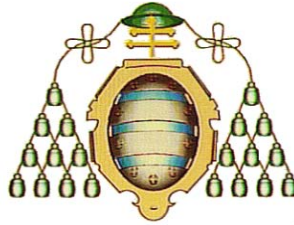


UNIVERSIDAD DE OVIEDO

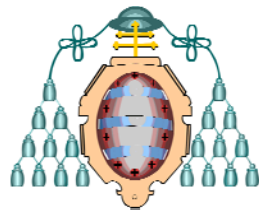
Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Patrón de alteraciones genético-moleculares en los carcinomas epidermoides de laringe y faringe y en sus correspondientes metástasis linfáticas

Marta Alonso Guervós



Reservados todos los derechos  
© El autor

Edita: Universidad de Oviedo,  
Biblioteca Universitaria, 2009  
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 53  
ISBN. 978-84-692-2639-1  
D.L.: AS.00741-2009





## INDICE

Agradecimientos	13
Abreviaturas	15
Glosario	15
Bases previas	17
I- Presentación	19
II- Estado actual del conocimiento de los carcinomas escamosos de laringe y faringe	23
II-1. Aspectos clínico-patológicos	24
II-1.1. Epidemiología y clínica	24
II-1.2. Factores etiológicos	25
II-1.3. Anatomía patológica	26
II-1.4. Estadificación	27
II-1.5. Factores pronósticos	29
II-2. Aspectos genéticos	31
II-2.1. Inestabilidad cromosómica en tumores sólidos	31
II-2.2. Modelos de progresión tumoral	33
II-2.3. Genes asociados	34
III- Técnicas de análisis genético-molecular	35
III-1. Citometría de flujo	36
III-2. Cariotipado	37
III-3. FISH	38
III-4. CGH y Array-CGH	39
III-5. SKY	41
III-6. MLPA	41
IV- Modelo teórico	43
V- Hipótesis de trabajo	47
VI- Objetivos	51
VII- Material y métodos	55
VII-1. Sujetos de estudio	56
VII-2. Recogida de muestras	56
VII-3. Extracción de ADN	57
VII-3.1. A partir de tejido fresco	57
VII-3.2. A partir de tejido en parafina	58
VII-3.3. A partir de sangre periférica	59
VII-4. Preparación de metafases normales	59
VII-5. Técnica de CGH	60
VII-6. Técnica de MLPA	61
VII-6.1. Tipos de sondas	61
VII-6.2. Pasos del experimento	62
VII-6.3. Interpretación de datos	66
VII-7. Descripción de las variables	67
VII-8. Análisis estadístico	68

VII-9. Búsqueda bibliográfica	68
VII-10. Reactivos empleados	68
VIII- Resultados	71
VIII-1. Clínico-patológicos	72
VIII-2. Citométricos	75
VIII-3- Cromosómicos	77
VIII-3.1. Alteraciones cromosómicas	77
VIII-3.2. Correlación de las alteraciones cromosómicas en los tumores primarios metastáticos y no metastáticos	81
VIII-3.3 Correlación de las alteraciones cromosómicas con los datos clínico-patológicos y citométricos	82
VIII-4. Génicos	85
VIII-4.1. Alteraciones génicas	85
VIII-4.1.1. Grupo completo de tumores primarios	85
VIII-4.1.2. Tumores primarios metastáticos y no metastáticos	88
VIII-4.1.3. Metástasis ganglionares	91
VIII-4.2. Correlación de las alteraciones génicas	95
VIII-4.2.1. Grupo completo de tumores primarios y metástasis ganglionares	95
VIII-4.2.2. Tumores primarios metastáticos y no metastáticos	96
VIII-4.2.3. Cada tumor primario metastático con su correspondiente metástasis ganglionar	97
VIII-4.3. Correlación de las alteraciones génicas de los tumores primarios con losdatos clínico-patológicos y citométricos	98
VIII-4.4. Comparación de las alteraciones cromosómicas y génicas	101
IX- Discusión	105
IX-1. Datos clínico-patológicos	106
IX-2. Datos citométricos	106
IX-3. Datos cromosómicos	107
IX-4. Datos génicos	110
X- Conclusiones	117
XI-Perspectivas futuras	121
XII- Bibliografía	125
XIII- Anexos	137
Anexo I. Cariotipo humano	139
Anexo II. Datos clínico-patológicos	140
Anexo III. Datos citométricos y cromosómicos	142
Anexo IV. Localización cromosómica de las 42 sondas de MLPA "SALSA P048"	144

## AGRADECIMIENTOS

Después de muchos años de trabajo en varios laboratorios me he decidido a escribir esta tesis. Todos los que me habéis ayudado sabéis lo mucho que os estoy agradecida.

Mis tres directores de tesis han sido fundamentales: Andrés Sampedro Nuño, CAM y José Luis Llorente Pendás. Me habéis ayudado a dar forma a este libro con mucha paciencia, energía y optimismo. ¡Pero qué mayor soy, Andrés! También agradecer a los miembros del tribunal su presencia en la defensa de esta tesis. Al Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas por aceptar su inscripción y a los miembros de la secretaría del departamento, Adela y Pedro, por su ayuda con los trámites burocráticos que una tesis conlleva.

Ana Salas Bustamante, Juan Ramón de los Toyos y Ángel Martínez Nistal. Con vosotros comencé a dar los primeros pasos en la citometría de flujo, los cultivos celulares y la purificación de anticuerpos monoclonales, la microscopía confocal y el análisis digital de imágenes. Janneke Weiss y Antoine Snijders, gracias por llevarme de la mano, junto con Mario Hermsen, por el mundo de la CGH. José Luis Martínez Fernández y Eva Allonca Campa, siempre dispuestos a compartir conmigo "la PCR" y analizar mis "fragmentos". Jan Baak, Paul van Diest y Gerrit Meijer. Me recibisteis tan bien en "KP" que decidí quedarme más tiempo. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en vuestro laboratorio. También a Evelin Schröck y sus chicas del laboratorio de Jena con las que aprendí a ver los cromosomas en colores con SKY. Y Mario Hermsen, siempre a mi lado para enseñarme, ayudarme y pensar juntos como darle forma a esta tesis y a nuestra vida. Bedankt jochie!

A todos los compañeros del antiguo Servicio Común de Citometría y Proceso de Imágenes y la asociación TATIANA de la Universidad de Oviedo y a los compañeros del Departamento de Anatomía Patológica Cuantitativa, "de KP", del centro médico, VUmc de Amsterdam con los que compartí trabajo y tiempo libre. A toda mi familia y amigos por escuchar la evolución de esta tesis y animarme a verlo más claro.

Mi mayor agradecimiento a todos por ayudarme a hacer posible que esta tesis esté terminada.

Muncó, 20 Octubre 2005, MARTA

Abreviaturas de los agradecimientos: CAM: César Álvarez Marcos





## ABREVIATURAS

**CECC:** carcinomas escamosos de cabeza y cuello

**CGH:** "comparative genomic hybridization" (hibridación genómica comparativa)

**CLF:** carcinomas de laringe y faringe

**FISH:** "fluorescence in situ hybridization" (hibridación "in situ" fluorescente)

**LOH:** "loss of heterozygosity" (pérdida de heterocigosidad)

**MLPA:** "multiplex ligation-dependent probe amplification" (múltiple amplificación de sondas dependientes de ligación)

**N<sub>0</sub>:** ganglios linfáticos sin metástasis

**N<sub>+</sub>:** ganglios linfáticos con metástasis

**NIL:** neoplasia intraepitelial laríngea

**pTNM:** TNM patológico

**SKY:** "spectral karyotyping" (cariotipado espectral)

**VAS:** vía aerodigestiva superior

## GLOSARIO

**Alteraciones cromosómicas:** cambios en el contenido global de material genético por pérdidas, ganancias o amplificaciones de una región cromosómica, un brazo o un cromosoma completo.

**Alteraciones no compensadas:** alteraciones cromosómicas que conllevan a una pérdida o una ganancia global de material genético.

**Alteraciones compensadas:** alteraciones cromosómicas sin pérdida ni ganancia global de material genético.

**Inestabilidad cromosómica:** falta de estabilidad en los cromosomas de una célula o células de un tejido que provoca el acúmulo progresivo de alteraciones cromosómicas y el desarrollo de tumores.

**-pter:** región cromosómica que abarca hasta el final del brazo p. Por ejemplo: 18p11-pter.

**-qter:** región cromosómica que abarca hasta el final del brazo q. Por ejemplo: 3q26-qter.



## **BASES PREVIAS**

Esta tesis doctoral es fruto de la línea de investigación sobre carcinomas escamosos de cabeza y cuello que el grupo de Oncología de Cabeza y Cuello del Hospital Universitario Central de Asturias y la Universidad de Oviedo, está desarrollando en los últimos años. Sus resultados están apoyados por sucesivas aportaciones científicas que a continuación enumeramos por orden cronológico:

### **Comunicaciones a Congresos**

- Hevia Llamas R, Álvarez Marcos C, Sampedro Nuño A, Suárez Nieto C, Alonso Guervós M, Noval Menéndez J. Ploidía de ADN y fase S en relación con las metástasis del carcinoma epidermoide faringo-laríngeo. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-facial. Las Palmas de Gran Canaria, 13-16 octubre, 1998. Comunicación oral.
- MA Guervós, MAJA Hermsen, C Álvarez-Marcos, A Salas, A Sampedro, PJ van Diest. Chromosomal gains and losses in larynx and pharynx carcinomas by comparative genomic hybridization (CGH). 6th Congress of the European Society for Analytical Cellular Pathology. Heilderberg (Alemania), 7-11 abril, 1999. Póster.
- MA Guervós, MAJA Hermsen, C Álvarez-Marcos, GA Meier, PJ van Diest, JPA Baak, A Salas, A Sampedro. Estudio de las alteraciones cromosómicas en carcinomas faringolaríngeos por hibridación genómica comparativa. VI Congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría. Salamanca, 3-5 junio, 1999. Comunicación oral.
- MA Guervós, MAJA Hermsen, C Álvarez-Marcos, GA Meijer, PJ van Diest, JPA Baak, A Salas, A Sampedro. Patterns of chromosomal alterations in larynx and pharynx carcinomas by comparative genomic hybridization (CGH). 17<sup>th</sup> European Congress of Pathology. Barcelona, 18-23 septiembre, 1999. Póster.
- MA Guervós, MAJA Hermsen, C Álvarez-Marcos, GA Meijer, PJ van Diest, JPA Baak, A Salas, A Sampedro. Aberraciones cromosómicas en el carcinoma faringolaríngeo (CLF) mediante la técnica de hibridación genómica comparativa (CGH). III Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 15 febrero a 15 abril 2000. <http://congonat.uniovi.es>.
- M Hermsen, MA Guervós, S Tänzer, J Baak, G Meijer, E Schröck. Differences in structural chromosomal aberrations between two types of epithelial tumors: oral squamous cell carcinoma versus colorectal adenocarcinoma. 14<sup>th</sup> International Society for Diagnostic Quantitative Pathology (ISDQP). Oviedo, 26-29 septiembre, 2001. Comunicación oral.
- M Hermsen, M Alonso Guervós, JL Llorente Pendás, C Álvarez Marcos, C Suárez Nieto. Gene copy number changes in 56 larynx and pharynx squamous cell carcinomas and their corresponding metastases. ISCO Belfast (Irlanda del Norte), 5-8 abril, 2005. Comunicación oral.
- M Alonso Guervós, M Hermsen, JL Llorente Pendás, C Suárez Nieto, C Álvarez Marcos. Alteraciones genético-moleculares en carcinomas de células escamosas de laringe y faringe y sus correspondientes metástasis. LVI Congreso Nacional de

la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-facial. Madrid, 12-15 noviembre, 2005. Comunicación oral.

C Álvarez Marcos, V Franco, MP Cuesta, M Puente, M Alonso Guervós, JL Llorente, C Suárez. Segundos tumores primarios y metástasis a distancia en los carcinomas de cabeza y cuello. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-facial. Madrid, 12-15 noviembre, 2005. Comunicación oral.

### **Artículos**

Sampedro A, Álvarez C, Martínez JA, Suárez C, Alonso-Guervós M, de los Toyos JR. Cell proliferation activity and kinetic profile in the prognosis and therapeutic management of carcinoma of the pharynx and larynx. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1999; 121:478-81.

Hermesen M, Guervós MA, Meijer G, Baak J, van Diest P, Marcos CA, Sampedro A. New chromosomal regions with high-level amplifications in squamous cell carcinomas of the larynx and pharynx, identified by comparative genomic hybridization. *J. Pathol.*, 2001; 194:177-182.

Sampedro Nuño A, Ariza Cobos M, Álvarez Marcos C, Hermesen, Alonso Guervós M, Salas Bustamante A, de los Toyos González JR. Alteraciones genético-moleculares en la progresión del cáncer faríngeo-laríngeo. En: Avances de una década en oncología quirúrgica. Enrique Martínez Rodríguez, José Paz Jiménez. Servicio de Publicaciones. Universidad de Oviedo, 2001.

Hardisson D, Álvarez Marcos C, Salas Bustamante A, Alonso Guervós M, Sastre Noelia, Sampedro A. Numerical aberrations of chromosomes 8,9,11 and 17 in squamous cell carcinoma of the pharynx and larynx: a fluorescent in situ hybridization and DNA flow cytometric analysis of 50 cases. *Oral Oncol.*, 2004; 40:409-417.

Hermesen M, Alonso Guervós M, Meijer G, van Diest P, Suárez Nieto C, Álvarez Marcos C, Sampedro A. Chromosomal changes in relation to clinical outcome in larynx and pharynx squamous cell carcinoma. *Cell Oncol.*, 2005; 27:191-198.





## I- Presentación

Los CECC ocupan el octavo lugar entre las neoplasias del sexo masculino, presentando el Principado de Asturias una de las tasas de incidencia más altas de España. Son tumores en los que se constata su estrecha relación con el consumo de tabaco y alcohol y, por tanto, son potencialmente evitables. Aunque se han realizado importantes avances en su diagnóstico y tratamiento, la supervivencia se ha modificado poco en los últimos años, debido a que se diagnostican en estadios avanzados. Dentro de la estadificación TNM, el factor que más influye en la supervivencia es la metástasis en los ganglios linfáticos cervicales. Sin embargo, la clasificación TNM no puede explicar por qué tumores con estadio similar tienen, en muchas ocasiones, evolución muy diferente, limitando su utilidad en el pronóstico individual.

En cuanto a las alteraciones genético-moleculares, los carcinomas escamosos son los tumores sólidos donde se han detectado los cambios cromosómicos más complejos. Se han diseñado modelos basados en LOH, que proponen pérdidas progresivas desde lesiones preinvasivas (9p21, 3p21, 17p13) hasta tumores avanzados (11q13, 13q21, 14q31), pero que no tienen en cuenta el papel de las ganancias cromosómicas en 3q26, 5p15, 7p12, 11q13, etc, que han sido detectadas mediante el estudio completo del genoma por CGH. En todas estas regiones cromosómicas se encuentran múltiples genes que pueden estar implicados en la progresión de la neoplasia. Así, el gen supresor *CDKN2A* localizado en 9p21, los oncogenes *CCND1/PRAD1* y *EMS1* en 11q13, el *TP53* en 17p13. Otros oncogenes candidatos son *cErbB1* en 7p12, *hTERT* en 5p15, y *PIK3CA* en 3q26. Aunque estos hallazgos son muy importantes y han contribuido a esclarecer la complejidad genética de los CECC, es una opinión, compartida por la mayoría de los investigadores, que estos son sólo el inicio de estudios más amplios que nos permitan ir conociendo el entramado genético de este tipo de tumores y su expresión proteica, para comprender su progresión hacia la formación de metástasis.

Personalmente, el trabajo realizado en el laboratorio del Servicio de Citometría y Proceso de Imágenes de la Universidad de Oviedo y en el Departamento de Anatomía Patológica Cuantitativa del Centro Médico, VUmc, de Amsterdam me han llevado a profundizar mis conocimientos en los CLF y sus alteraciones cromosómicas y genéticas. Todos estos años de investigación junto con la experiencia del Grupo de Oncología de Cabeza y Cuello del Hospital Universitario de Oviedo, me han permitido estudiar las alteraciones genético-moleculares que en estos tumores conducen a la formación de metástasis ganglionares, motivo principal de este trabajo de investigación.





**II- Estado actual del conocimiento  
de los carcinomas escamosos de laringe y faringe**

## II- Estado actual del conocimiento de los carcinomas escamosos de laringe y faringe

### II-1. Aspectos clínico-patológicos

Bajo el término de CECC se incluyen los tumores malignos de la VAS con etiología e histología similar. Se originan en la cavidad oral, faringe y laringe, así como en otras regiones vecinas (nasofaringe o cavum, fosa nasal, tiroides y glándulas salivales). En este estudio analizaremos los CLF de tipo escamoso ya que es la localización e histopatología más frecuente en estas neoplasias<sup>1</sup>.

#### II-1.1. Epidemiología y clínica

Los CLF representan el 56% de todas las neoplasias malignas de cabeza y cuello. Constituyen el 2,2-3,7% de todos los cánceres del organismo y causan el 1,5-2,5% de las muertes por tumores malignos<sup>2</sup>. Su incidencia se mantiene estable en España en torno a 24 casos por 100.000 habitantes/año en varones y 0,5 casos por 100.000 habitantes/año en mujeres. Este predominio masculino del 95% se reduce en los países anglosajones a una relación 5:1. La edad de mayor incidencia son los 60-70 años<sup>3,4</sup>.

Desde el punto de vista anatomo-clínico la **laringe** se divide en tres niveles diferentes: *supraglotis* (epiglotis, repliegues aritenoides-epiglóticos, aritenoides, bandas ventriculares y ventrículos de Morgagni), *glotis* (cuerdas vocales y comisuras anterior y posterior), *subglotis* (límite inferior de cuerdas vocales a límite inferior de cartílago cricoides) y *transglotis* (extensión en dos o más regiones laríngeas). En la **faringe** encontramos la *orofaringe* (base de la lengua, región amigdalina, paladar blando y pared posterior), la *hipofaringe* (seno piriforme, pared posterior y zona retrocricóidea) y la *nasofaringe o cavum*, que excluimos en este estudio por tratarse de tumores con una etiología, patología, tratamiento y pronóstico totalmente distintos al de los originados en el resto de la faringe<sup>5</sup>.

Los tumores de laringe ocurren más frecuentemente que los de faringe (31% laringe y 25% faringe), siendo a su vez los tumores de la región supraglótica más frecuentes (60-70%) que los glóticos (30-35%)<sup>3,4</sup>. En la faringe, la región que más frecuentemente desarrolla neoplasias malignas es la orofaringe.

Las manifestaciones clínicas y las metástasis ganglionares cervicales también son muy variables de una localización a otra. Los tumores glóticos comienzan con disfonía que favorece su detección en fases preinvasivas o iniciales de la enfermedad (carcinoma *in situ* y estadios I y II). Las metástasis ganglionares en esta localización son muy bajas

(3-4%). En cambio las lesiones supraglóticas y faríngeas, con una clínica más inespecífica (molestias al tragar, otalgia, etc...) suelen diagnosticarse en estadios más avanzados (III y IV), con metástasis ganglionares en el 40-50% de los casos.

Es un hecho frecuente el desarrollo de segundas neoplasias (15-20%), sincrónicas o metacrónicas al tumor primario, en la VAS, esófago o pulmón, por ser órganos expuestos a similares agentes carcinógenos<sup>6,7</sup>. Un segundo tumor primario de origen pulmonar o esofágico tiene, en la mayoría de los casos, un pronóstico infausto, mientras que puede ser susceptible de tratamiento curativo si es de cavidad oral o laringe. Las metástasis a distancia en el momento del diagnóstico son poco frecuentes y cuando aparecen (10%) lo hacen preferentemente a nivel óseo o pulmonar.

### *II-1.2. Factores etiológicos*

Aunque la etiología de los CLF no está totalmente definida, existen diversos factores ambientales y genéticos relacionados con su aparición, unos de forma clara y evidente, como el alcohol y el tabaco, y otros de forma más controvertida.

Tabaco. Múltiples estudios demuestran la relación que existe entre el hábito al tabaco y el cáncer. De hecho este tipo de neoplasia se presenta en un 90% de los casos en fumadores, siendo excepcional en no fumadores<sup>8</sup>. El tabaco posee sustancias carcinogénicas iniciadoras y promotoras de los cambios genéticos que favorecen el desarrollo de tumores. Existe además una relación dosis-efecto, de modo que la probabilidad de un CLF aumenta a mayor cantidad de cigarrillos consumidos. El riesgo relativo de cáncer laríngeo para los fumadores es de 6,1-15,8 con respecto a los no fumadores<sup>9</sup>.

Alcohol. El consumo de alcohol también se asocia con la aparición de este tumor, especialmente en las localizaciones supraglótica y faríngea, multiplicando el riesgo cuando se combina con el tabaco<sup>10</sup>. Así mismo, el alcohol actúa manteniendo el efecto irritativo y potenciando la acción carcinogénica del tabaco en los tumores glóticos.

Enfermedad por reflujo faringo-laríngeo. Favorece el desarrollo de NIL y cáncer invasivo al exponer la mucosa de las VAS al contacto prolongado con la secreción ácida gástrica, induciendo fenómenos de regeneración epitelial y metaplasia escamosa. Algunos estudios que avalan esta teoría, han detectado casos de CLF en pacientes sin exposición a los carcinógenos habituales (tabaco y alcohol) y con enfermedad por reflujo faringo-laríngeo como único factor de riesgo<sup>11</sup>. Este hecho ha sido bien descrito en la enfermedad por reflujo gastro-esofágico con el desarrollo de adenocarcinomas en el esófago de Barrett.

Virus. Los subtipos 16 y 18 del virus del papiloma humano (HPV) se relacionan con el desarrollo del CLF<sup>12</sup>. La integración del ADN viral en el genoma de las células epiteliales produce la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7, capaces de inactivar genes supresores de tumores como el *TP53* y *Rb*, favoreciendo la transformación de la célula huésped en tumoral.

Factores ocupacionales. Las diferencias geográficas en su incidencia no se explican sólo por los factores de riesgo. Se cree que existen otros factores etiológicos implicados en la génesis tumoral como la exposición laboral a ciertas sustancias entre las que destaca el polvo y gas de las minas de carbón, polvo de madera, fibras de vidrio y textiles, barnices, pinturas, etc. Su implicación en la carcinogénesis es todavía controvertida y los datos publicados podrían estar sesgados por la exposición al alcohol y tabaco<sup>13</sup>.

Factores genéticos. Aunque no son tumores hereditarios, el 50% de los pacientes presenta antecedentes familiares de neoplasias, la mayoría localizadas en el pulmón (77%). Se han realizado estudios que demuestran que los pacientes con CECC, colon y pulmón, tienen una capacidad genética de reparación del ADN inferior a la habitual y son más susceptibles a la acción mutagénica de los carcinógenos ambientales. Del mismo modo se ha comprobado que los pacientes jóvenes no fumadores con CECC son mutágeno-sensibles, mientras que grandes fumadores que no desarrollan cáncer son mutágeno-resistentes<sup>14</sup>.

Todos estos factores etiológicos ambientales descritos, unidos a la susceptibilidad genética individual, modulan el proceso carcinogénico, no sólo en la laringe y faringe, sino en toda la VAS.

### *II-1.3. Anatomía patológica*

El carcinoma de células escamosas o epidermoide es el tumor maligno más frecuente de la laringe y faringe (96%). Recibe este nombre al originarse en las células epiteliales del revestimiento superficial de estos órganos. La extirpe tumoral está constituida por una proliferación de células atípicas que exhiben diferenciación escamosa, es decir, formación de queratina, presencia de puentes intercelulares y tendencia a infiltrar el estroma. En las fases iniciales de la enfermedad se pueden observar las formas preinvasivas o lesiones intraepiteliales, sobre todo en cavidad oral y en laringe glótica, respetando el límite impuesto por la membrana basal sin invadir el corion. Se ha visto una evolución de la NIL hacia carcinomas invasivos en el 15-20% de los casos, sobre todo en las de alto grado (III) donde esta progresión llega al 50%.

Los carcinomas escamosos invasivos se clasifican en tres grados histológicos de diferenciación en relación con su semejanza al epitelio epidérmico (Tabla I)<sup>15</sup>. En la laringe glótica predominan los carcinomas escamosos bien y moderadamente diferenciados, mientras que en supraglotis y faringe lo hacen los poco diferenciados.

Tabla I. Descripción de los grado de diferenciación histológicos para carcinomas epidermoides invasivos basados en la actualización de la descripción de Broders <sup>15</sup>.

Grado de diferenciación histológico	Pleomorfismo nuclear	Puentes intercelulares	Queratinización	Mitosis atípicas	Hipercromatismo nuclear
Bien	+	+++	+++	-/+	+
Moderado	++	+	+	++	++
Poco	+++	-	-	+++	+++

#### II-1.4. Estadificación

Se emplea el sistema de estadificación TNM con el fin de lograr un consenso internacional a la hora de definir la extensión tumoral y tomar decisiones terapéuticas. En este sistema se consideran como categorías el tamaño del tumor primario (T), la afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y las metástasis a distancia (M). Una vez extirpado el tumor y estudiado histopatológicamente se define un pTNM, que es el utilizado para la estadificación final. Cada localización presenta una clasificación específica, que en el caso de los CLF sólo se ve modificada en la categoría T, según se trate de un tumor de laringe o de faringe. En las tablas II, III y IV se detalla la clasificación y estadificación según el actual sistema TNM para estas localizaciones tumorales<sup>16</sup>. La combinación de estas tres categorías define la estadificación TNM en cuatro estadios (Tabla V).

Con el sistema de clasificación TNM conseguimos unificar criterios y desarrollar un lenguaje común que ayuda a estandarizar tratamientos y comparar resultados en la estrategia contra el cáncer. Sin embargo, cuenta con importantes limitaciones a la hora de establecer el pronóstico individual de la enfermedad, al no tener en cuenta ciertos aspectos relacionados con el paciente, como el estado general inmunitario, o del tumor, como la agresividad intrínseca, el volumen o la rotura capsular, que han demostrado estar directamente correlacionados con la evolución de la neoplasia.

Tabla II. Estadificación T en tumores de laringe.

<b>Estadificación T en tumores de laringe</b>	
Supraglotis	<p>T1: Tumor limitado a una sublocalización dentro de la supraglotis con movilidad normal de las cuerdas vocales.</p> <p>T2: Invade la mucosa de más de una sublocalización de la supraglotis o de una región adyacente (base de lengua, valécula..) sin fijación de la laringe.</p> <p>T3: Tumor limitado a la laringe con fijación de las cuerdas vocales y/o que invade: región retrocricoidea, espacio preepiglótico o parte profunda de la base de la lengua.</p> <p>T4a: Invade el cartílago tiroides y/o se extiende hacia los tejidos blandos del cuello, músculos de la lengua, glándula tiroides y/o esófago.</p> <p>T4b: Invade el espacio prevertebral, mediastino y rodea la arteria carótida.</p>
Glotis	<p>T1: Tumor limitado a las cuerdas vocales con movilidad normal. T1a: Tumor limitado a una cuerda vocal. T1b: Tumor que afecta a ambas a cuerdas vocales.</p> <p>T2: Tumor que se extiende a la supraglotis y/o subglotis y/o disminuye la movilidad de la cuerda vocal.</p> <p>T3: Tumor limitado a la laringe con fijación de cuerdas vocales y/o invade el espacio paraglótico y/o erosión menor del cartílago tiroides.</p> <p>T4a: Invade el cartílago tiroides y/o se extiende hacia los tejidos blandos del cuello, músculos de la lengua, glándula tiroides y/o esófago.</p> <p>T4b: Invade el espacio prevertebral, mediastino y rodea la arteria carótida.</p>
Subglotis	<p>T1: Tumor limitado a la subglotis.</p> <p>T2: Tumor que se extiende a una o a ambas cuerdas vocales con movilidad normal o disminuida</p> <p>T3: Tumor limitado a la laringe con fijación de cuerda vocal.</p> <p>T4a: Invade el cartílago tiroides y/o se extiende hacia los tejidos blandos del cuello, músculos de la lengua, glándula tiroides y/o esófago.</p> <p>T4b: Invade el espacio prevertebral, mediastino y rodea la arteria carótida.</p>

Tabla III. Estadificación T en tumores de faringe.

<b>Estadificación T en tumores de faringe</b>	
Orofaringe	<p>T1: Tumor de diámetro <math>\leq</math> a 2 cm.</p> <p>T2: Tumor de 2-4 cm.</p> <p>T3: Tumor de <math>&gt;</math> 4 cm.</p> <p>T4a: Invade estructuras adyacentes (mandíbula, músculos profundos de la lengua, pterigoideo medial, paladar duro o laringe).</p> <p>T4b: Invade el pterigoideo lateral, apófisis pterigoides, nasofaringe lateral, base de cráneo o rodea la arteria carótida.</p>
Hipofaringe	<p>T1: Tumor limitado a la hipofaringe <math>\leq</math> a 2 cm.</p> <p>T2: Invade más de una sublocalización o zonas adyacentes, de 2-4 cm, sin fijación de la hemilaringe.</p> <p>T3: Tumor de <math>&gt;</math>4 cm, con fijación de hemilaringe.</p> <p>T4a: Invade los cartílagos tiroides/cricoides, hueso hioides, glándula tiroides, esófago.</p> <p>T4b : Invade el espacio prevertebral, mediastino y rodea la arteria carótida.</p>

Tabla IV. Estadificación N y M en el CLF.

<b>Estadificación N en tumores de laringe y faringe</b>
NX: Ausencia de requisitos mínimos para valorar los ganglios linfáticos regionales. N0: Ausencia de metástasis ganglionares. : Metástasis en un único ganglio homolateral $\leq$ a 3 cm de diámetro mayor. N2: Metástasis en ganglios ipsi o contralaterales de 3-6 cm. N2a: Metástasis en un único ganglio ipsilateral. N2b: Metástasis múltiples en ganglios ipsilaterales. N2c: Metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales. N3: Metástasis en un ganglio $>$ de 6 cm.
<b>Estadificación M en tumores de laringe y faringe</b>
MX: Metástasis no evaluables. M0: Sin evidencia de metástasis a distancia. M1: Metástasis a distancia.

Tabla V. Estadificación TNM en el CLF.

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Estadio IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Estadio IVB	T4b	N0, N1, N2, N3	M0
	T1, T2, T3, T4a, T4b	N3	M0
Estadio IVC	T1, T2, T3, T4a, T4b	N0, N1, N2, N3	M1

### II-1.5. Factores pronósticos

La identificación de los factores pronósticos de los tumores es de gran utilidad para predecir su evolución y aplicar las estrategias terapéuticas más adecuadas en cada caso. En el CLF la supervivencia a los 5 años no ha experimentado mejoras sustanciales a pesar de los avances conseguidos en las últimas décadas en el diagnóstico y tratamiento, siendo del 75% para los tumores glóticos, 60% para los supraglóticos y 30-40% para los faríngeos<sup>10,17</sup>.

Se han identificado un gran número de factores que influyen en la supervivencia de los pacientes y que podríamos agrupar en tres apartados:

### Factores pronósticos del paciente

La **edad** limita la evolución del tumor y cuanto más joven es el paciente peor será el pronóstico, aunque esto puede estar relacionado con otras variables<sup>18,19</sup>.

El **estado general** del paciente influye sobre la supervivencia. La patología respiratoria derivada del hábito tabáquico, la hepatopatía por alcoholismo crónico y la inmunodeficiencia que el propio tumor provoca se han estudiado en relación a la respuesta terapéutica, recidiva tumoral y supervivencia, aunque los resultados obtenidos son controvertidos. Se ha observado que la respuesta a la quimioterapia y la supervivencia son más altas en pacientes con mejor estado general. Otros factores relacionados con un mal pronóstico son la pérdida de peso corporal, la disminución de albúmina sérica (< 4 g/dL) y la hemoglobina baja (< 11 g/dL).

La respuesta del **sistema inmunitario** frente a la proliferación incontrolada de células tumorales, parece influir en la evolución de la enfermedad. La respuesta inflamatoria inducida por el tumor con infiltrado de eosinófilos y linfocitos T intra y peritumorales se asocia con menor riesgo de recidiva. Los signos reactivos en ganglios linfáticos (histiocitosis sinusal, hiperplasia folicular linfoide, células plasmáticas) se relacionan con mayor supervivencia. El déficit linfocitario en tumor o sangre (linfocitos T citotóxicos y supresores, células "Natural Killer") se ha relacionado también con la incidencia de metástasis a distancia

### Factores pronósticos del tumor

La **localización del tumor** es uno de los factores pronósticos más importantes que condiciona la clínica del paciente y el diagnóstico en estadios precoces o avanzados, por la posibilidad de invasión loco-regional o a distancia de las células tumorales. Los tumores de laringe glótica se manifiestan precozmente por disfonía, permitiendo su detección en estadios tempranos, con menos invasión local y escasas metástasis linfáticas. Esto es diferente en los tumores supraglóticos, detectados en fases más avanzadas del tumor y que presentan metástasis ganglionares frecuentes y, por tanto, peor pronóstico. Los tumores faríngeos tienen aún peor pronóstico, sobre todo los de hipofaringe<sup>1,2</sup>.

El **estadio del tumor**, definido por la clasificación TNM, está en relación con la supervivencia de grupos de pacientes y a medida que aumenta el estadio, va disminuyendo la supervivencia. Sin embargo, no es eficaz para establecer el pronóstico individual en determinados tumores<sup>3</sup>.

El **grado histológico del tumor** es utilizado también como factor pronóstico. Los tumores con menor grado de diferenciación son más agresivos y tienen peor pronóstico.



No obstante, es un factor pronóstico controvertido que no puede ser utilizado de manera independiente, sino respaldado por los otros factores pronósticos mencionados.

#### Factores pronósticos relacionados con el tratamiento

El tratamiento de elección en el CLF es la **cirugía** del tumor primario y de los ganglios linfáticos, a veces con metástasis ocultas clínicamente (20-30%) y sólo diagnosticadas en el estudio histopatológico del **vaciamiento** cérico-ganglionar, que, por ese motivo, se debe hacer de forma profiláctica en los tumores supraglóticos, transglóticos y faríngeos. La resección del tumor primario se hace de forma suficiente para asegurar **márgenes quirúrgicos** libres y evitar las recidivas locales, responsables en parte de su mortalidad<sup>5</sup>. En las lesiones de pequeño tamaño (NIL, T1 y T2) el empleo del **láser CO<sub>2</sub>** por vía endoscópica se ha impuesto sobre la cirugía abierta, preservando la función vocal y evitando la traqueotomía, manteniendo la misma supervivencia<sup>20</sup>.

El uso de la **radioterapia** radical se plantea como alternativa a la cirugía o el láser en tumores iniciales (T1), o de forma complementaria en márgenes afectados o metástasis ganglionares. El grado de remisión tras la radioterapia condiciona muchas veces la evolución del paciente. La **quimioterapia** sólo tiene interés en tumores avanzados (III-IV) dentro de una estrategia de preservación de órgano, siempre combinada con la radioterapia<sup>1,5</sup>.

## **II-2. Aspectos genéticos**

### *II-2.1. Inestabilidad cromosómica en tumores sólidos*

En la actualidad es aceptado que los tumores sólidos se desarrollan sobre cambios acumulados de forma progresiva en su secuencia de ADN<sup>21,22,23</sup>. Estos cambios genómicos pueden ser heredados o inducidos por los factores de riesgo externos (químicos, radiación, luz ultravioleta...) y conducen a un crecimiento celular incontrolado<sup>24,25</sup>. Durante mucho tiempo la investigación se centró en el mecanismo de proliferación celular tumoral, pero posteriormente se amplió a la apoptosis o muerte celular programada. La transformación neoplásica conlleva, con frecuencia, una disminución de la apoptosis con el correspondiente desarrollo de células inmortales<sup>26,27</sup>. Recientemente también se ha incorporado a la investigación oncológica la incapacidad celular para reparar los daños en el ADN, causa de inestabilidad de todo el genoma y motor en la progresión de los tumores<sup>28</sup>.

La inestabilidad del genoma se desarrolla a partir de pequeñas mutaciones o cambios en las proteínas que provocan, de forma progresiva, alteraciones cromosómicas

visibles a nivel numérico o estructural<sup>29,30,31,32,33,34,35,36</sup>. Los cambios cromosómicos incluyen pérdidas parciales, duplicaciones, inversiones, translocaciones y amplificaciones que alteran el funcionamiento y la expresión de determinados genes. En el desarrollo tumoral han sido considerados tres grupos:

\* **Oncogenes:** participan normalmente en el control del ciclo celular actuando a nivel de los factores de crecimiento y sus receptores, en la transcripción o asociados a proteínas transductoras. Su alteración y activación favorece la proliferación celular incontrolada.

\* **Genes supresores de tumores:** también denominados oncogenes recesivos. Codifican proteínas que inhiben el crecimiento y la proliferación celular. Cuando están inactivados llevan a la transformación neoplásica por pérdida de su función<sup>37</sup>. Dentro de este grupo se encuentra el conocido *TP53* cuya mutación se asocia al desarrollo del cáncer de colon o los *BRCA 1* y *2* en el cáncer de mama<sup>38,39</sup>.

\* **Genes reparadores del ADN:** corrigen los errores en la replicación del ADN o las mutaciones producidas por agentes físicos o químicos. Su alteración favorece el acúmulo de mutaciones y la posibilidad para desarrollar un tumor<sup>40</sup>.

En la tabla VI se recogen algunas características de los genes más representativos de estos tres grupos.

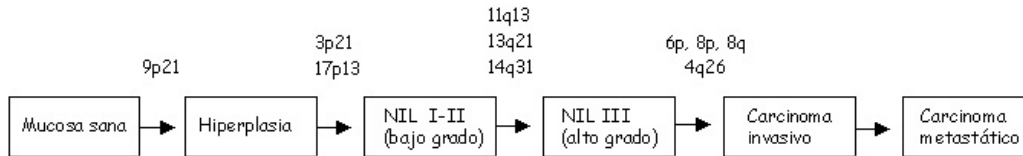
Tabla VI. Descripción de los principales genes asociados al desarrollo tumoral.

Genes	Nombre	Cromosoma	Proteína	Función
Oncogenes	<i>PIK3CA</i>	3q26	PI3-K	Regulación de la proliferación y migración celular
	<i>hTERT</i>	5p15		Función sobre la actividad de la telomerasa
	<i>cErbB1</i>	7p12	EGFR	Receptores de factores de crecimiento
	<i>CCND1</i>	11q13	Ciclina D1	Regulación del ciclo celular
	<i>cErbB2</i>	17q21.1	Her2/Neu	Receptores de factores de crecimiento
	<i>cMYC</i>	8q24		Regulación en la transcripción y apoptosis celular
Supresores de tumores	<i>TP53</i>	17p13	p53	Control del ciclo celular y apoptosis
	<i>BRCA1</i>	13q		Regulación de la transcripción
	<i>BRCA2</i>	17q		
	<i>Rb</i>	13q14		Regulación del ciclo celular y apoptosis
	<i>CDKN2A</i>	9p21	p16	Función sobre el ciclo celular
	<i>APC</i>	5q21		Control del ciclo celular y adhesión intercelular
Reparadores del ADN	<i>MLH1</i>	3p22.1		Reparación de los daños en la replicación del ADN o en las mutaciones producidas por agentes físicos o químicos
	<i>MLH2</i>	2p22		
	<i>MLH3</i>	5q12		

## II-2.2. Modelos de progresión tumoral

El hecho de admitir la acumulación de cambios en el ADN como llave en el desarrollo de los tumores sólidos nos conduce a preguntarnos cuántos cambios son necesarios para que una célula normal se convierta en neoplásica<sup>41</sup>. En la carcinogénesis de la VAS se estima que se precisan entre 6 y 10 alteraciones génicas en oncogenes, genes supresores o reparadores. Según estos cambios la mucosa normal se transforma en lesión intraepitelial y puede progresar a tumor invasivo con capacidad de invadir tejidos adyacentes y dar lugar a metástasis ganglionares y/o a distancia<sup>22,23,42,43,44</sup>.

En 1990 se describió un modelo de inicio y progresión del cáncer de colon<sup>45</sup> que, posteriormente, sirvió como base para el de otros tumores como cerebro, vejiga y CECC. En este último se asoció la progresión histopatológica tumoral con las alteraciones cromosómicas, estableciendo por LOH que los cambios ocurrían en 10 loci relacionados con genes supresores (9p21, 3p21, 17p13 en fases precoces y 13q21, 11q13, 14q31 y otros en fases tardías) (figura 1)<sup>46</sup>. Aunque este modelo ha supuesto un avance muy importante en el conocimiento de la carcinogénesis en la VAS, tiene limitaciones al no explicar bien el paso desde displasia-carcinoma *in situ* a carcinoma invasivo, ni la progresión metastática. Además, otra limitación importante es que sólo estudia pérdidas genéticas y, por tanto, sólo los genes supresores de tumores. Recientes estudios con CGH en el CLF han permitido definir ganancias cromosómicas localizadas en las regiones cromosómicas 3q26, 5p15, 7p12 y 11q13, y confirmar las zonas con ganancias en relación con oncogenes<sup>47,48,49,50</sup>. Hasta el momento ningún cambio cromosómico ha sido claramente asociado a la aparición de metástasis y los modelos de progresión tumoral definidos hasta ahora no incluyen este fenómeno en sus esquemas<sup>23,43</sup>.



**Figura 1.** Modelo de progresión tumoral en CECC mostrando los cambios fenotípicos y genéticos determinados por LOH. El paso hacia carcinoma metastático no figura en el modelo original ni ha sido incorporado en actualizaciones posteriores, pero debe ser tenido en cuenta en este esquema de progresión

### II-2.3. Genes asociados

En las regiones cromosómicas alteradas de los tumores sólidos se han propuesto un gran número de genes implicados en la progresión tumoral<sup>23,51,52</sup>. En 17p13 se encuentra el gen *TP53* que codifica la proteína p53, implicada en numerosas funciones celulares esenciales como la transcripción genética, síntesis y reparación del ADN, coordinación de ciclo celular y apoptosis<sup>31</sup>. En 9p21 sabemos que el gen supresor *CDKN2D* que codifica la proteína *p16* tiene un papel importante en el inicio de tumores de laringe, pero todavía no hay un candidato en 3p21<sup>29,53,54</sup>.

La ganancia de 11q13 está asociada a la sobreexpresión de la ciclina D1, codificada por el gen *CCND1*. Se trata de una proteína reguladora de la familia de las ciclinas, implicada en la progresión del ciclo celular mediante la interacción con quinasas ciclina-dependientes<sup>55,56</sup>. Sin embargo, estudios recientes han encontrado otros genes en la región 11q13 (*EMS1*, *GARP*) que también pueden tener un papel importante en la carcinogénesis<sup>57,58</sup>. Otros candidatos de oncogenes son *cErbB1* en 7p12, *hTERT* en 5p15, y *PIK3CA* en 3q26<sup>59,60</sup>. Aunque algunos de ellos se han asociado con una mala evolución, no siempre se encuentran alterados en todos los carcinomas, constituyendo una limitación importante para un uso pronóstico.

La definición de un modelo completo de progresión en el CLF parece difícil de establecer debido al gran número de alteraciones cromosómicas que ya desde fases muy tempranas se desarrollan en este tumor<sup>61,62</sup>.

### **III- Técnicas de análisis genético-molecular**

### **III- Técnicas de análisis genético-molecular**

Las técnicas aplicadas para el análisis citogenético han tenido un rápido desarrollo en los últimos años, si tenemos en cuenta que hasta 1956 sólo se conocía que el genoma humano estaba formado por 46 cromosomas. En la actualidad existe un gran número de técnicas para el análisis genético-molecular. Algunas de ellas se complementan entre sí y tienden a solapar sus resultados, pero otras aportan una información única de las alteraciones genético-moleculares de los tumores. A continuación enumeramos las técnicas que a lo largo de este estudio hemos utilizado y otras que están en relación con la detección de alteraciones cromosómicas.

#### **III-1. Citometría de flujo**

Está basada en el análisis de fluorescencia y dispersión de la luz sobre partículas individuales, como células, núcleos o cromosomas, durante su recorrido a lo largo de un sistema de fluidos en un citómetro de flujo.

A nivel nuclear, facilita de forma rápida y precisa datos sobre el contenido de ADN y las distintas fases del ciclo celular en las que se encuentra la muestra analizada. Tras una disgregación mecánica y enzimática del tejido, se obtiene una suspensión de núcleos intactos, que teñidos con un fluorocromo se transportan en un fluido isotónico sobre el que incide un rayo láser<sup>63</sup>. La luz dispersa y la emisión de fluorescencia son recogidas y conducidas por lentes y filtros hacia los detectores que convierten los fotones de luz en pulsos de corriente eléctrica. Los pulsos son amplificados y transformados en una señal digital que se almacena en el ordenador para su posterior procesamiento. Los resultados del análisis son normalmente representados en forma de histograma de intensidad de señal de dispersión o fluorescencia (Figura 2). La adquisición de las muestras y el análisis de las fases del ciclo celular, utilizando programas informáticos especializados, se realiza de acuerdo con las consideraciones de la Conferencia de Consenso<sup>64</sup>.

En los CECC, la citometría de flujo es utilizada actualmente en la práctica clínica como información complementaria con fines pronósticos y terapéuticos. Los tumores aneuploides y con fase S elevada (>20%) tienden a ser más invasivos y metastásicos, mientras que los tumores con un contenido de ADN diploide y con una fase S baja (<10%) presentan mayor supervivencia<sup>65,66</sup>.

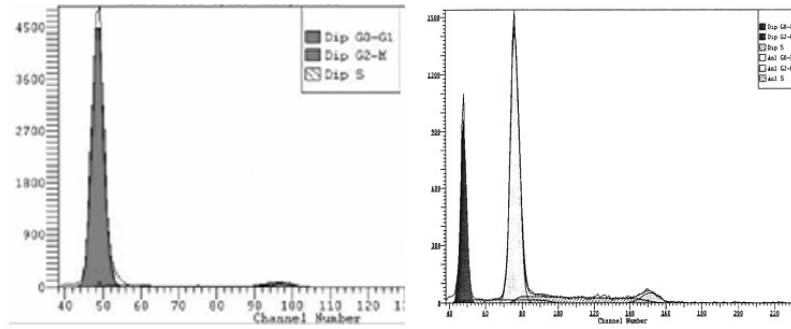


Figura 2. Histograma del contenido de ADN de dos muestras de carcinomas de laringe analizadas por citometría de flujo. A la izquierda, muestra diploide con índice de ADN= 1,00 y fase S baja. A la derecha, muestra aneuploide con índice de ADN= 1,59 y fase S baja.

### III-2. Cariotipado

En 1969, con el desarrollo de las técnicas de bandedo, se pudo identificar de forma individual cada cromosoma. En la actualidad hay tres tipos de tinciones que definen un patrón específico de bandas, permitiendo identificar todos los cromosomas y ordenarlos en un cariotipo. El patrón de bandas-G se obtiene después de tratar las metafases con tripsina, tiñendo con Giemsa y observando con un microscopio de campo claro. El patrón de bandas-Q se define tiñendo con Quinacrin y utilizando un microscopio de fluorescencia y, finalmente, el patrón de bandas DAPI emplea 4,6-diamino-2-fenilindol y un microscopio de fluorescencia.

En los tumores sólidos los estudios por cariotipado suelen ser difíciles de realizar debido al gran número de alteraciones cromosómicas presentes, cuyo origen no puede ser identificado mediante cariotipado, aunque sí con otras técnicas como FISH o SKY<sup>67</sup> (Figura 3).

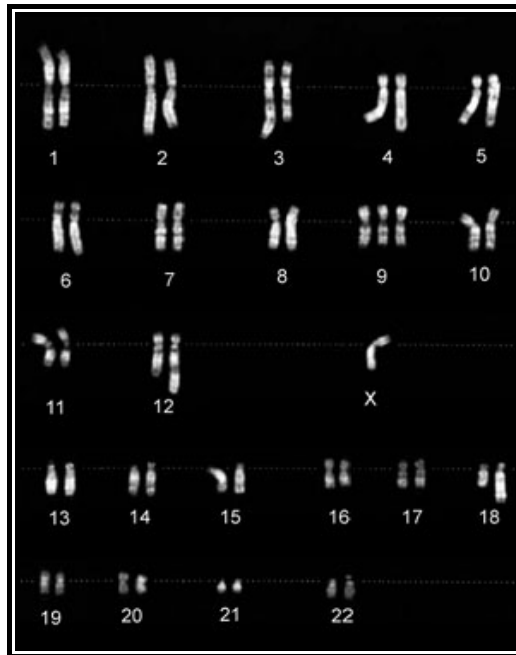


Figura 3. Cariotipo con un patrón de bandas-Q de la línea tumoral SCC040 de un carcinoma escamoso mostrando alteraciones en el número de copias (trisomía del cromosoma 9 y monosomía del cromosoma X) y alteraciones estructurales en los cromosomas 3, 12 y 18.

### III-3. FISH

Esta técnica fue desarrollada en los años ochenta y nos informa sobre zonas específicas de un determinado cromosoma. Consiste en una sonda de ADN normal de secuencia conocida, marcada con fluorescencia, que hibrida sobre la muestra problema revelando la posición de dicha zona en el cromosoma. Las sondas pueden marcar cromosomas completos, centrómeros, telómeros, regiones específicas e incluso genes. Es posible realizar la técnica sobre metafases o también sobre núcleos en interfase, evitando así los cultivos celulares y la preparación de las metafases. Con este procedimiento se puede identificar una situación normal con dos señales de hibridación (eusomía) o una situación alterada (aneusomías), que podrá presentar una única señal de hibridación (monosomía) o varias señales (polisomía).

En un estudio realizado por nuestro grupo, se aplicó la técnica FISH utilizando sondas centroméricas para los cromosomas 8, 9, 11 y 17 sobre núcleos en interfase de CLF<sup>68</sup>. El 70% de los tumores presentaron aneusomías para los cuatro cromosomas analizados, siendo la polisomía la alteración más frecuente. Este estudio constata la



utilidad del FISH para el conocimiento de los cambios citogenéticos que se producen en el CECC.

#### **III-4. CGH y array-CGH**

La CGH es una técnica desarrollada en los años noventa y que, en la actualidad, está muy difundida en los laboratorios de citogenética<sup>69,70</sup>. Con ella se puede analizar en un sólo experimento todo el genoma del tumor y conocer los cambios a nivel cromosómico en relación con pérdidas, ganancias o amplificaciones de material cromosómico. La posibilidad de utilizar ADN procedente de tejido fresco o congelado, así como de tejido incluido en parafina, ha favorecido el estudio de diferentes tipos de tumores sólidos<sup>71,72,73,74,75,76</sup>.

La CGH consiste básicamente en hibridar ADN normal y ADN tumoral, marcados con moléculas fluorescentes distintas (rojo y verde, respectivamente) sobre un porta con metafases normales. Ambos ADNs compiten para hibridar sobre las metafases normales (Figura 4). La relación de fluorescencia verde/rojo determina la ganancia o amplificación con un predominio de la señal verde, mientras que la pérdida se traducirá en un exceso de señal roja. El perfil de la relación de fluorescencia de cada cromosoma se representa sobre un cariotipo denominado idiograma

Esta técnica presenta algunos problemas al limitar su resolución a 10 Mpb y no detectar mutaciones puntuales. Esto ha sido resuelto con el reciente desarrollo de una técnica complementaria a la CGH, denominada "array-CGH"<sup>77</sup>. En ella el molde sobre el que compiten los ADNs, marcados con fluorescencia, no son metafases normales, sino una formación de clones conocidos de ADN ("array") (Figura 5). La resolución de esta técnica puede llegar e incluso superar los 0,5 Mpb. El análisis final no requiere del cariotipado, como ocurre en CGH, sino de un análisis directo con un programa informático que mide la relación de señal verde/rojo en cada clon y presenta los datos ordenados según su localización en el cromosoma<sup>78</sup>.

Numerosos artículos han sido publicados utilizando la CGH y el array-CGH en el estudio de CECC<sup>79,80,81,82,83,84,85</sup>. Estas investigaciones confirman la complejidad en el número de alteraciones y definen múltiples regiones en forma de ganancias (3q, 5p, 7p y 11q13), amplificaciones (11q13, 18p11) y pérdidas (9p y 3p, 5q).

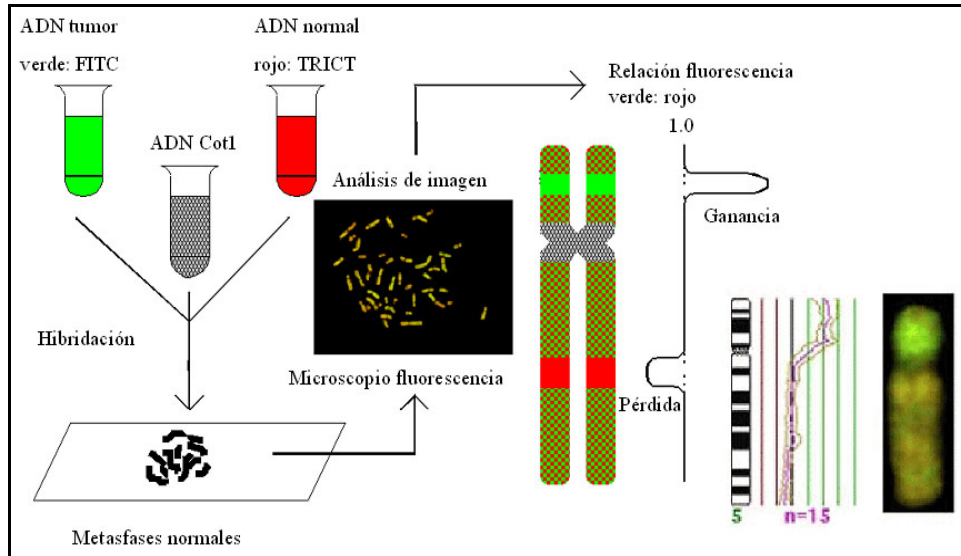


Figura 4. Esquema de la técnica de CGH junto con la imagen, para el cromosoma 5, de la señal verde/roja que se obtiene tras la hibridación y su representación a lo largo del cromosoma. Se observa una ganancia en el brazo corto 5p.

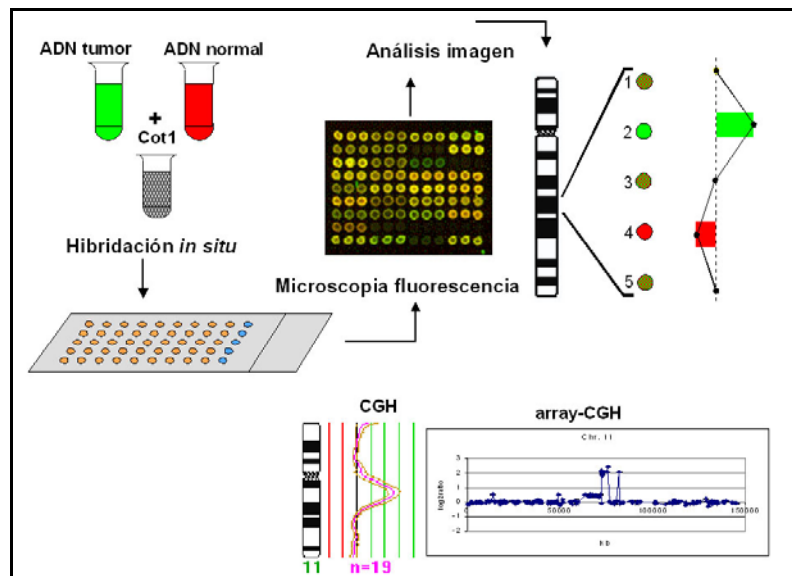


Figura 5. Esquema de la técnica de "array-CGH" con un detalle del resultado final para el cromosoma 11. Se observa una ganancia en la región cromosómica 11q13 que afecta a dos amplificaciones distintas, mientras que por CGH sólo se detectaba una región con amplificación.

### III-5. SKY

La CGH y el "array-CGH" nos informan de las ganancias o pérdidas de material genético, pero no de la posición de dicho material, importante a la hora de conocer la existencia de translocaciones cromosómicas. El cariotipado espectral o SKY ("Spectral karyotyping") da una solución a este problema<sup>86</sup>. Esta técnica hace hibridar, sobre metafases tumorales, sondas específicas marcadas con combinación de fluorocromos diferentes que confieren a cada uno de los 24 cromosomas humanos un color de fluorescencia característico.

En CECC, el SKY ha permitido localizar en los cromosomas la posición de la multitud de alteraciones que se detectan en este tipo de tumor, además de identificar un patrón especial de translocaciones que afectan a todo el brazo del cromosoma (Figura 6)<sup>83,87,82</sup>.

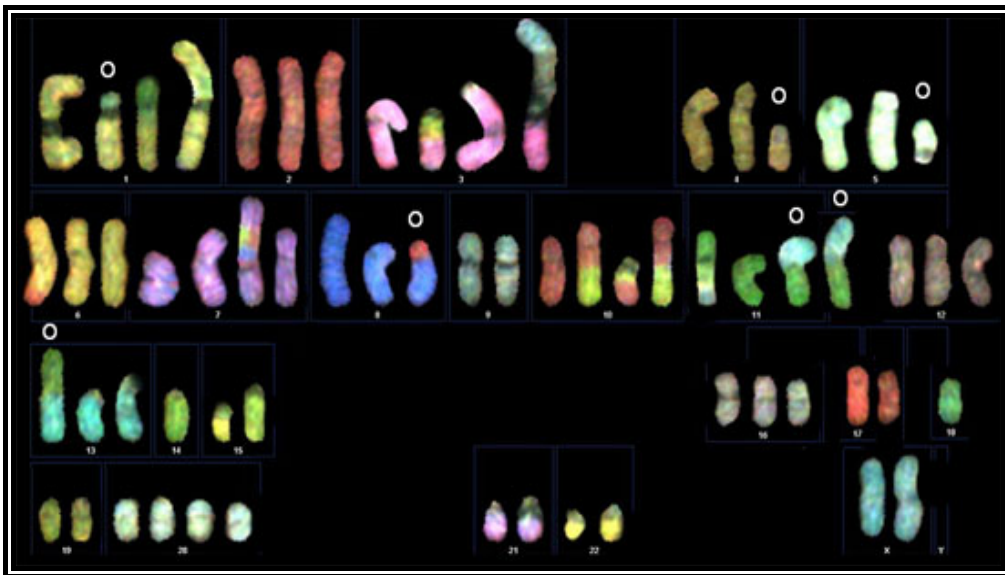


Figura 6 Cariograma obtenido utilizando la técnica de SKY sobre la línea celular SCC078 de un CECC. Los cromosomas que presentan translocaciones afectando a todo un brazo del cromosoma se indican con un círculo: (1q;18p), (4p;12p), (5p;18p), (8q;10p), 2x(11q;Xq) y (11q;13q).

### III-6. MLPA

Es una de las técnicas citogenéticas de desarrollo más reciente<sup>88</sup>. Permite cuantificar en un solo experimento hasta 42 genes diferentes, empleando una mínima cantidad de ADN (50 ng), lo que le confiere una ventaja sustancial respecto a otras técnicas citogenéticas. La información de esos 42 genes se obtiene por la amplificación

por PCR de 42 sondas predeterminadas que posteriormente se cuantifican por medio de electroforesis capilar. La selección de las sondas depende del tipo de tumor (carcinoma escamoso, adenocarcinoma...) y están comercializadas (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). Por tanto, una limitación de la MLPA es la existencia de sondas para nuevas alteraciones génicas, aunque podrían diseñarse sondas específicas "a la carta". Como se trata de un procedimiento muy novedoso sobre el que se apoya gran parte de este trabajo de investigación, la MLPA será descrita con detalle en el capítulo de material y métodos. Es necesario destacar que son muy pocas las publicaciones que han utilizado MLPA en el estudio de los CECC<sup>89, 90</sup>. No obstante, esta técnica ha sido frecuentemente utilizada en el diagnóstico de síndromes genéticos o estudios prenatales y en carcinomas de colon<sup>91,92 93</sup>.

En la tabla VII exponemos, a modo de resumen, las principales características de las técnicas citogenéticas descritas.

Tabla VII.- Resumen de las principales características de las técnicas citogenéticas descritas.

	Citometría flujo	Cariotipado	FISH	CGH	arrayCGH	SKY	MLPA
Desarrollo de la técnica	1980	1969	1980	1992	1997	1996	2002
Necesidad de cultivo celular	-	+	-	-	-	+	-
Método de "screening"	+	+	-	+	+	+	-
Material en parafina	+	-	+	+	+	-	+
Detección alteraciones no balanceadas	-	+	+	+	+	+/-	+
Detección alteraciones balanceadas	-	+	+	-	-	++	+
Cuantificación de la alteración	+/-	+	++	+/-	++	+	+
Sensibilidad	+/-	+	++	+/-	++	+/-	++
Precisión	+/-	+/-	++	+/-	++	+	++
Necesidad de personal especializado	+	++	+	++	++	++	+
Tiempo de realización	-	++	+	+++	+++	+++	++
Coste económico	-	-	+	++	+++	+++	++

(-: no o mínimo; +: sí o bajo; ++: medio; +++: alto)

#### **IV- Modelo teórico**



#### IV- Modelo teórico

Los carcinógenos químicos actúan sobre el ADN de las células epiteliales de la VAS produciendo cambios en la estructura cromosómica y en el funcionamiento de los genes. Los cambios son progresivos y se van acumulando en relación con la dosis y la intensidad con que actúan los carcinógenos y con la susceptibilidad genética del individuo. La expresión de los genes alterados condiciona el comportamiento intrínseco del tumor al producirse una expansión clonal dominante (Figura 7). Las cualidades que definen la progresión tumoral (invasión y metástasis) están determinadas en las primeras fases de la carcinogénesis y se manifiestan cuando se produce un predominio clonal de las células con dicha capacidad.

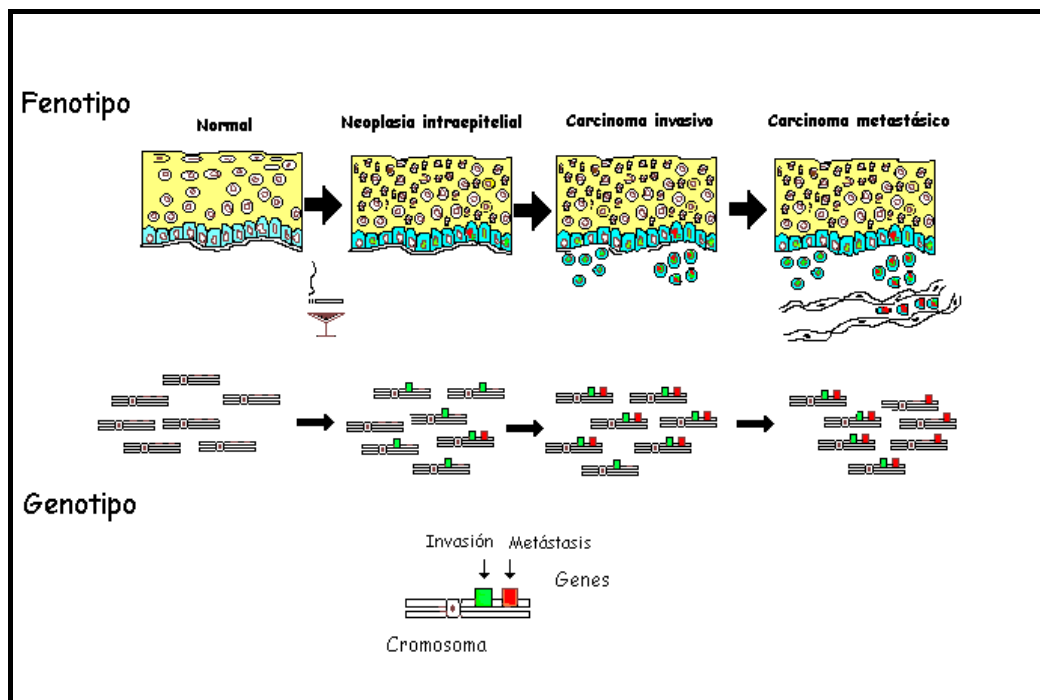


Figura 7. Esquema del modelo teórico para el desarrollo y progresión del CECC.





## V- Hipótesis de trabajo



## V- Hipótesis de trabajo

En base al modelo teórico expuesto formulamos que:

- 1- Los agentes carcinógenos producen cambios genéticos progresivos que al superar un umbral se manifiestan fenotípicamente como un CLF.
- 2- La aplicación de técnicas genético-moleculares que permitiesen estudiar el genoma de forma global podrían definir un perfil cromosómico y génico de estos múltiples cambios.
- 3- Este perfil podría ser utilizado como marcador pronóstico de la enfermedad en relación a su progresión metastásica.
- 4- La definición de un marcador de metástasis facilitaría el tratamiento individual en cada paciente de acuerdo con la capacidad invasiva y progresión de su tumor.



## **VI- Objetivos**



## **VI- Objetivos**

- 1- Describir los aspectos clínico-patológicos y citométricos más importantes de la muestra seleccionada.
- 2- Establecer un patrón de alteraciones cromosómicas de los CLF mediante CGH.
- 3- Determinar las alteraciones génicas en los tumores primarios y en sus correspondientes metástasis ganglionares por MLPA.
- 4- Relacionar las alteraciones cromosómicas y génicas encontradas con los datos clínico-patológicos y de seguimiento de los pacientes.
- 5- Proponer un modelo de alteraciones cromosómicas y génicas que sirva de marcador clínico para establecer la capacidad metastásica en estos tumores.





## **VII. Material y métodos**

## VII. Material y métodos

### VII-1. Sujetos de estudio

En este trabajo estudiamos 56 pacientes de la zona minera de Langreo (Asturias), diagnosticados por primera vez de CLF y tratados en el Hospital Valle del Nalón que es centro de referencia de dicha comarca. Todos los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente con fines curativos entre los años 1993-1999 siguiendo el protocolo habitual para este tipo de tumores (extirpación del tumor primario y vaciamiento cérico-ganglionar). Ningún paciente recibió tratamiento previo con quimio-radioterapia. En todos los pacientes se constató un historial clínico bien documentado con diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso. Para 48 de los 56 pacientes se dispone también de un estudio con citometría de flujo. El seguimiento mínimo fue de 45 meses o hasta la muerte del paciente.

### VII-2. Recogida de muestras

Las muestras a estudiar proceden de 56 tumores primarios y de sus 26 correspondientes metástasis ganglionares.

Las muestras de **tumor primario** fueron obtenidas de dos maneras:

1- Muestra en fresco. Se recogió durante la intervención quirúrgica, extrayendo una por paciente. La muestra tenía un tamaño mínimo de 3 mm<sup>3</sup> y procedía de una zona tumoral sin necrosis, evitando el tejido sano de los bordes, con el fin de alcanzar un mínimo del 70% de pureza en células tumorales. Una vez extraída se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido hasta que fue procesada.

2- Muestra en parafina. Se obtuvo de los bloques de tejido parafinado una vez procesada la pieza para su estudio histopatológico. Para determinar el tejido tumoral en el bloque, se hizo un corte de 5 μm para tinción con hematoxilina-eosina que, observado al microscopio óptico, permitió marcar la zona tumoral en el porta y seleccionarla en los cortes posteriores, evitando la necrosis y los tejidos sanos peritumorales.

Las muestras de las **metástasis ganglionares** proceden todas de material en parafina.

Las muestras **control** necesarias para realizar la CGH proceden de tejido fresco normal de mujeres donantes. Para las metafases normales de la CGH se empleó sangre de donantes normales. Ambos tipos de material fueron facilitados por el Departamento de Anatomía Patológica Cuantitativa del Centro Médico VUmc, Amsterdam (Holanda). Para los experimentos de MLPA se utilizó, como control, muestras de sangre de

donantes sanos facilitadas por el banco de sangre del Hospital Universitario Central de Asturias.

En la tabla VIII exponemos el número de muestras recogidas según su procedencia y el tipo de estudio realizado.

Tabla VIII.- Procedencia y utilización de las muestras utilizadas en este estudio.

Origen muestra	Control (MLPA)	Control (CGH)	Tumor (CGH y MLPA)	Metástasis ganglionar (MLPA)
Sangre	7 (100%)	1 (25%)		
Tejido fresco		3 (75%)	30 (53,6%)	-
Tejido en parafina			26 (46,4%)	26 (100%)
Total	7	4	56	26

### VII-3. Extracción de ADN

Los protocolos de extracción de ADN para todas las muestras se realizaron en base al uso de columnas de afinidad (QIAamp®, QIAgen, Valencia, CA, USA).

#### VII-3.1. A partir de tejido fresco

Los tejidos de las muestras control para CGH y las muestras tumorales para CGH y MLPA se **descongelan** a temperatura ambiente en una placa Petri y, con ayuda de dos bisturís, se **disgregan mecánicamente** cortándolos en pequeños fragmentos que son depositados en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

A continuación se realiza el **lisado** añadiendo 200 µL del tampón de lisis ATL y 20 µL de proteinasa K (concentración de almacenamiento: 10mg/mL). Se mezcla bien en un agitador y se deja incubando a 56°C en una placa térmica con agitación. Por la tarde se vuelven a añadir otros 20 µL de proteinasa K, se mezcla bien y se deja incubando a 56°C toda la noche.

A la mañana siguiente se añaden 200 µL de tampón AL, se agita enérgicamente y se incuba a 70°C durante 10 minutos. A continuación se añaden 200 µL de etanol absoluto y se agita enérgicamente durante 15 segundos para **precipitar** el ADN. Posteriormente se aplica el contenido del tubo de microcentrífuga a una columna de afinidad (QIAamp®) que se coloca en un tubo de recolección de 2 mL. La columna y el tubo de recolección se centrifugan durante 1 minuto a 8.000 rpm y el filtrado es eliminado. Posteriormente se

procede a la **purificación** del ADN añadiendo sobre la columna 500  $\mu\text{L}$  del tampón AW1, centrifugando a 8.000 rpm durante 1 minuto. Tras eliminar el filtrado se continúa con un segundo lavado añadiendo a la columna 500  $\mu\text{L}$  del tampón AW2 y centrifugando a 14.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente, se coloca la columna de afinidad en un nuevo tubo de microcentrífuga y se añaden 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada para **eluir** el ADN de la columna. Se incuba durante 1 minuto y se centrifuga 1 minuto a 8.000 rpm.

La concentración y la pureza del ADN obtenido se determinan midiendo su absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración de ADN que tenemos en nuestra muestra y la relación A260/A280 el grado de pureza de la muestra. Se consideran aceptables purezas con valores mayores de 1,5.

Mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% se puede comprobar que la extracción de ADN ha sido correcta y que no hay presencia de ARN.

### *VII-3.2. A partir de tejido en parafina*

En las muestras tumorales y en las de los ganglios linfáticos con metástasis se obtienen 3 cortes de 50  $\mu\text{m}$ . También se hace un corte de 5  $\mu\text{m}$  que se tiñe con hematoxilina-eosina con el fin de observar la muestra al microscopio óptico para seleccionar la zona tumoral más pura, evitando contaminaciones por zonas necróticas o tejido sano. Según esta selección se realiza la **microdissección** en los tres portas de 50  $\mu\text{m}$ , recogiendo el material en un tubo de microcentrífuga. Para el **desparafinado** del tejido, se incuba la muestra en 1 mL de xileno a 55°C durante 10 minutos, centrifugando a 14.000 rpm otros 10 minutos para eliminar los restos de parafina. Repetimos dos veces más la incubación con xileno y a continuación añadimos 1 mL de metanol, incubando la muestra 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugamos a máxima velocidad y decantamos el sobrenadante. Añadimos 1 mL de etanol absoluto, agitamos bien y centrifugamos a máxima velocidad otros 5 minutos. Tras decantar el sobrenadante, dejamos secar al aire el tejido depositado en el fondo del tubo de microcentrífuga.

A continuación se añade 1 mL de tiocianato sódico, 1M para **limpiar** el ADN y, tras mezclar bien en un agitador, se deja incubando toda la noche a 37°C en una placa térmica con agitación. A la mañana siguiente se centrifugan los tubos durante 5 minutos a máxima velocidad y se decanta el sobrenadante. Seguidamente se añade 1 mL de PBS para lavar y eliminar los restos de tiocianato sódico de los tubos, se mezcla bien, se centrifuga y se decanta el sobrenadante. Tras repetir una vez más este lavado con PBS,

los tubos son centrifugados de nuevo para retirar todo el posible PBS que quedara retenido en el tejido.

Una vez limpia y desparafinada la muestra, se realiza el **lisado** añadiendo 200  $\mu$ L del tampón de lisis ATL y 20  $\mu$ L de proteinasa K (concentración de almacenamiento: 10mg/mL). Se mezcla bien en un agitador y se deja incubando a 56°C en una placa térmica con agitación. Por la tarde se vuelven a añadir otros 20  $\mu$ L de proteinasa K, se mezcla bien y se deja incubando a 56°C toda la noche. Durante los dos días siguientes se añade de nuevo proteinasa K por la mañana y tarde.

Tras los tres días de lisis con el tampón ATL y la proteinasa K, se añaden 200  $\mu$ L de tampón AL, se agita enérgicamente y se incuba a 70°C durante 10 minutos. El resto del protocolo sería igual al descrito para muestras en fresco a partir del paso de **precipitación** del ADN (ver apartado VII-3.1).

### *VII-3.3. A partir de sangre periférica*

El ADN control para MLPA fue obtenido a partir de sangre periférica de donantes citogenéticamente sanos. La extracción de ADN de sangre no requiere disgregación (mecánica y/o enzimática) ni desparafinación.

En un tubo de microcentrífuga se añaden 200  $\mu$ L de sangre y se procede al **lisado** de las células mediante la adición de 200  $\mu$ L del tampón de lisis ATL y 20  $\mu$ L de proteinasa K incubando las muestras a 56°C durante dos horas. A continuación se añaden 200  $\mu$ L de tampón AL, se agita enérgicamente y se incuba a 70°C durante 10 minutos. El resto del protocolo sería igual al descrito para muestras en fresco a partir del paso de **precipitación** del ADN (ver apartado VII-3.1).

### **VII-4. Preparación de metafases normales**

Las metafases se obtienen de sangre periférica de donantes citogenéticamente normales. La sangre se recoge en un tubo estéril con heparina. En un frasco de cultivo se deposita 1 mL de sangre y 9 mL de medio de cultivo compuesto por RPMI 1640, penicilina/estreptomicina 100X, 20 % de suero bovino fetal y fitohemaglutinina (0,1  $\mu$ g/mL). Tras un cultivo de 72 horas a 37°C, se añade 0,1  $\mu$ l/mL de colchicina para detener la división celular en metafase. Se incuba la mezcla durante 20 minutos a 37°C, seguido de un choque hipotónico con 5 mL de solución de KCl 0,075 M, volviendo a incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se fijan las células añadiendo la solución de metanol/acético en proporción 3:1, gota a gota, agitando suavemente. Tras repetidos lavados con esta solución se dejan caer, sobre portaobjetos

lavados con etanol, dos gotas de la suspensión celular fijada para que se rompa la membrana citoplasmática de las células en metafase y los cromosomas se extiendan en el porta. Inmediatamente se lava el portaobjetos con la solución de metanol/acético y se dejan envejecer durante dos días a temperatura ambiente. Los portas con las metafases normales se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser utilizados.

#### VII-5. Técnica de CGH

El ADN de la muestra tumoral y control se **marca** mediante "nick translation". Esta técnica permite obtener fragmentos de ADN de la muestra tumoral y control con la incorporación de nucleótidos marcados que podrán ser detectados posteriormente mediante una prueba inmunoquímica. EL ADN tumoral se marca con biotina-11-dUTP y el ADN control con digoxigenina 16-dUTP. Posteriormente se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa que los fragmentos obtenidos poseen entre 500 y 1500 pb, tamaño necesario para poder hibridar fácilmente con las metafases normales.

El ADN control y el tumoral marcados se **precipitan** en igual cantidad (200-300 ng de cada ADN) y se mezclan con ADN no marcado Human Cot-1. La función de este reactivo es bloquear las secuencias repetitivas presentes en regiones pericentroméricas y heterocromáticas del genoma de células eucariotas, evitando la unión del ADN marcado y la aparición de señales de fluorescencia erróneas que pudieran falsear los resultados. Todos estos elementos se resuspenden en una solución de hibridación compuesta por 50% de formamida desionizada y 10% de dextrán-sulfato en 2x SSC y se **desnaturalizan** incubando a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Por separado, se desnaturaliza también el porta con metafases normales en un baño de agua, incubándolo 6 minutos en un vaso "coplin" que contiene una solución de 70% de formamida y 2x SSC. Finalmente, las sondas de ADN normal y tumoral se añaden sobre el porta con metafases normales y se dejan **hibridando** durante 3 días a  $37^{\circ}\text{C}$ , compitiendo ambos ADNs para unirse a los cromosomas de las metafases normales.

Tras la hibridación se realizan una serie de **lavados** sobre el porta, tres veces con 0.1x SSC, para eliminar el exceso de sonda no hibridada. A continuación se añaden los anticuerpos dirigidos frente a los nucleótidos marcados que llevan incorporados los fluorocromos avidina-FITC (señal verde) que **revelará** la biotina-11-dUTP del ADN tumoral y anti-digoxigenina-sheep-TRITC (señal roja) que se une a la digoxigenina 16-dUTP incorporada en el ADN control. Se realiza también una **contratinción** de las metafases con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol), para obtener un patrón de bandas que permita reconocer y cariotipar los cromosomas.

El último paso del proceso es la **adquisición** y el **análisis de las imágenes** a través de un microscopio de fluorescencia dotado con filtros específicos de emisión y excitación para FITC, TRITC y DAPI. Las imágenes se adquieren mediante una cámara CCD de alta sensibilidad conectada a un ordenador. Para cada muestra se capturan al menos 12 metafases que muestren los cromosomas bien extendidos, sin excesivos solapamientos y con un patrón de bandas suficientemente nítido para permitir su identificación. Por cada metafase se capturan tres imágenes, una con DAPI para el cariotipado de los cromosomas y otras dos con FITC y TRITC que representan la hibridación del ADN tumoral y normal sobre las metafases normales. Mediante un programa informático (Cytovision 3.5, Applied Imaging System, Newcastle upon Tyne, UK) se realiza y controla el cariotipo de la metafase y se cuantifica la relación de fluorescencia verde/roja a lo largo de cada cromosoma (media e intervalo de confianza del 95%), que se representa en un idiograma denominado cariotipado del número relativo de copias ("relative copy number karyotype"). Un valor de 1 para dicha relación de fluorescencia indica que no existen ganancias ni pérdidas de material genético, un valor < 1 indica pérdida, > 1 ganancia y > 1,5 amplificación (Figura 4).

#### **VII-6. Técnica de MLPA**

Para los experimentos de MLPA se utilizó ADN control procedente de sangre de sujetos sanos y ADN de los tumores primarios y sus correspondientes metástasis ganglionares. Los ADNs fueron extraídos según los protocolos anteriormente citados (apartado VII-3).

En cada experimento se prepararon un mínimo de 8 muestras, incluyendo siempre una muestra con ADN control. Todas las muestras se procesaron al menos dos veces en distintos experimentos.

##### *VII-6.1. Tipos de sondas*

Se empleó la mezcla de sondas "SALSA P084 HNSCC-1", junto con sus correspondientes tampones y enzimas (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). Esta "SALSA P084" incluye 42 **sondas de genes** descritos en la bibliografía como genes implicados en el desarrollo del CECC (Tabla IX y Anexo IV).

Cada una de las 42 sondas está formada por dos oligonucleótidos, uno sintético y otro derivado del vector M13 (figura 8a). El oligonucleótido sintético está formado por un "primer" en el extremo 5' de 19 nucleótidos ("primer" Y) y por una secuencia de hibridación de 21-30 nucleótidos que se unirá a la muestra de ADN (Figura 8a). El

oligonucleótido derivado del vector M13 tiene un tamaño diferente en cada sonda, que varía gracias a una secuencia de relleno ("stuffer sequence") de diferentes tamaños que se intercala entre el "primer" de 36 nucleótidos situado en el extremo 3' ("primer" X) y la secuencia de hibridación de 25-43 nucleótidos que se unirá a la muestra de ADN.

La mezcla de sondas de "SALSA P084" contiene también **sondas de control** interno. En la amplificación por PCR estas sondas control generan productos más pequeños que los amplificados por las 42 sondas de genes. El control interno determina si la calidad y la concentración del ADN de la muestra son las necesarias para obtener un resultado óptimo. El control interno está formado por dos tipos de sondas:

1- Cuatro fragmentos de ADN que generan productos amplificados de 64, 70, 76 y 82 pb, incluso si se omite el proceso de ligación.

2- Un producto de amplificación de 94 pb dependiente del proceso de ligación y del ADN de la muestra.

El tamaño de los cuatro picos del control interno (64-82 pb), una vez amplificados por PCR, depende de la cantidad de ADN de la muestra. Serán difícilmente visibles si el ADN es >100 ng y tendrán un tamaño menor que el fragmento amplificado de 94 pb si la cantidad de ADN es de 50 ng aproximadamente. Si estos 4 fragmentos tienen un tamaño similar o mayor que el fragmento de 94 pb y los productos de PCR de 130-482 pb, significa que la reacción de ligación ha fallado o que la cantidad de ADN es escasa y los resultados obtenidos no tienen validez. El tamaño del pico de 94 pb debe ser similar al obtenido por los productos amplificados de las sondas de genes y nos sirve de control para saber que el experimento ha sido satisfactorio.

#### *VII-6.2. Pasos del experimento*

El *primer día* del experimento, el ADN previamente extraído de cada muestra (100-200 ng) (apartado VII-3) se **desnaturaliza** en un termociclador, aplicando un ciclo de 5 minutos a 98°C y enfriando posteriormente a 25°C. Se mezcla el ADN desnaturalizado con las 42 sondas de "SALSA P048" y su correspondiente tampón de hibridación y se coloca, de nuevo, en el termociclador en un ciclo único de un minuto a 95°C y 16 horas a 60°C para que las sondas **hibriden** sobre el ADN de la muestra.



Tabla IX. Descripción de las 42 sondas de la SALSA P048. Longitud de los fragmentos, nombre de los genes, posición y localización cromosómica.

Longitud	Gen	Posición cromosómica (kb)	cromosoma
472	<i>NRAS</i>	01-114.1	01p13.2
283	<i>LMNA</i>	01-151.9	01q21.2
256	<i>IL1A</i>	02-111.4	02q14
220	<i>TANK</i>	02-160.6	02q24
154	<i>MLH1</i>	03-036.3	03p22.1
337	<i>MLH1</i>	03-036.3	03p22.1
454	<i>CTNNB1</i>	03-040.5	03p22
166	<i>CASP6</i>	04-110.9	04q25
373	<i>IL2</i>	04-123.7	04q26
481	<i>MFHAS1</i>	08-008.7	08p23.1
130	<i>CTSB</i>	08-011.7	08p22
184	<i>N33</i>	08-015.5	08p22
445	<i>PTPAA3</i>	08-142.4	08q24.3
418	<i>RECQL4</i>	08-145.8	08q24.3
202	<i>CDKN2A</i>	09-022.2	09p21
364	<i>AI651963</i>	10-010.9	10p14
463	<i>RENT2</i>	10-012.0	10p14
136	<i>CREM</i>	10-035.2	10p12.1
292	<i>CCND1</i>	11-071.1	11q13
229	<i>EMS1</i>	11-071.8	11q13
310	<i>IL18</i>	11-113.5	11q23.1
238	<i>IGSF4</i>	11-116.7	11q23
355	<i>BRCA2</i>	13-026.9	13q12.3
328	<i>RB1</i>	13-043.0	13q14.2
148	<i>DLEU1</i>	13-044.9	13q14.3
400	<i>IGF1R</i>	15-093.2	15q26
301	<i>TP53</i> (exón 8)	17-008.3	17p13.1
346	<i>TP53</i> (exón 9)	17-008.3	17p13.1
391	<i>TP53</i> (exón 10)	17-008.3	17p13.1
409	<i>TP53</i> (exón 11)	17-008.3	17p13.1
142	<i>ERBB2</i>	17-039.9	17q21.1
319	<i>CDH2</i>	18-025.4	18q11.2
436	<i>MADH2</i>	18-045.3	18q21.1
274	<i>BCL2</i>	18-060.9	18q21.2
247	<i>STK11</i>	19-001.1	19p13.3
265	<i>CDKN2D</i>	19-010.9	19p13
160	<i>BCL2L1</i>	20-030.0	20q11.1
427	<i>PTPN1</i>	20-048.9	20q13.1

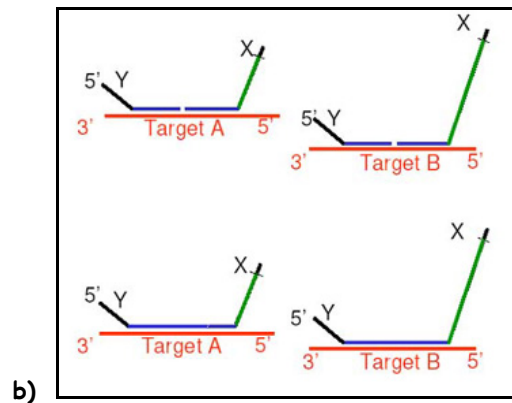
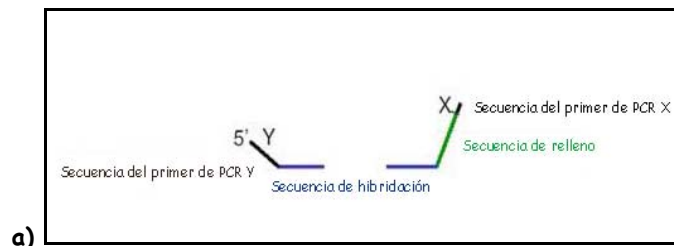
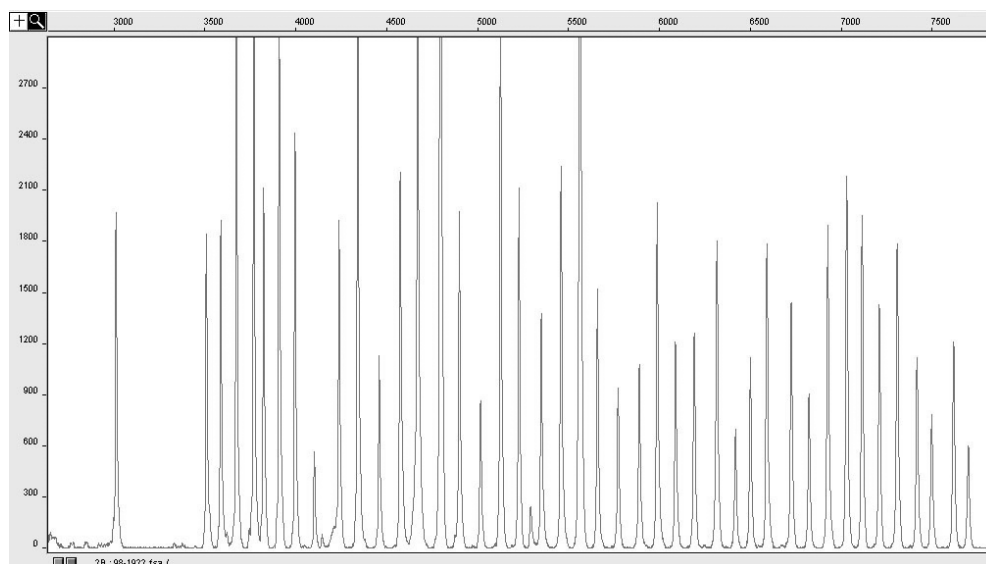


Figura 8. a) Esquema de las dos partes que conforman una sonda de MLPA. b) Representación de los pasos de hibridación y ligación en MLPA.

El *segundo día* se procede a la **ligación** de los dos oligonucleótidos de las 42 sondas que han hibridado sobre el ADN (Figura 8b). Para ello, se añade al tubo de PCR la mezcla de ligación con el enzima ligasa y su tampón y se coloca de nuevo en el termociclador 15 minutos a 54°C, seguido de 5 minutos a 98°C, y posterior enfriamiento a 25°C. Una vez ligados los moldes de las 42 regiones, se procede a preparar la mezcla de tampón y los "primers" para la PCR, el tampón del enzima de dilución y la polimerasa para la **amplificación** de las 42 sondas. Todas las sondas ligadas poseen las mismas secuencias en sus extremos, permitiendo su amplificación simultánea por PCR utilizando sólo un par de "primers". Los oligonucleótidos no ligados al ADN de la muestra no serán amplificados por PCR y, por tanto, no precisan ser eliminados.

Una vez añadidos los "primers", se colocan de nuevo las muestras en el termociclador y se corre el programa de PCR aplicando 1 minuto a 60°C, 33 ciclos con tres pasos cada ciclo de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C, y enfriando finalmente a 4°C. Las muestras son almacenadas a 4°C hasta realizar el **análisis de fragmentos**.

Cada sonda da lugar a un produto de amplificación de tamaño único de entre 130 a 482 pb debido a la diferencia en tamaño de la secuencia relleno. Los productos amplificados de las 42 sondas se analizan mediante **electroforesis capilar** (Figura 9). Para ello mezclamos 2  $\mu\text{L}$  del producto de amplificación con 10  $\mu\text{L}$  de formamida y 0,5  $\mu\text{L}$  de marcador interno. La mezcla se desnaturaliza por calor y se somete a electroforesis capilar en un equipo "ABI Prism 3100" (Applied Biosystems, Warrington, UK). Los capilares están rellenos de un polímero que ofrece dificultad a la migración permitiendo separar los fragmentos por su tamaño, corriendo los fragmentos más pequeños más rápido que los grandes. Al final del recorrido hay un láser y un sistema de captura de la señal de fluorescencia que permite detectar los distintos productos. Estos productos finales serán analizados con el software "GeneScan v3.7" (Applied Biosystems, Warrington, UK), que permite determinar su tamaño por interpolación con distintos fragmentos de tamaño conocido del marcador interno y cuantificar cada producto en función de la intensidad de fluorescencia. Cada sonda vendrá representada por un pico. La **señal relativa de cada sonda** se define dividiendo la medida del área de cada pico entre la suma de todas las áreas de todos los picos de sondas de una muestra.



**Figura 9.** Representación de los 42 productos amplificados por PCR y analizados por electroforesis capilar para una muestra de CLF. El pico de la izquierda representa el control interno de 94 pb; más a su izquierda, y casi no visibles, están los 4 picos de control interno de 64, 70, 76 y 82 pb que confirman la alta calidad del ADN de la muestra y del experimento.

### VII-6.3. Interpretación de datos

Para definir la existencia de una ganancia o una pérdida de material génico en cada una de las 42 sondas de una muestra hay que **normalizar** los datos obtenidos. Para ello se calcula la mediana, la desviación estándar y el valor mínimo y máximo para las muestras control y para cada una de las muestras de tumor primario y de metástasis ganglionar. La relación entre el valor del tumor y el control se calcula aplicando las siguientes fórmulas:

- 1) Relación mínima = cociente entre el valor mínimo del tumor y el valor máximo del control
- 2) Relación máxima = cociente entre el valor máximo del tumor y el valor mínimo del control
- 3) Relación tumor/control = Media de la relación mínima y la relación máxima
- 4) Desviación estándar de la relación tumor/control = diferencia entre la relación tumor/control y la relación mínima

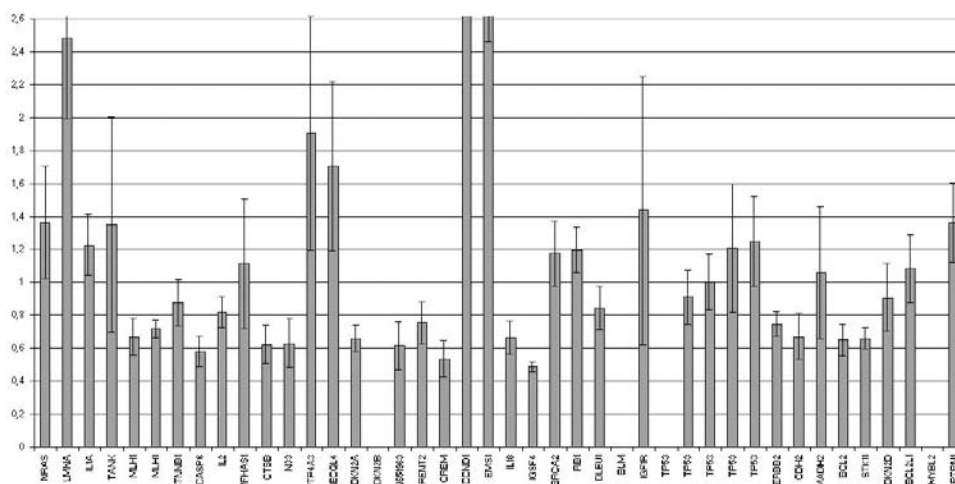


Figura 10. Diagrama de barras del resultado final obtenido por MLPA para una muestra de un CLF. Las barras en gris representan la relación tumor/control normalizada para cada sonda. Las líneas en negro sobre cada barra representan su desviación estándar.

Con este **análisis** normalizado se obtiene un diagrama de barras de las 42 sondas estudiadas en el ADN tumoral (Figura 10). Cuando la relación tumor/control es mayor de

1,2 y la desviación estándar es  $>1$  se **interpreta** como ganancia, si es menor de 0,8 y la desviación estándar es  $<1$  se interpreta como pérdida.

#### VII-7. Descripción de las variables

1) Las variables **clínico-patológicas** seleccionadas y estudiadas fueron las siguientes:

- Edad (años).
- Localización tumoral: faringe (orofaringe e hipofaringe) y laringe (supraglotis y glotis).
- Grado de diferenciación histológico: bien, moderado y poco.
- Estadio tumoral (pTNM): I, II, III, IV; agrupados como estadios precoces (I-II) y avanzados (III-IV).
- Ganglios linfáticos cervicales: N<sub>0</sub> (sin metástasis) y N<sub>+</sub> (con metástasis).
- Radioterapia tras la intervención quirúrgica.
- Tiempo de seguimiento (meses).
- Evolución de la enfermedad: sin tumor, con recidiva loco-regional y/o metástasis a distancia, con segundo tumor primario.
- Situación del paciente: vivo, fallecido por tumor (recidiva, metástasis) o por otras causas (segundo primario, enfermedad intercurrente, postoperatorio...)

2) Las variables **citométricas** estudiadas fueron:

- Contenido e índice de ADN: diploide igual a 1 y aneuploide mayor o menor a 1.
- Porcentaje de células en fase S: baja para diploides con fase S  $< 10\%$  o aneuploides con fase S  $< 20\%$  y alta para diploides con fase S  $> 10\%$  o aneuploides con fase S  $> 20\%$ .

3) Las variables **cromosómicas** definidas por CGH fueron la pérdida, ganancia o amplificación de un cromosoma completo, un brazo o una región. Un valor de 1 para la relación de fluorescencia verde/roja sería normal, un valor  $< 1$  indicaría pérdidas,  $> 1$  ganancia y  $> 1,5$  amplificación. También se estudió la variable pérdida de un brazo completo de un cromosoma como indicación de la formación de isocromosomas.

4) Las variables **génicas** estudiadas por MLPA fueron la pérdida o ganancia de un determinado gen. La relación tumor/control se interpreta como ganancia si es mayor de 1,2 y su desviación estándar es  $>1$  y como pérdida si es menor de 0,8 y la desviación estándar es  $<1$ .

#### **VII-8. Análisis estadístico**

Las ganancias y pérdidas obtenidas por CGH y MLPA, así como las variables clínico-patológicas y citométricas han sido analizadas estadísticamente mediante el programa informático SPSS ("Statistical Package for Social Science"), versión 12.0 para Windows (SPSS® Inc. Illinois, EE.UU).

La asociación de caracteres cualitativos se llevó a cabo mediante la prueba de correlación  $\chi^2$  de Pearson o la prueba del estadístico exacto de Fisher. El nivel de significación se fijó para una  $p \leq 0.05$ . Las diferencias de caracteres cualitativos se calculó mediante la comparación de medias aplicando la prueba T para muestras independientes y el test de cambios de McNemar con la corrección de Yates para evaluar las diferencias entre un tumor primario y su correspondiente metástasis ganglionar. El nivel de significación se estableció para una  $p \leq 0.05$ .

Para estimar la supervivencia se utilizaron las curvas Kaplan-Meier, comparando las distribuciones de supervivencia mediante la Prueba del Logaritmo del Rango « Log-Rank Test ». Los valores con una  $p \leq 0.05$  fueron considerados significativos.

#### **VII-9. Búsqueda bibliográfica**

Utilizando la base de datos de la "National Library of Medicine" y seleccionando los términos científicos relacionados con este trabajo se tuvo acceso a revisiones y artículos de investigación relacionados con los CLF y los CECC ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)).

Así mismo, la base de datos "Online Mendelian Inheritance in Man" (OMIM) se utilizó para la búsqueda de las regiones cromosómicas y genes alterados en estos tumores.

([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&cmd=Limits](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&cmd=Limits)).

#### **VII.10- Reactivos empleados**

En la tabla X se describen los reactivos utilizados en los distintos protocolos según su orden de aparición.

Tabla X. Reactivos empleados en las técnicas de laboratorio.

Producto	Técnica - Paso	Concentr.	Casa comercial	Referencias
Proteinasas K	Extracción de ADN	200 µg	Roche	www.qiagen.com
Xileno	Extracción de ADN-parafina	NA	Merck	www.qiagen.com, bibliografía <sup>94</sup>
Etanol absoluto	Extracción de ADN	NA	Merck	www.qiagen.com
RPMI 1640	Preparación metafases	NA	Gibco	bibliografía <sup>95</sup>
Penicilina/estreptomicina	Preparación metafases	100X	Gibco	bibliografía <sup>95</sup>
Suero bovino fetal	Preparación metafases	20%	Gibco	bibliografía <sup>95</sup>
Fitohemaglutinina (PHA)	Preparación metafases	1,5%	Gibco	bibliografía <sup>95</sup>
Colchicina	Preparación metafases	0.1 µl/mL	Sigma	bibliografía <sup>95</sup>
KCl	Preparación metafases	0,075 M	Merck	bibliografía <sup>95</sup>
Metanol	Preparación metafases	NA	Merck	bibliografía <sup>95</sup>
Ácido acético glacial	Preparación metafases	NA	Merck	bibliografía <sup>95</sup>
Biotina-11-dUTP	CGH-Nick translation	1 nmol/µL	Roche	bibliografía <sup>94,95</sup>
Digoxigenina-16-dUTP	CGH-Nick translation	1 nmol/µL	Roche	bibliografía <sup>94,95</sup>
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	CGH-Nick translation	0.2mM	Roche	bibliografía <sup>94,95</sup>
DNA polimerasa /DNAsa	CGH-Nick translation	V	Gibco	bibliografía <sup>94,95</sup>
DNAsa I	CGH-Nick translation	V	Gibco	bibliografía <sup>94,95</sup>
ADN Human Cot-1	CGH-precipitación	V	Roche	bibliografía <sup>94,95</sup>
Formamida desionizada	CGH-desnaturalización	NA	Merck	bibliografía <sup>94,95</sup>
Dextrán-sulfato	CGH-desnaturalización	NA	Merck	bibliografía <sup>94,95</sup>
20x SSC: 0.3M citrato sódico; 3M cloruro sódico	CGH-desnaturalización-lavados	NA	Merck	bibliografía <sup>94,95</sup>
Avidina-FITC	CGH-revelado	12,5 µg/mL	Sigma	bibliografía <sup>94,95</sup>
Anti-digoxigenina-sheep-TRITC	CGH-revelado	4, µg/mL	Roche	bibliografía <sup>94,95</sup>
DAPI	CGH-contratinción	350 ng/mL	Sigma	bibliografía <sup>94,95</sup>
"SALSA P084 HNSCC-1"	MLPA	NA	MRC-Holland	www.mlpa.com

(NA= no aplicable; V= variable)





## VIII- Resultados

## VIII- Resultados

### VIII-1. Clínico-patológicos

Se dispone de un historial clínico completo de los **56 pacientes** estudiados. Estas variables no tratan de definir los aspectos generales de los CLF, sino las características de los sujetos seleccionados para ver si se ajustan o desvían de lo esperado en este tipo de tumores. También tienen interés para establecer correlaciones con el resto de las variables (citométricas, cromosómicas y génicas), obtenidas por medio de las técnicas citogenéticas utilizadas. A continuación, se detallan aquellos datos clínico-patológicos con mayor trascendencia.

Todos los pacientes estudiados eran varones. El 58% han trabajado en la mina o en la industria metalúrgica o química y todos consumían habitualmente tabaco y alcohol.

La **edad media** fue de 63 años, con un rango de 44-80 años. Se estudiaron 34 tumores de laringe y 22 de faringe, cuya **localización** y edad media se expone en la tabla XI.

Tabla XI. Localización tumoral y edad de los 56 pacientes estudiados.

		Localización (%)	Edad media (rango)
<b>Laringe</b> (n= 34)	<b>Supraglotis</b>	19 (34)	65 (48-77)
	<b>Glottis *</b>	15(26)	60,5 (43-80)
<b>Faringe</b> (n= 22)	<b>Orofaringe</b>	11(20)	58 (44-72)
	<b>Hipofaringe</b>	11(20)	61,5 (50-74)

\* Incluye glóticos, transglóticos y subglóticos

Todos los pacientes tenían un diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso, siendo el **grado histológico** más frecuente el moderadamente diferenciado (28 casos; 50%), seguido del bien diferenciado (17 casos; 30,4%) y, finalmente, el pobremente diferenciado (11 casos; 19,6%).

En el **estadio tumoral** (pTNM) se observó un predominio de estadios avanzados (III-IV) (34 pacientes, 61%), frente a estadios precoces (I-II) ( 22 pacientes, 39%).

La presencia de **ganglios linfáticos** cervicales con metástasis constatadas en el estudio histopatológico (categoría N+) se observó en 26 (46%), de los cuales 4 pertenecían al estadio III y 22 al estadio IV. Ningún paciente presentó metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

La **radioterapia** complementaria postoperatoria se indicó en 21 pacientes (37%).

Todos los datos clínico-patológicos anteriormente mencionados se exponen con detalle, de acuerdo a su localización, en la tabla XII.

El tiempo medio de **seguimiento** fue de 45 meses o hasta la muerte del paciente (rango de 0-100 meses). La **evolución de la enfermedad** al final del seguimiento se expone en la tabla XIII. Es de destacar que los tumores de faringe presentan mayor riesgo de recidivas loco-regionales (50%) que los de laringe (21%).

La **supervivencia** al final del estudio fue del 30% (17 pacientes), siendo la causa principal de mortalidad las recidivas loco-regionales (32%) y los segundos tumores primarios (13%). En la tabla XIII se especifican las causas de mortalidad en relación con las localizaciones tumorales.

Tabla XII. Estadificación, grado histológico, ganglios linfáticos cervicales y radioterapia post-operatoria según su localización tumoral.

	Laringe (n= 34)			Faringe (n= 22)			(n= 56)
	Supraglotis	Glotis *	Total (%)	Orofaringe	Hipofaringe	Total (%)	TOTAL (%)
<b>Estadio</b>							
I	5	3	8 (24)	1	0	1 (5)	9 (16)
II	7	4	11 (32)	1	1	2 (9)	13 (23)
III	1	3	4 (12)	3	2	5 (23)	9 (16)
IV	6	5	11 (32)	6	8	14 (64)	25 (45)
<b>Grado histológico</b>							
Pobre	3	2	5 (15)	4	2	6 (27)	11 (20)
Moderado	11	7	18 (53)	5	5	10 (46)	28 (50)
Bien	5	6	11 (32)	2	4	6 (27)	17 (30)
<b>Ganglios linfáticos</b>							
Negativos (No)	12	10	22 (65)	4	4	8 (36)	30 (54)
Positivos (N+)	7	5	12 (35)	7	7	14 (64)	26 (46)
<b>Radioterapia postoperatoria</b>							
No	14	8	22 (65)	6	7	13 (59)	35 (63)
Sí	5	7	12 (35)	5	4	9 (41)	21 (37)

\* Incluye glóticos, transglóticos y subglóticos

Tabla XIII. Evolución de la enfermedad y situación del paciente al final del seguimiento, según su localización tumoral.

	Laringe (n= 34)			Faringe (n= 22)			(n= 56)
	Supraglotis	Glotis *	Total, (%)	Orofaringe	Hipofaringe	Total, (%)	TOTAL, (%)
<b><u>Evolución enfermedad</u></b>							
Sin tumor	13	7	20 (59)	3	2	5 (23)	25 (45)
Recidiva loco-regional	3	4	7 (21)	4	7	11 (50)	18 (32)
Metástasis distancia	2	1	3 (9)	1	2	3 (14)	6 (11)
Segundo primario	1	3	4 (12)	3	0	3 (14)	7 (13) **
<b><u>Situación paciente</u></b>							
vivo	8	6	14 (41)	1	2	3 (14)	17 (30)
† Recidiva loco-regional	3	4	7 (21)	4	7	11 (50)	18 (32)
†Metástasis distancia	2	1	3 (9)	1	2	3 (14)	6 (11)
†Segundo primario	1	3	4 (12)	3	0	3 (14)	7 (13)
†Enfer. intercurrente	3	1	4 (12)	0	0	0 (0)	4 (7)
†Postoperatorio	2	0	2 (6)	2	0	2 (9)	4 (7)

\* Incluye glóticos, transglóticos y subglóticos. \*\* Segundos primarios: 3 pulmón, 1 tráquea, 1 hipofaringe, 1 orofaringe y 1 colon. †: muerte por. Enfer.: enfermedad

El estadio tumoral pTNM y los ganglios linfáticos metastáticos (N+) mostraron una correlación inversa estadísticamente significativa con la supervivencia, con una peor supervivencia a mayor estadio y positividad de los ganglios linfáticos (Figuras 11 y 12).

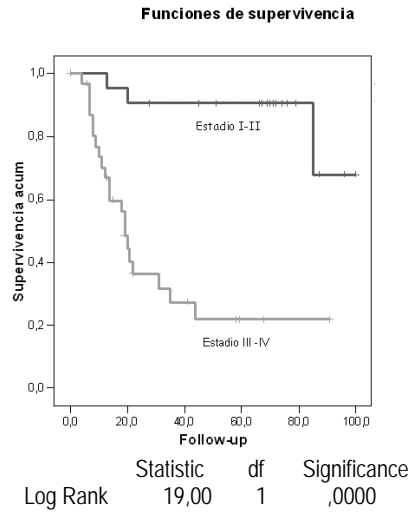


Figura 11. Curva Kaplan-Meier para la variable estadificación, agrupando en estadios precoces (I y II) y avanzados (III y IV).

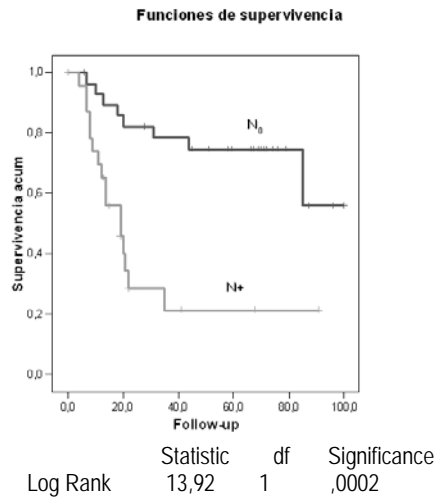


Figura 12. Curva Kaplan-Meier para la variable ganglios linfáticos con metástasis (N+) y sin metástasis (N<sub>0</sub>).

### VIII-2. Citométricos

Los datos de citometría de flujo se obtuvieron en **48 tumores primarios** (85,7%) de los 56 pacientes estudiados. En los ocho pacientes restantes (14,3%) no se pudo hacer una interpretación citométrica adecuada por deterioro de las muestras.

En relación a la **ploidía**, se observó un predominio de los casos aneuploides (63%) frente a los diploides (37%). En los 30 tumores aneuploides el índice de ADN medio fue 1,7 (rango de 1,4-3,0) y la **fase S** fue alta en 11 casos y baja en 19. Los tumores diploides presentaron fase S alta en 7 casos y baja en 11. La localización faríngea presentó más aneuploidía, pero sus valores de fase S fueron más bajos. En la tabla XIV se resumen estas variables citométricas.

Tabla XIV. Datos de citometría de flujo según su localización tumoral.

Tumores primarios	Laringe (n= 28)			Faringe (n= 20)			(n= 48)
	Supraglotis	Glotis*	Total, (%)	Orofaringe	Hipofaringe	Total, (%)	TOTAL, (%)
<b>Contenido de ADN</b>							
Diploide	6	7	13 (46)	3	2	5 (25)	18 (37)
Aneuploide	10	5	15 (54)	6	9	15 (75)	30 (63)
<b>Fase S</b>							
Baja	9	6	15 (54)	8	7	15 (75)	30 (63)
Alta	7	6	13 (46)	1	4	5 (25)	18 (37)

\* Incluye glóticos, transglóticos y subglóticos

En los **ganglios linfáticos con metástasis** (n= 26; Tabla XII) obtuvimos datos citométricos en **11 pacientes** (42%), de los que 8 eran aneuploides (72,7%) y 3 diploides (27,3%). El índice de ADN medio en los casos aneuploides fue 1,8 (rango de 1,5-3,3). Tres casos presentaron fase S alta, otros tres fase baja, no pudiendo ser evaluada en los dos restantes. Los tres pacientes con metástasis ganglionares diploides presentaron valores de fase S alta en dos casos y el caso restante tenía fase S baja. En la tabla XV se detallan las variables citométricas para los ganglios linfáticos con metástasis según su localización tumoral.

Tanto en los tumores primarios como en las metástasis ganglionares no se observó ninguna correlación estadísticamente significativa entre las variables citométricas y los parámetros clínico-patológicos estudiados. Así mismo, ninguna de las variables citométricas estudiadas guarda correlación con la supervivencia de los pacientes. Como ejemplo, en la figura 13 se representa la curva de supervivencia para el contenido de ADN.

Tabla XV. Datos de citometría de flujo en los ganglios linfáticos con metástasis según su localización tumoral.

Ganglios linfáticos	Laringe (n= 4)			Faringe (n= 7)			(n= 11)
	Supraglotis	Glotis*	Total, (%)	Orofaringe	Hipofaringe	Total, (%)	TOTAL, (%)
<b>Contenido de ADN</b>							
Diploide	0	1	1 (25)	1	1	2 (29)	3 (27)
Aneuploide	2	1	3 (75)	3	2	5 (72)	8 (73)
<b>Fase S</b>							
Baja	1	0	1 (25)	2	1	3 (43)	4 (36)
Alta	0	2	2 (50)	1	2	3 (43)	5 (46)

\* Incluye glóticos, transglóticos y subglóticos

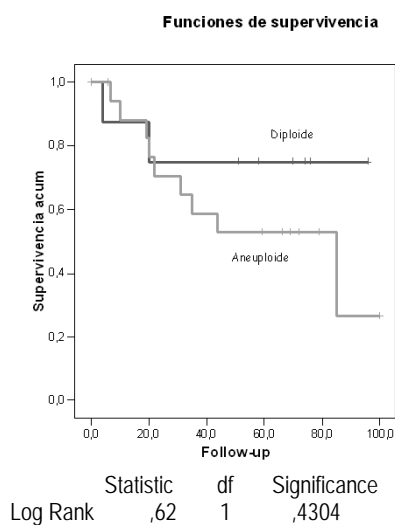


Figura 13. Curva Kaplan-Meier para la variable contenido de ADN de los tumores primarios estudiados.

### VIII-3- Cromosómicos

#### VIII-3.1. Alteraciones cromosómicas

Se estudiaron por CGH las alteraciones cromosómicas de **56 tumores primarios**. El número medio de estas alteraciones fue 19,5 por caso (rango de 1-34), siendo más frecuentes las ganancias que las pérdidas. Las alteraciones de un cromosoma completo fueron escasas, sin embargo, las asociadas a un brazo cromosómico completo fueron más frecuentes, representando más del 36% de los cambios observados. En la figura 14 se

resumen todas las alteraciones cromosómicas detectadas. En el anexo I se indica la nomenclatura utilizada para definir cada región cromosómica según su patrón de bandas.

### Ganancias

Son las alteraciones cromosómicas más frecuentes, con una media por caso de 11,1 (rango de 1-23). Las **regiones cromosómicas** con mayor número de ganancias aparecen reflejadas en la tabla XVI.

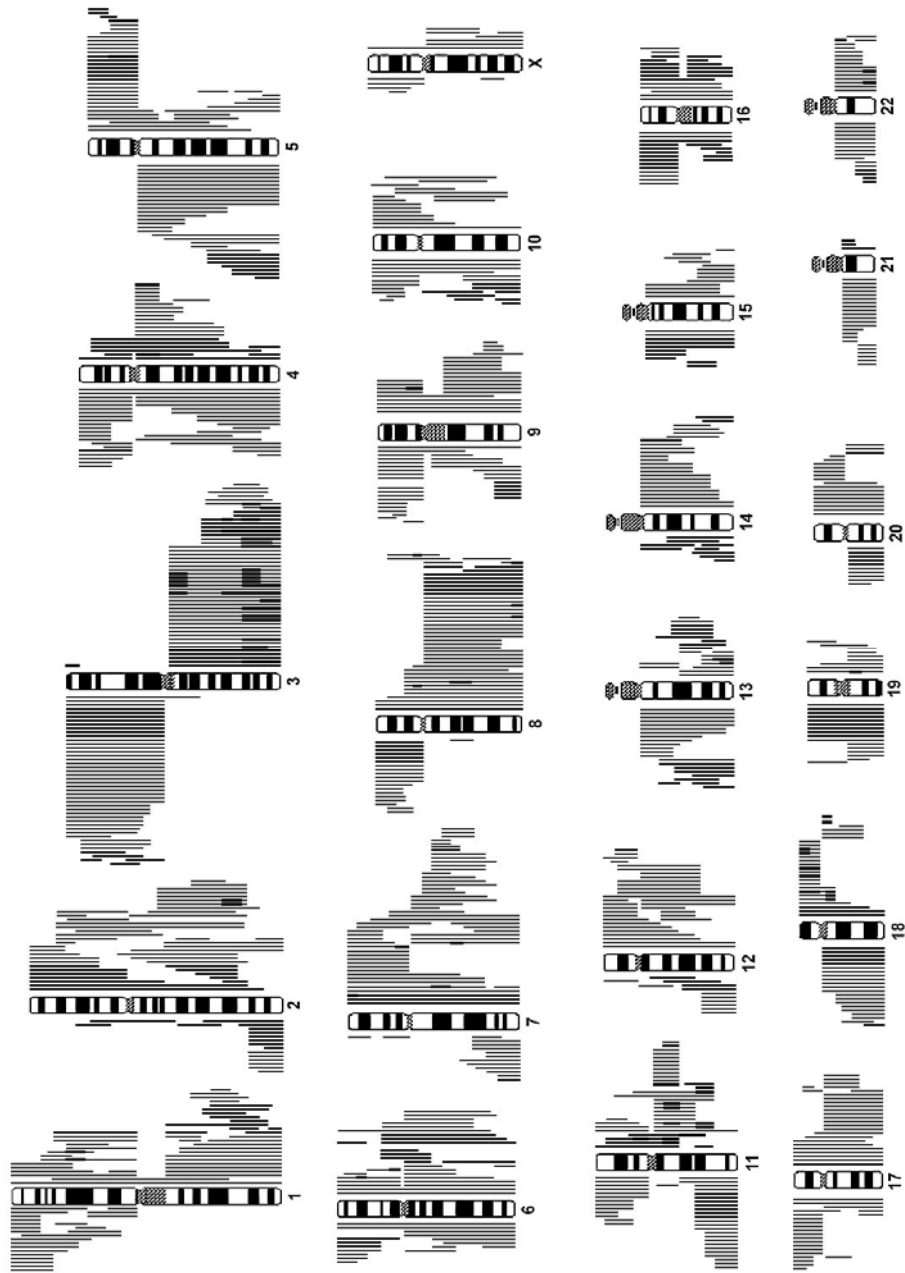
Los **brazos cromosómicos** completos con más alteraciones en ganancias fueron el 3q (32 casos, 57%), 8q (21 casos, 38%), 5q (19 casos, 34%), 18p (12 casos, 21%), 17q (10 casos, 18%), 7p (7 casos, 13%), 1q y 9q (6 casos, 11%) y el 20p (5 casos, 9%) (Figura 14).

Los **cromosomas completos** que presentaron con mayor frecuencia ganancias fueron el 20 (8 casos, 14%), 22 (7 casos, 13%), 17 (5 casos, 9%), 7 y el 9 (4 casos, 7%) (Figura 14).

Tabla XVI. Regiones cromosómicas con ganancias más frecuentes en los 56 tumores primarios.

<b>Ganancias</b>	<b>Casos (%)</b>
3q25-27	48 (86)
7q21-31	38 (68)
8q11-qter	34 (61)
5p12-14	30 (54)
11q11-13	28 (50)
2q24-32	24 (43)
12p11-12	24 (43)
17q11-23	23 (41)
6q12-15	21 (38)
4q12-13	20 (36)
18p11-pter	20 (36)





**Figura 14.** Alteraciones cromosómicas detectadas por CGH en los 56 tumores primarios. A la derecha de cada cromosoma las barras indican las ganancias y a la izquierda las pérdidas. Las amplificaciones se representan con barras más gruesas.

### Amplificaciones

En 35 tumores primarios (62,5%) se detectaron 64 amplificaciones. En la tabla XVII se representan las **regiones cromosómicas** con mayor número de amplificaciones.

Tabla XVII. Regiones cromosómicas con amplificaciones más frecuentes en los 56 tumores primarios.

<b>Amplificaciones</b>	<b>Casos (%)</b>
3q26-qter	20 (35)
11q13	7 (13)
11q22	5 (9)
3q12-13	5 (9)
18p11.3	5 (9)
18q11.2	5 (9)
8q24.3	3 (5)
1p31	2 (4)
2q32-33	2 (4)
4q11-13	2 (4)
5p11-14	2 (4)
8p11	2 (4)
13q33-34	2 (4)
22q13	2 (4)

### Pérdidas

La media de pérdidas por caso fue 8,4 (rango de 0-20). Las **regiones cromosómicas** con mayor número de pérdidas aparecen reflejadas en la tabla XVIII.

Los **brazos cromosómicos** completos con alteraciones más abundantes en pérdidas fueron el 3p (27 casos, 48%), 18q (12 casos, 21%), 5q, 8p, 9p, 16p, 17p (11 casos, 20%), 20q (9 casos, 16%), 4p (7 casos, 13%) y el 11p (6 casos, 11%) (Figura 14). Los **cromosomas completos** con mayor número de pérdidas fueron el 21 (13 casos, 23%), 19 (10 casos, 18%), 22 (9 casos, 16%), 15 (6 casos, 11%) y el 13 (5 casos, 9%) (Figura 14).

Tabla XVIII. Regiones cromosómicas con pérdidas más frecuentes en los 56 tumores primarios.

<b>Pérdidas</b>	<b>Casos (%)</b>
3p13-24	44 (79)
11q23-25	25 (45)
4p15-16	16 (38)
18q21-23	16 (38)
5q31-35	21 (36)
8p21-22	19 (34)
21q22	19 (34)
17p12-13	18 (32)
4q31-34	17 (30)
9p21-23	17 (30)

### Isocromosomas

La ganancia de un brazo cromosómico completo se asoció frecuentemente a la pérdida del otro, prediciendo la formación de un isocromosoma. Esta alteración cromosómica se detecta en 3p pérdida/3q ganancia (24 casos, 43%), 8p pérdida/8q ganancia (13 casos, 23%), 5p ganancia/ 5q pérdida (10 casos, 18%), 18p ganancia/18q pérdida (7 casos, 13%), 17p pérdida/17q ganancia (6 casos, 11%) y 9p pérdida/9q ganancia (4 casos, 7%) (Figura 14).

### *VIII-3.2. Correlación de las alteraciones cromosómicas en los tumores primarios metastáticos y no metastáticos*

Ambos grupos presentaron un patrón muy similar de alteraciones cromosómicas en ganancias, pérdidas y amplificaciones. Las principales diferencias aparecen reflejadas en las tablas XIX, XX y XXI. Aunque el número de las alteraciones cromosómicas fue superior en los tumores metastáticos, sólo la amplificación de la región 11q13 fue estadísticamente significativa.

Tabla XIX. Incremento de las ganancias cromosómicas entre los tumores metastáticos (n=26) y no metastáticos (n=30).

Región cromosómica	T. primarios N+ %	T. primarios N <sub>0</sub> %	Incremento %	p*
15q	14,3	7,1	7,1	p= 0,104
16q	12,5	8,9	3,6	p= 0,272
17p	10,7	8,9	1,8	p= 0,394
19q	8,9	7,1	1,8	p= 0,406
11p	7,1	5,4	1,8	p= 0,418
Xq	5,4	3,6	1,8	p= 0,431
Xp	1,8	0,0	1,8	p= 0,464
3p	1,8	0,0	1,8	p= 0,646

\* prueba T

Tabla XX. Incremento de las amplificaciones cromosómicas entre los tumores metastáticos (n=26) y no metastáticos (n=30).

Región cromosómica	T. primarios N+ %	T. primarios N <sub>0</sub> %	Incremento %	p*
11q13	10,7	1,8	8,9	p= 0,007
18p11	7,1	1,8	5,4	p= 0,135
1p31-32	3,6	0,0	3,6	p= 0,211
22q13	3,6	0,0	3,6	p= 0,211
5p11-13	3,6	1,8	1,8	p= 0,446
8q24	3,6	1,8	1,8	p= 0,446
3p25-26	1,8	0,0	1,8	p= 0,464
6p22	1,8	0,0	1,8	p= 0,464
9p11-13	1,8	0,0	1,8	p= 0,464
11p11-12	1,8	0,0	1,8	p= 0,464
14q11-21	1,8	0,0	1,8	p= 0,464
19q13	1,8	0,0	1,8	p= 0,464
22q11.2	1,8	0,0	1,8	p= 0,464

\* prueba T

Tabla XXI. Incremento de las pérdidas cromosómicas entre los tumores metastáticos (n=26) y no metastáticos (n=30).

Región cromosómica	T. primarios N+ %	T. primarios N <sub>0</sub> %	Incremento %	p*
2p	3,6	0,0	3,6	p= 0,211
18q	19,6	17,9	1,8	p= 0,339
10q	12,5	10,7	1,8	p= 0,383
3q	1,8	0,0	1,8	p= 0,464
8q	1,8	0,0	1,8	p= 0,464
Xq	1,8	0,0	1,8	p= 0,464

\* prueba T

### VIII-3.3. Correlación de las alteraciones cromosómicas con los datos clínico-patológicos y citométricos

No se observó ninguna correlación estadísticamente significativa entre el patrón de las alteraciones cromosómicas con la edad, localización tumoral y grado histológico.

En la correlación entre las alteraciones cromosómicas con el estadio pTNM y los ganglios linfáticos, sólo la amplificación de la región cromosómica 11q13 se asoció con tumores en estadio IV y con ganglios metastáticos, de forma estadísticamente significativa. En el caso de la región 18p11.3 se observó esta misma tendencia, pero los

valores no alcanzan un grado de significación estadística. Las tablas XXII y XXIII representan las correlaciones referentes a estas dos amplificaciones.

Tabla XXII. Correlación de las amplificaciones 11q13 y 18p11.3 con el estado.

Región cromosómica	Estadios precoces		Estadios avanzados		p*
	Estadio I Casos (%)	Estadio II Casos (%)	Estadio III Casos (%)	Estadio IV Casos (%)	
Amplificación 11q13	1 (2)	0 (0)	0 (0)	6 (11)	p= 0.040
Amplificación 18p11.3	0 (0)	1 (2)	0 (0)	4 (7)	p= 0.340

\* Chi<sup>2</sup> de Pearson

Tabla XXIII. Correlación de las amplificaciones 11q13 y 18p11.3 con el estado de los ganglios linfáticos.

Amplificación cromosómica	Ganglios linfáticos N <sub>0</sub> Casos (%)	Ganglios linfáticos N <sub>+</sub> Casos (%)	p*
Amplificación 11q13	1 (2)	6 (11)	p= 0.007
Amplificación 18p11.3	1 (2)	4 (7)	p= 0.135

\* estadístico exacto de Fisher

Ninguna de las alteraciones cromosómicas encontradas guarda correlación estadísticamente significativa con la supervivencia de los pacientes. En la figura 15 se representa, a modo de ejemplo, la curva de supervivencia para la amplificación de 11q13.

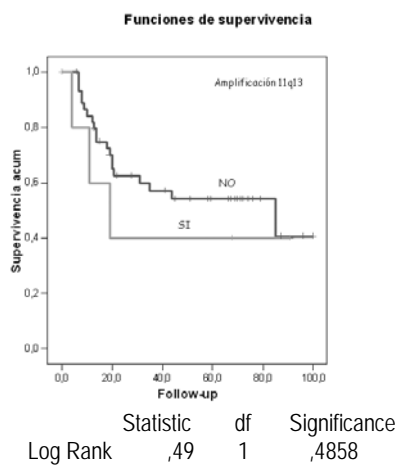
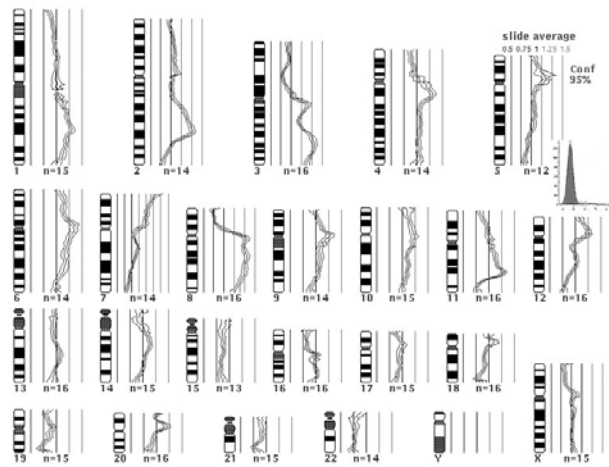
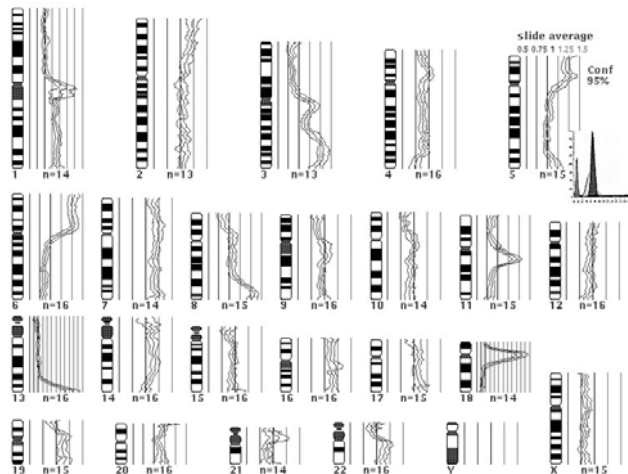


Figura 15. Curva Kaplan-Meier para la amplificación de 11q13.

Las alteraciones cromosómicas encontradas tampoco guardan relación estadísticamente significativa con las variables citométricas de ploidía y fase S. Las figuras 16a y 16b muestran a modo de ejemplo dos resultados de CGH en un caso diploide y otro aneuploide.



**Figura 16a.** Resultados de CGH en una muestra de carcinoma de laringe (caso 8 del anexo II) con contenido diploide de ADN. Las ganancias fueron encontradas en 1q, 2q, 3q, 4q, 5p, 6p y q, 7p y q, 8q, 10p y q, 11q, 12p, 14q y 20p. Las pérdidas fueron localizadas en 2q, 3p, 4p, 5q, 8p, 11p, 11q, 12q, 15q, 16p, 17q, 18q, 19p y q, 20q, 21q, 22q y Xp. Se observan también dos amplificaciones en 2q32-33 y 3q26 y la posible formación de isocromosomas en los cromosomas 3 y 8. A la derecha del cromosoma 5 se representa el histograma de la citometría de flujo.



**Figura 16b.** Resultados de CGH en una muestra de carcinoma de laringe (caso 42 del anexo II) con contenido aneuploide de ADN (ID= 1,55). Las ganancias fueron encontradas en 1q, 2p, 3q, 5p, 6p, 7p y q, 8q, 11q, 13q, 14q, 16p y q, 18q, 19q, 20p y q y en 22q. Las pérdidas fueron localizadas en 3p, 4q, 6q, 8p, 9p, 10p, 11p, 11q, 18q, 21q y X. Se observan también amplificaciones en 3q26-qter, 8q24.3, 11q13, 13q33-34 y 18q11.2 y la posible formación de isocromosomas en los cromosomas 3 y 6. A la derecha del cromosoma 5 se representa el histograma de la citometría de flujo.

#### VIII-4. Génicos

Se estudiaron por MLPA las alteraciones génicas de los **56 tumores primarios**. El estudio también se realizó en los 26 casos que presentaron metástasis ganglionares, pero una muestra no pudo ser procesada y se descartó, obteniendo datos génicos en **25 metástasis ganglionares**.

De los 42 genes estudiados, 5 sondas no funcionaron correctamente y fueron también descartadas del estudio (*CDKN2B*, *BLM*, *TP53* (193 pb), *MADH2* y *MYBL2*), por lo que al final estudiamos 37 sondas (Tabla IX y anexo IV).

Con el propósito de ordenar estos resultados, describiremos en primer lugar las alteraciones génicas. En segundo lugar compararemos dichas alteraciones entre los tumores primarios y las metástasis ganglionares. En tercer lugar estableceremos correlaciones con los datos clínico-patológicos y citométricos.

##### VIII-4.1. Alteraciones génicas

El orden establecido en la exposición de los resultados génicos comprende la descripción de las alteraciones encontradas en los 56 tumores primarios, separando a continuación, los tumores primarios metastáticos de los no metastáticos, para finalizar con las metástasis ganglionares.

##### VIII-4.1.1. Grupo completo de tumores primarios

En la tabla XXIV se resumen todas las alteraciones detectadas para cada una de las sondas estudiadas en los 56 tumores primarios.

##### Pérdidas

En la figura 17 se representan las pérdidas génicas más importantes observadas en el total de los tumores primarios. Las pérdidas de los genes *CDKN2A* y *MLH1* (154 pb) fueron las más frecuentes y se observaron en más del 60 % de las muestras analizadas.

##### Ganancias

En la figura 18 se representan las ganancias génicas más importantes observadas en el total de los tumores primarios. Las ganancias de los genes *CCND1* y *EMS1* fueron las más frecuentes y se observaron en más del 50% de las muestras analizadas.

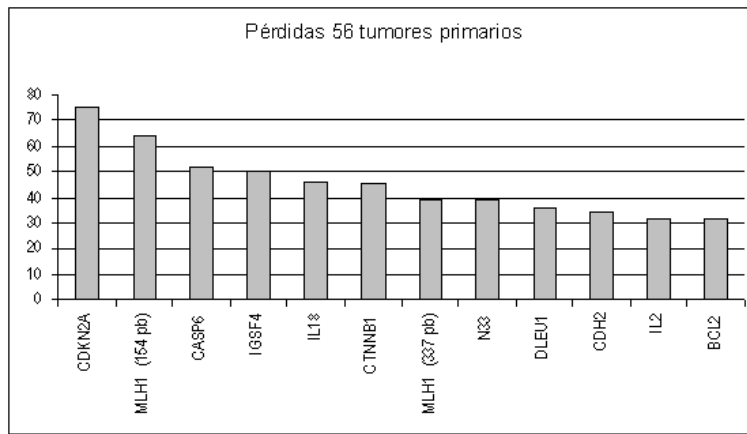


Figura 17. Pérdidas génicas más frecuentes en los 56 tumores primarios.

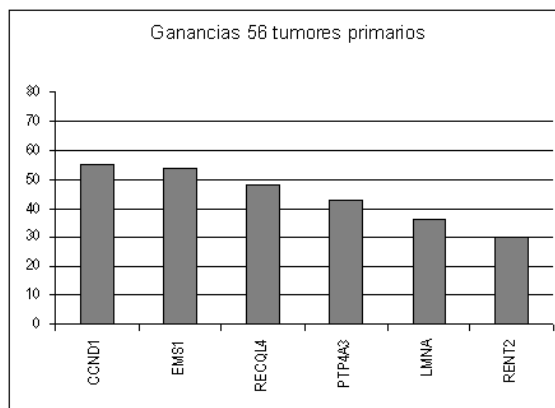


Figura 18. Ganancias génicas más frecuentes en los 56 tumores primarios.



Tabla XXIV. Alteraciones génicas detectadas por MLPA en los 56 tumores primarios.

Gen	Cromosoma	Pérdida Número (%)	Ganancia Número (%)
<i>NRAS</i>	01p13.2	13 (23,2)	12 (21,4)
<i>LMNA</i>	01q21.2	7 (12,5)	20 (35,7)
<i>IL1A</i>	02q14	10 (17,9)	6 (10,7)
<i>TANK</i>	02q24	6 (10,7)	5 (8,9)
<i>MLH1</i> (154 pb)	03p22.1	36 (64,3)	0 (0,0)
<i>MLH1</i> (337 pb)	03p22.1	22 (39,3)	0 (0,0)
<i>CTNNB1</i>	03p22	25 (44,6)	3 (5,4)
<i>CASP6</i>	04q25	29 (51,8)	1 (1,8)
<i>IL2</i>	04q26	18 (32,1)	1 (1,8)
<i>MFHAS1</i>	08p23.1	11 (19,6)	9 (16,1)
<i>CTSB</i>	08p22	12 (21,4)	11 (19,6)
<i>N33</i>	08p22	22 (39,3)	1 (1,8)
<i>PTP4A3</i>	08q24.3	2 (3,6)	24 (42,9)
<i>RECQL4</i>	08q24.3	5 (8,9)	27 (48,2)
<i>CDKN2A</i>	09p21	42 (75,0)	0 (0,0)
<i>AI651963</i>	10p14	11 (19,6)	4 (7,1)
<i>RENT2</i>	10p14	8 (14,3)	17 (30,4)
<i>CREM</i>	10p12.1	13 (23,2)	5 (8,9)
<i>CCND1</i>	11q13	2 (3,6)	31 (55,4)
<i>EMS1</i>	11q13	4 (7,1)	30 (53,6)
<i>IL18</i>	11q23.1	26 (46,4)	4 (7,1)
<i>IGSF4</i>	11q23	28 (50,0)	1 (1,8)
<i>BRCA2</i>	13q12.3	15 (26,8)	2 (3,6)
<i>RB1</i>	13q14.2	15 (26,8)	1 (1,8)
<i>DLEU1</i>	13q14.3	20 (35,7)	1 (1,8)
<i>IGF1R</i>	15q26	15 (26,8)	5 (8,9)
<i>TP53</i> (exón 8)	17p13.1	9 (16,1)	12 (21,4)
<i>TP53</i> (exón 9)	17p13.1	9 (16,1)	7 (12,5)
<i>TP53</i> (exón 10)	17p13.1	16 (28,6)	8 (14,3)
<i>TP53</i> (exón 11)	17p13.1	6 (10,7)	8 (14,3)
<i>ERBB2</i>	17q21.1	8 (14,3)	13 (23,2)
<i>CDH2</i>	18q11.2	19 (33,9)	2 (3,6)
<i>BCL2</i>	18q21.2	18 (32,1)	2 (3,6)
<i>STK11</i>	19p13.3	7 (12,5)	9 (16,1)
<i>CDKN2D</i>	19p13	7 (12,5)	13 (23,2)
<i>BCL2L1</i>	20q11.1	9 (16,1)	10 (17,9)
<i>PTPN1</i>	20q13.1	5 (8,9)	16 (28,6)

### VIII-4.1.2. Tumores primarios metastáticos y no metastáticos

De los 56 tumores primarios estudiados, 26 presentaron metástasis ganglionares y 30 no (Tabla XII). En la tabla XXV se desglosan los resultados para estas dos categorías de tumores primarios. La representación de dichas alteraciones se expone en la figura 19.

#### Pérdidas

Las pérdidas génicas más frecuentes se exponen en la figura 20 y en la tabla XXV.

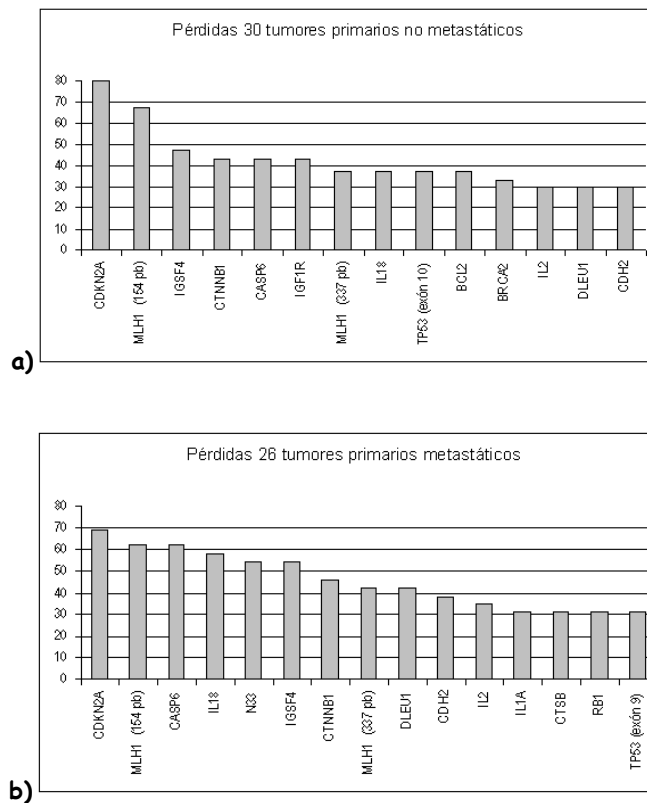
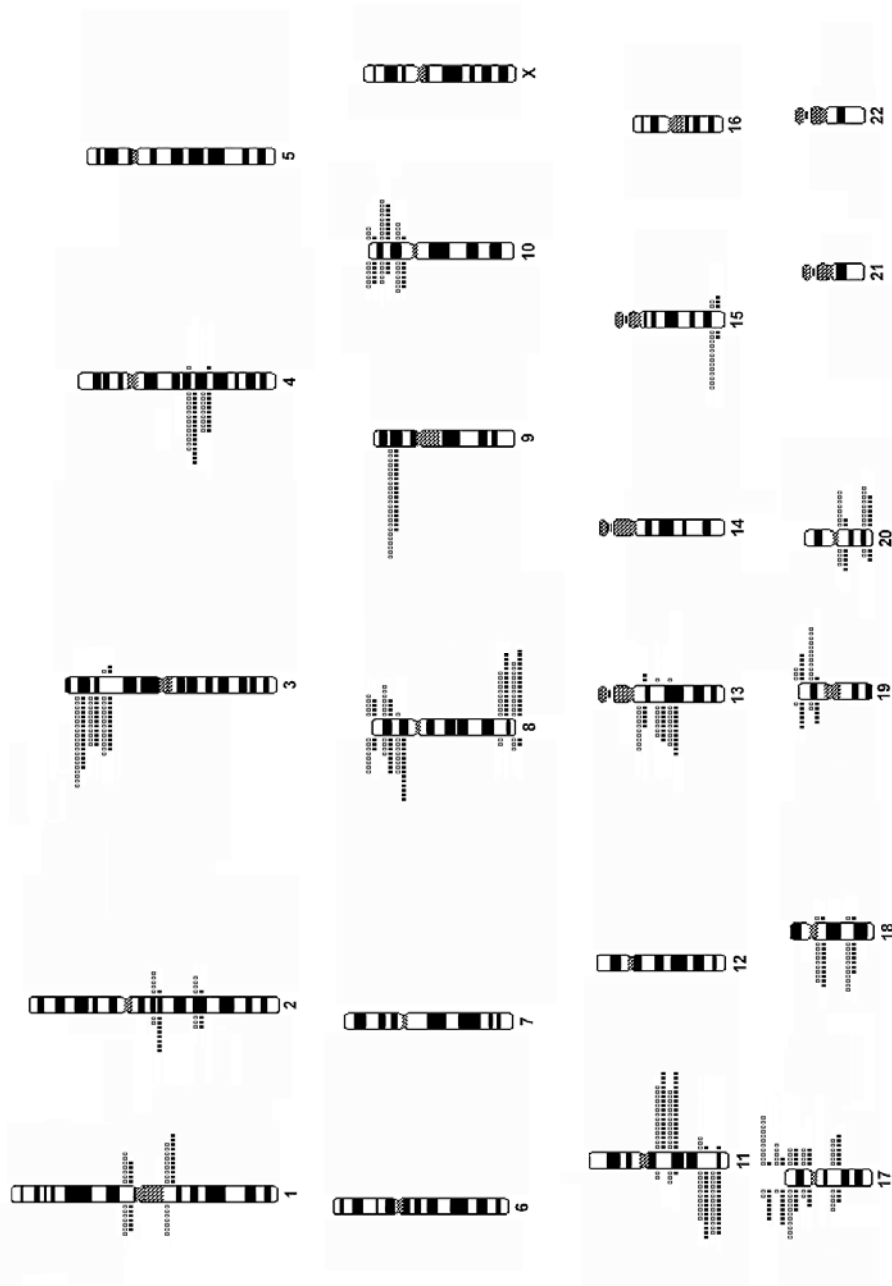


Figura 20. Pérdidas génicas más frecuentes para: a) tumores primarios no metastáticos (No) y b) tumores primarios metastáticos (N+).

Tabla XXV. Alteraciones génicas de los 56 tumores primarios, separando los tumores metastáticos de los no metastáticos.

Gen	Cromosoma	T. primarios N <sub>0</sub> (n= 30)		T. primario N+ (n= 26)	
		Pérdidas Número (%)	Ganancias Número (%)	Pérdidas Número (%)	Ganancias Número (%)
<i>NRAS</i>	01p13.2	7 (23,3)	7 (23,3)	6 (23,1)	5 (19,2)
<i>LMNA</i>	01q21.2	7 (23,3)	9 (30,0)	0 (0,0)	11 (42,3)
<i>IL1A</i>	02q14	2 (6,7)	5 (16,7)	8 (30,8)	1 (3,8)
<i>TANK</i>	02q24	3 (10,0)	4 (13,3)	3 (11,5)	1 (3,8)
<i>MLH1</i> (154 pb)	03p22.1	20 (66,7)	0 (0,0)	16 (61,5)	0 (0,0)
<i>MLH1</i> (337 pb)	03p22.1	11 (36,7)	0 (0,0)	11 (42,3)	0 (0,0)
<i>CTNNB1</i>	03p22	13 (43,3)	1 (3,3)	12 (46,2)	2 (7,7)
<i>CASP6</i>	04q25	13 (43,3)	1 (3,3)	16 (61,5)	0 (0,0)
<i>IL2</i>	04q26	9 (30,0)	0 (0,0)	9 (34,6)	1 (3,8)
<i>MFHAS1</i>	08p23.1	8 (26,7)	5 (16,7)	3 (11,5)	4 (15,4)
<i>CTSB</i>	08p22	4 (13,3)	7 (23,3)	8 (30,8)	4 (15,4)
<i>N33</i>	08p22	8 (26,7)	1 (3,3)	14 (53,8)	0 (0,0)
<i>PTP4A3</i>	08q24.3	2 (6,7)	10 (33,3)	0 (0,0)	14 (53,8)
<i>RECQL4</i>	08q24.3	3 (10,0)	12 (40,0)	2 (7,7)	15 (57,7)
<i>CDKN2A</i>	09p21	24 (80,0)	0 (0,0)	18 (69,2)	0 (0,0)
<i>AI651963</i>	10p14	6 (20,0)	3 (10,0)	5 (19,2)	1 (3,8)
<i>RENT2</i>	10p14	5 (16,7)	9 (30,0)	3 (1,5)	8 (30,8)
<i>CREM</i>	10p12.1	7 (23,3)	4 (13,3)	6 (3,1)	1 (3,8)
<i>CCND1</i>	11q13	2 (6,7)	14 (46,7)	0 (0,0)	17 (65,4)
<i>EMS1</i>	11q13	3 (10,0)	13 (43,3)	1 (3,8)	17 (65,4)
<i>IL18</i>	11q23.1	11 (36,7)	3 (10,0)	15 (57,7)	1 (3,8)
<i>IGSF4</i>	11q23	14 (46,7)	0 (0,0)	14 (53,8)	1 (3,8)
<i>BRCA2</i>	13q12.3	10 (33,3)	0 (0,0)	5 (19,2)	2 (7,7)
<i>RBI</i>	13q14.2	7 (23,3)	1 (3,3)	8 (30,8)	0 (0,0)
<i>DLEU1</i>	13q14.3	9 (30,0)	1 (3,3)	11 (42,3)	0 (0,0)
<i>IGF1R</i>	15q26	13 (43,3)	2 (6,7)	2 (7,7)	3 (11,5)
<i>TP53</i> (exón 8)	17p13.1	2 (6,7)	11 (36,7)	7 (26,9)	1 (3,8)
<i>TP53</i> (exón 9)	17p13.1	1 (3,3)	5 (16,7)	8 (30,8)	2 (7,7)
<i>TP53</i> (exón 10)	17p13.1	11 (36,7)	4 (13,3)	5 (19,2)	4 (15,4)
<i>TP53</i> (exón 11)	17p13.1	2 (6,7)	4 (13,3)	4 (15,4)	4 (15,4)
<i>ERBB2</i>	17q21.1	5 (16,7)	6 (20,0)	3 (11,5)	7 (26,9)
<i>CDH2</i>	18q11.2	9 (30,0)	1 (3,3)	10 (38,5)	1 (3,8)
<i>BCL2</i>	18q21.2	11 (36,7)	1 (3,3)	7 (26,9)	1 (3,8)
<i>STK11</i>	19p13.3	1 (3,3)	3 (10,0)	6 (23,1)	6 (23,1)
<i>CDKN2D</i>	19p13	2 (6,7)	12 (40,0)	5 (19,2)	1 (3,8)
<i>BCL2L1</i>	20q11.1	4 (13,3)	8 (26,7)	5 (19,2)	2 (7,7)
<i>PTPN1</i>	20q13.1	2 (6,7)	9 (30,0)	3 (11,5)	7 (26,9)



**Figura 19.** Alteraciones génicas detectadas en los 56 tumores primarios. Los recuadros a la izquierda de cada cromosoma representan las pérdidas y a la derecha las ganancias. Recuadros blancos: tumores no metastáticos (N<sub>0</sub>); recuadros negros: tumores metastáticos (N<sub>+</sub>).

## Ganancias

Las ganancias génicas más frecuentes se exponen en la figura 21 y en la tabla XXV.

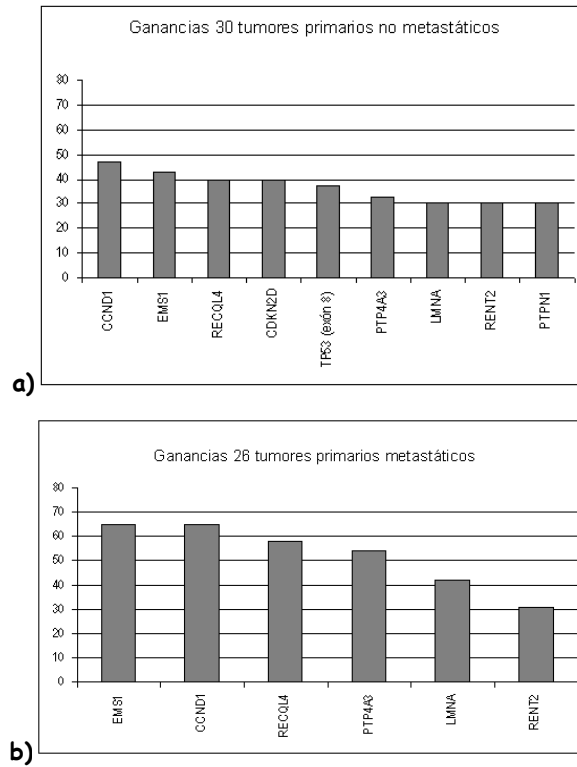


Figura 21. Ganancias génicas más frecuentes para: a) tumores primarios no metastáticos (N<sub>0</sub>) y b) tumores primarios metastáticos (N<sub>+</sub>).

### VIII-4.1.3. Metástasis ganglionares

En la tabla XXVI se resumen todas las alteraciones génicas detectadas por MLPA en las 25 metástasis ganglionares. Las alteraciones génicas se representan en la figura 22.

Tabla XXVI. Alteraciones génicas en las metástasis ganglionares (n= 25).

Gen	Cromosoma	Pérdida Número (%)	Ganancia Número (%)
<i>NRAS</i>	01p13.2	11 (44)	1 (4)
<i>LMNA</i>	01q21.2	8 (32)	3 (12)
<i>IL1A</i>	02q14	7 (28)	0 (0)
<i>TANK</i>	02q24	5 (20)	0 (0)
<i>MLH1</i> (154 pb)	03p22.1	7 (28)	1 (4)
<i>MLH1</i> (337 pb)	03p22.1	6 (24)	1 (4)
<i>CTNNB1</i>	03p22	22 (88)	0 (0)
<i>CASP6</i>	04q25	14 (56)	0 (0)
<i>IL2</i>	04q26	14 (56)	0 (0)
<i>MFHAS1</i>	08p23.1	11 (44)	6 (24)
<i>CTSB</i>	08p22	2 (8)	5 (20)
<i>N33</i>	08p22	8 (32)	7 (28)
<i>PTP4A3</i>	08q24.3	0 (0)	16 (64)
<i>RECQL4</i>	08q24.3	8 (32)	8 (32)
<i>CDKN2A</i>	09p21	16 (64)	0 (0)
<i>AI651963</i>	10p14	10 (40)	1 (4)
<i>RENT2</i>	10p14	8 (32)	0 (0)
<i>CREM</i>	10p12.1	3 (12)	1 (4)
<i>CCND1</i>	11q13	0 (0)	18 (72)
<i>EMS1</i>	11q13	0 (0)	17 (68)
<i>IL18</i>	11q23.1	17 (68)	1 (4)
<i>IGSF4</i>	11q23	5 (20)	4 (16)
<i>BRCA2</i>	13q12.3	9 (36)	0 (0)
<i>RB1</i>	13q14.2	13 (52)	0 (0)
<i>DLEU1</i>	13q14.3	6 (24)	1 (4)
<i>IGF1R</i>	15q26	10 (40)	0 (0)
<i>TP53</i> (exón 8)	17p13.1	0 (0)	7 (28)
<i>TP53</i> (exón 9)	17p13.1	0 (0)	2 (8)
<i>TP53</i> (exón 10)	17p13.1	7 (28)	1 (4)
<i>TP53</i> (exón 11)	17p13.1	2 (8)	7 (28)
<i>ERBB2</i>	17q21.1	0 (0)	6 (24)
<i>CDH2</i>	18q11.2	13 (52)	3 (12)
<i>BCL2</i>	18q21.2	9 (36)	0 (0)
<i>STK11</i>	19p13.3	1 (4)	11 (44)
<i>CDKN2D</i>	19p13	2 (8)	9 (36)
<i>BCL2L1</i>	20q11.1	3 (12)	3 (12)
<i>PTPN1</i>	20q13.1	8 (32)	1 (4)

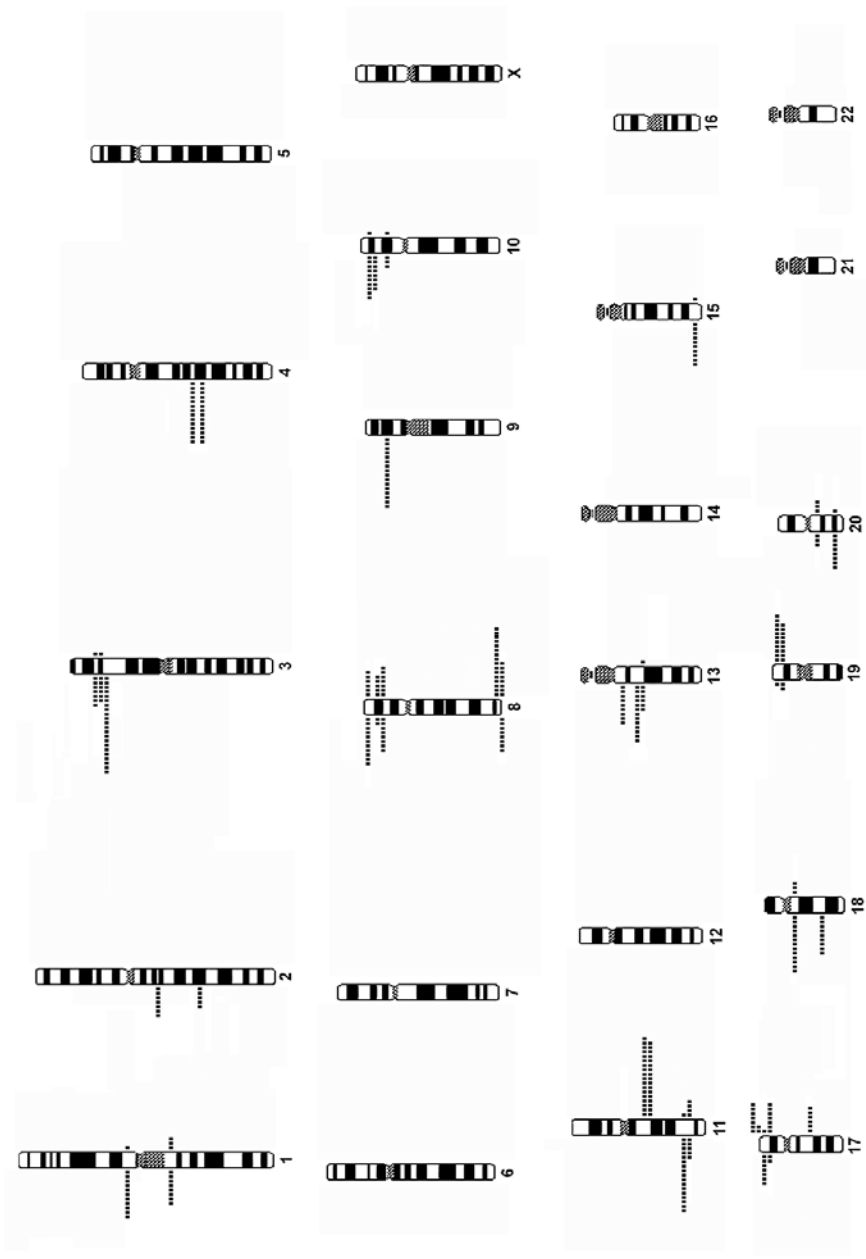


Figura 22. Alteraciones génicas en las 25 metástasis ganglionares. Los recuadros a la izquierda de cada cromosoma representan pérdidas y a la derecha ganancias.

### Pérdidas

Las pérdidas génicas más frecuentes se exponen en la figura 23 y en la tabla XXVI. El gen *CTNNB1*, localizado en la región cromosómica 3p22, fue la pérdida más frecuente estando presente en el 88% de los casos.

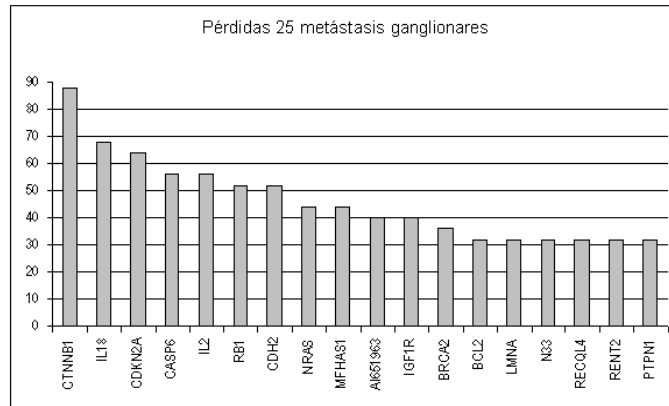


Figura 23. Pérdidas génicas más frecuentes en las metástasis ganglionares (n= 25).

### Ganancias

Las ganancias génicas más frecuentes se exponen en la figura 24 y en la tabla XXVI. Los genes *CCND1* y *EMS1*, localizados en la región cromosómica 11q13, destacaron entre las ganancias y fueron detectados en el 72% y 68% de los casos, respectivamente.

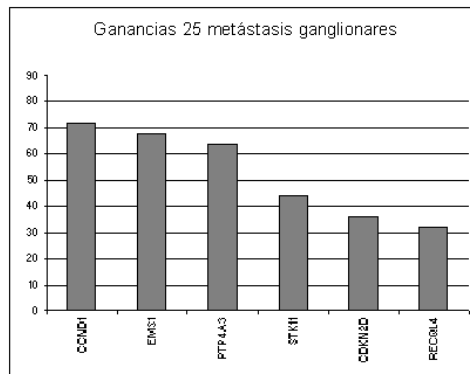


Figura 24. Ganancias génicas más frecuentes en las metástasis ganglionares (n= 25).



#### VIII-4.2. Correlación de las alteraciones génicas

Se correlacionaron las alteraciones génicas detectadas por MLPA en los siguientes grupos: 1) Grupo completo de tumores primarios (n=56) y metástasis ganglionares (n=25), con el fin de identificar un posible patrón génico para las metástasis ganglionares. 2) Tumores primarios metastáticos (n=26) y no metastáticos (n=30), para identificar el patrón génico metastático en el tumor primario. 3) Cada tumor primario metastático (n=25) con su correspondiente metástasis ganglionar (n=25) con el propósito de establecer similitudes y diferencias génicas en el mismo proceso tumoral y definir el patrón génico que conduce a la formación de metástasis ganglionares.

##### VIII-4.2.1. Grupo completo de tumores primarios y metástasis ganglionares

Las pérdidas y ganancias génicas observadas en ambos grupos se ponen de manifiesto en las tablas XXVII y XXVIII donde se muestran 9 genes con pérdidas y 8 con ganancias que presentaron más alteraciones en las metástasis ganglionares.

Tabla XXVII. Incremento en las pérdidas génicas entre los tumores primarios (n= 56) y las metástasis ganglionares (n= 25).

Gen	Cromosoma	Tumor primario (%)	Metástasis ganglionar (%)	Incremento (%)	p*
<i>CTNNB1</i>	3p22	44,6	88	43,3	p= 0,000
<i>RBI</i>	13q14.2	26,8	52	25,2	p= 0,002
<i>MFHAS1</i>	8p23.1	19,6	44	24,4	p= 0,009
<i>PTPNI</i>	20q13.1	8,9	32	23,1	p= 0,003
<i>NRAS</i>	1p13.2	23,2	44	20,8	p= 0,010
<i>LMNA</i>	1q21.2	12,5	32	19,5	p= 0,014
<i>CDH2</i>	18q11.2	33,9	52	18,1	p= 0,033
<i>RENT2</i>	10p14	14,3	32	17,7	p= 0,000
<i>IGF1R</i>	15q26	26,8	40	13,2	p= 0,063

\* prueba T

Tabla XXVIII. Incremento en las ganancias génicas entre los tumores primarios (n= 56) y las metástasis ganglionares (n= 25).

Gen	Cromosoma	Tumor primario (%)	Metástasis ganglionar (%)	Incremento (%)	p*
<i>STK11</i>	19p13.3	16,1	44	27,9	p= 0,007
<i>N33</i>	8p22	1,8	28	26,2	p= 0,000
<i>PTP4A3</i>	8q24.3	42,9	64	21,1	p= 0,081
<i>CCND1</i>	11q13	55,4	72	16,6	p= 0,079
<i>IGSF4</i>	11q23	1,8	16	14,2	p= 0,014
<i>EM51</i>	11q13	53,6	68	14,4	p= 0,229
<i>TP53</i> exón 11	17p13	14,3	28	13,7	p= 0,146
<i>CDKN2D</i>	9p21	23,2	36	12,8	p= 0,125

\* prueba T

#### VIII-4.2.2. Tumores primarios metastáticos y no metastáticos

El incremento de pérdidas y ganancias asociadas a los tumores metastáticos aparecen reflejadas en las tablas XXIX y XXX.

Tabla XXIX. Incremento de pérdidas génicas entre los tumores metastáticos (N+), (n= 26) y los no metastáticos (No), (n= 30).

Gen	Cromosoma	T. primario N+ (%)	T. primario NO (%)	Incremento (%)	p*
<i>TP53</i> exón 9	17p13	30,8	3,3	27,4	p= 0,005
<i>N33</i>	8p22	53,8	26,7	27,2	p= 0,038
<i>TP53</i> exón 8	17p13	26,9	6,7	20,3	p= 0,040
<i>STK11</i>	19p13.3	23,1	3,3	19,7	p= 0,026
<i>CASP6</i>	7q25	61,5	43,3	18,2	p= 0,180
<i>CTBS</i>	8p22	30,8	13,3	17,4	p= 0,126
<i>CDKN2D</i>	19p13	19,2	6,7	12,6	p= 0,177

\* prueba T

Tabla XXX. Incremento de ganancias génicas entre los tumores metastáticos (N+), (n= 26) y los no metastáticos (No), (n= 30).

Gen	Cromosoma	T. primario N+ (%)	T. primario NO (%)	Incremento (%)	p*
<i>EM51</i>	11q13	65,4	43,3	22,1	p= 0,102
<i>PTP4A3</i>	8q24.3	53,8	33,3	20,5	p= 0,128
<i>CCND1</i>	11q13	65,4	46,7	18,7	p= 0,164
<i>RECQL4</i>	8q24.3	57,7	40	17,7	p= 0,193
<i>STK11</i>	19p13.3	23,1	10	13,1	p= 0,202
<i>LMNA</i>	1q21.2	42,3	30	12	p= 0,350

\* prueba T

VIII-4.2.3. Cada tumor primario metastático con su correspondiente metástasis ganglionar

Las pérdidas y ganancias génicas comunes entre cada tumor primario metastático con su correspondiente metástasis ganglionar se ponen de manifiesto en la tabla XXXI. Sólo la pérdida de *CDKN2A* tuvo un valor estadísticamente significativo.

Tabla XXXI. Pérdidas y ganancias génicas comunes entre cada tumor primario metastático y su correspondiente metástasis ganglionar (n= 25).

Gen	Cromosoma	Pérdida común Número (%)	Ganancia común Número (%)	p*
<i>CDKN2A</i>	9p21	14 (56)		p= 0,010
<i>CTNNB1</i>	3p22	11 (44)		p= 0,531
<i>CDH2</i>	18q11.2	6 (24)		p= 0,404
<i>CCND1</i>	11q13		12 (48)	p= 0,499
<i>EMS1</i>	11q13		13 (52)	p= 0,075
<i>PTP4A3</i>	8q24.3		9 (36)	p= 0,440

\* estadístico exacto de Fisher

Las pérdidas y ganancias génicas que aparecieron como nuevas alteraciones o incrementaron su valor en las metástasis ganglionares con respecto a los tumores primarios metastáticos se exponen en las tablas XXXII y XXXIII.

Tabla XXXII. Incremento de pérdidas génicas entre cada tumor primario metastático y su correspondiente metástasis ganglionar (n= 25).

Gen	Cromosoma	T. primario N+ (%)	Metástasis ganglionar (%)	Incremento (%)	p*
<i>CTNNB1</i>	3p22	4	44	40	p= 0,009
<i>LMNA</i>	1q21.2	0	32	32	p= 0,013
<i>IGF1R</i>	15q26	0	32	32	p= 0,018
<i>MFHAS1</i>	8p23.1	4	36	32	p= 0,026
<i>RECQL4</i>	8q24.3	0	24	24	p= 0,041
<i>PTPN1</i>	20q13.1	4	24	20	p= 0,130
<i>RENT2</i>	10p14	8	28	20	p= 0,023
<i>NRAS</i>	1p13.2	12	32	20	p= 0,227
<i>RBI</i>	13q14.2	20	40	20	p= 0,301

\* test de cambios de McNemar con corrección de Yates

Tabla XXXIII. Incremento de ganancias génicas entre cada tumor primario metastático y su correspondiente metástasis ganglionar (n= 25).

Gen	Cromosoma	T. primario N+ (%)	Metástasis ganglionar (%)	Incremento (%)	p*
<i>CDKN2D</i>	19p13	0	32	32	p= 0,013
<i>N33</i>	8p22	0	28	28	p= 0,023
<i>TP53</i> exón 8	17p13	0	24	24	p= 0,041
<i>STK11</i>	19p13.3	12	32	20	p= 0,227

\* test de cambios de McNemar con corrección de Yates

#### VIII-4.3. Correlación de las alteraciones génicas de los tumores primarios con los datos clínico-patológicos y citométricos

Las alteraciones génicas de los 56 tumores primarios se correlacionaron una a una con los datos clínico-patológicos, no teniendo significación estadística la edad, el grado de diferenciación histológico y la localización tumoral.

La variable **estadificación** para estadios avanzados (III y IV) se asoció con pérdidas en los genes *N33* y *TP53* (exón 9) y ganancias en *CCND1* y *EMS1*, estos últimos en la región cromosómica 11q13. Todas estas correlaciones referentes a la estadificación fueron estadísticamente significativas (Tabla XXXIV). También se asoció el estadio avanzado con pérdidas de los genes *CASP6*, *CTSB*, *CDH2*, y *STK11* y ganancias en *PTP4A3* y *RECQL4*, pero sin alcanzar significación estadística.

Tabla XXXIV. Correlación entre el estadio y las alteraciones génicas en los 56 tumores primarios.

Gen	Cromosoma	Estadio precoz (I-II) (n= 22)		Estadio avanzado (III-IV) (n= 34)		p*
		Pérdida Casos (%)	Ganancia Casos (%)	Pérdida Casos (%)	Ganancia Casos (%)	
<i>N33</i>	8p22	4 (7)		18 (32)		0,009
<i>TP53</i> exón 9	17p13	1 (2)		8 (14)		0,007
<i>CCND1</i>	11q13		8 (14)		23 (41)	0,021
<i>EMS1</i>	11q13		7 (13)		23 (41)	0,009

\* estadístico exacto de Fisher

La variable **ganglios linfáticos** metastáticos (N+) se correlacionó con pérdidas en los genes *N33*, *TP53* (exones 8 y 9) y *STK11*, de forma estadísticamente significativa,

mientras que pérdidas en *LMNA* y ganancias en *TP53* (exón 10) y *CDKN2D* se asociaron de forma estadísticamente significativamente con su ausencia (ganglios N<sub>0</sub>) (Tabla XXXV).

Tabla XXXV. Correlación entre la presencia o ausencia de metástasis ganglionares y las alteraciones génicas en los 56 tumores primarios.

Gen	Cromosoma	Tumores primarios N+ (n= 26)		Tumores primarios N <sub>0</sub> (n= 30)		p*
		Pérdida Casos (%)	Ganancia Casos (%)	Pérdida Casos (%)	Ganancia Casos (%)	
<i>N33</i>	8p22	14 (25)		8 (14)		0,035
<i>TP53</i> (exón 8)	17p13	7 (13)		2 (4)		0,044
<i>TP53</i> (exón 9)	17p13	8 (14)		1 (2)		0,007
<i>STK11</i>	19p13.3	6 (11)		1 (2)		0,035
<i>LMNA</i>	1q21.2	0 (0)		7 (13)		0,009
<i>TP53</i> (exón 10)	17p13		5 (9)		11 (20)	0,003
<i>CDKN2D</i>	19p13		1 (2)		12 (21)	0,001

\* estadístico exacto de Fisher

La **supervivencia** se correlacionó con la pérdida del gen *N33* de forma estadísticamente significativa (Figura 25). También se observó relación de la supervivencia con la pérdida del gen *MLH1* (334pb) y la ganancia de *EMS1*, aunque estos últimos no fueron estadísticamente significativos (Figuras 26 y 27).

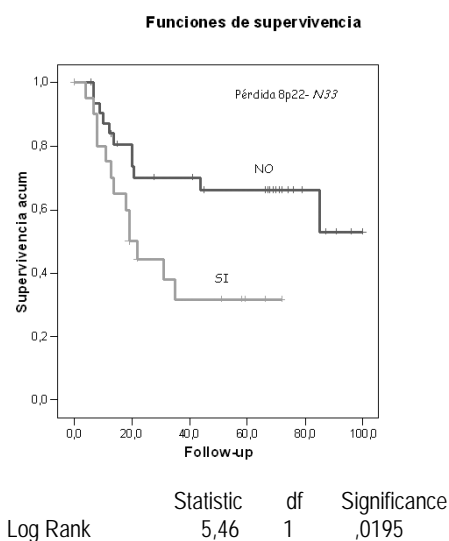


Figura 25. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para la pérdida del gen *N33*.

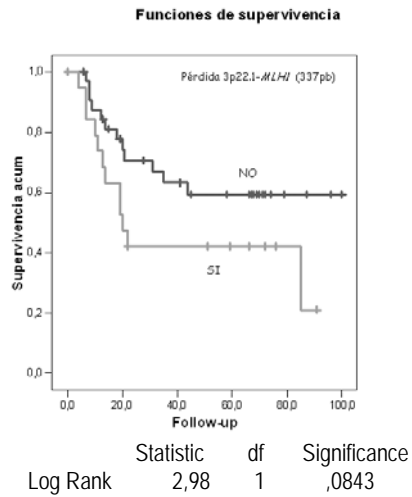


Figura 26. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para la pérdida del gen *MLH1* (334 pb).

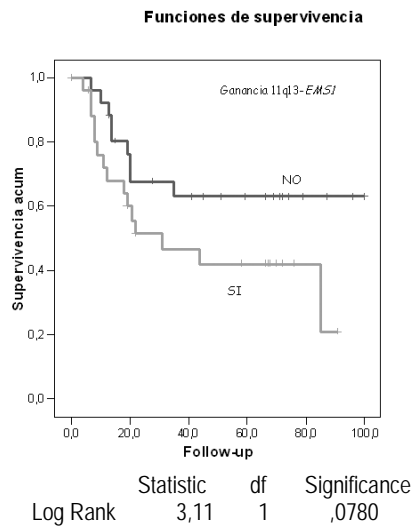


Figura 27. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para la ganancia del gen *EMS1*.

En cuanto a los datos citométricos observamos que el contenido de ADN aneuploide se correlacionó de forma significativa con la pérdida del gen *TP53* (exón 8). También se asoció con las pérdidas de *MLH1* (154 pb) y *CDKN2A* y con las ganancias de

*CCND1* y *EMS1*, aunque sin significación estadística (Tabla XXXVI). La fase S no mostró correlación estadística con ninguna de las alteraciones génicas encontradas.

Tabla XXXVI. Correlación entre las alteraciones génicas y el contenido de ADN en los tumores primarios (n=48).

Gen	Cromosoma	Diploide (n= 18)		Aneuploide (n= 30)		p*
		Pérdida Casos (%)	Ganancia Casos (%)	Pérdida Casos (%)	Ganancia Casos (%)	
<i>TP53</i> (exón 8)	17p13	0 (0)		8 (17)		0,016
<i>CDKN2A</i>	9p21	13 (27)		22 (46)		0,594
<i>MLH1</i> (154pb)	3p22.1	12 (25)		20 (42)		0,627
<i>CCND1</i>	11q13		10 (21)		18 (38)	0,498
<i>EMS1</i>	11q13		10 (21)		16 (33)	0,560

\* estadístico exacto de Fisher

En la tabla XXXVII se muestran las correlaciones entre las alteraciones génicas y el contenido de ADN de las metástasis ganglionares. Ninguna fue estadísticamente significativa.

Tabla XXXVII. Correlación entre las alteraciones génicas y el contenido de ADN para las metástasis ganglionares (n=11).

Gen	Cromosoma	Diploide (n= 3)		Aneuploide (n= 8)		p*
		Pérdida Casos (%)	Ganancia Casos (%)	Pérdida Casos (%)	Ganancia Casos (%)	
<i>CTNNB1</i>	3p22	3 (27)		7 (64)		0,727
<i>CDKN2A</i>	9p21	2 (18)		6 (55)		0,661
<i>PTP4A3</i>	8q24.3		3 (27)		5 (45)	0,339
<i>CCND1</i>	11q13		3 (27)		6 (55)	0,509
<i>EMS1</i>	11q13		1 (9)		7 (64)	0,152

\* estadístico exacto de Fisher

#### VIII-4.4. Comparación de las alteraciones cromosómicas y génicas

La CGH y la MLPA son técnicas que estudian el genoma de forma distinta, aunque complementaria y, por tanto, no es posible establecer una correlación estadística de las variables cromosómicas y génicas obtenidas en nuestro estudio para los CLF. Las alteraciones detectadas por CGH hacen referencia a todos los cromosomas al ser una

técnica global de "screening", mientras que la MLPA se orienta a las alteraciones de 42 genes determinados, y se trata de una prueba más selectiva.

No obstante, hemos comparado sobre el cariograma la localización de las alteraciones cromosómicas y génicas detectadas (Figura 28). En las tablas XXXVIII, XXXIX y XL destacamos también su grado de conformidad.

Tabla XXXVIII. Localización de las ganancias cromosómicas (CGH) y génicas (MLPA).

CGH (Región cromosómica)	%	MLPA (genes)	%	Conformidad*
3q25-27	86	No	-	
7q21-31	68	No	-	
8q11-qter	61	<i>RECQL4</i>	48	p= 0.003
		<i>PTP4A3</i>	43	p= 0.094
5p12-14	54	No	-	
11q11-13	50	<i>CCND1</i>	55	p= 0.004
		<i>EMS1</i>	54	p= 0.008
2q24-32	43	<i>TANK</i>	13	p= 0.363
12p11-12	43	No	-	
17q11-23	41	<i>ERBB2</i>	23	p= 0.455
6q12-15	38	No	-	
4q12-13	36	No	-	
18p11-pter	36	No	-	
1q21-24	20	<i>LMNA</i>	36	p= 0.452
10p	16	<i>RENT2</i>	30	p= 0.060

\* prueba T

Tabla XXXIX. Localización de las amplificaciones cromosómicas (CGH) y las ganancias génicas (MLPA).

CGH (Región cromosómica)	%	MLPA (genes)	%	Conformidad*
3q26-qter	35	No	-	
11q13	13	<i>CCND1</i>	55	p= 0.130
		<i>EMS1</i>	54	p= 0.094
11q22	9	No	-	
3q12-13	9	No	-	
18p11.3	9	No	-	
18q11.2	9	<i>CDH2</i>	4	p= 0.568
8q24.3	5	<i>RECQL4</i>	48	p= 0.219
		<i>PTP4A3</i>	43	p= 0.093
1p31	4	No	-	
2q32-33	4	No	-	
4q11-13	4	No	-	
5p11-14	4	No	-	
8p11	4	No	-	

\* prueba T



Tabla XL. Localización de las pérdidas cromosómicas (CGH) y génicas (MLPA).

CGH (Región cromosómica)	%	MLPA (genes)	%	Conformidad*
3p13-24	79	<i>MLH1</i> (154 pb)	64	p= 0.067
		<i>MLH1</i> (337 pb)	39	p= 0.067
		<i>CTNNB1</i>	45	p= 0.111
11q23-25	45	<i>IGSF4</i>	50	p= 0.007
		<i>IL18</i>	46	p= 0.000
4p15-16	38	No	-	
18q21-23	38	<i>BCL2</i>	32	P= 0.000
5q31-35	36	No	-	
8p21-22	34	<i>N33</i>	39	p= 0.000
21q22	34	No	-	
17p12-13	32	<i>TP53</i> exón 8	16	p= 0.310
		<i>TP53</i> exón 9	16	p=0.607
		<i>TP53</i> exón 10	29	p=0.069
		<i>TP53</i> exón 11	11	p=0.077
4q31-34	30	No	-	
9p21-23	30	<i>CDKN2A</i>	75	p=0.259
13q11-14	16	<i>DLEU1</i>	36	p= 0.020
		<i>BRCA2</i>	27	p= 0.029
		<i>RB1</i>	27	p= 0.264
18q11	21	<i>CDH2</i>	34	p= 0.084
4q26	23	<i>IL2</i>	32	p= 0.485
4q25	23	<i>CASP6</i>	52	p= 0.162

\* prueba T

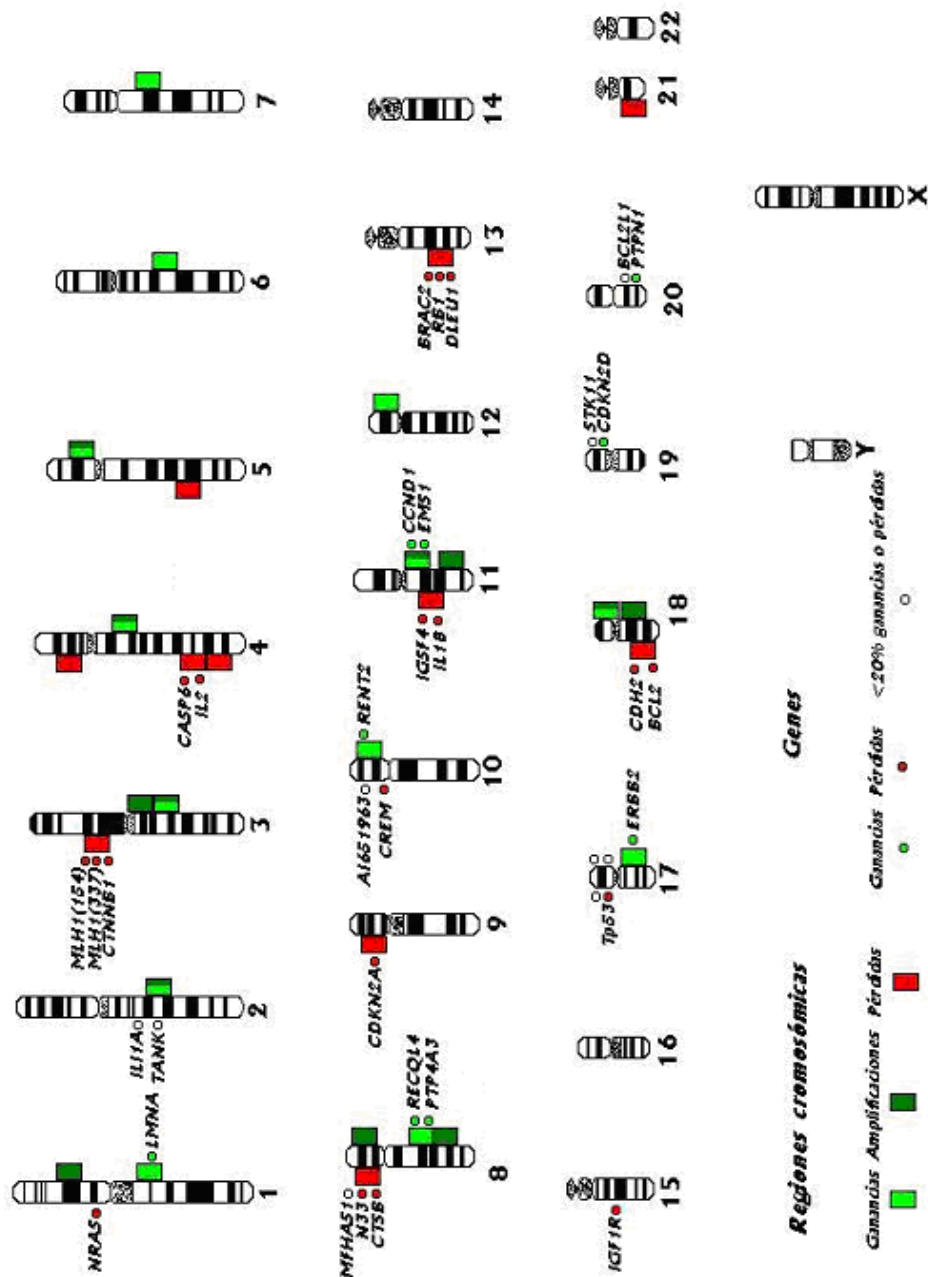


Figura 28. Localización de las alteraciones cromosómicas y génicas detectadas en los 56 tumores primarios estudiados.

## **IX-Discusión**

## **IX-Discusión**

### **IX-1. Datos clínico-patológicos**

Las variables clínico-patológicas de los 56 pacientes estudiados concuerdan, en general, con los rasgos descritos en series más amplias de CLF. Así, el sexo (todos varones), la edad media (63 años), la localización predominante en la laringe supraglótica y el alto porcentaje de tumores faríngeos que hemos encontrado, es similar a lo observado habitualmente en nuestro medio (Tabla XI)<sup>1,2,4</sup>. El consumo de tabaco y alcohol es un hecho habitual en nuestra serie, como también se ha descrito en la literatura, aunque con la peculiaridad de tener como factor de riesgo añadido el alto porcentaje de trabajadores en minería y metalurgia, actividad laboral predominante hasta hace unos años en nuestra comunidad<sup>8,9</sup>.

El estadio avanzado (61%), sobre todo en los tumores faríngeos, el grado histológico moderadamente diferenciado (50%) y el predominio de formas poco diferenciadas en faringe, son otros de los rasgos publicados, que nosotros hemos corroborado (Tabla XII)<sup>3,5</sup>. La evolución de la enfermedad es mejor para los tumores laríngeos (59%) que para los faríngeos (23%), hecho que se correlaciona con el estadio más avanzado y el mayor número de metástasis ganglionares (64%) que presentan estos últimos (Tablas XII y XIII). Los datos de supervivencia y el número de recidivas, segundos primarios y metástasis a distancia (Tabla XIII y figuras 11 y 12) también son concordantes con lo publicado<sup>20,96,97</sup>. Tan sólo indicar la baja incidencia de segundos tumores primarios en la localización supraglótica, que es para otros autores la que más los presenta, aunque nuestro limitado número de casos no permite establecer conclusiones a este respecto (Tabla XIII)<sup>6,7</sup>.

Por todo lo expuesto consideramos que nuestra serie es representativa de los CLF, respondiendo las localizaciones tumorales que la integran a las características clínicas que deberíamos esperar.

### **IX-2. Datos citométricos**

En nuestra serie de pacientes predominan los tumores aneuploides (63%) y la fase S baja (63%) (Tabla XIV). En las metástasis ganglionares estudiadas aumentó la aneuploidía (73%) y la fase S alta (46%) (Tabla XV). Estas tendencias han sido constatadas y descritas en los CECC, aunque existe gran disparidad en los resultados publicados<sup>15,98,99,100</sup>. Son de destacar algunos estudios previos de nuestro grupo que, combinando ploidía y fase S, definen un perfil cinético y un patrón metastático asociados

a la supervivencia. Así, los tumores diploides y con fase S baja tendrían mayor supervivencia y menor número de metástasis, por lo que, salvo otro criterio, en ellos no estaría indicada la radioterapia postquirúrgica<sup>65,66</sup>. En relación a esta modalidad de tratamiento otros autores consideran a los tumores de cuerda vocal aneuploides y con fase S elevada más radiosensibles, aunque sin relación significativa con la supervivencia<sup>101,102,103</sup>.

En nuestra serie esto resulta difícil de demostrar al tratarse de tumores con localizaciones más dispares y estadios tumorales más avanzados, donde prima el tratamiento quirúrgico y la radioterapia es complementaria.

No hemos encontrado ninguna correlación entre las variables citométricas y los datos clínico-patológicos estudiados, estando este hecho en discrepancia con lo publicado en relación a que la combinación de aneuploidía y fase S alta implicaría mayor riesgo de metástasis ganglionares y menor supervivencia<sup>104,105</sup>.

### **IX-3. Datos cromosómicos**

Las alteraciones cromosómicas no compensadas son el tipo de inestabilidad genética más frecuente encontrada en tumores sólidos<sup>10,21,25,36</sup>. La CGH es una técnica de "screening" con la que podemos determinar las alteraciones que ocurren en todo el genoma y ha sido aplicada en un gran número de tumores, incluyendo los CECC<sup>71,72,73,74,75,76</sup>.

En nuestro estudio, el número de alteraciones cromosómicas fue muy alto (19,5 por caso), predominando las ganancias sobre las pérdidas. Las más frecuentes se localizan en el cromosoma 3, el cual es típico de sufrir alteraciones en los carcinomas de células escamosas, con ganancia del brazo q y pérdida del brazo p. Esta alteración ha sido también descrita por otros autores (Figura 14)<sup>51,106,107,108</sup>.

Las **ganancias** cromosómicas más frecuentes ocurren en regiones cromosómicas concretas (3q25-27, 7q21-23, 8q11-qter, etc) (Tabla XVI), aunque también podemos observar alteraciones que afectan a cromosomas enteros (20, 22, 17, etc) o brazos cromosómicos completos (3q, 8q, 5q, 18p, 17q, etc) (Figura 14). En estas regiones cromosómicas se han descrito diversos oncogenes como el *c-myc* (8q24), *c-ErbB2* (17q12), *PIK3CA* (3q26), *CCND1* y *EMS1* (11q13), *hTR* (3q26-27) y *hTERT* (5p15), estos dos últimos relacionados con la actividad telomerasa y la inmortalización celular<sup>21,27,58</sup>. Sin embargo, para otras regiones aún se desconocen los posibles oncogenes implicados.

Las **amplificaciones** fueron detectadas en el 62,5% de los casos de nuestra serie, destacando las regiones 3q26-qter, 3q12-13, 11q13, 8q24.3 y 11q22 que ya habían

sido descritas en estudios previos<sup>61,106,107</sup>. Sin embargo, las amplificaciones en 1p31, 4q11-13, 5p11-14, 8p11, 13q33-34, 18p11.3, 18q11.2 y 22q13 no habían sido nunca asociadas a CLF hasta nuestro estudio (Tabla XVII). En algunas de estas regiones amplificadas se encuentran oncogenes conocidos como *CCND1* (11q13) encargado de regular el ciclo celular y la proliferación y *c-MYC* (8q23-24) relacionado con la apoptosis<sup>56,109,110</sup>. Muchas de estas amplificaciones se encuentran en regiones con genes que codifican factores de crecimiento de fibroblastos (11q13, 3q28, 13q34) y sus receptores (8p11), así como receptores de factores de crecimiento epidérmico (1p31, 7p11-12), factores de crecimiento endotelial (4q12-13, 6p12, 22q13) y hepatocítico (7q21) (Tabla XVII y figura 14)<sup>52,111,112</sup>. Sin embargo, en algunas de las nuevas amplificaciones encontradas en nuestro estudio, como en 5p11 y 18q11, no se han descrito aún genes implicados en el CLF, justificando una investigación más detallada. Así, podemos sugerir que las proteínas asociadas a estos posibles genes estimularían la proliferación celular al actuar como receptores o factores de crecimiento, induciendo la angiogénesis y la formación de estroma. Por tanto, todos estos factores serían importantes en la progresión de los CECC hacia estadios avanzados y procesos metastáticos.

Entre las **pérdidas** detectadas en nuestro estudio destacan las localizadas en 3p y 11q23-25 (Tabla XVIII), como también han señalado otros autores<sup>47,79,108</sup>. Las pérdidas en 3p y 9p han sido descritas como cambios precoces que afectan a lesiones preinvasivas con displasia, dentro del modelo de progresión de los CECC, por medio de técnicas de CGH<sup>106,113</sup>, FISH<sup>47</sup> y LOH<sup>46,80</sup>. El cambio en 9p21 se ha asociado al gen supresor de tumores *CDKN2A* que codifica la proteína p16, asignándole un papel importante en el desarrollo tumoral. Sin embargo, aún no hay un claro candidato a gen implicado en 3p. Otras pérdidas destacables en nuestro estudio se localizaron en 11q23-25, 5q31-35 y 18q21-23 (Tabla XVIII). En estas regiones se han descrito varios candidatos a genes supresores de tumor como el *IGSF4* (11q23) asociado a carcinomas de pulmón, el *BCL2* (18q21.2) cuya mutación modifica el proceso normal de apoptosis en linfocitos B o el *DPC4* (18q21), también denominado *SMAD4*, relacionado con el factor de crecimiento tumoral-beta (TGFB) y candidato en el desarrollo tumoral en páncreas y colon<sup>114,115,116,117</sup>. Pero para la región 5q31-35 aún no se conoce el gen o genes candidatos.

La presencia de alteraciones de brazos completos nos indica la formación de **isocromosomas** y representan más de un tercio de todas las alteraciones descritas, siendo frecuentes en los cromosomas 3, 5, 8, 9, 17 y 18. La ganancia de un brazo y la pérdida del otro podría deberse a la exposición continua y prolongada a agentes

mutagénicos y carcinogénicos, especialmente tabaco y alcohol, que han sido claramente asociados con este tipo de tumores<sup>118,119</sup>, aunque este punto no ha sido aún demostrado. La rotura a nivel de centrómero durante la mitosis conduce a translocaciones de un brazo cromosómico completo, resultando en su pérdida o ganancia (Figura 14). Este fenómeno no es exclusivo de los CECC, pero tiene una frecuencia más alta que en otros tumores sólidos y hematológicos<sup>82,120</sup>.

El patrón de ganancias, amplificaciones y pérdidas entre tumores primarios metastáticos y no metastáticos fue muy similar y únicamente la amplificación de 11q13 se asoció estadísticamente a los tumores metastáticos (Tablas XIX, XX, XXI).

La amplificación en 11q13 es la única alteración cromosómica que guarda relación con algunos datos clínico-patológicos. Así, se ha observado en estadios avanzados (estadio IV) y metástasis ganglionares (N+), de forma estadísticamente significativa (Tablas XXII y XXIII). No obstante, aunque estas variables guardan una estrecha correlación con la supervivencia, ésta no llega a ser estadísticamente significativa con esta amplificación (Figura 15). En el caso de la región 18p11.3 se observan las mismas tendencias, pero los valores no alcanzan significación estadística en ninguna de las correlaciones con los datos clínico-patológicos. Estos datos de nuestro estudio difieren con lo publicado por otros autores que sí encuentran relación entre el pronóstico y supervivencia con un buen número de alteraciones cromosómicas. Así, la amplificación 11q13 en estadios avanzados se ha asociado a peor supervivencia<sup>55,121,122,123</sup>, aunque esta relación no ha sido siempre confirmada<sup>79,124</sup>. También se ha descrito una relación de la supervivencia con las pérdidas cromosómicas 3p, 4q y con ganancias en 9q, detectadas por CGH, o por LOH en 3p24-26, 3p13, 9p21, 8p23 y 18q21<sup>80,113,117,125,126,127,128</sup>.

Sin embargo, nosotros tenemos que objetar que las pérdidas en 3p y 9p son eventos precoces en la progresión tumoral y establecerían el paso de lesión intraepitelial a carcinoma invasivo, siendo menos importante en la progresión del tumor invasivo y por tanto en la supervivencia. Otros autores si han visto que las pérdidas en 3p, 5q, 18q, 10q y 11p son más frecuentes en los tumores metastáticos, pero en nuestra serie las alteraciones cromosómicas son similares en los tumores metastáticos y no metastáticos, repartiéndose de forma similar en los estadios clínicos (I-IV)<sup>129,130</sup>.

Es difícil encontrar una explicación a la falta de valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas detectadas. Una posibilidad es que en la progresión tumoral de los CECC, el paso de lesión preinvasiva (displasia) a tumor invasivo se acompañe de la

adquisición inmediata de múltiples cambios cromosómicos. En nuestro estudio, tanto los tumores en estadio I como en estadio IV presentan gran número de alteraciones cromosómicas apoyando la idea de que el CLF presenta un patrón cromosómico complejo que no difiere con el estadio clínico-patológico (Anexo II)<sup>49,131</sup>.

La correlación entre las alteraciones cromosómicas y los datos citométricos de ploidía y fase S no mostraron ninguna diferencia significativa. Este hecho podría explicarse por el alto número de ganancias y pérdidas cromosómicas que también presentan los tumores diploides, que al compensarse entre ellas, muestran finalmente un contenido de ADN diploide (Figura 16a y anexo III).

#### **IX-4. Datos génicos**

Se estudiaron los tumores primarios (n= 56) con sus metástasis ganglionares (n= 25) por medio de MLPA con 37 sondas seleccionadas para genes implicados en el CECC<sup>88</sup>.

El grupo completo de tumores primarios presentó un alto número de **pérdidas**, destacando los genes *CDKN2A* y *MLH1* (154 pb) localizados en las regiones 9p21 y 3p22 (Figura 17 y Tabla XXIV). Ambas regiones han sido descritas por LOH como zonas de alteración precoz en el desarrollo de CECC<sup>80,129</sup>. En nuestra serie, todos los CLF se encuentran en fase invasiva y es lógico que estos cambios acumulativos sean muy frecuentes. Entre las **ganancias** destacaron las de *CCND1* y *EMS1*, localizados ambos en la región cromosómica 11q13, así como *RECQL4* y *PTP4A3* en 8q24 (Figura 18 y Tabla XXIV). Todas estas alteraciones observadas por nosotros han sido también descritas por otros autores y están en consonancia con nuestros resultados de CGH (Tablas XVI y XVIII)<sup>47,49,113,131</sup>.

Si diferenciamos los tumores primarios en metastáticos y no metastáticos encontramos **pérdidas comunes** en *CDKN2A*, *MLH1* (154 y 337 pb), *CTNNB1*, *IGSF4* y *CASP6*, y **ganancias comunes** en *CCND1*, *EMS1*, *RECQL4*, *PTP4A3*, *LMNA* y *RENT2* (Figuras 19, 20, 21 y tabla XXV). Todos estos genes codifican proteínas que regulan la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis y la adhesión intercelular y del citoesqueleto, estando localizados en regiones cromosómicas alteradas frecuentemente en el CECC<sup>23,57,110, 132</sup>.

Más interesante fue establecer las **diferencias** entre los tumores primarios metastáticos (N+) y no metastáticos (N<sub>0</sub>), para identificar los genes implicados en el desarrollo de la capacidad metastática tumoral. De esta forma, las **pérdidas** en *N33*, *TP53* exón 8 y 9 y *STK11* fueron mayores en los tumores primarios metastáticos, de



forma estadísticamente significativa (Tabla XXIX). El gen *TP53* codifica la proteína p53, que es clave en el control del ciclo celular. Su alteración ha sido descrita en CECC y también en otros muchos tumores<sup>30,33,51</sup>. La pérdida de *N33* ha sido descrita en tumores metastáticos de próstata y la de *STK11* en pacientes con Síndrome de Peutz-Jeghers que presenta mayor riesgo de sufrir neoplasias. Ninguno de los dos genes había sido descrito hasta la fecha asociado al CLF<sup>133,134,135</sup>. Las **ganancias** presentaron un patrón muy similar en ambos grupos y, aunque se observó un incremento en los genes *EMS1* y *PTP4A3* asociado a los tumores primarios metastáticos, estos no tuvieron significación estadística (tabla XXX). Esta falta de significación puede deberse a que no son alteraciones nuevas sino que ya están presentes, con una frecuencia alta, en los tumores primarios no metastáticos.

En las metástasis ganglionares las alteraciones génicas más frecuentes fueron las **pérdidas** en *CTNNB1* y *CDKN2A*, y las **ganancias** en *CCND1*, *EMS1*, *PTP4A3* y *RECQL4* (figuras 22, 23 y 24 y tabla XXVI) que coinciden con los genes alterados en los tumores primarios, localizados en las regiones cromosómicas 3p22, 9q21, 11q13 y 8q24, que como ya hemos indicado coinciden con nuestro estudio de CGH (Tablas XVI y XVIII) y con los de otros autores<sup>50, 82,110</sup>.

Para determinar un patrón metastático de alteraciones génicas seleccionamos los cambios nuevos o los incrementos llamativos que se observan en las metástasis ganglionares. De este modo, entre el grupo completo de tumores primarios (n= 56) y las metástasis ganglionares (n= 25) destacaron las **pérdidas** de los genes *CTNNB1*, *RB1*, *MFHAS1*, *PTPN1*, *NRAS*, *LMNA*, *CDH2* y *RENT2* que tuvieron incrementos estadísticamente significativos en las metástasis ganglionares con respecto a los tumores primarios (Tabla XXVII). Sólo los genes *N33*, *STK11* y *IGSF4* tuvieron un incremento estadísticamente significativo en las **ganancias**. Aunque también *CCND1* y *PTP4A3* mostraron incremento de ganancias en las metástasis ganglionares, no fueron estadísticamente significativos (Tabla XXVIII).

Para estudiar las alteraciones génicas en el desarrollo de las metástasis ganglionares contamos con un grupo de pacientes de gran interés formado por el tumor primario metastático y su correspondiente metástasis ganglionar (n=25). Aunque se han realizado numerosos estudios que analizan los cambios entre tumores primarios metastáticos y no metastáticos, los estudios que comparan el tumor primario y la metástasis ganglionar en el mismo paciente son muy escasos<sup>129,136,137,138,139</sup>.

Se detectaron **pérdidas comunes** de los genes *CDKN2A* y *CTNNB1* y **ganancias comunes** de *EMS1* (Tabla XXXI), aunque únicamente la pérdida de *CDKN2A* fue estadísticamente significativa. El gen *CDKN2A* se localiza en la región cromosómica 9p21 y está asociado a cambios precoces de la progresión tumoral<sup>53,80</sup>. Este gen codifica la proteína p16, inhibidora de quinasas ciclina-dependientes, y cuya delección ha sido descrita como punto crítico en el desarrollo y progresión del CECC<sup>29,32,89</sup>. El gen *CTNNB1* localizado en 3p22 codifica la catenina beta-1, proteína de unión de las membranas epiteliales que permite la adhesión intercelular, la comunicación de señales con las células vecinas y el anclaje a la actina del citoesqueleto<sup>111,140,141,142</sup>. El gen *EMS1* codifica la cortactina, proteína del citoesqueleto que regula la migración celular. Su sobreexpresión incrementa la movilidad celular y la capacidad metastática<sup>42,143</sup>. Estos tres genes alterados se han descrito como eventos precoces en el modelo de progresión tumoral en CECC<sup>57,58,62</sup>. En nuestra serie, al tratarse de tumores avanzados, tiene sentido encontrar dichas alteraciones génicas con tan alta frecuencia.

Para conocer el patrón de alteraciones asociado a metástasis ganglionares fue preciso estudiar las **diferencias** entre cada metástasis ganglionar y el tumor primario que la originó. Entre las **pérdidas** destacaron los genes *CTNNB1*, *LMNA*, *MFHS1*, *IGF1R*, *RECQL4* y *RENT2*, todos ellos estadísticamente significativos (Tabla XXXII). La pérdida del gen *CTNNB1* presentó un incremento muy significativo entre la metástasis ganglionar y el tumor primario que la originó. El resto de los genes, con incrementos significativos aunque con bajos porcentajes de alteración, se localizaron en regiones cromosómicas con pérdidas ya descritas por nosotros (Tabla XVIII) o por otros autores<sup>50,107,110,131</sup>. Sólo en el caso del gen *LMNA* no hemos observado alteraciones en la región cromosómica donde se localiza (1q21).

Entre las **ganancias** más frecuentes, que presentaron significación estadística en las metástasis ganglionares con respecto a sus tumores primarios, destacaron los genes *CDKN2D*, *N33* y *TP53* exón 8 (Tabla XXXIII). La interpretación de estas ganancias resulta difícil de explicar. Los 3 genes han sido identificados como genes supresores y su alteración debería estar asociada a pérdidas y no a ganancias. El *N33*, localizado en la región cromosómica 8p22, codifica una proteína encontrada en tejidos de próstata, pulmón, hígado y colon<sup>144</sup>. Su delección se ha asociado a tumores de próstata metastáticos<sup>133,134</sup>. Nosotros también hemos observado pérdidas de este gen en los tumores primarios metastáticos y en las metástasis ganglionares, pero al comparar las metástasis ganglionares con el tumor primario que la originó fueron las ganancias las que mostraron un incremento significativo (Tablas XXV y XXVI). El *CDKN2D* es el gen

que codifica la proteína p19, que forma un complejo enzimático con quinasas ciclina-dependientes, regulando el ciclo celular. Su deficiente funcionamiento estaría relacionado con su pérdida, pero no con su ganancia, como nosotros hemos detectado. La pérdida de *TP53* se observa como un cambio más tardío en el proceso de progresión del CECC y de otros tumores<sup>24,30,97,145</sup>. Una posible explicación a esta discrepancia entre las ganancias encontradas en estos 3 genes asociadas a las metástasis ganglionares, en vez de las pérdidas esperadas, podría ser que en la región cromosómica donde se localizan los genes existan oncogenes que al alterarse modifican toda la región cromosómica y hace que estos genes supresores se detecten como ganancias en las metástasis ganglionares.

Ninguna de las alteraciones génicas de los tumores primarios mostró correlación estadísticamente significativa con las variables clínico-patológicas de localización tumoral y grado de diferenciación histológico. Por el contrario, la pérdida de *N33* y *TP53* exón 9 y las ganancias de *EMS1* y *CCND1* se correlacionaron de forma estadísticamente significativa con los estadios avanzados del tumor (Tabla XXXIV). Además, la pérdida de *N33*, *TP53* exones 9 y 8 y *STK11* se correlacionaron de forma significativa con la presencia de ganglios linfáticos positivos (Tabla XXXV).

Sólo la pérdida de *N33* se encontró correlacionada significativamente con una peor supervivencia (Figura 25), mientras que el resto de las pérdidas génicas no fueron estadísticamente significativas (Figuras 26 y 27). El gen *N33* ha sido asociado al desarrollo de metástasis en tumores de próstata y también la región cromosómica donde se localiza (8p21-23) ha sido correlacionada con una peor supervivencia para este tipo de tumores<sup>50,133</sup>. Podríamos concluir que *N33* también tiene importancia en el desarrollo de las metástasis ganglionares, que condicionarían una menor supervivencia en el CLF.

En relación con las alteraciones génicas de los tumores primarios y las variables citométricas, únicamente la pérdida de *TP53* exón 8 fue estadísticamente significativa (Tabla XXXVI). Como ya comentamos en la discusión de los datos cromosómicos, el elevado número de ganancias y pérdidas cromosómicas y génicas, tanto en tumores diploides como aneuploides, disminuye la posibilidad de encontrar las alteraciones asociadas a las variables citométricas descritas. Para las metástasis ganglionares, el reducido número de muestras con datos citométricos no permite realizar una correlación adecuada con las alteraciones génicas detectadas.

Nuestros resultados génicos obtenidos por MLPA son equiparables a los cromosómicos obtenidos por CGH, pero no podemos decir que una técnica sea mejor que la otra, aunque sí que son complementarias. La CGH es una técnica de "screening" de todo el genoma y detecta alteraciones en regiones cromosómicas de hasta un mínimo de 10 Mb, donde se localizan multitud de genes<sup>94 95</sup>. Con la MLPA observamos solamente alteraciones génicas que ocurren en zonas muy concretas de 60 pb, dentro de un gen<sup>88</sup>. Por esa razón los resultados de MLPA han sido analizados de forma independiente a los de CGH, sin establecer correlaciones entre ellos.

Las sondas utilizadas para MLPA están localizadas en regiones cromosómicas que han sido citadas en la bibliografía, pero no cubren todas las regiones alteradas en los CECC. En las tablas XXXVIII, XXXIX y XL se exponen las regiones cromosómicas con ganancias, amplificaciones y pérdidas más frecuentes y las sondas génicas empleadas. El conjunto de sondas "SALSA PO84", utilizado en este estudio, presenta un mayor número de genes supresores que de oncogenes. Por ello, muchas regiones cromosómicas con ganancias no se reflejan en los resultados obtenidos, como 3q, 5p y 18p, descritas en la bibliografía y asociadas a la progresión tumoral en el CECC<sup>115,132,146,147,148</sup>.

Para las regiones cromosómicas 3q25-27, 7q21-31, 5p12-14, 8q11-qter y 18p11-pter, detectadas en nuestro estudio, no se han desarrollado aún sondas sobre genes candidatos concretos y queda un vacío de información sobre el patrón génico del tumor primario y de su correspondiente metástasis ganglionar. Sin embargo, sabemos que en 3q26-qter se encuentra el gen *PIK3CA* que codifica la proteína PI3-K, asociada con la proliferación y migración celular en estadios iniciales del CECC<sup>60,149</sup>. También en 3q26-qter encontramos el gen *hTR* y en 5p15 el *hTERT*, que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa, asociada con la inmortalidad celular. En 18p se han identificado recientemente varios genes candidatos en el desarrollo del cáncer de esófago como *YES1*, *TYMS*, *HEC* y *TGIF*<sup>47</sup>. No obstante, para las otras regiones cromosómicas los genes candidatos están aún por identificar.

A modo de reflexión sobre el modelo teórico planteado en este estudio y como resumen final, previo a las conclusiones, cabría pensar que las células normales adquieren un fenotipo maligno debido a cambios en las funciones de proliferación y diferenciación celular, apoptosis, invasión e inmunidad. La alteración y sobreexpresión de determinadas proteínas provocaría un aumento de la inestabilidad genética, estimulando el desarrollo de más alteraciones génicas y cromosómicas<sup>23,32,36,53</sup>. Para algunos investigadores la capacidad del tumor para evolucionar hacia metástasis sería una adquisición tardía en la

progresión tumoral. Sin embargo, es posible que pueda estar presente ya en fases tempranas de la carcinogénesis, aunque su fenotipo metastático no se manifieste hasta fases avanzadas (Figura 7)<sup>42,43,44,51</sup>. Nuestros datos confirman la presencia de alteraciones génicas específicas en las metástasis ganglionares, a la vez que detectamos cambios comunes entre el tumor primario y su metástasis. Cabría pensar que el clon celular que origina las metástasis se desarrolla en el tumor primario junto a otros clones celulares con los que posee alteraciones comunes, pero también cambios genéticos específicos que le darían la capacidad para desplazarse hacia los ganglios linfáticos. Una vez allí, debido a los cambios comunes con el tumor primario, se produciría la invasión local de los ganglios linfáticos. En nuestro estudio encontramos como las alteraciones génicas en *CDKN2A*, *CTNNB1* y *EMSI* son comunes entre tumores primarios y metástasis ganglionares. Este hecho confirma el desarrollo común de clones celulares con las mismas alteraciones. Sin embargo, los cambios asociados a los genes *N33*, *TP53* exón 9 y *CDKN2D* se han observado en las metástasis ganglionares y podrían ser la causa de que las células tumorales adquieran capacidad para diseminarse por vía linfática.



## X. Conclusiones





## X. Conclusiones

- 1- Los pacientes estudiados tenían unas características clínico-patológicas y citométricas similares a las de los CLF, correlacionando, de forma significativa, las metástasis ganglionares y los estadios avanzados con la supervivencia.
- 2- Todos los tumores primarios presentaron gran número de alteraciones cromosómicas, destacando las ganancias en las regiones 3q25-27, 7q21-31, 8q11-qter, 5p12-14, 11q11-13, 2q24-32, 12p11-12, 17q11-23, 6q12-15, 4q12-13 y 18p11-pter; las amplificaciones en 3q26-qter, 11q13, 11q22, 3q12-13, 8q24.3, 2q32-33, 18p11.3, 18q11.2, 1p31, 4q11-13, 5p11-14, 8p11, 13q33-34, 22q13, las 8 últimas descritas por primera vez; y las pérdidas en 3p13-24, 11q23-25, 4p15-16, 18q21-23, 5q31-35, 8p21-22, 21q22, 17p12-13, 4q31-34 y 9p21-23.
- 3- De todas las alteraciones cromosómicas sólo la amplificación en 11q13 se asoció de forma significativa con el estadio tumoral avanzado y las metástasis ganglionares, aunque no con la supervivencia.
- 4- Los tumores primarios de nuestra serie presentaron como alteraciones génicas más frecuentes las pérdidas en *CDKN2A* y *MLH1* (154pb) y las ganancias en *CCND1* y *EMS1*, mientras que en las metástasis ganglionares lo fueron las pérdidas en *CTNNB1* y *CDKN2A* y las ganancias en *CCND1* y *EMS1*.
- 5- Los tumores primarios metastáticos presentaron un patrón génico diferente de los no metastáticos con pérdidas en los genes *TP53* (exones 8 y 9), *N33* y *STK11*.
- 6- Las metástasis ganglionares presentaron un patrón génico diferente del grupo completo de los tumores primarios con pérdidas en *CTNNB1*, *RB1*, *MFHAS1*, *PTPN1*, *NRAS*, *LMNA*, *CDH2* y *RENT2* y ganancias en *STK11*, *IGSF4* y *N33*.
- 7- En los pacientes con tumor primario metastático y su correspondiente metástasis ganglionar la pérdida de *CDKN2A* y la ganancia de *EMS1* fueron alteraciones génicas comunes, siendo el patrón génico metastático el de las pérdidas en *CTNNB1*, *LMNA*, *MFHAS1*, *IGF1R*, *RECQL4* y *RENT2* y las ganancias en *CDKN2D*, *N33* y *TP53* (exón 8).
- 8- Los tumores con estadios avanzados se correlacionaron con pérdidas génicas en *N33* y *TP53* (exón 9) y ganancias en *EMS1* y *CCND1*, mientras que los ganglios metastáticos lo hicieron con pérdidas en *N33*, *TP53* (exones 8 y 9) y *STK11*. La supervivencia sólo se correlacionó con la pérdida en *N33*.
- 9- Por último, la carencia de sondas génicas adecuadas sobre algunas regiones cromosómicas en ganancia o amplificación (3q12-13, 3q26-qter, 5p11-14 y 18p11-pter) resta información sobre otros posibles genes asociados al patrón metastático.



## **XI. Perspectivas futuras**

## XI. Perspectivas futuras

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral sigue la línea de investigación de nuestro grupo, iniciada hace más de 20 años, en el estudio de los CECC. Durante este tiempo se han realizado importantes avances en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento, pero la supervivencia casi no se ha modificado debido, entre otras posibles explicaciones, a que la enfermedad se diagnostica en estadios avanzados<sup>43,17</sup>. Además, el consumo de tabaco y alcohol no ha disminuido, a pesar de ser factores reconocidos de alto riesgo en los CLF, siendo su abstinencia, una de las medidas de prevención más eficaces.

En el grupo de pacientes estudiados hemos encontrado múltiples alteraciones cromosómicas y génicas, algunas ya descritas, pero otras nuevas, que se han asociado a las diferentes etapas del desarrollo del tumor, principalmente en la fase hacia metástasis ganglionar. Estas alteraciones han definido un patrón genético muy complejo por la cantidad de alteraciones detectadas (Figura 14). El modelo de progresión tumoral se basa en la acumulación de alteraciones desde las lesiones preinvasivas hasta el carcinoma invasivo metastático<sup>23,51,62</sup>. En nuestro trabajo todos los tumores son invasivos y un buen número metastáticos, de ahí la gran cantidad de alteraciones encontradas. La definición de un patrón metastático se está utilizando en la actualidad para el pronóstico del cáncer de mama, donde las metástasis juegan un papel decisivo en la supervivencia, pero en el CECC aún no ha tenido una aplicación clínica<sup>150</sup>. Una línea de investigación futura, muy prometedora, que permitiría esclarecer este entramado de alteraciones en el modelo de progresión tumoral, sería el estudio genético de las formas preinvasivas, incluso en sujetos sanos pero expuestos a factores de riesgo, como el tabaco, donde cabría esperar menos cambios, aunque decisivos para identificar mejor los genes implicados en el inicio y propagación del proceso tumoral y en el desarrollo de segundas neoplasias en la VAS<sup>10</sup>.

En este sentido, la técnica de MLPA realiza un estudio génico de calidad utilizando muy poca muestra de tejido, que en las lesiones precoces, es un factor crítico y limitante en el uso de otras técnicas que necesitan más material, como la CGH<sup>88,89,90</sup>. Sin embargo, la MLPA tiene como importante desventaja el número limitado de genes que puede estudiar. Sería necesario diseñar grupos de sondas más específicas que cubran con mayor precisión los genes que se encuentran en las regiones cromosómicas alteradas descritas previamente por CGH.

Otro aspecto interesante, que ha sido descrito en nuestro estudio cromosómico, pero que deberíamos profundizar con otros procedimientos, es el de la rotura

centromérica y la formación de isocromosomas y su implicación en la progresión tumoral y en el pronóstico<sup>82,75</sup>.

La definición de un perfil genético también dirigirá y será la llave de futuros estudios sobre la expresión proteica de los genes implicados en el desarrollo del CECC, aunque, con la lección aprendida, daríamos prioridad al estudio de las lesiones preinvasivas.

Todos estos futuros esfuerzos contribuirán al desarrollo de una terapia molecular aplicada a mejorar la supervivencia de nuestros pacientes.



## **XII. Bibliografía**

## XII. Bibliografía

---

- <sup>1</sup> Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Ki Hong W. Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1993; 328: 184-194
- <sup>2</sup> Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann. Oncol.*, 2005; 16:481-488.
- <sup>3</sup> Quer Agustí M, Burgués Vila. Evaluación clínica y evolución de los tumores de laringe. En: Tratado de otorrinolaringología y cirugía de Cabeza y Cuello. Ed: Suárez C. Proyectos Médicos, Madrid, 1999; 3010-3024.
- <sup>4</sup> Atlas de incidencia de cáncer en Asturias 1982-1993: mapas municipales y evolución temporal. Consejería de Salud y Servicios Sanitarios. Principado de Asturias 2000.
- <sup>5</sup> Ridge JA, Glisson BS, Horwitz EM, Meyers MO. Head and neck tumors. En: *Cancer management: a multidisciplinary approach*. Edited by Pazdur R, Coia LR, Hosking WJ, Wagman LD. The Oncology Group. New York, 2003; 39-85.
- <sup>6</sup> Fergie N, Muty G. Second primary neoplasms in patients with laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2000;110: 1586-1587.
- <sup>7</sup> Sood S, Bradley PJ, Quraishi MS. Second primary tumors in squamous cell carcinoma of head and neck-incidence, site, location and prevention. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 2000; 8: 87-90.
- <sup>8</sup> Copper P, Jovanovic A, Nauta JJP, Braakchuis BJM, De Vries N, Von der Waal I, Srow G. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ach. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1995; 121: 157-160.
- <sup>9</sup> Morales M, Llopis A, Moreno E, Martínez M.I, Vitoria I, Gibert V. Hábitos tóxicos en relación con el cáncer de laringe. *Acta Otorrinolaringol Esp.*, 1997; 44: 45-50.
- <sup>10</sup> Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Proliferating early head and neck cancer. *Nature Rev. Cancer*, 2005; 5: 127-135.
- <sup>11</sup> Lewin JS, Gillenwater AM, Garret JD, Bishop-Leone JK, Nguyen DD, Callender DL, Ayers GD, Myers JN. Characterization of laryngopharyngeal reflux in patients with premalignant or early carcinomas of the larynx. *Cancer*, 2003; 97:1010-14.
- <sup>12</sup> Álvarez I, Sánchez Lazo P, Ramos González S, Rodrigo Tapia JP, Llorente Pendás JL, Suárez Nieto C. Detección simultánea del HPV-6b y 16 en el cáncer faringolaríngeo. *Acta Otorrinolaring. Esp.*, 1996; 47: 93-96.
- <sup>13</sup> Maier H, De Vries N, Snow G.B. Occupational factors in the aetiology of head and neck cancer. *Clin. Otorrinolaringol.*, 1991; 16: 406-412.
- <sup>14</sup> Schaatz SP, Zhang ZF, Spitz MS, Sun M, Hsu TC. Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity. *Laryngoscope*, 1997; 107: 765-781.
- <sup>15</sup> Rua S, Comino A, Fruttero A, Cera G, Semeria C, Lanzillotta L, Boffetta P. Relationship between histologic features, DNA flow cytometry, and clinical behavior of squamous cell carcinomas of the larynx. *Cancer*, 1991; 67: 141-149.
- <sup>16</sup> Sobin LH. TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin. Surg. Oncol.*, 2003; 21: 19-22.
- <sup>17</sup> Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br. J. Plast. Surg.*, 2004; 57: 595-602.
- <sup>18</sup> Gilroy JS, Morris CG, Amdur RJ, Mendenhall WM. Impact of young age on prognosis for head and neck cancer: a matched-pair analysis. *Head Neck*, 2005; 27: 269-273.
- <sup>19</sup> Magnano M, Bussi M, De Stefani A, Milan F, Leida W, Ferrero V, Gervasio F, Ragoma R, Gabriele P, Valente G, Cortesina G. Prognostic factors for head and neck tumor recurrence. *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, 1995; 115: 833-838.



- 
- <sup>20</sup> Clark J, Li W, Smith G, Shannon K, Clifford A, McNeil E, Gao K, Jackson M, Tin MM, O'Brien C. Outcome of treatment for advanced cervical metastatic squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2005; 27: 87-94.
- <sup>21</sup> Hanahan D, Wienberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100: 57-70.
- <sup>22</sup> Shadan FF, Kiziol J. Induced genome instability as a potential screening test for cancer susceptibility? *Med. Hypotheses*, 2000; 55: 69-72.
- <sup>23</sup> Almandori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Rigante M, Artuso A, Maurizi M. Multistep laryngeal carcinogenesis helps our understanding of the field cancerisation phenomenon: a review. *Eur. J. Cancer*, 2004; 40: 2383-2388.
- <sup>24</sup> Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*, 1994, 266: 1821-1828.
- <sup>25</sup> Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 1996, 27:342-249.
- <sup>26</sup> Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguria A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 2005; 436:636-637.
- <sup>27</sup> Steenbergen RD, Walboomers JM, Meijer CJ, van der Raaij-Helmer EM, Parker JN, Chow LT, Broker TR, Snijders PJ. Transition of human papillomavirus type 16 and 18 transfected human foreskin keratinocytes towards immortality: activation of telomerase and allele losses at 3p, 10p, 11q and/or 18q. *Oncogene*, 1996; 19: 1249-1257.
- <sup>28</sup> Liu B, Wang J, Chan KM, Tjia WM, Deng W, Guan X, Huang JD, Li KM, Chau PY, Chen DJ, Pei D, Pendas AM, Cadinanos J, Lopez-Otin C, Tse HF, Hutchison C, Chen J, Cao Y, Cheah KS, Tryggvason K, Zhou Z. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat. Med.*, 2005; 11: 780-785.
- <sup>29</sup> Smigiel R, Sasiadek M, Krecicki T, Ramsey D, Jagielski J, Blin N. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2<sup>a</sup> (*CDKN2A*) gene in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mol. Carcinog.*, 2004; 39: 147-154.
- <sup>30</sup> Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, Zabalza I, Alfaro J, Rezola R, Moreno E, Elorriaga J, Alonso I, Baroja A, de la Hoz C. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*, 2003; 113: 167-172.
- <sup>31</sup> Shin DM, Charuruks N, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN. p53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001; 10: 603-609.
- <sup>32</sup> Krecicki T, Smigiel R, Fraczek M, Kowalczyk M, Sasiadek MM. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue. *J. Laryngol. Otol.*, 2004; 118: 676-680.
- <sup>33</sup> Haruki N, Harano T, Masuda A, Kiyono T, Takahashi T, Tatematsu Y, Shimizu S, Mitsudomi T, Konishi H, Osada H, Fujuu Y, Takahashi T. Persistent increase in chromosome instability in lung cancer. Possible indirect involvement of p53 inactivation. *Am. J. Pathol.*, 2001; 159: 1345-1352.
- <sup>34</sup> Jin YS, Mertens F. Chromosome abnormalities in oral squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cancer Oral. Oncol.*, 1993; 29B: 257-263.
- <sup>35</sup> Veltman JA, Bot FJ, Huynen FC, Ramaekers FC, Manni JJ, Hopman AH. Chromosome instability as an indicator of malignant progression in laryngeal mucosa. *J. Clin. Oncol.*, 2000; 18: 1644-1651.
- <sup>36</sup> Baak JPA, Path FRC, Hermsen MAJA, Meijer G, Schmidt J, Janssen EAM. Genomics and proteomics in cancer. *Eur J Cancer*, 2003; 39: 1199-1215.
- <sup>37</sup> Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Ann. Rev. Biochem.*, 1993;62: 623-651.

- 
- <sup>38</sup> de Jong KP, Gouw AS, Peeters PM, Bulthuis M, Menkema L, Porte RJ, Slooff MJ, van Goor H, van den Berg A. P53 mutation analysis of colorectal liver metastases: relation to actual survival, angiogenic status, and p53 overexpression. *Clin Cancer Res.*, 2005; 11: 4067-73.
- <sup>39</sup> Haber DA. The *BRCA2-EMSY* connection: implications for breast and ovarian tumorigenesis. *Cell*, 2003; 115: 507-508.
- <sup>40</sup> Eshleman JR, Markowitz SD. Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, 1996; 5: 1489-1494.
- <sup>41</sup> Boland CR, Ricciardiello L. How many mutations does it take to make a tumor?. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1999; 96: 14675-14677.
- <sup>42</sup> Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Rev. Cancer*, 2004; 4: 448-456.
- <sup>43</sup> Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 345: 1890-1900.
- <sup>44</sup> Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.*, 2003; 63: 1727-1730.
- <sup>45</sup> Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61: 759-767.
- <sup>46</sup> Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. *Cancer Res.*, 1996; 56:2488-2492.
- <sup>47</sup> Soder AI, Hopman AHN, Ramaekers FCS, Conradt C, Bosch FX. Distinct nonrandom patterns of chromosomal aberrations in the progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.*, 1995; 55: 5030-5037.
- <sup>48</sup> Jin YS, Mertens F, Mandahl N, Heim S, Olegard C, Wennerberg J, Biorklund A, Mitelman F. Chromosome abnormalities in 83 head and neck squamous cell carcinomas. Influence of culture conditions on karyotypic pattern. *Cancer Res.*, 1995; 53: 2140-2146.
- <sup>49</sup> Hermesen M, Guervos MA, Meijer G, Baak J, van Diest P, Marcos CA, Sampedro A. New chromosomal regions with high-level amplifications in squamous cell carcinomas of the larynx and pharynx, identified by comparative genomic hybridization. *J. Pathol.*, 2001; 194:177-182.
- <sup>50</sup> Bockmühl U, Schläns K, Küchler I, Petersen S, Petersen I. Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients. *Am. J. Pathol.*, 2000; 157: 369-375.
- <sup>51</sup> Kim MM, Califano JA. Molecular pathology of head and neck cancer. *Int. J. Cancer*, 2004; 112: 545-553.
- <sup>52</sup> Shah SI, Yip L, Greenberg B, Califano JA, Chow J, Eisenberger CF, Lee DJ, Sewell DA, Reed AL, Lango M, Jen J, Kock WM, Sidransky D. Two distinct regions of loss on chromosome arm 4q in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2000; 126: 1073-1076.
- <sup>53</sup> Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, van der Wal JE, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am. J. Pathol.*, 2002; 161: 1051-1060.
- <sup>54</sup> Rowley H, Jones AS, Spandidos D, Field JK. Definition of a tumor suppressor gene locus on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the head and neck by means of microsatellite markers. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1996; 122: 497-501.
- <sup>55</sup> Akervall JA, Jin Y, Wennerberg JP, Zatterstrom UK, Kjellen E, Mertens F, Willen R, Mandahl N, Heim S, Mitelman F. Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 1995; 76: 853-859.

- 
- <sup>56</sup> Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Hügland M, Mertens F. Cyclin D1 amplification in chromosomal band 11q13 is associated with overexpression of 3q21-q29 in head and neck carcinomas. *Int. J. Cancer*, 2002; 98: 475-479.
- <sup>57</sup> Kowalski JR, Egile C, Gil S, Snapper SB, Li R, Thomas SM. Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP. *J. Cell Science*, 2005; 118: 79-87.
- <sup>58</sup> Huang X, Gollin SM, Godfrey TE. High-resolution mapping of the 11q13 amplicon and identification of a gene, *TAOS1*, that is amplified and overexpressed in oral cancer cells. *Proc. Natl. Acad. USA*, 2002; 99: 11369-11374.
- <sup>59</sup> Liehr T, Ries J, Wolff E, Fiedler W, Dahse R, Ernst G, Steininger H, Koscielny S, Girod S, Gebhart E. Gain of DNA copy number on chromosomes 3q26-qter and 5p14-pter is a frequent finding in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.*, 1998; 2: 173-179.
- <sup>60</sup> Redon R, Muller D, Caulee K, Wanherdrick K, Abecassis J, du Manoir S. A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but no p63 as a likely target of 3q26-qter gains. *Cancer Res.*, 2001; 61: 4122-4129.
- <sup>61</sup> Wreesmann VB, Shi W, Thaler HT, Poluri A, Kraus DH, Pfister D, Shaha AR, Shah JP, Rao PH, Singh B. Identification of novel prognosticators of outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 3965-3972.
- <sup>62</sup> Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 347-352.
- <sup>63</sup> Vindelöf LL, Christensen IJ. Detergent and proteolytic enzyme-based techniques for nuclear isolation and DNA content analysis. En: *Flow cytometry (2<sup>a</sup> ed)* Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA (eds), Academic Press, San Diego, 1994; 219-229.
- <sup>64</sup> Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW, Mayall BH, Wheelless L, Cox C. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry*, 1993; 14: 472-477.
- <sup>65</sup> Sampedro A, Álvarez C, Martínez JA, Suárez C. Cell proliferation activity and kinetic profile in the prognosis and therapeutic management of carcinoma of the pharynx and larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 1999; 121: 476-481.
- <sup>66</sup> Álvarez Marcos CA, Salas Bustamante A, Sampedro Nuño A, Suárez Nieto C, Hevia Llama RM, Noval Neméndez J. Ploidía de AND y fase S en relación con las metástasis de los carcinomas epidermoides faringolaríngeos. *Acta Otorrinolaring. Esp.*, 2000; 51: 293-298.
- <sup>67</sup> Hermsen MAJA, Joenje H, Arwert F, Welters MJP, Braakhuis BJM, Bagnay M, Westerveld A, Slater R. Centromeric breakage as a major cause of cytogenetic abnormalities in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996; 15:1-9.
- <sup>68</sup> Hardisson D, Álvarez-Marcos C, Salas Bustamante A, Alonso-Guervós M, Sastre N, Sampedro A. Numerical aberrations of chromosomes 8, 9, a11, and 17 in squamous cell carcinoma of the pharynx and larynx: a fluorescence in situ hybridization and DNA flow cytometric analysis of 50 cases. *Oral Oncology*, 2004; 40:409-417.
- <sup>69</sup> Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992; 258: 818-821.
- <sup>70</sup> Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1994; 91:2156-2160.

- 
- <sup>71</sup> Hermsen MAJA, Joenje H, Arwert F, Braakhuis BJM, Baak JPA, Westerveld A, Slater R. Assessment of chromosomal gains and losses in oral squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, 1997; 33: 414-418.
- <sup>72</sup> Wei F, Ni J, Wu SS, Liu H, Xu X, Han YL, Cai Y, Zhang JW, Chen XJ, Pang H, Lu N, Ji L, Wu M, Wang MR. Cytogenetic studies of esophageal squamous cell carcinomas in the northern Chinese population by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2002; 138: 38-43.
- <sup>73</sup> Janssen EAM, Baak JPA, Alonso Guervós M, van Diest PJ, Jiwa M, Hermsen MAJA. In lymph node-negative invasive breast carcinomas, specific chromosomal aberrations are strongly associated with high mitotic activity and predict outcome more accurately than grade, tumour diameter and oestrogen receptor. *J. Pathol.*, 2003; 201: 555-561.
- <sup>74</sup> Zweemer RP, Ryan A, Snijders AM, Hermsen MAJA, Meijer GA, Beller U, Menko FH, Jacobs IJ, Baak JPA, Verheijen RHM, Kenemans P, van Diest PJ. Comparative genomic hybridization of microdissected familial ovarian carcinoma: two deleted regions on chromosome 15q not previously identified in sporadic ovarian carcinoma. *Lab. Invest.*, 2001; 81: 1363-1370.
- <sup>75</sup> Ariza M, Llorente JL, Alvarez-Marcos C, Baragaño L, Salas A, Rodriguez. N, Hermsen M, Suárez C, Sampedro A. Comparative genomic hybridization in primary sinonasal adenocarcinomas. *Cancer*, 2004;100:335-341.
- <sup>76</sup> van Grieken NCT, Weiss MM, Meijer GA, Hermsen MAJA, Scholte GHA, Lindeman J, Craanen ME, Bloemena E, Meuwissen SGM, Baak JPA, Kuipers EJ. Helicobacter pylori-related and -non related gastric cancers do not differ with respect to chromosomal aberrations. *J. Pathol.*, 2000; 192: 301-306.
- <sup>77</sup> Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindel AK, Huey B et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat. Genet.*, 2001; 29:263-264.
- <sup>78</sup> Jain AN, Tokuyasu T, Snijders AM, Segraves R, Albertson DG, Pinkel D. Fully automatic quantification of microarray image data. *Genome Res.*, 2001; 12: 325-332.
- <sup>79</sup> Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Dictor M, Mertens F. Nonrandom pattern of cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the larynx. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000; 28: 66-76.
- <sup>80</sup> Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S, Hittelman W, Hong WK. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat. Med.*, 1996; 2: 682-685.
- <sup>81</sup> Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, Dekker N, Pinkel D, Jordan RC, Albertson DG. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 2005; 24: 4232-4242.
- <sup>82</sup> Hermsen M, Snijders A, Alonso Guervós M, Tänzer S, Körner U, Baak J, Pinkel J, Albertson D, Meijer G, Schröck E. Centromeric chromosomal translocations show tissue-specific differences between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Oncogene*, 2005; 24: 1571-1579.
- <sup>83</sup> Squire JA, Bayani J, Luk C, Unwin L, Tokunaga J, MacMillan C, Irish J, Brown D, Gullane P, Kamel-Reid S. Molecular cytogenetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma: By comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and expression array analysis. *Head Neck*, 2002; 24: 874-887.
- <sup>84</sup> Cromer A, Carles A, Millon R, Ganguli G, Cahmel F, Lemaire F, Young J, Dembele D, Thibault C, Muller D, Poch O, Abecassis J, Wasyluk B. Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene*, 2004; 23: 2484-2498.

- 
- <sup>85</sup> Ginos M, Page GR, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, Ondrey FG, Adams GL, Gaffney. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of head and neck. *Cancer Res.*, 2004; 64: 55-63.
- <sup>86</sup> Schrock 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: 494-497.
- <sup>87</sup> Singh B, Gogineni SK, Sacks PG, Shaha AR, Shah JP, Stoffel A, Rao PH. Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res.*, 2001; 61: 4506-4513.
- <sup>88</sup> Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 2002; 30: e57.
- <sup>89</sup> Worsham MJ, Pals G, Schouten JP, Van Spaendonk RM, Concus A, Carey TE, Benninger MS. Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2003; 129: 702-708.
- <sup>90</sup> Bremner JF, Braakhuis BJ, Ruijter-Schippers HJ, Brink A, Duarte HM, Kuik DJ, Bloemena E, Rene Leemans C, van der Waal I, Brakenhoff RH. A noninvasive genetic screening test to detect oral preneoplastic lesions. *Lab. Invest.*, 2005; Aug 29:Epub.
- <sup>91</sup> Nakagawa H, Hampel H, de la Chapelle A. Identification and characterization of genomic rearrangements of MSH2 and MLH1 in Lynch syndrome (HNPCC) by novel techniques. *Hum. Mutat.*, 2003; 22: 258-258.
- <sup>92</sup> Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Chook KHA. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J. Med. Genet.*, 2003; 40: 907-912.
- <sup>93</sup> Postma C, Hermsen MA, Coffa J, Baak JP, Mueller JD, Mueller E, Bethke B, Schouten JP, Stolte M, Meijer GA. Chromosomal instability in flat adenomas and carcinomas of the colon. *J. Pathol.*, 2005; 205: 514-521.
- <sup>94</sup> Weiss MM, Hermsen MAJA, Meijer GA, van Grieken NCT, Baak JPA, Kuipers EJ, van Diest PJ. Comparative genomic hybridization. *Mol. Pathol.*, 1999; 52: 243-251.
- <sup>95</sup> Hermsen MAJA, Weiss MM, Meijer GA, Baak JPA. Detection of chromosomal abnormalities by comparative genomic hybridization. En: *Methods in Molecular Biology. Vol 175: Genomics Protocols.* Starkey MP, Elaszwarapu R (eds), Human Press Inc, Totowa, NJ, 2001; 47-55.
- <sup>96</sup> Grandis JR, Pietenpol JA, Greenberger JS, Pelroy RA, Mohla S. Head and neck cancer: meeting summary and research opportunities. *Cancer Res.*, 2004; 64: 8126-8129.
- <sup>97</sup> Braakhuis BJM, Tabor MP, Leermans R, der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck*, 2002; 24: 198-206.
- <sup>98</sup> Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Chatelain B, Remacle M, Marbaix E. Prognostic value of cell proliferation markers, tumor suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2003; 260: 28-34.
- <sup>99</sup> Feinmesser R, Freeman JL, Noyek A. Flow cytometric analysis of DNA content in laryngeal cancer. *J. Laryngol. Otol.*, 1990; 104: 377-384.
- <sup>100</sup> Lampe HB. DNA analysis of head and neck squamous carcinoma by flow cytometry. *Laryngoscope*, 1993; 103:637-644.
- <sup>101</sup> Wong G, Stidley C, Dressler L, Castillo M, Crooks L, Bartow S. Predictive value of flow cytometric analysis in DNA content in patients with locally advanced head and neck carcinoma. *J. Laryngol. Otol.*, 1996; 110:243-248.

- 
- <sup>102</sup> Stern Y, Aronson M, Shpitzer T, Nativ O, Medalia O, Segal K, Feinmesser R. Significance of DNA ploidy in the treatment of T<sub>1</sub> glottic carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 1995; 121:1003-1005.
- <sup>103</sup> Tennvall J, Wennerberg J, Willen R, Ask A, Baldetorp B, Ferno M. T3N0 glottic carcinoma: DNA S-phase as a predictor of the outcome after radiotherapy. *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, 1993; 113:220-224.
- <sup>104</sup> Wolf GT, Fisher SG, Travelson JM, Beals TF. DNA content and regional metastases in patients with advanced laryngeal squamous carcinoma. *Laryngoscope*, 1994; 104:479-483.
- <sup>105</sup> Welkoborsky HJ, Mann WJ, Gluckman JL, Freije JE. Comparison of quantitative DNA measurements and cytomorphology in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract with and without lymph node metastases. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1993; 102:52-57.
- <sup>106</sup> Bockmuhl U, Schwendel A, Dietel M, Petersen I. Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.*, 1996; 56: 5325-5329.
- <sup>107</sup> Brzoska PM, Levin NA, Fu KK, Kaplan MJ, Singer MI, Gray JW, Christman MF. Frequent novel DNA copy number increase in squamous cell head and neck tumors. *Cancer Res.*, 1995; 55: 3055-3059.
- <sup>108</sup> Speicher MR, Howe C, Crotty P, Du Manoir S, Costa J, Ward DC. Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.*, 1995; 55: 1010-1013.
- <sup>109</sup> Akervall JA, Michelides RJAM, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, Jun Y, Loftus B, Mertens F, Wennerberg JP. Amplification of Cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer*, 1997; 79: 380-389.
- <sup>110</sup> Arkevall J, Bockmuhl U, Petersen I, Yang K, Carey C, Kurnit DM. The gene ratios *c-MYC*: cyclin-dependent kinase (*CDKN2A*) and *CCND1*: *CDKN2A* correlate with poor prognosis in squamous cell carcinoma head and neck. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 1750-1755.
- <sup>111</sup> Cohen EEW. Novel therapeutic targets in squamous cell carcinoma of head and neck. *Semin Oncol* 2004; 31: 755-768.
- <sup>112</sup> Garnis C, Campbell J, Zhang L, Rosin MP, Lam WL. *OCGR* array: an oral cancer genomic regional array for comparative genomic hybridization analysis. *Oral Oncol.*, 2004; 40: 511-519.
- <sup>113</sup> Weber RG, Scheer M, Born A, Joos S, Cobbers L, Hofele C, Reifenberger G, Zoller JE, Lichter P. Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy material from oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection, universal DNA amplification, and comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.*, 1998; 153: 295-303.
- <sup>114</sup> Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y. *TSLC1* is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nature Genet.*, 2001; 27: 427-430.
- <sup>115</sup> Rowley H, Jones AS, Field JK. Chromosome 18: a possible site for a tumor suppressor gene deletion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Otolaryngol.*, 1995; 20: 266-271.
- <sup>116</sup> MacGrogan D, Pegram M, Slamon D, Bookstein R. Comparative mutational analysis of *DPC4* (*Smad4*) in prostatic and colorectal carcinomas. *Oncogene*, 1997; 15: 1111-1114.
- <sup>117</sup> Takebayashi S, Hickson A, Ogawa T, Jung KY, Mineta H, Ueda Y, Grenman R, Fisher SG, Carey TE. Loss of chromosome 18q with tumor progression in head and neck squamous cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004; 41: 145-154.

- 
- <sup>118</sup> Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, 1993; 22:459-462.
- <sup>119</sup> Kato I, Nomura MY. Alcohol in the aetiology of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, 1994, 30B: 75-81.
- <sup>120</sup> Mertens F, Johansson B, Mitelman F. Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosome Cancer*, 1994; 10: 221-230.
- <sup>121</sup> Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, Erickson NL, Williams ME. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 1995; 121: 790-794.
- <sup>122</sup> Patel AM, Incognito LS, Schechter GL, Wasilenko WJ, Somers KD. Amplification and expression of EMS-1 (cortactin) in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncogene*, 1996; 12: 31-35.
- <sup>123</sup> Rodrigo JP, Garcia LA, Ramos S, Lazo PS, Suarez C. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.*, 2000; 6: 3177-3182.
- <sup>124</sup> Muller D, Millon R, Velten M, Bronner G, Jung G, Engelmann A, Flesch H, Eber M, Methlin G, Abecassis J. Amplification of 11q13 DNA markers in head and neck squamous cell carcinomas: correlation with clinical outcome. *Eur. J. Cancer*, 1997 ;33: 2203-2210.
- <sup>125</sup> Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, A'Hern R, Lee G, Phillips E, Langdon J. The prognostic significance of allelic imbalance at key chromosomal loci in oral cancer. *Br. J. Cancer*, 1999; 79: 1821-1827.
- <sup>126</sup> Pearlstein RP, Benninger MS, Carey TE, Zarbo RJ, Torres FX, Rybicki BA, Dyke DL. Loss of 18q predicts poor survival of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998; 21: 333-339.
- <sup>127</sup> Scholnick SB, Haughey BH, Sunwoo JB, el\_Mofty SK, Baty JD, Piccirillo JF, Zequeira MR. Chromosome 8 allelic loss and the outcome of patients with squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996; 88: 1676-1682.
- <sup>128</sup> Lin SC, Chen YJ, Kao SY, Hsu MT, Lin CH, Yang SC, Liu TY, Chang KW. Chromosomal changes in betel associated oral squamous cell carcinomas and their relationship to clinical parameters. *Oral Oncol.*, 2002;38: 266-273.
- <sup>129</sup> Kujawski M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, Szyfter K, Knuutila S. Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999; 26:253-257.
- <sup>130</sup> Bockmuhl U, Petersen S, Schmidt S, Wolf G, Jahnke V, Dietel M, Petersen I. Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res.*, 1997; 57: 5213-5216.
- <sup>131</sup> Hermsen M, Alonso Guervos M, Meijer G, van Diest P, Suarez Nieto C, Marcos CA, Sampedro A. Chromosomal changes in relation to clinical outcome in larynx and pharynx squamous cell carcinoma. *Cell Oncol.*, 2005, 27:191-198.
- <sup>132</sup> Huang Q, Yu GP, McCormick SA, Mo J, Datta B, Mahimkar M, Lazarus O, Schaffer AA, Desper R, Schantz SP. Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002; 34: 224-233.
- <sup>133</sup> Oba K, Matsuyama H, Yoshihiro S, Kishi F, Takahashi M, Tsukamoto M, Kinjo M, Sagiya K, Naito K. Two putative tumor suppressor genes on chromosome arm 8p may play different roles in prostate cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2001; 124: 20-26.

- 
- <sup>134</sup> Bova GS, MacGrogan D, Levy A, Pin SS, Bookstein R, Isaacs WB. Physical mapping of chromosome 8p22 markers and their homozygous deletion in a metastatic prostate cancer. *Genomics*, 1996; 35: 46-54.
- <sup>135</sup> Schumacher, V.; Vogel, T.; Leube, B.; Driemel, C.; Goecke, T.; Moslein, G.; Royer-Pokora, B. STK11 genotyping and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *J. Med. Genet.*, 2005; 42: 428-435.
- <sup>136</sup> Kujawski M, Aalto Y, Jaskula-Sztul R, Szyfter W, Szmeja Z, Szyfter K, Knuutila S. DNA copy number losses are more frequent in primary larynx tumors with lymph node metastases than in tumors without metastases. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1999; 114: 31-34.
- <sup>137</sup> Roepman P, Wessels LFA, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, Tilanus MGJ, Koole R, Hordijk G, van der Vliet PC, Reinders MJT, Slootweg PJ, Holstege FCP. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.*, 2005; 37: 182-186.
- <sup>138</sup> Tremmel SC, Gotte K, Popp S, Weber S, Hormann K, Bratram CR, Jauch A. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2003; 144: 165-174.
- <sup>139</sup> Bockmühl U, Ishwad CS, Ferrell RE, Gollin SM. Association of 8p23 deletion with poor survival in head and neck cancer. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2001; 124: 451-455.
- <sup>140</sup> Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Streblov DN, Nelson JA, Ilic D, Huang S, Li E, Nemerow GR, Leng J, Spencer KS, Cheresch DA, Schlaepfer DD. Differential regulation of the cell motility and invasion by FAK. *J. Cell Biol.*, 2003; 160: 753-767.
- <sup>141</sup> Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elbe RC, Pauli BU. Focal adhesion kinase activated by  $\beta_4$  integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 34391-34400.
- <sup>142</sup> Besson A, Assoian RK, Roberts JM. Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 948-955.
- <sup>143</sup> Patel AS, Schechter GL, Wasilenko WJ, Somers KD. Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblast causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene*, 1998; 16: 3227-3232.
- <sup>144</sup> MacGrogan D, Levy A, Bova GS, Isaacs WB, Bookstein R. Structure and methylation-associated silencing of a gene within a homozygously deleted region of human chromosome band 8p22. *Genomics*, 1996; 35: 55-65.
- <sup>145</sup> Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, Goodman SN, Westra WH, Schwab D, Yoo GH, Lee DJ, Forastiere AA, Sidransky D. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996; 88: 1580-1586.
- <sup>146</sup> Singh B, Stoffel A, Gogineni SK, Poluri A, Pfister DG, Shaha AR, Pathak A, Bosl G, Cordon-cardo C, Shah J, Rao PH. Amplification of the 3q26,3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 2002; 161: 365-371.
- <sup>147</sup> Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M, Amagasa T, Inazaga J. Novel targets for 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 19-24.
- <sup>148</sup> Oga A, Kong G, Tae K, Lee Y, Sasaki K. Comparative genomic hybridization analysis reveals 3q gain resulting in genetic alteration in 3q in advanced oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genetic Cytogenetic*, 2001; 127: 24-29.
- <sup>149</sup> Woenckhaus J, Steger K, Werner E, Fenic I, Gamerdinger U, Dreyer T, Stahl U. Genomic gain of *PIK3CA* and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *J. Pathol.*, 2002; 198: 335-342.



---

<sup>150</sup> van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 347: 1999-2009.