

INVESTIGACIÓN CLÍNICA

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y EXPRESIÓN DE LA E-CADHERINA EN LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO

J. P. RODRIGO TAPIA¹, F. DOMÍNGUEZ IGLESIAS², C. ÁLVAREZ MARCOS³, M. V. GONZÁLEZ MEANA¹,
J. GARCÍA PEDRERO¹, C. SUÁREZ NIETO¹

¹SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA, HOSPITAL CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS, UNIVERSIDAD DE OVIEDO, ASTURIAS. ²SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA. ³SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA, HOSPITAL VALLE DEL NALÓN, LANGREO, ASTURIAS.

RESUMEN

Introducción: La molécula de adhesión E-cadherina tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la morfología y diferenciación epiteliales normales. Se ha sugerido que la dispersión e invasividad de las células cancerosas inducida por la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) podrían deberse a su acción sobre la E-cadherina. El objetivo de este estudio es determinar si la activación por amplificación del EGFR se relaciona con la expresión de la E-cadherina en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. **Material y métodos:** Se estudian 50 pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. La determinación de la amplificación

del EGFR se realizó mediante PCR semicuantitativa. La expresión de la E-cadherina se estudió con técnicas de inmunohistoquímica. **Resultados:** Se halló amplificación del EGFR en 9 casos (18%). La expresión de la E-cadherina en las muestras tumorales mostró, en general, una disminución con relación al epitelio normal adyacente. No se observó relación entre la amplificación del EGFR y la expresión de la E-cadherina. **Conclusión:** La amplificación del EGFR no tuvo influencia en la expresión de la E-cadherina, sugiriendo que se trata de mecanismos complementarios en la disminución de la adhesión celular en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

PALABRAS CLAVE: Receptor del factor de crecimiento epidérmico. E-cadherina. Adhesión celular. Carcinoma epidermoide. Cabeza y cuello.

ABSTRACT

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR GENE AMPLIFICATION AND E-CADHERIN EXPRESSION IN HEAD AND NECK CARCINOMAS

Introduction: The E-cadherin adhesion molecule is fundamentally involved in the maintenance of normal epithelial morphology and differentiation. The scattering and invasion of cancer cells induced by epidermal growth factor receptor (EGFR) activation has been suggested to be probably by affecting E-cadherin function. The aim of this study is to confirm whether EGFR amplification is related to E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinomas. **Material and methods:** Fifty patients with head and neck squamous cell carcinoma were studied. EGFR amplification was analyzed by

semiquantitative PCR. E-cadherin expression was determined by immunohistochemistry. **Results:** EGFR amplification was found in 9 cases (18%). E-cadherin expression was generally weaker in tumors than in adjacent normal epithelium. No relationship was found between EGFR amplification and E-cadherin expression. **Conclusion:** EGFR amplification did not affect the level of E-cadherin expression, suggesting a complementary role of both of these molecules in reduction of cellular adhesion in head and neck squamous cell carcinomas.

KEY WORDS: Epidermal growth factor receptor. E-cadherin. Cellular adhesion. Squamous cell carcinoma. Head and neck.

Correspondencia: Juan Pablo Rodrigo Tapia. C/ Fernández Ladreda 32 Esc A 4ºB. 33011 Oviedo. E-mail: juanpablo.rodrigo@sespa.princast.es

Fecha de recepción: 10-10-2004

Fecha de aceptación: 2-10-2004

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones en la expresión o en la función de moléculas que afectan a la adhesión y a la proliferación celular son acontecimientos críticos en la progresión tumoral. La disminución o pérdida de expresión de la molécula de adhesión E-cadherina y la amplificación y/o sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) son dos alteraciones moleculares relacionadas con la génesis de muchos tumores humanos^{1,2}, incluyendo los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello³⁻⁶.

La disminución de la adhesión celular mediada por la E-cadherina puede ser debida a una disminución en la expresión de la propia E-cadherina o a modificaciones post-traducción (por ejemplo, por fosforilación) de las proteínas con las que interacciona para unirse al citoesqueleto de actina, las llamadas cateninas⁷. A través de este último mecanismo, el EGFR parece participar también en la regulación de la adhesión celular, fosforilando las cateninas e inactivando el complejo E-cadherina-cateninas⁸.

A pesar de las diversas evidencias en líneas celulares derivadas de distintos tipos de tumores humanos que han demostrado esta relación entre el EGFR y la adhesión celular mediada por la E-cadherina, no se han realizado estudios en carcinomas epidermoides primarios sobre los efectos de la activación del EGFR en la expresión de la E-cadherina. En este estudio pretendemos determinar si existe una relación entre la activación por amplificación del EGFR y la expresión de la E-cadherina en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudian 50 pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello intervenidos quirúrgicamente. En todos los casos se trataba de tumores primarios que no habían recibido tratamiento previamente. En 30 casos se administró radioterapia postoperatoria (en general, se administró a los casos localmente avanzados y/o con metástasis ganglionares). Todos los pacientes eran varones, con una media de edad de 58,2 años (rango entre 38 y 85 años). Todos ellos tenían antecedentes de consumo habitual de tabaco, y 46 además de alcohol. Por localizaciones, las más frecuentes fueron la orofaringe y la hipofaringe, cada una con 17 casos, seguidas de la supraglotis (n=7), la glotis

(n=6) y la cavidad oral (n=3). La distribución por estadios se hizo según la clasificación de la Unión Internacional Contra el Cáncer vigente en el momento del tratamiento de los pacientes (5ª Edición), y se muestra en la tabla 1.

Obtención de las muestras

Para el análisis de la amplificación del EGFR se obtuvieron muestras tumorales en el momento de la intervención quirúrgica, fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su procesamiento. Para el estudio de la expresión de la E-cadherina las muestras tumorales incluidas en parafina de los mismos pacientes fueron obtenidas del archivo del Servicio de Anatomía Patológica.

Análisis inmunohistoquímico de la expresión de la E-cadherina

Las muestras tumorales incluidas en parafina fueron cortadas en secciones de 4 µm y adheridas a portas siliconizados (ChemMate, BioTEK Solutions, Santa Barbara, CA, USA). Las secciones fueron desparafinizadas e hidratadas de forma convencional. La recuperación antigénica se realizó calentando las secciones en tampón citrato 10 minutos en una olla a presión. Las reacciones de tinción se realizaron a temperatura ambiente de forma automatizada en una estación de trabajo TechMate 1000 (BioTEK Solutions). Los portas estuvieron 15 minutos en un medio

Tabla 1: Distribución por estadios de los casos estudiados

Estadio	Número de casos
Estadio T:	
- T1	1
- T2	11
- T3	18
- T4	20
Estadio N:	
- N0	16
- N1	9
- N2	20
- N3	5
Estadio global:	
- I	1
- II	3
- III	14
- IV	32

bloqueante (peróxido de hidrógeno al 3%) y posteriormente reaccionaron con el anticuerpo primario (el anticuerpo anti-E-cadherina, clon 36, Transduction Labs, Lexington, KY, USA) a una concentración de 1:2000 durante 30 minutos. La inmunodetección se realizó con el sistema Envision (Envision Plus, Dako, Carpinteria, CA, USA). Una tinción con hematoxilina durante 1 minuto fue el paso final. Tras la tinción las secciones fueron deshidratadas y montadas con un cubreobjetos empleando un medio estándar.

Los controles positivos consistieron en epitelio laríngeo normal obtenido de cirugía no oncológica. También se incluyeron controles negativos con omisión del anticuerpo primario.

Las preparaciones fueron estudiadas al azar, sin datos clínicos, por uno de los autores (F.D.). A cada una se le asignó una puntuación basándose en la intensidad de la tinción de membrana (0-4) y en el porcentaje de células teñidas (0%-100%). Los dos componentes fueron multiplicados para obtener una puntuación total entre 0 y 400. La puntuación fue asignada tanto al tumor como al epitelio adyacente normal (cuando estaba disponible).

Análisis por PCR de la amplificación del EGFR

Las muestras tumorales fueron trituradas, homogeneizadas y digeridas dos veces durante 8 horas a 37°C con 100 µg de Proteinasa K por mililitro de buffer (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl y 0,2% de SDS). El ADN de alto peso molecular fue entonces aislado por extracción con fenol-cloroformo, precipitado en etanol, disuelto en 10 mM Tris pH 8,0 y 1 mM EDTA, y almacenado a -20°C.

Para las reacciones de PCR se emplearon, en un volumen final de 50 µl, 0,2 µg del ADN a estudio, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,005% Tween-20, 0,005% NP-40, 0,01% gelatina, 0,2 mM de cada dNTP, 1 mM de cada oligonucleótido, y 1 U de Taq polimerasa. Las mezclas de reacción se sometieron a 30 ciclos compuestos cada uno por un minuto a las siguientes temperaturas: 94°C (desnaturalización), 56°C (anillamiento) y 72°C (elongación).

En cada reacción de PCR se emplearon simultáneamente dos pares de oligonucleótidos, uno para amplificar el gen a estudio (EGFR) y el otro para el gen de referencia (β -actina), localizado en el mismo cromosoma que el del EGFR. De esta manera se evitan los falsos positivos debidos a duplicaciones cromosómicas. Los cebadores para el EGFR fueron 5'-ACAGCCATGCCCGCATTAGCTCTAA-3' y 5'-GGAATGCAACT-TCCCAAATGTGCC-3', amplificando un fragmento de 109 pares de bases (bp). Los ceba-

dores del gen de la β -actina fueron 5'-TATC-CAGGCTGTGCTATCCCTGTAC-3' y 5'-CTTGAT-GAGGTAGTCAGTCAGGTCC-3', amplificando un fragmento de 160 bp. Como controles negativos se emplearon tejidos normales obtenidos en cirugía no oncológica. Los controles positivos se obtuvieron mezclando ADN de tejidos normales con cantidades conocidas de un fragmento del EGFR previamente amplificado por PCR, de manera que se podían simular diferentes grados de amplificación.

De cada reacción de PCR, 10 µl fueron sometidos a electroforesis en geles compuestos por 3% de NuSieve (FMC). Las bandas correspondientes a los productos de la PCR fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta, y fotografiadas con una cámara digital. Las bandas fueron cuantificadas mediante técnicas de análisis de imagen (Kodak Digital Science), calculando a continuación las razones EGFR/ β -actina.

Análisis estadístico

Para analizar la relación de la expresión de la E-cadherina con los parámetros clínico-patológicos y con la amplificación del EGFR, se compararon las medias de puntuación de tinción entre los diferentes grupos empleando el análisis de la varianza. La relación de la amplificación del EGFR con los distintos parámetros clínico-patológicos de analizó mediante tablas de contingencia empleando el test de chi-cuadrado, con la corrección de Yates cuando era preciso. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

El epitelio laríngeo normal empleado como control mostró con la E-cadherina una tinción membranosa en las células de todo el espesor del epitelio, excepto en las capas más superficiales y diferenciadas. Por tanto, estas capas superficiales fueron excluidas para obtener la puntuación de tinción del epitelio normal adyacente a los tumores. Por esto también se excluyeron de la puntuación las áreas de queratinización y diferenciación terminal dentro de los tumores.

En el epitelio normal adyacente a los tumores (disponible en 48 casos) prácticamente todas las células (excepto las capas superficiales como ya se indicó) mostraban una intensa tinción con la E-cadherina, de forma que la puntuación mínima obtenida fue de 300. Todos los tumores, menos dos, presentaron expresión de E-cadherina. Los tumores mostraban, en general, una menor expresión



Figura 1. Ejemplo de tinción positiva para la E-cadherina, mostrando un patrón de tinción membranoso (magnificación original, X 260).

que el epitelio normal, de forma que la puntuación media de tinción para los tumores fue de 148 (desviación estándar de 98). En la figura 1 se muestra un ejemplo de tinción con la E-cadherina.

En la tabla 2 se muestra la relación de la expresión de la E-cadherina con diferentes parámetros clínico-patológicos. No se apreció relación entre la expresión de la E-cadherina y el estadio local (T). La expresión de E-cadherina fue menor en los casos con metástasis ganglionares, aunque las diferencias no fueron significativas. Tampoco hubo diferencias significativas en la expresión de E-cadherina según el gra-



Figura 2. Electroforesis de los productos de la PCR semicuantitativa en los casos con amplificación. N: ADN de tejido normal. C-: control negativo. C+: control positivo.

do de diferenciación, aunque está era claramente inferior en los casos pobremente diferenciados.

Se halló amplificación del EGFR en 9 de los 50 casos analizados (18%) (figura 2). Aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al escaso número de casos con amplificación, la amplificación del EGFR se encontró en mayor porcentaje en los casos localmente avanzados (T4), en los casos con metástasis ganglionares, y en los pobremente diferenciados (Tabla 3).

No hubo diferencias en la expresión de la E-cadherina entre los casos con y sin amplificación del EGFR: la puntuación media para la tinción de la E-cadherina en los casos sin amplificación del EGFR fue de 149 (desviación estándar de 94), y en los casos con amplificación de 143 (desviación estándar de 95) (P= 0,86).

DISCUSIÓN

Es bien conocido que la adhesión intercelular se halla frecuentemente reducida en los cánceres

Tabla 2: Relación de la expresión de la E-cadherina con distintos parámetros clínico-patológicos

Característica	Nº Casos	Expresión media de E-cadherina	Intervalo de confianza del 95%	P*
Total de casos	50	148	121-175	
Estadio T				
- T1	1	180	-	0,64
- T2	11	118	35-201	
- T3	18	148	105-192	
- T4	20	162	123-202	
Estadio N				
- N0	16	170	118-221	0,26
- N1-3	34	137	105-169	
Grado de diferenciación				
- Bien diferenciado	28	157	120-194	0,14
- Moderadamente diferenciado	17	156	109-203	
- Pobremente diferenciado	5	69	7-145	

* Análisis de la varianza.

Tabla 3: Relación de la amplificación del EGFR con distintos parámetros clínico-patológicos

Característica	Nº de casos	Amplificados (%)	P*
Estadio T			
- T1	1	0	0,34
- T2	11	1 (9%)	
- T3	18	2 (11%)	
- T4	20	6 (30%)	
Estadio N			
- N0	16	2 (12%)	0,39
- N1-3	34	7 (21%)	
Grado de diferenciación			
- Bien diferenciado	28	5 (18%)	0,35
- Moderadamente diferenciado	17	2 (12%)	
- Pobremente diferenciado	5	2 (40%)	

* Test de χ^2 .

humanos. En los tejidos epiteliales, la adhesión célula-célula está fundamentalmente mediada por el complejo E-cadherina-cateninas. Las cadherinas son glicoproteínas transmembrana con una región citoplasmática altamente conservada que interactúa con el citoesqueleto de actina a través de las α , β y γ -cateninas. La familia de las cadherinas está formada por varios miembros, dependiendo de su distribución en diferentes tejidos, siendo la E-cadherina la que forma el componente clave en las uniones adherentes entre las células epiteliales. Por esto se considera al complejo E-cadherina-cateninas como fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la morfología epitelial normal y en la diferenciación celular^{1,7}.

Múltiples estudios han documentado la disminución o la pérdida de la expresión de la E-cadherina en diversos tumores humanos, incluyendo los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (revisado en la referencia 1). Generalmente, la expresión de la E-cadherina es mayor en los cánceres bien diferenciados, que mantienen su adhesión intercelular y son menos invasivos, y se encuentra reducida en los cánceres indiferenciados, que han perdido la adhesión célula-célula y muestran una mayor tendencia invasiva.

El sistema de adhesión celular mediado por la E-cadherina está estrechamente regulado por una serie de vías de señalización intracelulares. Recientes evidencias sugieren que una de estas vías de control es a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)⁸. La activación del EGFR (una tirosina-quinasa) produce una fosforila-

ción de la β -catenina, que lleva a una disociación del complejo E-cadherina-cateninas, con la subsiguiente pérdida de adhesión celular. La activación del EGFR (bien sea por sobreexpresión o por amplificación) es un fenómeno frecuente en muchos cánceres humanos, siendo probable que parte de su actividad oncogénica se deba a sus efectos sobre la adhesión celular mediada por la E-cadherina⁸. Así, se ha visto disminución de la expresión de la E-cadherina cuando se inducía la activación del EGFR^{9,10}.

En los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello es también frecuente la activación del EGFR, habiéndose descrito amplificación del gen que lo codifica (el gen ERBB1) en un 15-25% de los casos^{5,6,11,12}, cifras que son concordantes con las halladas en el presente estudio (18%). En contra de lo que sería de esperar según lo previamente citado, la amplificación del EGFR no ha tenido influencia en el nivel de expresión de la E-cadherina en nuestra serie de tumores. La explicación podría ser que, tal como se ha descrito en algunos otros estudios^{13,14}, la fosforilación de las cateninas resultante de la activación del EGFR impediría la interacción de la E-cadherina con el citoesqueleto, con la consiguiente reducción en la adhesión celular, pero no causaría una disminución de la expresión de la E-cadherina. Por tanto, el efecto de la activación del EGFR sobre la adhesión celular sería complementario a la disminución de la expresión de la E-cadherina.

Por otra parte, con relación a las correlaciones clínico-patológicas de las alteraciones estudiadas,

nuestro estudio confirma los hallazgos previamente descritos por otros autores. La expresión de E-cadherina se ha descrito habitualmente reducida en los tumores con pobre diferenciación histológica y con metástasis ganglionares^{3,4,15}. Nosotros hallamos también una disminución de la expresión en los casos con metástasis ganglionares y en los casos pobremente diferenciados, aunque las diferencias no fueron significativas. La amplificación del EGFR también se ha descrito previamente asociada a tumores localmente avanzados, con metástasis ganglionares y pobremente diferenciados^{5,6,12,16}, tal como hallamos en nuestro estudio, aunque tampoco obtuvimos diferencias significativas, probablemente por el escaso número de casos con amplificación.

En conclusión, no hemos hallado que la activación por amplificación del EGFR tenga influencia

en la expresión de la E-cadherina. Ambos mecanismos de reducción de la adhesión celular, la disminución de la expresión de la E-cadherina y la modulación de la interacción de ésta con el citoesqueleto por parte del EGFR, serían complementarios y sugieren una participación coordinada de ambas moléculas (E-cadherina y EGFR) en la progresión tumoral.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el FIS (ayuda a la investigación 00/0171). Las Dras. M.V. González Meana y J. García Pedrero están financiadas por una ayuda al Instituto Universitario de Oncología de la Obra Social de CajAstur.

REFERENCIAS

- 1.- Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998; 153: 333-339.
- 2.- Prigent SA, Lemoine NR. The type 1 (ERBB1-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* 1992; 4: 1-24.
- 3.- Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of the head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991; 51: 6328-6337.
- 4.- Andrews NA, Jones AS, Helliwell TR, Kinsella AR. Expression of the E-cadherin-catenin cell adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases. *Br J Cancer* 1997; 75: 1474-1480.
- 5.- Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, et al. Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 1989; 59: 559-562.
- 6.- Rodrigo JP, Ramos S, Lazo PS, Alvarez I, Suárez C. Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2004-2010.
- 7.- Beavon IRG. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1607-1620.
- 8.- Jawhari AU, Farthing MJ, Pignatelli M. The E-cadherin/epidermal growth factor interaction; a hypothesis of reciprocal and reversible control of intercellular adhesion and cell proliferation. *J Pathol* 1999; 187: 155-157.
- 9.- Jones JL, Royall JE, Walker RA. E-cadherin relates to EGFR expression and lymph node metastasis in primary breast carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 1237-1241.
- 10.- Shiozaki H, Kadowaki T, Doki Y, Inoue M, et al. Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 1995; 71: 250-258.
- 11.- Kearsley JH, Leonard JH, Walsh MD, Wright GR. A comparison of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathology* 1991; 23: 189-194.
- 12.- Rikimaru K, Tadokoro K, Yamamoto T, Enomoto S, Tsuchida N. Gene amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1992; 14: 8-13.
- 13.- Hazan RB, Norton L. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; 273: 9078-9084.
- 14.- Moon HS, Choi EA, Park HY, Choi JY, et al. Expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin, beta- and gamma-catenin, and epidermal growth factor receptor in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2001; 81: 355-359.
- 15.- Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santucci M. Prediction of occult metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin immunohistochemical determination. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1801-1808.
- 16.- Irish JC, Bernstein A. Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1993; 103: 42-52.