

Utilidad del análisis de DNA polimerasa en el diagnóstico de tumor en cuello de primario desconocido

M. C. Juan Carlos Cruz-Castillo,* Dra. Sofía Cruz-Martínez,** M. M. C. Sergio Caretta-Barradas***

Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Oncología
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción. La mayoría de los carcinomas metastásicos a ganglios linfáticos de la mitad superior del cuello, se originan de un sitio primario en la cabeza y en el cuello. Los carcinomas escamocelulares en la mitad inferior de cuello pueden representar un sitio primario en cabeza y cuello, así como en el tracto esofágico, pulmonar o genitourinario. El material genómico puede ser detectable en el tejido ganglionar del cuello después de una amplificación de DNA usando la reacción de cadena polimerasa.

Objetivo. Análisis de PCR (*Polimerasa Chain Reaction* o Reacción de Cadena de la Polimerasa) para determinar su utilidad en el diagnóstico de Ca escamoso de cuello de tumor primario desconocido.

Material y métodos. Se trabajó con nueve biopsias previamente diagnosticadas con carcinoma epidermoide de cuello de primario desconocido, obtenidas en forma directa de pacientes de ambos sexos (tres femeninos y seis masculinos), mayores de 40 años, con antecedentes genéticos y tabaquismo positivos, revisión de historias clínicas, laboratorio y gabinete disponibles en los expedientes. Se realizó a todas las biopsias amplificación del DNA y análisis con la técnica de DNA polimerasa, descrita por Kary B. Mullis.

Resultados. Los resultados que obtuvimos con las nueve biopsias, tomadas directamente y procesadas con PCR, nos concluyen que se puede detectar el tumor primario desconocido de un tumor de células escamosas metastásico de cuello; de igual forma, se puede determinar el riesgo oncogenético, con una $t = 1.803$ y $p = 0.191$, comprobación de hipótesis de $t = 1.927$, y un nivel de confianza de 85.25%.

Discusión y conclusiones. La PCR es útil en oncología para evidenciar mutaciones activadoras de oncogenes o supresoras de antioncogenes, con el fin de detectar reajustes cromosómicos presentes en los procesos neoplásicos y para detectar virus y secuencias oncogénicas. Tiene múltiples aplicaciones en los diferentes campos de la biomedicina.

Palabras clave: DNA polimerasa, PCR, carcinoma epidermoide, cuello.

Usefulness of the DNA polimerasa analysis in the unknown-primary neck tumor diagnosis

SUMMARY

Introduction. Most of the metastatic carcinoma from lymphatic ganglia of the upper neck halfdome from a primary site in head and neck. The squamocellular carcinoma in the lower neck half can represent a primary spot in head and neck, as well as in the esophageal, pulmonary or genitourinary tract. The genomic material can be detectable in the neck ganglial tissue after DNA amplification by polimerasa chain reaction.

Objective. PCR (*Polimerasa Chain Reaction*) analysis to determine the usefulness to diagnose the squamous carcinoma of unknown primary neck tumor.

Material and methods. Nine previously diagnosed biopsies with neck epidermoid carcinoma of unknown-primary tumor were directly taken and analyzed from patients of both sexes (three female and six male), older than 40 years, genetic background and positive smoking. Revision of clinical records, laboratory and study data available in files. DNA amplification and DNA Polimerasa technique analysis, as described by Kary B. Mullis, were applied to all biopsies.

Results. The obtained results from the nine biopsies, directly taken and PCR processed, lead us to infer that the unknown-primary tumor can be detected from a neck squamocellular metastatic tumor and so the oncogene risk can be determined likewise, with a $t = 1.803$ and $p = 0.191$, and a hypothetic check-up of $t = 1.927$ with reliability level of 85.25%.

Discussion and conclusions. The PCR is very useful in oncology to demonstrate the activating mutations of oncogenes, or else the suppressors' mutations of antioncogenes, so that we can detect chromosomal rearrangements that are present in the neoplastic processes and to detect viruses and oncogenic sequences. Finally, it has a lot of applications in the various biomedical fields.

Key words: DNA Polimerasa, PCR, epidermoid carcinoma, neck.

* Residente de cuarto año de la especialidad y residencia en otorrinolaringología. Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ** Asesor Científico, *** Asesor Interino

Correspondencia:
Dr. Juan Carlos Cruz-Castillo.
Calle 7 No. 60 Col. Reforma Social. C.P. 11650. Del. Miguel Hidalgo. México, D.F. E-mail: drcastillo69@yahoo.com.mx

Recibido: Septiembre 21, 2004.

Aceptado: Febrero 18, 2005.

Introducción

El cáncer de cabeza y cuello ocupa el sexto lugar en la prevalencia mundial; en la República Mexicana comprende 5.2% de todos los casos. Predomina en el sexo masculino a razón de 3:1, aparece entre la quinta y sexta décadas de la vida, y el tabaquismo, alcoholismo y predisposición genética se asocian con el carcinoma escamocelular de cabeza y cuello.

Alrededor de 15% de las neoplasias pueden relacionarse, en cuanto a incidencia, con infecciones virales como el virus Epstein-Barr, el virus del papiloma humano, especialmente los tipos 6, 11, 16, 18, 30, 31 y 33, y el virus de la inmunodeficiencia humana. Un sujeto es portador de una metástasis en cuello de tumor primario desconocido cuando es imposible detectar el tumor primario después de realizar una cuidadosa historia clínica, examen físico completo, estudios de laboratorio pertinentes, radiografías de tórax, endoscopia de la vía respiratoria-digestiva alta, y del árbol traqueobronquial, además de la exploración de las regiones anatómicas que constituyan un posible origen del tumor primario.

La mayoría de los carcinomas epidermoides metastásicos a ganglios linfáticos de la mitad superior del cuello, se originan de un sitio primario de la cabeza y el cuello. Los carcinomas escamocelulares metastásicos, en la parte inferior del cuello, pueden representar un sitio primario en la cabeza y en el cuello, en el tracto esofágico, pulmonar o genitourinario.

Estudios recientes sugieren que los pacientes con tumores metastásicos de primario desconocido tienen un mínusculo tumor totalmente asintomático, demostrable por la evidencia de cambios genéticos idénticos en las células neoplásicas de los ganglios metastásicos y la mucosa aparentemente normal.

Excepto para el carcinoma epidermoide metastásico al cuello compatible con un tumor primario de la vía respiratoria-digestiva alta, se reconoce poco valor intentar localizar el origen del tumor primario; en lugar de esto, el enfoque diagnóstico se dirige a identificar grupos de pacientes con neoplasias sensibles a un tratamiento exitoso, como linfoma, tumor de células germinales o cáncer de células pequeñas.

Los sitios más frecuentes de tumor primario están señalados en la *figura 1*. Más de 60% de los tumores cervicales en un adulto mayor de 40 años son causados por tumores malignos, y de esto, 80% comprenden adenopatías metastásicas, mientras que 20% restante constituye un tumor primario del área, como una neoplasia de las glándulas salivales, de tiroides o sarcomas o linfomas. En 85% de los casos con metástasis ganglionares cervicales, el tumor primario se localiza en el área de cabeza y cuello; en 5% de los sujetos no hay un sitio demostrable de tumor primario.

La mayoría de los estudios a gran escala han revelado que los carcinomas de pulmón y de páncreas son los carcinomas primarios más comunes que se presentan inicialmente como carcinoma de primario desconocido.

Actualmente es posible el diagnóstico molecular de enfermedades mendelianas y de virus relacionados con el cáncer, para lo cual se requiere del DNA genómico del paciente y de herramientas o técnicas de diagnóstico.

La Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) ha reemplazado paulatinamente las técnicas convencionales y de hibridación tipo Southern. La técnica permite reproducir en laboratorio millones de copias de un segmento del gen que se desea analizar y que se encuentra en muy bajas cantidades en el material clínico a analizar.

La presente investigación intenta realizar una integración clínica entre las especialidades de Otorrinolaringología, Oncología y Patología (Biología molecular), así como determinar la utilidad de las reacciones con marcadores tumorales como la PCR en el estudio de la etiología del Ca escamoso de cuello de primario desconocido.

Método

Se trabajó con nueve pacientes previamente diagnosticados con cáncer escamoso metastásico a cuello de primario desconocido, en etapas III y IV.

Se incluyeron pacientes de ambos sexos (tres femeninos y seis masculinos), mayores de 40 años de edad (con una media de 52.5 años), con antecedentes positivos genéticos, de tabaquismo, de exposición o contacto con solventes o hidrocarburos, y de infecciones virales (Epstein-Barr y virus del Papiloma humano).

Se procedió a la revisión de las historias clínicas, exámenes de laboratorio y de gabinete disponibles en los expedientes de los pacientes.

Se obtuvieron nueve biopsias directas de cáncer epidermoide de cuello de primario desconocido.

Procesamiento de las muestras

Todas las muestras que fueron analizadas por el método histopatológico, se fijaban en una solución de formol buffer

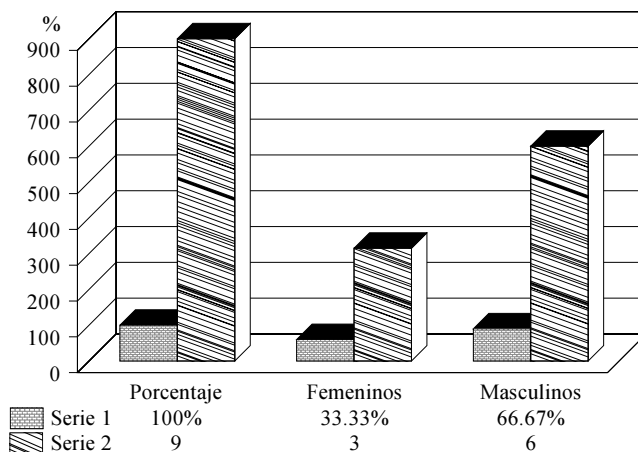


Figura 1. Distribución por sexo de la población estudiada. De la población estudiada, los pacientes de sexo femenino representan 33.33%, los pacientes de sexo masculino representan 66.67%.

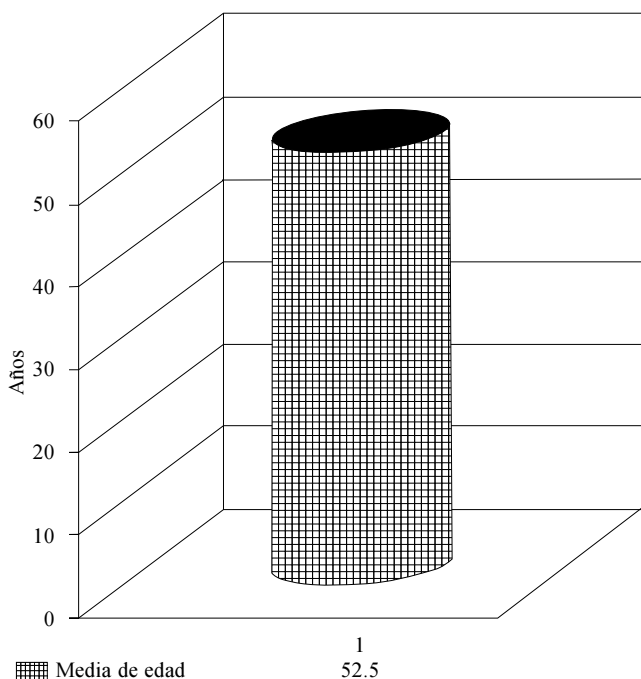


Figura 2. Media de edad de la población total. La media de la edad de nuestra población estudiada es de 52.5 años.

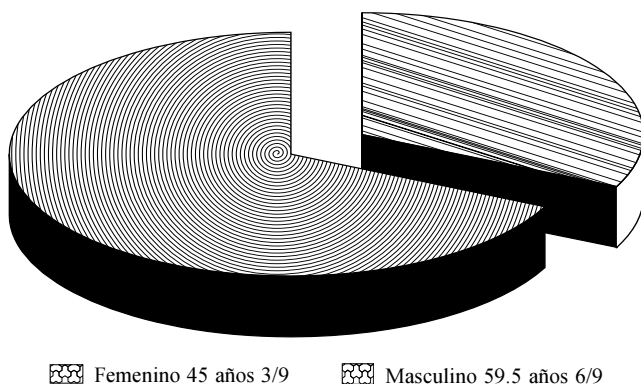


Figura 3. Media de edad por sexo. De la población total, los pacientes femeninos presentan una m = 45 años y los pacientes masculinos una m = 59.5 años.

a 10% y luego se incluían en parafina. Se realizaron cortes de 5 mgr y coloración con hematoxilina-eosina (H-E) para la interpretación con el microscopio de luz.

Se obtuvo con un micrótopo una media de tres cortes de 40 mm de los bloques incluidos en parafina, usando cuchillas desechables. El micrótopo se había irradiado con UVC entre 15 y 30 minutos previos a su utilización. A los cortes se les realizó microdissección cuidadosa para separar el tejido tumoral del normal.

Sólo se utilizaron para la extracción del DNA, áreas que correspondían claramente a tejido normal o tumoral. Las áreas microseccionadas se desparafinaron y se les realizó digestión con proteinasas K durante 48-72 horas, tal como describieron Wrigth y Manos.

Posteriormente, a la inactivación por calor de la proteínaasa K, la fase acuosa obtenida se empleó como molde para la PCR.

Resultados

Se estudiaron con técnica de PCR nueve muestras de biopsias, con diagnóstico de Ca epidermoide de primario desconocido en etapas III y IV. Las muestras fueron tomadas en forma directa.

El rango de edad de los pacientes fue de 40 a 70 años (con una media de 52.5 años) (Figura 1), siendo el sexo femenino el de menor rango de edad (40-55 años) y el sexo masculino el de mayor rango de edad (48-70 años) (Figura 2). El sexo femenino representa 33.33% del total de pacientes (tres pacientes); y el sexo masculino representa 66.67% del total de pacientes (seis pacientes) (Figura 3). El Ca que se presentó con más frecuencia en nuestras muestras fue el Ca CU en 3/9 con 48.0%, en segundo lugar el Ca Gástrico 2/9 con 32.0%; Ca Pulmonar 1/9 con 5.0%. Osteosarcoma 1/9 con 5.0%; Ca Pancreático 1/9 con 5.0% y Ca de Próstata 1/9 5.0% (Figura 4).

La valoración con la técnica PCR para Ca de células escamosas de primario desconocido fue de nueve muestras con $t = 1.803$; $p = 0.191$.

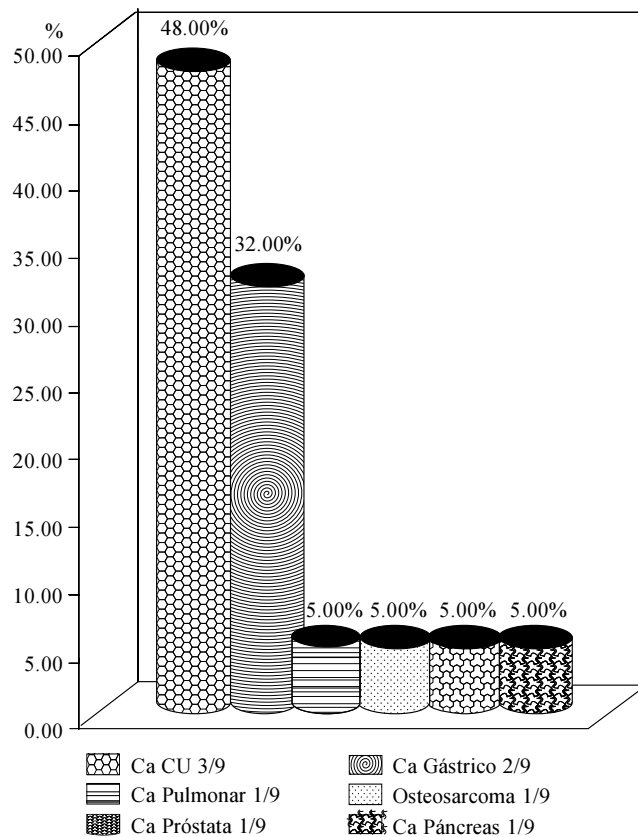


Figura 4. Frecuencia de Ca en la población estudiada. El Ca que se determinó con más frecuencia en nuestra población fue el Ca CU (48.0%), gástrico (32.0%), pulmonar, osteosarcoma, próstata y pancreático (5.0%).

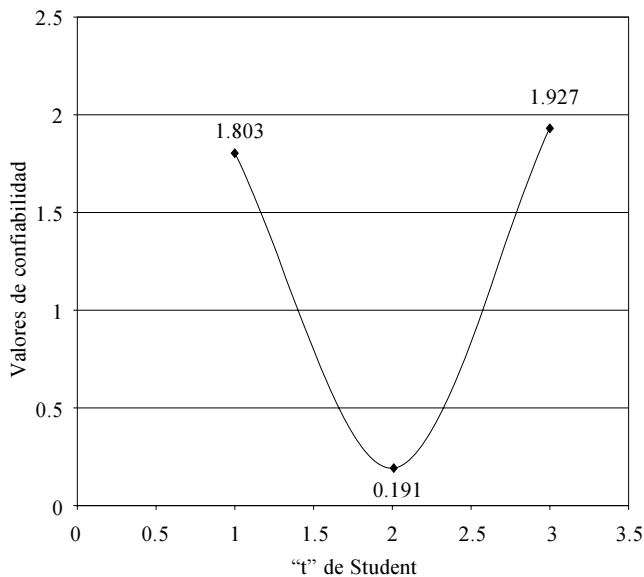


Figura 5. La gráfica muestra el resultado de la "t" de Student en relación con la prueba de hipótesis, sin gran variación de nuestros resultados y permitiendo aceptar nuestra hipótesis.

Prueba de hipótesis

A fin de comprobar la hipótesis planteada se realizó el análisis estadístico "t" Student, siendo el resultado $t = 1.927$ (Figura 5), con un nivel de confianza de 85.25%, con 72 grados de libertad, la cual resultó ser significativa, permitiendo aceptar la hipótesis que predice que las técnicas de reacción de cadena de DNA polimerasa, practicadas en piezas quirúrgicas obtenidas por biopsias directas, son de gran utilidad para realizar una distinción genética y oncogénica para la orientación clínica y química hacia la etiología del tumor escamoso metastásico de cuello de primario desconocido, aceptando la hipótesis de trabajo y confirmándola con la prueba de correlación de Sperman, la cual indica como resultado 88.15%, y se probó con una prueba de hipótesis "t" para rangos, resultando ser significativa de 1.80, lo que permite dar por positivos los fines de este estudio.

Discusión

El cáncer de células escamosas representa 90% de todos los cánceres de cabeza y cuello; sin embargo, es también el mayor tipo histológico entre los tumores del pulmón, esófago, cervix y piel. Cerca de un tercio de pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello se presentan con enfermedad de estadio temprano (estadios I y II), mientras dos tercios se presentan con enfermedad avanzada (estadios III y IV).²

En los últimos 20 años ha habido claros mejoramientos en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello, especialmente por el progreso en los campos de la cirugía y la radioterapia. Ruud H. Brankenhoff,³ en 1999, en su estudio de detección de células escamosas de

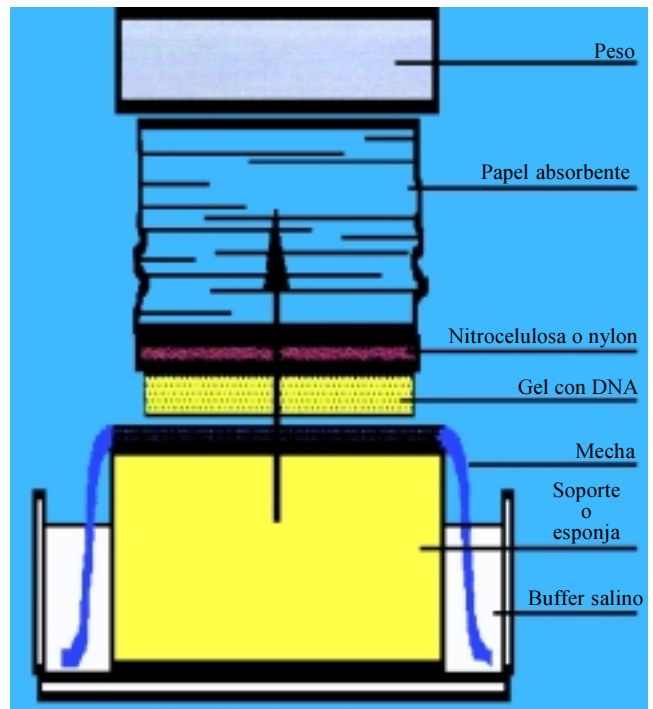


Figura 6. Procesamiento de las muestras. Transferencia Sothem. La solución buffer sube por la mecha hacia el papel absorbente. A su paso arrastra los fragmentos de DNA en el gel hacia la membrana de nitrocelulosa o nylon, que los inmoviliza en la misma posición en que se encontraban en el gel.

cáncer de cabeza y cuello por PCR, resalta la importancia de detectar los pequeños depósitos de tumor indetectables ("enfermedad residual mínima"); sin esta determinación, existirá una falla en el diagnóstico y el tratamiento. Esta aseveración se logró observar en nuestro estudio en donde la población femenina (3/9 pacientes) presentó un riesgo oncogénico alto, relacionado con la sensible detección por PCR (a la espectrofotometría o hibridación) de la presencia del VPH, así como con antecedentes positivos al tabaco y alcohol.

Al analizar las biopsias con diagnóstico histopatológico de Ca epidermoide de los pacientes femeninos, se determinó por PCR, como lo describe Kary B. Mullis,⁴ la presencia del VPH, y por el número y secuencia de oligonucleótidos y proteínas, la presencia de células endometriales, concluyendo como tumor primario un cáncer cervicouterino (49% de nuestra población), al compararlo con el número y secuencia de oligonucleótidos y proteínas de células endometriales ya determinadas y de uso exclusivo del laboratorio (Cuadro 2).

Lo anterior concuerda con las aseveraciones de Barrera Saldaña H. (biología molecular y medicina),⁵ en el sentido de que en el área de oncología es útil la PCR para detectar reajustes cromosómicos, presentes en procesos neoplásicos, y para detectar virus y secuencias oncogénicas.

De igual manera, se detectó por PCR la presencia del virus de Epstein-Barr tipo 6, en un paciente masculino con diagnóstico de Ca epidermoide en cuello (1/9 pacientes = 5.5%), determinando la presencia de células gástricas con

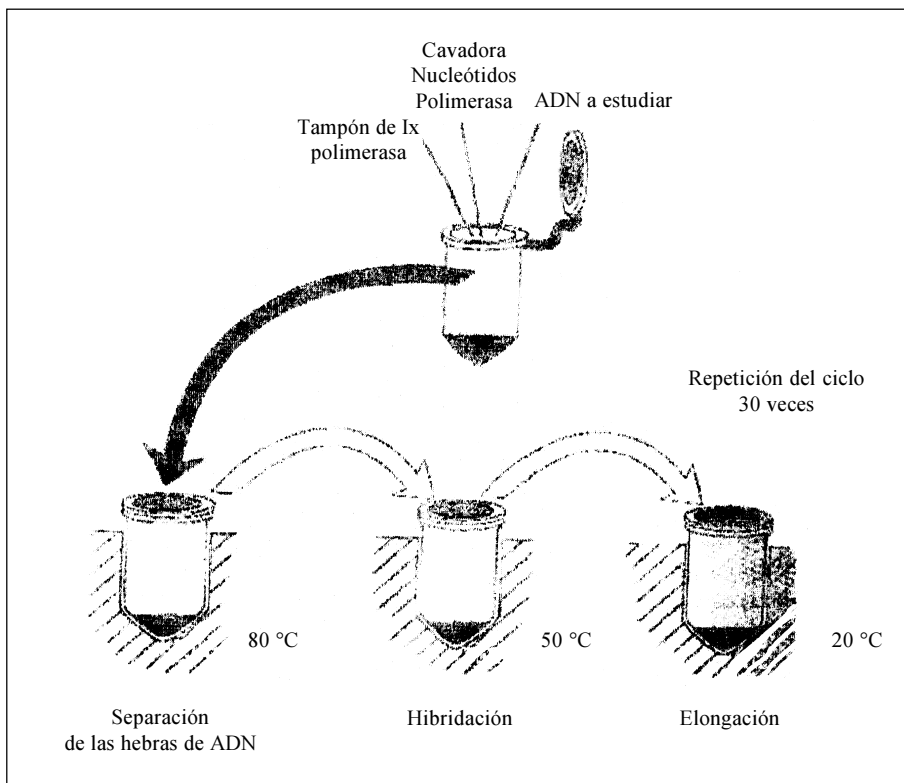


Figura 7. Análisis molecular PCR. Los pasos básicos del análisis molecular de la PCR.

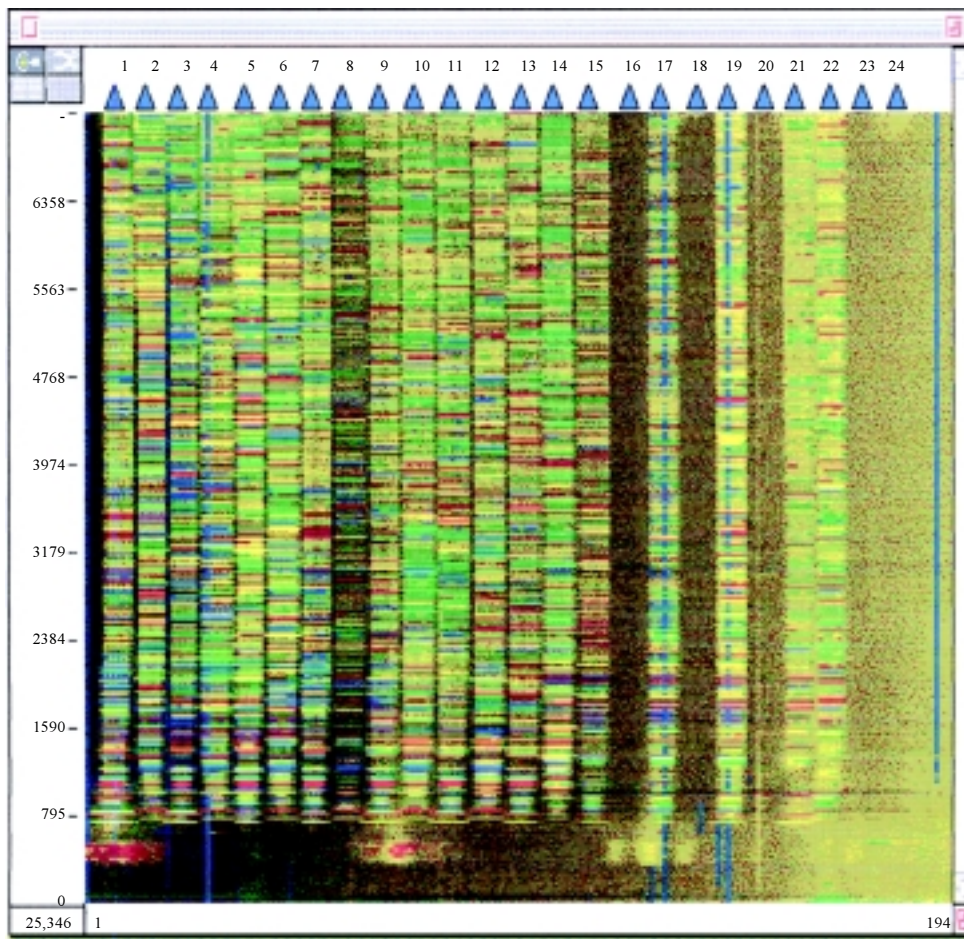


Figura 8. Espectrofotometría. Imagen virtual de gel de secuencias típico. Cada línea corresponde a una muestra diferente, cada color representa un oligonucleótido, con valores proteicos y moleculares únicos.

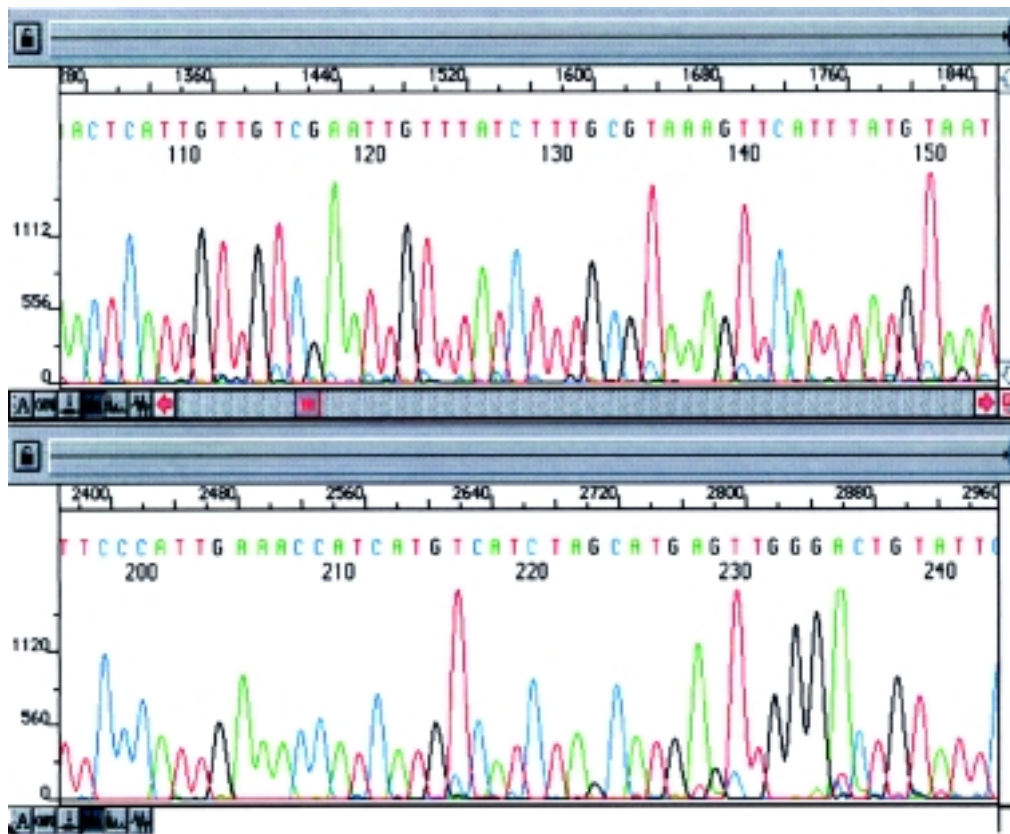


Figura 9. Electroferograma. La gráfica representa el electroferograma de una de las líneas del gel

Cuadro 1. Sitio de tumores en pacientes con ganglios cervicales metastásicos en estudio.

Sitio primario	Porcentaje
Tiroides	20
Orofaringe	15
Nasofaringe	15
Hipofaringe	10
Bronquios	20
Vías gastrointestinales	10
Sitios distantes varios (pulmón, mama, próstata)	10

mutaciones genéticas y concluyendo la presencia de Ca gástrico como tumor primario (*Cuadro 2*).

A 20 años de su descubrimiento, la PCR se lleva a cabo en muchos laboratorios y con múltiples aplicaciones en los diferentes campos de la biomedicina, dentro de los cuales se pueden mencionar: la genética, inmunología, oncología, microbiología, medicina legal, paleontología, biología molecular, ingeniería genética y biotecnología.

Al utilizar la técnica del DNA polimerasa como análisis de piezas quirúrgicas en nuestro estudio, a pesar de ser una población reducida de pacientes, hemos podido constatar en una proporción considerable (9/9 pacientes) su utilidad como herramienta diagnóstica en el estudio de tumores de origen

Cuadro 2. Hallazgos y análisis de las biopsias estudiadas.

Paciente	Dx. Inicial	Hallazgos	Análisis
1	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Células cervicouterinas más VPH.	Número y secuencia de oligonucleótidos.
2	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Células cervicouterinas más VPH.	Número y secuencia de oligonucleótidos.
3	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Células cervicouterinas más VPH.	Número y secuencia de oligonucleótidos.
4	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Células gástricas.	Proteínas totales.
5	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Células gástricas más EBV.	Número y secuencia de oligonucleótidos más proteínas totales.
6	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Células de tejido pulmonar.	Proteínas totales.
7	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Células de tejido óseo de mandíbula.	Número y secuencia de oligonucleótidos más proteínas totales.
8	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Células prostáticas.	Peso molecular.
9	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Tejido pancreático.	Peso molecular.

Cuadro 3. Seguimiento de los pacientes en estudio.

Paciente	Dx. Inicial	Dx. por PCR	Seguimiento
1	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Cáncer cervicouterino más VPH.	Sin ningún tipo de tratamiento.
2	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Cáncer cervicouterino más VPH.	Finada a las tres semanas de la toma de la muestra. Sin autopsia.
3	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Cáncer cervicouterino más VPH.	Finada. Sin autopsia.
4	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Cáncer gástrico.	No aceptó ningún manejo.
5	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Cáncer gástrico más EBV.	Finado. Sin autopsia.
6	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Cáncer pulmonar.	Sin ningún seguimiento.
7	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Cáncer de próstata.	Prostatectomía radical.
8	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Osteosarcoma de mandíbula.	Cirugía más quimioterapia.
9	Ca. epidermoide de primario desconocido.	Cáncer pancreático.	Sin ningún seguimiento.

desconocido para alcanzar un diagnóstico lo más cercano a la condición clínica y bioquímica del paciente y elegir el tratamiento más adecuado.

Lo anterior abre la posibilidad de utilizar el estudio en una población mayor, el cual será objeto de un siguiente trabajo de investigación, dando consideración especial a la determinación oncogénica de los VPH y EBV.

Conclusiones

La reacción en cadena de DNA Polimerasa permite amplificar y obtener varias copias del DNA a partir de muestras muy pequeñas.

La técnica de análisis por PCR es totalmente reproducible y es menos laboriosa que la inmunocitoquímica.

La PCR presenta una sensibilidad confiable para detectar reajustes cromosómicos presentes en los procesos neoplásicos.

La PCR es altamente sensible para detectar virus (VPH y EBV) y secuencias oncogénicas.

En nuestro estudio, la técnica de PCR mostró ser confiable en determinar la condición clínica y bioquímica de los pacientes al demostrar la presencia de células diferentes en las muestras diagnosticadas histopatológicamente como Ca epidermoide.

La PCR es útil para detectar la enfermedad residual mínima (micrometástasis).

La PCR tiene múltiples aplicaciones en los diferentes campos de la biomedicina.

La PCR permite detectar células diferentes del Ca escamoso.

De acuerdo con el estudio, la PCR mostró su utilidad como método diagnóstico.

Referencias

1. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin embedded tissues. In: Iimes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.). PCR Protocols. San Diego: Academic Press; 153-8.
2. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Blair. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 338: 1227-9.
3. Dingemans AMC, Brakenhoff RH, Giaccone G. Detection of cytokera-tine 19 transcripts by reverse transcriptase polymerase chain reaction in lung cancer cell lines and blood of lung cancer patients. *Lab Invest* 1997; 77: 213-20.
4. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 1990; 56-65.
5. Barrera Saldaña H. Biología molecular y medicina. El Manual Moderno; 2000.
6. Rodríguez Cuevas S. Tumores de cabeza y cuello. Cap. 20. McGraw-Hill Interamericana; 2000.
7. Cairns P, Mao L, Merino A, et al. Retes of (MTS) mutation in primary tumor with 9p loss. *Science* 1994; 265: 415-7.
8. Carter LR. Pathology of squamous carcinomas of the head and neck. *Curr Opin Oncol* 1991; 3: 507-11.
9. Dennington ML, Meijers AD. Distant metastases in head and neck carcinoma. *Laryngoscope* 1997; 90: 196-201.
10. Smith B, Selby P, Southgate J, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 338: 1227-9.
11. Moreno J, Croce CM, Fisher RLG. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 6110-2.
12. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 429-35.
13. Moreno JG, Croce CM, Gomella. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 6110-2.
14. Eschwegwe P, Dumas F, Blanchet P, Le Maire V. Hematogenous dissemination of prostatic epithelial cells during radical prostatectomy. *Lancet* 1995; 346: 1528-30.
15. Datta YH, Adams PT, Drobosky WR, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12: 475-82.