixa fosca. Deixar reposar mínim de 20-30 minuts a -20°C abans de l'observació.