

INVESTIGACIÓN BÁSICA

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA CICLINA D1 EN LOS CARCINOMAS ADENOIDES QUÍSTICOS DE GLÁNDULAS SALIVARES MENORES

G. SEQUEIROS SANTIAGO¹, J. P. RODRIGO TAPIA^{1,2}, D. GARCÍA-CARRACEDO², J. GARCÍA PEDRERO², C. SUÁREZ NIETO^{1,2}, M. V. GONZÁLEZ MEANA²

¹SERVICIO DE ORL. HOSPITAL CENTRAL DE ASTURIAS. OVIEDO.

²INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA. UNIVERSIDAD DE OVIEDO. ASTURIAS.

RESUMEN

Introducción/Objetivo: El carcinoma adenoide quístico (CAQ) es un tumor de estirpe epitelial y representa el tumor maligno más frecuente de las glándulas salivares menores. Sin embargo, se conoce poco de los genes implicados en el desarrollo y progresión de estos tumores. El gen de la ciclina D1 (*CCND1*) juega un papel clave en el control del ciclo celular, y su anomalía está descrita en numerosos cánceres. El objetivo de este estudio es determinar si existe amplificación del *CCND1* en los CAQ de glándulas salivares menores y su posible relación con el pronóstico. **Material y métodos:** Se realiza un estudio retrospectivo de 12 pacientes intervenidos de CAQ de fosas nasales y senos paranasales. Se determinó

la existencia de amplificación del *CCND1* mediante PCR múltiple. **Resultados:** Se encontró amplificación del *CCND1* en 4 casos (33,3%). No se halló relación significativa con ninguno de los parámetros clínico-patológicos analizados (localización, tipo histológico, estadio; $p>0,05$). La supervivencia fue menor en los pacientes que presentaban amplificación de *CCND1*. **Discusión/Conclusiones:** Nuestro estudio es el primero que demuestra la amplificación del gen de la ciclina D1 en los CAQ. La amplificación del *CCND1* parece tener relación con un peor pronóstico en estos tumores, aunque es necesario confirmar esta relación en estudios más amplios.

PALABRAS CLAVE: Carcinoma adenoide quístico. Glándulas salivares menores. Ciclina D1. Pronóstico.

ABSTRACT

CCND1 GENE AMPLIFICATION IN THE ADENOID CYSTIC CARCINOMA OF THE MINOR SALIVARY GLANDS

Objective: Adenoid cystic carcinoma (ACC) is a tumour of epithelial origin that represents the most common malignant neoplasm of the minor salivary glands. However, little is known about the genes involved in the development and progression of this tumour. Cyclin D1 gene (*CCND1*) plays a key role in the control of the cell cycle, and its amplification is described in numerous cancers. The aim of this study is to determine the amplification of the *CCND1* gene in the ACC of the minor salivary glands. **Materials and methods:** A retrospective study was performed on 12 patients with ACC of the head and neck. The amplifica-

tion of the *CCND1* was determined using multiple PCR. **Results:** Amplification of the *CCND1* was found in 4 patients (33,3%). No correlation was found between *CCND1* amplification and clinicopathological parameters, although disease-free survival was diminished in patients with amplification. **Discussion/Conclusion:** Our study demonstrates for the first time the amplification of the *CCND1* gene in ACC. We have found an amplification rate similar to others neoplasms. *CCND1* amplification seems to be associated with a poorer prognosis in these tumours, although this needs to be confirmed in larger studies.

KEY WORDS: Adenoid cystic carcinoma. Minor salivary glands. Cyclin D1. Prognosis.

Correspondencia: Guadalupe Sequeiros Santiago. C/ Baldomero Fernández 14, 3º. 33006 Oviedo.
E-mail: gsequeiros_orl@hotmail.com

Fecha de recepción: 3-11-2003

Fecha de aceptación: 29-1-2004

INTRODUCCIÓN

El Carcinoma Adenoide Quístico (CAQ) es un tumor maligno, de crecimiento lento e infiltrante, que presenta tendencia a la recurrencia local y al desarrollo de metástasis a distancia durante el curso de la enfermedad. Hoy en día continúa siendo un tumor con un pronóstico incierto. Varios estudios han comprobado que tienen peor pronóstico aquellos CAQ que presentan un subtipo histológico sólido, estadio tumoral avanzado, presencia de metástasis linfáticas al diagnóstico, localización en el seno maxilar y existencia de invasión perineural macroscópica^{1,2}. Sin embargo las alteraciones moleculares responsables de la progresión tumoral de estos tumores no están todavía bien caracterizadas, por lo que es prioritario actualmente investigar acerca de las posibles dianas genéticas alteradas en los CAQ.

Se consideran genes clave en la tumorigénesis los implicados en la regulación del ciclo celular, y entre ellos está el gen de la ciclina D1. El gen *CCND1* (*PRAD1/BCL1*), que se encuentra localizado en la región cromosómica 11q13, codifica la ciclina D1, que es una proteína clave en la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. Su sobreexpresión, ya sea por reordenamientos cromosómicos o bien por amplificación génica (aumento del número de copias), resultaría en una aceleración en la transición G1/S³, con hiperproliferación celular y eventual transformación maligna⁴.

La ruta en la que participa este gen (ciclina D1-cdk4/ INK4 (p16)/retinoblastoma (pRb)/E2F) se encuentra alterada en alguno de sus componentes en más del 80% de las neoplasias humanas, ya sea por mutaciones en los genes que codifican estas proteínas o en sus reguladores. Concretamente el *CCND1* se encuentra alterado en varios tipos de tumores, entre los que se incluye el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, en el que se encuentra amplificado en el 40% de los casos aproximadamente⁵.

Dada la frecuente implicación de este gen en el desarrollo de neoplasias humanas, el objetivo de nuestro estudio es determinar si la amplificación de *CCND1* es una alteración presente en los CAQ de glándulas salivares menores y, a su vez pretende establecer posibles correlaciones entre esta alteración y variables clínico-patológicas de los tumores estudiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudian 12 pacientes con CAQ de glándulas salivares menores intervenidos entre los años

1990 y 2001. En todos los casos se trataba de tumores primarios que no habían recibido tratamiento previamente, y su localización era predominantemente nasosinusal, excepto 3 casos. Nueve de ellos eran mujeres y tres hombres, con una media de edad al diagnóstico de 55 años (rango entre 30 y 79 años). Todos fueron sometidos a cirugía, y en 10 de los casos se complementó ésta con radioterapia, coincidiendo con tumores localmente avanzados o con invasión de los márgenes quirúrgicos.

Ninguno de los pacientes presentó metástasis ganglionares o a distancia, en el momento del diagnóstico.

Los pacientes fueron estadificados según la clasificación de la Unión Internacional contra el Cáncer (6ª edición).

Obtención de las muestras y extracción del ADN

Las muestras tumorales, conservadas en parafina, se obtuvieron del archivo del Servicio de Anatomía Patológica. Para cada caso se realizaron 4 cortes de 5 micras de grosor, comprobando que la mayoría de las células fuesen tumorales; se obtuvo tejido sano cuando se disponía de éste, que se utilizó como control negativo.

El primer paso fue desparafinar las muestras, incubándolas en 1 ml de Xileno y posterior centrifugación y secado en un bloque térmico. Una vez bien seco, el tejido se lisó a 55°C mediante un tampón de lisis (TrisHCL pH 8,5 50 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 0,5%, proteinasa K 1 mg/ml). El tejido digerido se sometió a dos rondas sucesivas de extracción con fenol cloroformo-alcohol isoamílico y el ADN se precipitó con acetato sódico 3 M (1/10 volumen) y etanol absoluto frío (2 volúmenes). Tras un lavado con etanol al 70% se secó el ADN al aire y se resuspendió en agua bidestilada estéril. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso. La concentración del ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. Se trabajó con concentraciones de ADN de 0,2 microgramos/microlitro.

Análisis de la amplificación del gen *CCND1* (CICLINA D1)

El estudio de la amplificación del oncogen *CCND1* se realizó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) múltiple como método semicuantitativo. En cada reacción de PCR se emplearon simultáneamente dos pares de oligonucleótidos, uno para amplificar el gen diana

(*CCND1*) y el otro para el gen control, que se localiza en el mismo cromosoma que el primero (se utilizó el gen de la tirosin-hidroxilasa), lo cual permite excluir falsos positivos procedentes de una posible polisomía del cromosoma en cuestión.

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de propileno de pared fina de 0,2 ml en un volumen final de 20 microlitros, conteniendo 200 micromoles de deoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 2 micromolar de $MgCl_2$, 100 nanogramos de ADN, 0,5 micromolar de cada oligonucleótido, 1X tampón de Amplitaq GOLD y 0,5 U Amplitaq GOLD (Applied Biosystems). Tras un paso previo de 10 minutos a 94°C, requerido para la activación del enzima empleado, las muestras se sometieron a 32 ciclos de amplificación con una temperatura de anillamiento de 60°C. Los cebadores para el gen *CCND1* fueron 5'-CG-TACCCCGATGCCAACC y 5'-ATGGACGGCAG-GACCTCC, amplificando un fragmento de 121 pares de bases (bp). Los cebadores del gen de la tirosina-hidroxilasa fueron 5'-GCCCCAGCTGCATCCTAC y 5'-CTTGGCAGACACCTGGGG, amplificando un fragmento de 188 bp. Los cebadores fueron obtenidos de MWG-Biotech.

Los productos de las reacciones (9 microlitros) se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% (conteniendo 0,5 mg/ml de bromuro de etidio) en tampón TAE. Las bandas correspondientes se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta, y fueron fotografiados con una cámara digital. La amplificación se estimó contrastando siempre las opiniones de dos observadores.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el método de Chi-cuadrado y el test exacto de Fisher, con la ayuda del programa informático SPSS 8,0. Se calcularon las curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las curvas de supervivencia se compararon mediante el método log-rank. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Amplificación de la Ciclina D1

En nuestro estudio hemos encontrado una frecuencia de amplificación del gen de la ciclina D1 del 33,3% de los casos (4/12).

En la figura 1 se muestra un ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de los productos de la



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR semicuantitativa de cuatro casos; los casos 1 y 7 presentan amplificación del gen de la ciclina D1, frente a los casos 6 y 9 que son negativos para dicha amplificación. N, tejido sano; T, tejido tumoral; --, control negativo.

PCR semicuantitativa de cuatro casos, en la que se observa como los casos 1 y 7 presentan un resultado positivo (aumento de la intensidad de la banda perteneciente al gen *CCND1* comparada con la banda correspondiente al gen control) frente a la negatividad de los casos 6 y 9, en los que el gen diana y el gen control presentan la misma intensidad de banda.

Asociación entre la amplificación de *PRAD1* y las características clínico-patológicas

No se encontró asociación entre la amplificación de *CCND1* y el subtipo histológico ($p = 0,091$), aunque los dos únicos casos con patrón tubular y sólido presentaban amplificación del *CCND1* frente a sólo un 20% de los casos con patrón cribiforme (Tabla 1). En lo referente a la localización tumoral tampoco se encontró correlación estadísticamente significativa ($p = 0,344$), sin embargo se halló una mayor frecuencia de amplificación en los casos localizados en el seno maxilar (Tabla 1).

Todos los casos con amplificación del *CCND1* se correspondían con estadios avanzados de la enfermedad (III-IV) (Tabla 1), siendo las diferencias casi significativas ($p = 0,083$) (Tabla 1).

Supervivencia

La supervivencia global de los pacientes estudiados fue del 70% a los 10 años. Como era de esperar, los pacientes en estadios avanzados (III, IVa, IVb) presentaban una menor supervivencia, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa ($p = 0,17$).

Aquellos pacientes que presentaban amplificación del *CCND1* mostraron una menor supervivencia frente a los que no presentaban dicha amplificación (Figura 2). Nuevamente, las diferencias no fueron significativas ($p = 0,16$), lo que puede ser debido al pequeño número de casos estudiados.

Tabla 1: Relación entre la amplificación del CCND1 y las características clínico-patológicas

Característica	Total del CCND1 (%)	Amplificación	P*
Subtipo histológico			0,091
Tubular	1	1 (100)	
Cribiforme	10	2 (20)	
Sólido	1	1 (100)	
Localización			0,344
Maxilar	4	3 (75)	
Etmoides	3	1 (33)	
Fosa nasal	2	0 (8)	
Cavum	1	0 (8)	
Paladar blando	1	0 (8)	
Fosa Pterigopalatina	1	0 (8)	
Estadio T			0,083
II	4	0	
III-IV	8	4 (50)	

* Test de Chi-cuadrado.

DISCUSION

Los estudios abordados hasta la fecha sobre el CAQ a nivel molecular son escasos. Entre los marcadores moleculares descritos, se ha propuesto el valor pronóstico del contenido de ADN (ploidía)⁶, las regiones de organización nucleolar (reflejo del índice de proliferación)⁷, la expresión del antígeno Ki-67⁸ y del PCNA, y el porcentaje de células en fase S⁹.

En cuanto a estudios de expresión proteica de dianas como bcl-2¹⁰, c-erbB-2¹¹, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α)¹², receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)¹³, receptores de estrógenos (ER) y progestágenos (PR)¹⁴, no se ha encontrado ninguna correlación con el grado histológico. La expresión de la proteína c-kit se ha correlacionado con el subtipo histológico sólido, asociado a un peor pronóstico¹⁵.

P53 ha mostrado una expresión variable y poco clara en los CAQ primarios, pero muestra una clara tendencia a la sobreexpresión en las recurrencias tumorales¹⁶.

Uno de los estudios más recientes dirigidos a buscar alteraciones en la expresión génica, llevado

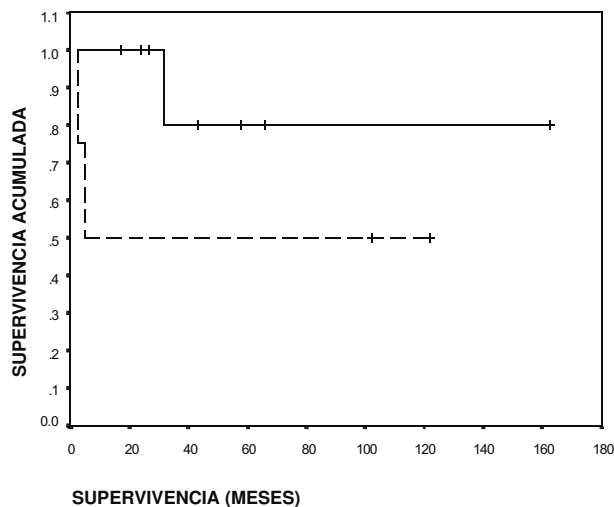


Figura 2. Curva de supervivencia obtenida según el método de Kaplan-Meier en función del estado del CCND1. La línea continua muestra la supervivencia de los pacientes que no presentan amplificación de CCND1 frente a los pacientes que si muestran dicha amplificación (línea discontinua).

a cabo mediante el uso de microarrays de ARN¹⁷, subyacentes al desarrollo de CAQ de glándulas salivares menores, ha demostrado que en estos tumores existe sobreexpresión de ciertos genes que codifican factores de transcripción (SOX 4, AP-2 ALFA, AP-2 GAMMA), componentes de la matriz extracelular, y miembros de las vías de señalización. Uno de los posibles mecanismos que pudieran justificar esta sobreexpresión podría ser la amplificación génica (aumento del número de copias de un gen), que ya ha sido descrito para otro tipo de tumores.

El gen de la ciclina D1 se encuentra con frecuencia alterado en muchos tipos de tumores. Así, la amplificación de la región 11q13, donde se localiza este gen, se ha descrito en varios tumores humanos, entre ellos el carcinoma de mama y el carcinoma escamoso de pulmón¹⁸. En los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (HNSCC) se observó una incidencia de amplificación de CCND1 en el 40% de los casos y de forma más frecuente en pacientes con enfermedad avanzada, patrones histológicos pobremente diferenciados y tumores localmente agresivos; además los tumores que presentan dicha amplificación desarrollan recurrencias con más frecuencia y tienen un riesgo de muerte asociado al tumor⁵.

En nuestro estudio hemos encontrado una frecuencia de amplificación del gen de la ciclina D1 (33,3%) similar a la encontrada en otros tumores de cabeza y cuello. Este gen se convierte entonces en

una de las principales dianas genéticas alteradas en este tipo de tumor. La amplificación se relacionaba con estadios avanzados de la enfermedad; sin embargo tal asociación no fue estadísticamente significativa, debido probablemente a un insuficiente número de casos. Así mismo, tampoco pudimos establecer una correlación estadísticamente significativa entre la amplificación de *CCND1* y factores que se asocian a un peor pronóstico del CAQ, como son el subtipo histológico sólido, o la localización en el seno maxilar; sin embargo, destacamos que de los 4 casos en que se encontró amplificación de *CCND1*, 3 de ellos se localizaban en el seno maxilar (75%).

También hemos hallado una menor supervivencia en los casos con amplificación del *CCND1*, al igual que ocurre en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, que presentan un porcentaje de amplificación del *CCND1* similar. Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos orientan hacia la posible implicación de la ciclina D1 como factor pronóstico en los CAQ de glándulas salivales menores, aunque es necesario continuarlo en un estudio más amplio.

CONCLUSIÓN

En este estudio se describe por primera vez la amplificación del gen *CCND1* en el carcinoma adenóide quístico de glándulas salivales menores. El hecho de que todos los casos positivos para la amplificación de *CCND1* correspondan a estadios avanzados, justifica el interés de realizar un estudio prospectivo en el que se acumule una serie más amplia de casos y poder confirmar, en su caso, el valor de la amplificación de *CCND1* como factor pronóstico.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por una ayuda a la investigación del FIS (00/0171). Las doctoras Juana M. García Pedrero y María V. González Meana están financiadas por una ayuda al Instituto Universitario de Oncología de la Obra Social de Cajatur.

REFERENCIAS

- 1.- Spiro RH, Hooves AG, Strong EW. Adenoid cystic carcinoma: factors influencing survival. *Am J Surg* 1979; 138: 579-83.
- 2.- Fordice J, Kershaw C, El-Naggar A, Goepfert H. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: Predictors of morbidity and mortality. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125: 149-52.
- 3.- Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602: 73-78.
- 4.- Schuurung E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes- a review. *Gene* 1995; 159: 83-96.
- 5.- 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: 3177-82.
- 6.- Franzen G, Klausen OG, Grenko RT, Carstensen J, Nordenskjold B. Adenoid cystic carcinoma: DNA as a prognostic indicator. *Laryngoscope* 1991; 101: 669-73.
- 7.- Xie X, Nordgard S, Halvorsen TB, Franzen G, Boysen M. Prognostic significance of nucleolar organizer regions in adenoid cystic carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 620-23.
- 8.- Nordgard S, Franzen G, Boysen M, Halvorsen TB. Ki-67 as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma assessed with the monoclonal antibody MIB1 in paraffin sections. *Laryngoscope* 1997; 107: 531-36.
- 9.- Bang G, Donath K, Thoresen S, Clausen OPF. DNA flow cytometry of reclassified subtypes of malignant salivary glands tumors. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 291-97.
- 10.- L, Dardick I, Ledin T. Adenoid cystic carcinoma: use of cell proliferation, BCL-2 expression, histologic grade, and clinical stage as predictors of clinical outcome. *Head Neck* 2000; 22:489-97.
- 11.- Cho K-J, Lee S-S, Lee Y-S. Proliferating cell nuclear antigen and c-erbB-2 oncoprotein expression in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. *Head Neck* 1999; 21: 414-19.
- 12.- Chiang CP, Chen CH, Liu BY, Sun A, Leu JS, Wang JT. Expression of transforming growth factor-alpha in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *J Formos Med Assoc* 2001; 100: 471-77.
- 13.- Vered M, Braunstein E, Buchner A. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Head Neck* 2002; 24:632-36.
- 14.- Dori S, Trougouboff P, David R, Buchner A. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptors in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Oral Oncol* 2000; 36:450-53.
- 15.- Jeng YM, Lin CY, Hsu HC. Expression of the c-kit protein is associated with certain subtypes of salivary gland carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 154:107-11.
- 16.- Nogueira CP, Dolan RW, Gooney J, Byahatti S, Vaughan CW, Fuleihan NS, et al. Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1998, 108: 345-50.
- 17.- Frierson HF, El-Naggar AK, Welsh, JB, Sapinoso LM, Su AI, Cheng J, et al. Large scale molecular analysis identifies genes with Altered Expression in Salivary Adenoid Cystic carcinoma. *Am J of Pathol* 2002; 161: 1315-22.
- 18.- Lammie GA, Fanti V, Smith R, et al. D11s287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to bcl-1. *Oncogene* 1991; 6: 439-44.