

Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares

Eduardo Chimenos Küstner ⁽¹⁾, Imma Font Costa ⁽²⁾, José López López ⁽¹⁾

(1) Profesor Titular de Medicina Bucal

(2) Odontóloga. Diplomada en Estudios Avanzados. Facultad de Odontología. Universidad de Barcelona

Dirección para la correspondencia:

Dr. Eduardo Chimenos Küstner

Vía Augusta 124, 1º 3ª

08006 – Barcelona

E-mail: 13598eck@comb.es

Recibido: 5-09-2003 Aceptado: 22-02-2004

Chimenos-Küstner E, Font-Costa I, López-López J. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2004;9: 377-84.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-4447

Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed
-EMBASE, Excerpta Medica
-Índice Médico Español
-IBECS

RESUMEN

El aspecto clínico y en especial el grado de displasia que pueden presentar las lesiones precancerosas de la cavidad oral sugieren su capacidad potencial de malignización. Cada vez es más frecuente encontrar investigaciones orientadas hacia la búsqueda de nuevos marcadores, más específicos, que contribuyan a determinar el grado de alteración celular y permitan una mayor aproximación al conocimiento del grado de degeneración maligna de aquellas lesiones.

En el presente trabajo de revisión se repasan los conceptos más actuales de estos marcadores, agrupados por familias: marcadores de crecimiento tumoral; marcadores de supresión tumoral y de respuesta antitumoral; marcadores de angiogénesis; marcadores de invasión tumoral y de potencial metastatizante; marcadores celulares de superficie; marcadores intracelulares; marcadores derivados del ácido araquidónico y marcadores enzimáticos.

Palabras clave: *Marcadores moleculares, marcadores tisulares, displasia epitelial, leucoplasia oral, carcinoma escamoso oral.*

INTRODUCCION

El diagnóstico de las lesiones precancerosas empieza con el examen clínico, pero el estudio histopatológico es el que proporciona la información de si existe displasia (que hace referencia a diversas alteraciones del normal desarrollo y maduración de un tejido, en particular epitelial) y cuál es el grado de la misma. Este término orienta hacia el potencial o riesgo de malignización (más o menos elevado) de la lesión en cuestión. Sin embargo, los datos que aportan el examen clínico y el estudio histopatológico rutinario no son totalmente satisfactorios. Por esta razón, numerosos investigadores estudian la posibilidad de emplear, de una forma selectiva, otros exámenes más específicos, que permitan valorar las alteraciones celulares.

Se postula que el desarrollo del cáncer es el resultado de la acu-

mulación de errores genéticos en un mismo tejido (1,2), donde también se encuentran implicadas la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (3). Estudios estadísticos de aspectos moleculares sugieren que hacen falta entre 6 y 10 alteraciones genéticas, para que se produzca una transformación maligna de la mucosa oral. Existen diferentes tipos de marcadores celulares y tisulares, que, desde una perspectiva molecular, pueden proporcionar información adicional a la recopilada en el examen clínico y en el estudio histopatológico. Se describen a continuación los más conocidos, así como los aspectos más relevantes de los mismos.

MARCADORES DE CRECIMIENTO TUMORAL

-EGF (Epithelial Growth Factor) (EGF-R, c-erb1-4 o Her-2/neu):

El factor receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) se localiza en el cromosoma 7. Pertenece a la familia erbB, receptores de la tiroquinasa, que está constituida por el gen EGFR, erbB-1, erbB-3 y erbB-4. Es una glucoproteína transmembrana de 170 kDA. Los EGFR o el C-erbB-2 son importantes en la transducción de la diferenciación, el desarrollo y la emisión de la señal mitogénica en las células normales. En diferentes estadios de transformación maligna de los tejidos se produce un aumento anómalo del oncogén erbB-1. Según Werkmeister y cols. (4) se encuentra sobreexpresado en un 20,2% de los carcinomas orales. Se ha localizado una sobreexpresión del gen EGFR en diferentes tumores humanos, incluido el carcinoma oral de células escamosas, y la razón no es bien conocida (5,6). El oncogén erbB-2 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y su sobreexpresión, en un 14,7% de los carcinomas orales, incrementa el potencial de metástasis. Según Werkmeister, las aberraciones de erbB-1 y erbB-2 son marcas que indican que en la lesión puede producirse un proceso de carcinogénesis y conviene recordar que son muy comunes las alteraciones genéticas en lesiones orales premalignas histológicamente no displásicas (4).

-Ciclinas (ciclina A, B, D, E): Son esenciales en el control del

ciclo celular. Su activación avanza el inicio del ciclo celular e incrementa la replicación. Una elevada expresión de cdk_2 es un factor crítico en la progresión del cáncer y se puede utilizar como marcador predictivo en el pronóstico del mismo (7,8). La proteína ciclina D_1 tiene un papel importante en las fases más tardías del proceso de malignización. La CD_1 se encuentra sobreexpresada en un 39,62% de los carcinomas de células escamosas orales y faríngeos (9).

-Antígenos de proliferación celular nuclear: Son proteínas nucleares asociadas con la ADN-polimerasa. Aparecen en la fase final de G_1 y en la fase S. También se considera que forman parte del complejo ciclina D-cdk, donde participan en las fases del ciclo celular. Son indicativos de proliferación celular (7).

-P120: Es un nuevo componente en la familia de las cateninas. Se trata de una proteína asociada a la proliferación nuclear en estadios precoces de la fase S. Se localiza junto al centrómero del brazo largo del cromosoma 11. Las alteraciones del complejo E-caderina-p120 pueden jugar un papel importante en la progresión tumoral. Una pérdida de expresión de este complejo indica que la neoplasia se encuentra en situación de progresión (7).

-Ki-67/MIB: Son anticuerpos monoclonales. Los dos marcadores aumentan cuando hay proliferación tisular. Los niveles de Ki-67 tienen una estrecha relación con el grado histológico del carcinoma de células escamosas oral (7,10).

-AgNOR (Argyrophilic nucleolar organizer-region associated proteins): Las proteínas AgNOR se han definido como anillos de ADN nuclear que codifican para el ADN ribosomal. Son argirofílicas y constituyen un indicador de proliferación nuclear. La cuantificación y distribución de las AgNOR son parámetros subjetivos y no diagnósticos de lesiones específicas, pero son útiles como complemento al estudio histopatológico, para conocer el grado de alteraciones celulares y nucleares existentes (11). Es el único marcador de este grupo que tiene una importante asociación con el pronóstico y podría ser indicativo del grado de malignidad (7,11).

-Skp2 (S-phase kinase-interacting protein 2): Una alta expresión está ligada a una disminución del p27 y se ha relacionado con un pobre pronóstico (7).

-Bcl2/BAG1: La proteína antiapoptótica Bcl2 se encuentra en la membrana mitocondrial (6). Es regulada por la proteína p53. Forma parte del sistema de regulación que controla el ciclo celular y la inducción de la apoptosis (6,7). Altas concentraciones de Bcl2 pueden prevenir la inducción de varias formas de apoptosis (6), dando lugar al desarrollo de carcinomas, favoreciendo la aparición de mutaciones y progresión tumoral. La función de la BAG1 es inversa a la de Bcl2 (7).

-HSP27 y 70 (Heat shock proteins): Parecen estar asociadas con mutaciones del gen p53. La proteína HSP27 se encuentra en mucosa normal y en pequeños tumores. Se detectan niveles elevados de HSP70 en los carcinomas de células escamosas orales. Ambas interactúan con Bcl2, dando soporte al efecto de proliferación (7).

-Telomerasa: Se trata de una estructura proteica del ADN, situada en el extremo de los cromosomas eucariotas (7). La actividad telomérica es esencial para controlar el potencial indefinido de la división y de la inmortalidad de las células eucariotas (7,12). Esta actividad, que en las células somáticas normales no se

detecta, puede valorarse en los tejidos biopsiados (13). Como en otros tumores, esta actividad se utiliza como marcador, en el diagnóstico de lesiones preneoplásicas o neoplásicas de la mucosa oral, ya que entre el 80-90% de los tumores tienen un elevado nivel de expresión telomérica, en particular de la subunidad hTERT (actividad catalítica) (14). La detección, sobre todo de la subunidad hTERT, puede ser útil como marcador de diagnóstico adicional, especialmente en la detección precoz del carcinoma de células escamosas (12,14,15).

MARCADORES DE SUPRESION TUMORAL Y DE RESPUESTA ANTITUMORAL

-Proteína del retinoblastoma (pRb): Es un factor clave del punto de comprobación de G_1 (7); por tanto es la llave del punto R. Koontongkaew y cols. (9) han encontrado una sobreexpresión de esta proteína en un 58,49% de los carcinomas orales estudiados. La desregulación de la pRb da lugar a aberraciones de distintas proteínas celulares, como la CD_1 y la CDK_4 ; este mecanismo es necesario para el desarrollo del cáncer oral y faríngeo.

-Inhibidores de la ciclina dependiente de la quinasa: Hay 2 familias de CDKs: la familia de p21 y la familia de INK4 (7). La p21 es el gen inhibidor universal de las CDKs; se localiza en el cromosoma 6. En condiciones normales forma un complejo con las ciclinas. Hay una asociación entre la expresión de p21 y el grado de diferenciación tumoral (6,15). Es muy posible que la sobreexpresión de p21 sea causada por mecanismos de transactivación p53-independiente (16).

-p53: El p53 es una fosfoproteína de 53 kDa (7), formada por 393 aminoácidos, descubierta en 1970. Tiene un papel importante en el control del ciclo celular, actuando como factor de transcripción (6), de la estabilidad genómica, de la diferenciación celular y de la apoptosis (6,17). Las aberraciones del gen p53 son las alteraciones genéticas más frecuentes en el cáncer oral. La detección de esta proteína suele indicar la ineficacia de los mecanismos estabilizadores, es decir, hay una pérdida de la función proapoptótica, lo que da lugar a un crecimiento continuo tumoral (4). Este gen no se detecta en el estudio inmunohistoquímico de las células normales. La detección de p53 en áreas adyacentes preinvasivas de carcinoma escamoso y de lesiones displásicas sugiere que puede constituir un avance en la historia natural del cáncer oral. En diferentes estudios se ha demostrado, que la expresión de la proteína p53 en biopsias donde existen displasias orales y carcinomas *in situ* es precedida por cambios histológicos malignos en meses o semanas (18). Pero no es posible concluir que se trate de un biomarcador intermedio de riesgo, ya que su mutación es relativamente tardía en el proceso carcinogénico, aun cuando, para Bautista y Santiago (17), la inmunolocalización de la p53 aparece en estadios muy precoces del carcinoma de células escamosas. En todo caso, la mutación de la p53 o su sobreexpresión no son suficientes, para que se desarrolle el carcinoma oral. Esta alteración se encuentra en una proporción que varía entre el 11 y el 80% de los carcinomas aerodigestivos. En un estudio realizado por Schildt y cols. (19) recientemente, se ha encontrado que en un 63% de los carcinomas orales se sobreexpresa la p53 y en un 36% hay mutaciones de la p53. Las alteraciones de expresión de la p53 en las lesiones premalignas se asocian a un aumento de la polisomía cromosómica (1).

-*Bax*: Cofactor de p53 que actúa en la inducción de la apoptosis. Es inducido por la p53. Bajos niveles de Bax se han relacionado con mal pronóstico del carcinoma de células escamosas (7,18).

-*Fas/FasL*: Son mediadores de la apoptosis y pertenecen a la familia de TNF-R (32). FasL se ha encontrado sobreexpresada en carcinoma de células escamosas. Si no se encuentran receptores de Fas, ello indica que hay una pobre diferenciación tumoral (7,20).

-*Células dendríticas (DC)*: Pueden generar una respuesta antitumoral importante. Una sobreexpresión de ellas indica buen pronóstico (7).

-*Cadenas Zeta*: Se han identificado recientemente como parte de receptor de células T, que participan en la defensa tumoral. La carencia de expresión de las cadenas zeta en tumores se ha asociado a menor supervivencia (7).

MARCADORES DE ANGIOGENESIS

La angiogénesis es muy importante en el crecimiento y metástasis de los tumores sólidos. Algunos factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias y angiogéninas son conocidas como promotoras de la angiogénesis tumoral.

VEGF/VEGF-R (vascular endothelial growth factor/receptor): Es una citoquina multifuncional, que controla la angiogénesis y también actúa como factor de supervivencia de las células endoteliales, realzando la expresión de bc12, Bc12 y VEGF. Éstas regulan la expresión de la citoquina proangiogénica interleuquina 8 (IL8) (7).

NOS₂ (Nitric oxide synthase type II): Se considera el responsable de la angiogénesis en los cánceres y también de la diseminación tumoral. El enzima NOS₂ se ha encontrado en las metástasis linfáticas (7).

PD-ECGF (Platelet-derived endothelial cell growth factor): Es una citoquina angiogénica que deriva de las plaquetas. Se han encontrado en los microvasos del carcinoma de células escamosas oral (7).

FGFs (Fibroblast growth factor): Son una familia de polipéptidos que regulan la proliferación y diferenciación celular. El FGF-1 no está directamente relacionado con el proceso de proliferación celular en el carcinoma de células escamosas, aunque una menor concentración de él en la carcinogénesis puede influir en una pobre diferenciación. FGF-2 y FGF-3 pueden influir en la carcinogénesis a través de un mecanismo de autorregulación (21).

MARCADORES DE INVASION TUMORAL Y POTENCIAL METASTASICO

-*MMPs (Matrix-Metallo-Proteases)*: Son metaloenzimas de zinc. Su expresión se ha puesto de manifiesto en el carcinoma de células escamosas oral y se relaciona con el estadio del tumor (7).

-*Catepsinas*: Estas proteasas lisosomales realzan el efecto de la invasión tumoral y sus metástasis (7).

-*Integrinas*: Son una familia de receptores de superficie celular. Estos receptores transmembrana están compuestos por 2 subunidades: alfa y beta. La expresión de la integrina $\alpha_v\beta_6$ es

inducida durante la génesis del tumor y la reparación epitelial. Existen diversos estudios que demuestran que la integrina $\alpha_v\beta_6$ se expresa en el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (7). En el estudio realizado por Hamidi y cols. (22), el 41% de las leucoplasias expresaban la integrina $\alpha_v\beta_6$, que podía estar asociada a procesos de reparación epitelial, inflamación o transformación maligna. La expresión de esta integrina parece ser necesaria, pero no suficiente para que se produzca dicha transformación (7).

-*Caderinas i cateninas*: Su función principal es el mantenimiento de la polaridad y la arquitectura tisular. La expresión de estas moléculas es inversamente proporcional a la diferenciación tumoral (7,23).

-*Desmoplaquina/placoglobina*: Una baja expresión de estas moléculas se ha relacionado con metástasis a distancia (7).

-*Ets-1*: Protooncogén que actúa como un factor de transcripción. Se ha relacionado con el estadio tumoral y las metástasis linfáticas (7).

MARCADORES CELULARES DE SUPERFICIE

-*Carbohidratos*: Un aumento del complejo mucínico en la superficie celular se relaciona con un aumento del grado de displasia.

-*Antígeno de histocompatibilidad (HLA)*: Las moléculas que forman el complejo de inmunohistocompatibilidad clase I tienen un papel muy importante en la inmunidad. El antígeno HLA de clase II se expresa en algunos carcinomas orales y con más frecuencia en los que están poco diferenciados (24).

-*Antígeno CD57*: Se encuentra en la membrana de las células linfoides y neurales. En leucoplasias orales con displasia moderada o severa existe un aumento del porcentaje de linfocitos CD57, respecto a los tejidos normales (17).

MARCADORES INTRACELULARES

-*Citoqueratinas*: Son estructuras proteicas de las células epiteliales. Existen 19 citoqueratinas, que se dividen en 2 subfamilias. Los cambios en la expresión de estas proteínas no se pueden considerar predictores del desarrollo de displasia. La malignización de las lesiones orales se asocia con la desaparición de las citoqueratinas. Se ha visto que la expresión de CK19 en la capa de células suprabasal de la mucosa oral puede utilizarse como marcador diagnóstico de lesiones precancerosas orales. Y la expresión de CK19 se ha localizado en las fases iniciales de la carcinogénesis (25).

MARCADORES DE QUERATINIZACION ANOMALA

-*Filagrinas*: Son proteínas ricas en histidina, que se encuentran en las capas granular y córnea del epitelio normal. Son responsables de la agregación de queratina entre los filamentos, en los estadios finales de la diferenciación de los queratinocitos. En las leucoplasias orales las filagrinas aparecen en el estrato córneo y en los carcinomas orales forman perlas de queratina. Se supone que su expresión es independiente del grado de atipia histológica.

Involucrina: Es un producto de diferenciación de los queratinocitos y se piensa que su expresión es independiente de la agresividad tumoral o de la atipia histológica.

-Proteínas desmosomales: Constituyen un complejo. En un estudio realizado sobre la glicoproteína desmosomal 1 se observó que su expresión estaba muy reducida en tumores primarios poco diferenciados y cuando existían metástasis en ganglios linfáticos cervicales.

-Antígeno de la sustancia intercelular: Se encuentra parcial o totalmente ausente en el 92 % de las leucoplasias orales con displasia y en un 26 % de las leucoplasias sin displasia. La pérdida de expresión de este antígeno se observa en el 95 % de los carcinomas orales.

-Análisis nuclear: El trabajo de Sudbo y cols. (26) expone que se ha producido un avance importante en la valoración del riesgo de cáncer oral en pacientes que tienen leucoplasias, mediante el análisis del ADN. Por tanto, el ADN es un potente predictor de riesgo de la transformación maligna de una lesión (27,28). Una de las técnicas más sensibles en el estudio de los cambios clonales en tumores y lesiones premalignas es el análisis basado en el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). La ventaja de este procedimiento es que precisa una cantidad mínima de ADN. Este análisis puede realizarse con células exfoliadas por raspado de las superficies sospechosas, pudiéndose obtener mucha información mediante una técnica no invasiva. En el análisis nuclear se valoran diferentes parámetros:

1) Estado ploidie del ADN (de apareamiento cromosómico), que refleja el riesgo de cáncer oral (7):

- Anaploide: riesgo alto.

- Tetraploide: riesgo intermedio.

- Diploide: riesgo bajo.

A modo de orientación, el 32% de las leucoplasias orales y el 45% de los carcinomas de células escamosas tienen núcleos anaploides. Un 29% de núcleos anaploides se encuentran en leucoplasias sin displasia, un 22% en leucoplasias con displasia leve y un 67% en leucoplasias con displasia grave. Por tanto, se puede decir que la información molecular permite redefinir la valoración del riesgo de cáncer oral y sirve de guía de tratamiento frente a lesiones como la leucoplasia. Es decir, que las leucoplasias orales anaploides requieren tratamientos más agresivos, para prevenir su evolución hacia la malignidad (26).

2) Polisomía cromosómica: Es un determinante de inestabilidad genética (1,28). Para Kim y cols. (1), en las áreas catalogadas de alto riesgo de malignización existe gran polisomía cromosómica, en comparación con áreas de bajo riesgo. Estas polisomías son mucho más numerosas en epitelios displásicos que en epitelios hiperplásicos.

PRODUCTOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO

Los metabolitos de la lipooxigenasa, incluyendo la prostaglandina E₂, el ácido hidroxieicosatetraenoico y el leucotrieno B₄, se encuentran incrementados en el carcinoma escamoso oral. Sin embargo, no se ha profundizado en el estudio del papel que desempeñan en la potencialidad de malignización (19).

ENZIMAS

La glutatión S-transferasa (GST_s) es un isoenzima que actúa en la segunda fase del metabolismo celular. Pertenece a una compleja familia de proteínas multifuncionales. Desarrolla un papel importante de protección celular frente a agentes citotóxicos y carcinogénicos. Existen 3 tipos de GST: α , β y π . En diversos trabajos se ha demostrado que existe una sobreexpresión de GST- π en los tejidos humanos con cáncer, en lesiones orales premalignas y durante la carcinogénesis oral experimental. Por tanto, puede emplearse como marcador tumoral de lesiones epiteliales premalignas orales. Se ha observado que la displasia epitelial y la GST- π están relacionadas con una disfunción inmunológica local (17).

DISCUSION

El proceso de carcinogénesis es multifactorial y requiere la acumulación de múltiples alteraciones genéticas en las células epiteliales. La inclusión de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico patológico de las biopsias, tanto de lesiones precancerosas como de carcinomas de células escamosas, pueden mejorar ostensiblemente la detección de alteraciones invisibles al microscopio. Ello facilitará una terapia más eficaz en casos donde se detecten alteraciones genéticas en la mucosa oral. En un futuro próximo se podrá identificar a los pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer oral. Recientemente se ha descrito un modelo preliminar de progresión genética para el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Este modelo se basa en detectar las alteraciones genéticas presentes en las lesiones premalignas de cabeza y cuello y la progresión genética hallada en las zonas adyacentes. Mediante este modelo se conocen ciertas características genéticas de las lesiones premalignas, que, si no se tratan en un plazo limitado de tiempo, se convertirán en lesiones cancerosas agresivas (29).

Las investigaciones bioquímicas y de biología molecular que definen los marcadores de evolución de las lesiones premalignas y malignas servirán también para evaluar su pronóstico o la eficacia de los tratamientos. Existen diversos marcadores tisulares. Uno de ellos es la actividad de la telomerasa, cuya cuantificación puede ser un parámetro futuro para el diagnóstico y determinación del pronóstico de las lesiones premalignas y malignas de la mucosa oral. Queda por demostrar que la combinación de la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_6$ con otros posibles marcadores tumorales sea un instrumento útil en la predicción de la transformación maligna de las lesiones de la mucosa oral. Las aberraciones del gen p53 son las alteraciones genéticas más comunes en el cáncer oral, si bien no bastan para justificar el desarrollo del mismo. Pero el papel de esta proteína en el cáncer oral tiene una especial relevancia, por sus implicaciones clínicas (30).

En conclusión, deben continuar y ampliarse las investigaciones en todos los ámbitos mencionados, o en otros nuevos, para conseguir que el estudio del genoma y de los factores relacionados pueda llevarse a cabo mediante técnicas más sencillas y más baratas, que puedan aplicarse en los protocolos diagnósticos rutinarios.

Oral cancer risk and molecular markers

CHIMENOS-KÜSTNER E, FONT-COSTA I, LÓPEZ-LÓPEZ J. ORAL CANCER RISK AND MOLECULAR MARKERS. MED ORAL PATOL ORAL CIR BUCAL 2004;9:377-84.

ABSTRACT

The clinical appearance and, especially, the degree of dysplasia that may be shown by pre-cancerous lesions in the oral cavity suggest a potential for malignisation. An increasing number of studies are seeking new, more specific markers that would help to determine the degree of cell alteration and enable a better understanding of the degree of malignant degeneration of these cells.

The present review considers the most recent findings for these markers, grouping them into families: tumour growth markers; markers of tumour suppression and anti-tumour response; angiogenesis markers; markers of tumour invasion and metastatic potential; cell surface markers; intracellular markers; markers derived from arachidonic acid; and enzymatic markers.

Key words: *Molecular markers, tissue markers, epithelial dysplasia, oral leukoplakia, oral squamous carcinoma.*

INTRODUCTION

Although the diagnosis of precancerous lesions begins with the clinical examination it is the histopathological study which determines the presence and degree of any dysplasia (a term covering various alterations of the normal development and maturation of tissue, particularly epithelial). Thus, information is provided about the potential or risk (to varying degrees) of the lesion in question becoming malignant. However, the data obtained from the clinical examination and routine histopathological study are not entirely satisfactory. Therefore, several researchers have been studying the possibility of using (selectively) other more specific examinations that enable cell alterations to be evaluated.

It is postulated that cancer develops as a result of the accumulation of genetic errors in the same tissue (1, 2) — the activation of oncogenes and the inactivation of tumour suppressor genes also being involved (3). Statistical studies of molecular aspects suggest that between six and ten genetic alterations are required to produce a malignant transformation of the oral mucosa. There are various types of cell and tissue markers that, from a molecular perspective, may provide additional information to that obtained from the clinical examination and histopathological study. In what follows, the most well-known markers are described, along with their most relevant aspects.

TUMOUR GROWTH MARKERS

-EGF (Epithelial Growth Factor) (EGF-R, c-erb1-4 o Her-2/neu) The epithelial growth factor receptor (EGFR) is localised on chromosome 7. It belongs to the erbB family (of tyrosine kinase receptors) comprising the EGFR gene, erbB-1, erbB-3 and erbB-4, and is a transmembrane glucoprotein of 170 kDa.

EGFRs or C-erbB-2s play an important role in the transduction of the differentiation, development and emission of the mitogenic signal in normal cells. At different stages of malignant transformation in tissue an anomalous increase of the erbB-1 oncogene is produced. According to Werkmeister et al. (4) the gene is 20.2% overexpressed in oral carcinomas. Other studies have found an overexpression of the EGFR gene in several human cancers, including oral squamous cell carcinoma, although the reason for this is not well understood (5, 6). The oncogene erbB-2 is localised on the short arm of chromosome 17 and its overexpression (14.7% in oral carcinomas) increases metastatic potential. Werkmeister et al. argue that aberrations of erbB-1 and erbB-2 are signs that a carcinogenic process may be produced in the lesion, and point out that genetic alterations are very common in histologically non-dysplastic, premalignant oral lesions (4).

-Cyclins (cyclin A, B₁, D₁, E) Cyclins are essential in controlling the cell cycle. Their activation triggers the start of the cell cycle and increases replication. A high cdk₂ expression is a critical factor in the progression of cancer and can be used as a predictive marker in its prognosis (7, 8). The cyclin protein D₁ plays an important role in the later stages of the malignisation process. CD₁ has been found to be 39.62% overexpressed in oral squamous cell and pharyngeal carcinomas (9).

-Nuclear cell proliferation antigens These are nuclear proteins associated with DNA-polymerase. They appear in the final phase of G₁ and in the S phase. In addition, they are thought to form part of the D-cdk cyclin complex, where they are involved in phases of the cell cycle. They are indicative of cell proliferation (7).

P120 This is a new component of the catenin family. It is a protein associated with nuclear proliferation in the early stages of the S phase, and is localised next to the centromere of the long arm of chromosome 11. Alterations of the E-cadherin-p120 complex may play an important role in tumour progression. A loss of expression of this complex indicates that the neoplasia is in a state of progression (7).

-Ki-67/MIB These two markers, which are monoclonal antibodies, increase when there is tissue proliferation. Ki-67 levels are closely related to the histological degree of carcinoma in oral squamous cells (7, 10).

-AgNOR (argyrophilic nucleolar organiser region) associated proteins The AgNOR proteins have been defined as loops of nuclear DNA that code for ribosomal DNA. They are argyrophilic and serve as an indicator of nuclear proliferation. Although the quantification and distribution of AgNOR are subjective and non-diagnostic parameters of specific lesions, they are useful as a complement to histopathological study in terms of identifying the degree of any cell and nuclear alterations (11). It is the only marker of this group to show an important association with prognosis and may be indicative of the degree of malignity (7, 11).

-Skp2 (S-phase kinase-interacting protein 2) High expression of this protein is linked to a decrease in p27 and has been associated with poor prognosis (7).

-Bcl2/BAG1 The anti-apoptotic protein Bcl2 is located in the mitochondrial membrane (6) and is regulated by the protein p53. It forms part of the regulatory system that controls the cell cycle and the induction of apoptosis (6, 7). High concentrations

of Bcl2 may prevent the induction of several forms of apoptosis (6), giving rise to the development of carcinomas, promoting mutations and tumour progression. The function of BAG1 is the opposite to that of Bcl2 (7).

-HSP27 and 70 (heat shock proteins) These appear to be associated with mutations of the p53 gene. The HSP27 protein is found in normal mucosa and small tumours. High levels of HSP70 have been detected in oral squamous cell carcinomas. Both proteins interact with Bcl2, lending support to the proliferation effect (7).

-Telomerase This is a DNA protein structure located at the end of eukaryote chromosomes (7). Telomeric activity is essential for controlling the unlimited potential for division and the immortality of eukaryote cells (7, 12). This activity, which is not detected in normal somatic cells, can be evaluated in biopsied tissue (13). As in other tumours, this activity is used as a marker in the diagnosis of pre-neoplastic or neoplastic oral mucosa lesions, as 80-90% of such tumours have high levels of telomeric expression, particularly of the hTERT sub-unit (catalytic activity) (14). Detection (in particular, of the hTERT sub-unit) may be useful as an additional diagnostic marker, especially in the early detection of squamous cell carcinoma (12, 14, 15).

MARKERS OF TUMOUR SUPPRESSION AND ANTI-TUMOUR RESPONSE

-Retinoblastoma protein (pRb) This protein is a key factor in the G₁ check point (7), and is therefore the key to the R point. Koontongkaew et al. (9) found this protein to be 58.49% overexpressed in the oral carcinomas they studied. Deregulation of the pRb gives rise to aberrations in various cell proteins such as CD₁ and CDK₄; this mechanism is necessary for the development of oral and pharyngeal cancer.

-Cyclin-dependent kinase inhibitors There are two families of CDKs: the p21 family and the INK4 family (7). p21 is the universal inhibitory gene of the CDKs, and is localised on chromosome 6. Under normal conditions it forms a complex with cyclins. An association has been found between p21 expression and the degree of tumour differentiation (6, 15). It is likely that the overexpression of p21 is caused by p53-independent transactivation mechanisms (16).

-p53 p53 is a phosphoprotein of 53 kDA (7) comprising 393 amino acids, and was discovered in 1970. It plays an important role in control of the cell cycle, acting as a factor in transcription (6), genomic stability, cell differentiation and apoptosis (6, 17). Aberrations of the p53 gene are the most common genetic alterations in oral cancer. Detection of this protein usually indicates that stabilising mechanisms are inefficient, that is, there is a loss of pro-apoptotic function, giving rise to continued tumour growth (4). This gene is not detected in the immunohistochemical study of normal cells. The detection of p53 in pre-invasive adjacent areas in squamous carcinoma and dysplastic lesions suggests that it may constitute an advance in the natural history of oral cancer. Various studies have shown that expression of the p53 protein in biopsies where there are *in situ* oral dysplasias and carcinomas is preceded, in a period of months or weeks, by malignant histological changes (18). However, it cannot be

concluded that it is an intermediate biomarker of risk as its mutation appears relatively late in the carcinogenic process — despite the fact that, as Bautista and Santiago report (17), the immunolocalisation of p53 appears in the very early stages of squamous cell carcinoma. Whatever the case, the mutation of p53 and/or its overexpression are themselves not sufficient for the development of oral carcinoma. This alteration appears in between 11 and 80% of aerodigestive carcinomas. A recent study by Schildt et al. (19) found p53 to be overexpressed in 63% of oral carcinomas, with p53 mutations in 36%. Altered p53 expression in premalignant lesions is associated with increased chromosomal polysomy (1).

-Bax This is a p53 co-factor which acts in the induction of apoptosis; it is induced by p53. Low levels of Bax have been linked to poor prognosis in squamous cell carcinoma (7, 18).

-Fas/FasL These apoptosis mediators belong to the TNF-R family (32). FasL has been found to be overexpressed in squamous cell carcinoma. The absence of Fas receptors indicates poor tumour differentiation (7, 20).

-Dendritic cells (DC) These are capable of generating an important anti-tumour response. Their overexpression is indicative of a good prognosis (7).

-Zeta chains These have recently been identified as part of the T-cell receptor, which is involved in tumour defence. Lack of zeta chain expression in tumours has been associated with reduced survival (7).

ANGIOGENESIS MARKERS

Angiogenesis is highly important in the growth and metastasis of solid tumours. Some growth factors, inflammatory cytokines and angiogenins are known to promote tumour angiogenesis.

-VEGF/VEGF-R (vascular endothelial growth factor/receptor) This is a multifunction cytokine that controls angiogenesis and also serves as a survival factor in endothelial cells, promoting the expression of bc12, Bcl2 and VEGF. The latter regulate the expression of the proangiogenic cytokine interleukin 8 (IL8) (7).

-NOS₂ (nitric oxide synthase type II) This is thought to be responsible for both angiogenesis in cancers and tumour dissemination. The enzyme NOS₂ has been found in lymphatic metastases (7).

-PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor) This is an angiogenic cytokine derived from platelets. It has been found in the microvessels of oral squamous cell carcinoma (7).

-FGFs (fibroblast growth factor) This family of polypeptides regulates cell proliferation and differentiation. Although FGF-1 is not directly related to the process of cell proliferation in squamous cell carcinoma, a lower concentration of this polypeptide in carcinogenesis may be a factor in poor differentiation. FGF-2 and FGF-3 may be involved in carcinogenesis through an autoregulation mechanism (21).

MARKERS OF TUMOUR INVASION AND METASTATIC POTENTIAL

-MMPs (matrix-metallo proteases) The expression of these zinc metalloenzymes has been found in oral squamous cell carcinoma and is associated with the tumour stage (7).

-*Cathepsins* These lysosomal proteases promote the effect of tumour invasion and its metastases (7).

Integrins A family of transmembrane, cell surface receptors composed of two sub-units: alpha and beta. Expression of the integrin $\alpha_v\beta_6$ is induced during tumour genesis and epithelial repair. Various studies have shown that the integrin $\alpha_v\beta_6$ is expressed in squamous cell carcinoma of the oral cavity (7). Hamidi et al. (22) found that 41% of leukoplakias expressed the integrin $\alpha_v\beta_6$, which may be associated with processes of epithelial repair, inflammation or malignant transformation. The expression of this integrin seems to be necessary, but not sufficient, to produce this transformation (7).

-*Cadherins and catenins* Their main function is maintaining polarity and tissue architecture. The expression of these molecules is inversely proportional to tumour differentiation (7, 23).

-*Desmoplakin/placoglobin* Low expression of these molecules has been associated with distant metastasis (7).

-*Ets-1* A protooncogene that acts as a transcription factor. It has been linked to tumour stage and lymphatic metastases (7).

CELL SURFACE MARKERS

-*Carbohydrates* Increased levels of the mucin complex at the cell surface are associated with a heightened degree of dysplasia.

-*Histocompatibility antigen (HLA)* The molecules which form the class-I immunohistocompatibility complex play a highly important role in immunity. The class-II HLA antigen is expressed in some oral carcinomas, and more commonly in those with little differentiation (24).

-*CD57 antigen* This is found in the membrane of lymphoid and neural cells. The percentage of CD57 lymphocytes is increased in oral leukoplakias with moderate or severe dysplasia compared with normal tissue (17).

INTRACELLULAR MARKERS

-*Cytokeratins* These are epithelial cell proteins. There are 19 cytokeratins, divided into two sub-families. Changes in the expression of these proteins cannot be considered predictive of the development of dysplasia. The malignisation of oral lesions is associated with the disappearance of cytokeratins. Research has shown that the expression of CK19 in the suprabasal cell layer of the oral mucosa can be used as a diagnostic marker of pre-cancerous oral lesions; CK19 expression has also been localised in the early stages of carcinogenesis (25).

MARKERS OF ANOMALOUS KERATINISATION

-*Filaggrins* These proteins, rich in histadine, are found in the granular and corneal layers of the normal epithelium. They are responsible for aggregating keratin between the filaments in the final stages of keratinocyte differentiation. In oral leukoplakias, filaggrins appear in the corneal layer, while in oral carcinomas they form keratin pearls. Their expression is thought to be independent of the degree of atypical histology.

-*Involucrin* The expression of this product of keratinocyte differentiation is thought to be independent of tumour aggressivity and atypical histology.

-*Desmosomal proteins* These constitute a complex. A study of desmosomal glycoprotein 1 found that its expression was greatly reduced in primary tumours with low differentiation and when there was metastasis in cervical lymphatic ganglia.

-*Intercellular substance antigen* This is partially or totally absent in 92% of oral leukoplakias with dysplasia and in 26% of leukoplakias without dysplasia. The loss of expression of this antigen is observed in 95% of oral carcinomas.

-*Nuclear analysis* Sudbo et al. (26) argue that DNA analysis constitutes an important advance in the evaluation of the risk of oral cancer in patients with leukoplakias. Therefore, DNA is a powerful predictor of the risk of a lesion's malignant transformation (27, 28). One of the most sensitive methods for studying clonal changes in tumours and premalignant lesions is analysis based on the polymerase chain reaction (PCR). The advantage of this procedure is that it requires a small amount of DNA. The analysis can be performed with cells scraped from suspicious surfaces and enables much information to be obtained through what is a non-invasive technique. The parameters evaluated in nuclear analysis include:

1) DNA ploidy state (of chromosomal pairing), which reflects the risk of oral cancer (7):

- Anaploidy: high risk

- Tetraploidy: intermediate risk

- Diploidy: low risk

As a guideline, 32% of oral leukoplakias and 45% of squamous cell carcinomas have anaploid nuclei. Anaploid nuclei are found in 29% of leukoplakias without dysplasia, in 22% of leukoplakias with mild dysplasia, and in 67% of leukoplakias with severe dysplasia. Therefore, it can be said that molecular information enables the evaluation of the risk of oral cancer to be redefined and serves as a treatment guide in the case of lesions such as leukoplakia. In other words, anaploid oral leukoplakias require more aggressive treatments in order to prevent them becoming more malignant (26).

2) Chromosomal polysomy: this determines genetic instability (1, 28). Kim et al. (1) reported extensive chromosomal polysomy in areas classified as high risk of malignisation compared with low-risk areas. These polysomies are much more numerous in dysplastic epithelia compared with hyperplastic epithelial cells.

ARACHIDONIC ACID PRODUCTS

Levels of lipoxigenase metabolites, including the prostaglandin E₂, hydroxyeicosatetraenoic acid and the leucotriene B₄, have been found to be increased in oral squamous carcinoma. However, the role they play in the potential for malignisation has yet to be studied in detail (19).

ENZYMES

Glutathione S-transferase (GST_s) is an isoenzyme that acts in the second phase of cell metabolism. It belongs to a complex family of multifunctional proteins and plays an important role in protecting the cell against cytotoxic and carcinogenic agents. There are three types of GST: α , β and π . Various studies have shown that GST- π is overexpressed in human cancer tissue, in premalignant oral lesions and during experimental oral carci-

nogenesis. Therefore, it may be used as a tumour marker of premalignant oral epithelial lesions. Epithelial dysplasia and GST- π have been found to be related to local immunological dysfunction (17).

DISCUSSION

Many factors are involved in the process of carcinogenesis and it requires the accumulation of multiple genetic alterations in epithelial cells. The inclusion of molecular biology techniques in the pathological diagnosis of biopsies, for both pre-cancerous lesions and squamous cell carcinomas, may improve ostensibly the detection of alterations which are invisible to the microscope. This will enable therapy to be more effective in cases where genetic alterations in the oral mucosa are detected. In the near future it will be possible to identify those patients at high risk of developing oral cancer. Recently, a preliminary model of genetic progression has been reported for head and neck squamous cell carcinoma. This model involves detecting the genetic alterations present in premalignant head and neck lesions, along with the genetic progression found in adjacent areas. Certain genetic characteristics of premalignant lesions are thus revealed which, if not treated within a given period, will become aggressive cancerous lesions (29).

Biochemical and molecular biological studies that define markers for the evolution of premalignant and malignant lesions will also serve to evaluate prognosis and treatment efficacy. Various tissue markers have been identified. One of these is telomerase activity, whose quantification may in the future become a parameter for diagnosing and determining the prognosis of premalignant and malignant oral mucosa lesions. It remains to be seen, however, whether the combination of integrin $\alpha_6\beta_6$ expression with other possible tumour markers is indeed a useful instrument for predicting the malignant transformation of such lesions. The most common genetic alterations in oral cancer are aberrations of the p53 gene, although these alone do not account for its development. However, the role of this protein in oral cancer is of particular relevance due to its clinical implications (30).

In conclusion, research should be continued and extended in all the abovementioned areas, as well as in new ones, so that study of the genome and related factors can be carried out through simpler and cheaper techniques which, in turn, can be applied in routine diagnostic protocols.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Kim J, Shin DM, El-Naggar A, Lee JS, Corrales C, Lippman SM et al. Chromosome polysomy and histological characteristics in oral premalignant lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:319-25.
2. Joseph BK. Oral cancer: prevention and detection. *Med Princ Pract* 2002;11:132-5.
3. Sudbo J, Bryne M, Johannessen AC, Kildal W, Danielsen HE, Reith A. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. *J Pathol* 2001;194:303-13.
4. Werkmeister R, Brandt B, Joos V. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol* 2000;36:100-5.
5. De Vicente JC, Esteban I, Germanà A, Vega JA. Expresión de las proteínas de los proto-oncogenes ErbB-3 y ErbB-4 en el carcinoma oral de células escamosas: estudio piloto. *Med Oral* 2003;8:374-81.
6. Whyte DA, Broton CE, Shillitoe EJ. The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53?. *J Oral Pathol Med* 2002;31:25-33.
7. Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer -A review.

- J Oral Maxillofac Surg 2003;32:233-45.
8. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Ueda Y, Misawa K, Haida H et al. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2000;36:194-8.
9. Koontongkaew S, Chareonkitkajorn A, Chavitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P. Alterations of p53, pBb, cyclin D₁ and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000;36:334-9.
10. Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002;31:598-604.
11. Cano LC, Álvarez GJ, Valencia WA, Ramírez JA, Prada CA. Análisis del marcador tisular AgNOR en leucoplasia y carcinoma escamocelular oral. *Medicina Oral* 2002;7:17-25.
12. Ries JC, Hassfurther E, Steininger H, Kloss FR, Wiltfang J, Girod SC, Neukam FW. Correlation of telomerase activity, clinical prognosis and therapy in oral carcinogenesis. *Anticancer Res* 2001;21:1057-64.
13. Liao J, Mitsuyasu T, Yamane K, Ohishi M. Telomerase activity in oral and maxillofacial tumors. *Oral Oncol* 2000;36:347-52.
14. Lee B-K, Diebel E, Neukam FW, Wiltfang J, Ries J. Diagnostic and prognostic relevance of expression of human telomerase subunits in oral cancer. *Int J Oncol* 2001;19:1063-8.
15. Epstein JB, Zhang L, Poh C, Nakamura H, Berean K, Rosin MI. Increased allelic loss in toluidine blue-positive oral premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:45-50.
16. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi Di, Mizuno A. P53, mdm2 and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: Relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:593-600.
17. Bautista AM, Santiago R. Immunolocalization of p53, Glutathione S-transferase pi and CD57 antigens in oral leukoplakia. *Anticancer Res* 2001; 21:379-86.
18. Cruz I, Napier SS, van der Waal I, Sniijders PJ, Walboomers JM, Lamey PJ et al. Suprabasal p53 immunorexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol* 2002;55:98-104.
19. Schildt EB, Nylander K, Eriksson M, Hardell L, Magnusson A, Roos G. Expression of p53, PCNA, ki-67 and bcl-2 in relation to risk factors in oral cancer -a molecular epidemiological study. *Int J Oncol* 2003;22:861-8.
20. Muraki Y, Tateishi A, Seta C, Fukuda J, Haneji T, Oya R et al. Fas antigen expression and outcome of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000;29:360-5.
21. Wakulich C, Jackson-Boeters L, Daley TD, Wysocki GP. Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:573-9.
22. Hamidi S, Salo T, Kainulainen T, Epstein J, Lerner K, Larjava H. Expression of $\alpha_6\beta_6$ integrin in oral leukoplakia. *Brit J Cancer* 2000;82:1433-40.
23. Bánkfalvi A, Krabort M, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Deranged expression of the E-cadherin/b-catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2002;31:450-7.
24. Chung-Ji L, Yann-Jinn L, Hsin-Fu L, Ching-Wen D, Che-Shoa C, Yi-Shing L et al. The increase in the frequency of MICA gene A6 allele in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002;31:323-8.
25. Nie M, Zhong L, Zeng G, Li B. The changes of cytokeratin 19 during carcino-genesis. *Zonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002;37:187-90.
26. Sudbo J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A. DNA content as a prognostic marker in patient with oral leukoplakia. *N Engl J Med* 2001;344:1270-8.
27. Lippman SM, Hong WK. Molecular markers of the risk of oral cancer. *N Engl J Med* 2001;344:1323-6.
28. Zhang L, Cheung K-J, Lam WL, Cheng X, Poh C, Priddy R et al. Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites. *Cancer* 2001;91:2148-55.
29. Califano J, Westra WH, Meiningner G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* 2000;6:347-52.
30. Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2 and ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:532-40.