

# Expresión de las proteínas de los proto-oncogenes ErbB-3 y ErbB-4 en el carcinoma oral de células escamosas: estudio piloto

Juan Carlos de Vicente (1), Isabel Esteban (2), Patricia Germanà (3), Antonino Germanà (3), José Antonio Vega (4)

(1) Profesor Titular Vinculado. Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial. Hospital Central de Asturias, y Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas. Facultad de Medicina de Oviedo

(2) Profesora Asociada. Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo

(3) Profesores Titulares. Department of Morphology, Biochemistry, Physiology and Animals Production. University of Messina. Messina. Italy

(4) Profesor Titular de Universidad. Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo. España

## Correspondencia:

Juan Carlos de Vicente.

Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, Universidad de Oviedo

C/ Catedrático José Serrano s/n, 33006, Oviedo, España

E-mail: jvicente@correo.uniovi.es.

Recibido:8-12-2002 Aceptado: 4-5-2003

de Vicente JC, Esteban I, Germanà P, 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.  
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1137 - 2834

## RESUMEN

**Objetivos:** Examinar la expresión de ErbB-3 y ErbB-4 en el carcinoma oral de células escamosas e investigar la posible relación existente entre la expresión de las proteínas codificadas por estos proto-oncogenes y las características patológicas y clínicas del cáncer oral.

**Diseño de estudio:** Diecinueve casos de carcinomas orales de células escamosas (CCE) han sido analizados mediante inmunohistoquímica.

**Resultados:** Se ha observado inmunotinción positiva para ErbB-3 en 13 de los 19 casos estudiados (68%) y para ErbB-4 en 10 de 19 (52%). La intensidad de la inmunotinción en los casos ErbB-3 positivos fue baja en 8 (42,1%) y alta en 5 (26,3%); siendo para los ErbB-4 positivos baja en 6 (31,6%) y elevada en 4 (21%) de los 19 casos. Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de ErbB-4 y el estadio TNM (coeficiente de correlación de Spearman = 0,467; P= 0,04). En el análisis de Kaplan-Meier se observó que la sobreexpresión de ErbB-3 y ErbB-4 no mostró relación significativa con la supervivencia (P= 0,05), la cual sí fue apreciada entre esta y el estadio TNM (P= 0,04). Se observó una relación significativa entre la expresión de ErbB-3 y ErbB-4  $\chi^2=6,193$ ; P= 0,037).

**(Conclusiones:** Los resultados del presente estudio sugieren que c-erbB-4 puede contribuir al desarrollo y progresión tumoral.

**Palabras clave:** Proto-oncogenes, ErbB-3, ErbB-4, inmunohistoquímica, cáncer oral.

## INTRODUCCION

El carcinoma de células escamosas (CCE) de cabeza y cuello es el sexto cáncer sólido más frecuente en el mundo, diagnosticándose anualmente más de 500.000 nuevos casos (1). El carcinoma de la cavidad oral constituye el 30% de todos los cánceres de cabeza y cuello (2) y se origina a partir de una población clonal de células que acumulan numerosas alteraciones genéticas (entre seis y diez) a lo largo de un proceso multiescalonado (3). La activación de proto-oncogenes y la inactivación de anti-oncogenes ha sido ampliamente investigada en los tumores de cabeza y cuello (4).

Recientemente, se ha intensificado el interés de los investigadores en la expresión de receptores de factores de crecimiento codificados por proto-oncogenes c-erbB en el desarrollo de CCE y tumores de las glándulas salivales (5-7). Los receptores tirosín quinasa tipo I codificados por los proto-oncogenes ErbB o HER incluyen el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER1 o ErbB-1), ErbB-2 (HER-2 o neu), ErbB-3 (HER-3) y ErbB-4 (HER-4). El factor de crecimiento epidérmico se une a ErbB-1, mientras que el factor de diferenciación neural (NDF) es el ligando preferente para ErbB-3 y ErbB-4 (8, 9). En la literatura han sido referidas variaciones en la expresión de estas moléculas, así como de los niveles de mRNA o

proteínas, en CCE, incluyendo los de origen glandular salival (10-12), así como la expresión de más de una proteína Erb en los carcinomas de cabeza y cuello (12), habiéndoseles asignado, en algunos casos, papeles pronósticos. En concreto, la sobre-expresión de ErbB-1 ha sido referida como indicativa de mal pronóstico en carcinomas adenoideos quísticos (11), habiendo sido considerado el ErbB-2 como indicador pronóstico en carcinomas adenoideos quísticos y mucoepidermoides (10). Sin embargo, no hay datos disponibles sobre los posibles cambios existentes en la expresión de ErbB-3 ni de ErbB-4 en tumores glandulares salivales, ni sobre la expresión de más de una proteína Erb en el mismo tumor.

De forma característica, los carcinomas de células escamosas orales que son similares desde un punto de vista histopatológico, exhiben cursos clínicos muy diferentes en diversos pacientes. Es por tanto importante, encontrar nuevos indicadores clínicos o moleculares que puedan ser utilizados con fines diagnósticos o pronósticos. El presente estudio ha sido diseñado para investigar por medios inmunohistoquímicos, la expresión de ErbB-3 y ErbB-4 en el CCE oral, y para estudiar si esta expresión puede correlacionarse con características clínicas y patológicas.

## MATERIAL Y METODO

### *Pacientes*

Para la realización del presente estudio han sido utilizados 19 pacientes aquejados de un CCE de la cavidad oral, seleccionados mediante un muestreo consecutivo entre los que acudieron al servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, España) y fueron sometidos a cirugía con intención curativa, durante los primeros seis meses de 1995. Los criterios de inclusión que permitieron seleccionar los pacientes fueron los siguientes: tratamiento quirúrgico realizado según los procedimientos estándar, registro completo de datos clinicopatológicos y disponibilidad de suficiente material histopatológico incluido en parafina. Los pacientes con metástasis a distancia fueron excluidos del estudio. La información clinicopatológica incluyó, en cada caso, la siguiente información: edad, sexo, antecedentes de consumo habitual de tabaco y/o alcohol, tamaño tumoral, estado de los ganglios linfáticos regionales, localización, grado histológico, tratamiento realizado y presencia o ausencia de recidiva tumoral. Los datos de los 19 pacientes son recogidos en la Tabla 1. El período durante el que los pacientes fueron seguidos, se extendió entre julio de 1995 y julio del 2000, siendo la duración promedio del mismo de 26,6 meses, variando sus límites entre 6 y 44,5 meses. Todos los pacientes fueron sometidos a tratamiento quirúrgico, consistente en resección del tumor primario y de los ganglios linfáticos regionales, recibiendo 5 de ellos radioterapia postoperatoria (40-70 Gy). En cada caso se registraron el periodo de tiempo libre de recidiva y la supervivencia en meses. El resultado clínico fue medido mediante dos eventos: muerte causada por recidiva de la enfermedad, así como presencia de enfermedad no tratable al final del período de seguimiento. De los 19 pacientes incluidos en el estudio, 9 fallecieron como resultado de una recidiva de la neoplasia oral, mientras que el resto permaneció vivo y sin recidiva tumoral al final del período de seguimiento.

### *Inmunohistoquímica*

Los especímenes histológicos obtenidos en la cirugía fueron fijados en formaldehído al 10% y procesados de forma rutinaria mediante inclusión en parafina. Posteriormente se obtuvieron secciones de 10 µm de espesor de cada bloque tisular que fueron procesadas para estudio inmunohistoquímico mediante su inmersión en HCl-Tris-Buffer (TBS; pH = 7,5) que contenía albúmina sérica bovina al 1% y Tritón X-100 al 0,1%, siendo expuestas después a una solución de tripsina al 0,1% durante 2 minutos. Después de esto se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena y la unión inespecífica, mediante peróxido de hidrógeno al 3% y suero fetal de ternero (Sigma) al 50%. Las secciones titulares fueron incubadas durante una noche con los anticuerpos primarios en una cámara húmeda a 4°C. Los anticuerpos policlonales anti erbB3 y anti erbB4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) fueron diluidos a 1:100. Estos anticuerpos reconocen secuencias aminoacídicas específicas del extremo carboxiterminal de la forma precursora de ErbB-3 p160 y ErbB-4 humanos (nota del fabricante).

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las secciones fueron lavadas en el mismo buffer en que habían sido incubadas previamente, junto con peroxidasa etiquetada con anti-IgG de conejo (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), diluida a 1:100, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones fueron aclaradas y la inmunorreacción visualizada usando como cromógeno 3-3' diaminobenzidina (DAB). Para utilizar controles del procedimiento, secciones representativas de los tumores fueron procesadas de la forma descrita, pero omitiendo el anticuerpo primario, o reemplazándolo por suero de conejo no inmune. Bajo estas condiciones no se observó inmunotinción específica. Como controles positivos de la inmunorreacción se utilizaron secciones de carcinoma de mama, procesado de idéntica manera.

Todas las preparaciones fueron evaluadas independientemente por dos investigadores que desconocían el desenlace clínico de cada caso. En caso de disenso se procedió a una discusión para resolverlo y, cuando las diferencias persistieron entre ambos, se eligió como medida la media de ambas opiniones. El inmunomarcaje para ErbB-3 y ErbB-4 fue registrado como el porcentaje de células con tinción membranosa y citoplásmica sobre un total de 700 células tumorales contadas en 10 campos consecutivos y asignadas a las tres siguientes categorías: expresión indetectable o muy infrecuente (0% a 10%), baja intensidad de inmunoexpresión (11% a 50%) y sobreexpresión (51% a 100%). Tres muestras de mucosa oral normal fueron incluidas en el estudio y usadas como controles.

### *Análisis estadístico*

Fue realizado mediante el programa SPSS para Windows (versión 10.0. SPSS Ins., Chicago, IL). Las asociaciones entre variables categóricas (intensidad de la inmunotinción de ErbB-3 y ErbB-4, grado de diferenciación histológica y estadio tumoral) fueron examinadas mediante el test de chi-cuadrado o el exacto de Fisher (si los efectivos fueron inferiores a 5). Las correlaciones estadísticas existentes entre las intensidades de inmunotinciones de ErbB-3 y ErbB-4, estadio TNM y grado de diferenciación histológica, fueron investigadas mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Asimismo, se estimaron

curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier y comparadas entre sí mediante el estadístico de log-rank. El tiempo de supervivencia fue medido como el transcurrido entre el tratamiento de cada paciente y la fecha del último contacto de seguimiento en el período del estudio o la fecha de la muerte para los que fallecieron a causa del cáncer oral o mostraron una recidiva intratable. Todos los pacientes que estuvieron vivos al final del periodo de seguimiento fueron seguidos por al menos 24 meses. Las pruebas estadísticas fueron consideradas significativas cuando los valores de P fueron menores de 0,05

**RESULTADOS**

*Mucosa oral sana:*

La inmunorreactividad para ErbB-3 fue observada en un caso de mucosa normal y la inmunorreactividad para ErbB-4 fue detectada también en uno de los tres especímenes estudiados. La tinción del ErbB-3 fue moderada y citoplásmica. El caso de positividad para ErbB-4 mostró una débil tinción membranosa y citoplásmica, sin tinción nuclear específica.

*Carcinoma de células escamosas de la cavidad oral:*

La inmunoexpresión de ErbB-3 y ErbB-4 varió entre los diferentes casos de CCE de la cavidad oral. La inmunotinción para ErbB-3 fue encontrada en 13 de 19 casos (68%) (Figura 1) y fue negativa en 6 (32%). En los casos de positividad de ErbB-3, esta fue baja en 8 (42%) y alta en 5 (26%) de ellos. La inmunorreactividad para ErbB-4 (Figura 2) fue observada en 10 de 19 casos (52%) y fue negativa en 9 (47%). La intensidad de la inmunotinción para esta proteína fue baja en 6 (31%) y alta en 4 (21%) de los 19 casos (Tabla 2). La sobreexpresión de ErbB-3 y ErbB-4 no fue asociada con la edad, sexo de los pacientes ni grado de diferenciación histológica. Tampoco se observó asociación entre el estadio tumoral y ErbB-3 (P = 0,87). Sin embargo, la sobreexpresión de ErbB-4 y el estadio TNM mostraron una correlación (coeficiente de correlación de Spearman = 0,467; P= 0,04) y asociación significativas ( $\chi^2 = 4,225$ ; P= 0,042; Tabla 3). El análisis de Kaplan-Meier no mostró influencia en la supervivencia de la inmunoexpresión de ErbB-3 ni de ErbB-4 (P = 0,5). Sin embargo, este análisis mostró una clara relación inversa entre el estadio TNM y la supervivencia (P = 0,04) (Figura 3). Se observó una correlación positiva entre ErbB-4 y TNM, si bien ErbB-4 no alcanzó por sí mismo significación estadística en el análisis de supervivencia. Se observó coexpresión de positividad para ErbB-3 y ErbB-4 en 3 de 19 pacientes (15%) y coexpresión de su negatividad en 13 de 19 casos (68%). La asociación entre la expresión de ErbB-3 y ErbB-4 fue estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 6,193$ ; P= 0,037).

**DISCUSION**

Los receptores tirosinquinasa tipo ErbB son expresados en un gran número de tejidos normales, así como en diferentes tumores (12). Aunque se trata de receptores de membrana, y los resultados de nuestro trabajo así lo confirman, los epitopos marcados por los anticuerpos son intracitoplasmáticos y se sintetizan por las propias células que los expresan. Esa es la razón del

Caso / Case	Localización / Site	Edad / Age	Sexo / Sex	HD	TNM	TS	Tiempo / Time	Situación / Status
1	T	84	F	H	T4N0M0	IV	6	D
2	T	67	F	M	T1N0M0	I	42	A
3	T	82	M	P	T1N0M0	I	24	D
4	AM	47	M	M	T2N0M0	II	12	D
5	OF	52	M	P	T4N0M0	IV	27	D
6	OF	46	M	H	T4N0M0	IV	28	D
7	AM	77	M	H	T2N0M0	II	44.5	A
8	G	71	M	H	T4N3M1	IV	8.5	D
9	AM	80	F	H	T2N0M0	II	28	A
10	G	59	F	M	T2N0M0	II	35.5	A
11	OF	58	M	M	T2N0M0	II	38	A
12	P	46	F	H	T2N1M0	III	10.5	D
13	T	84	M	P	T2N1M0	III	27	A
14	L	73	M	M	T2N0M0	II	24	A
15	L	61	M	H	T1N0M0	I	39	A
16	T	80	F	H	T1N0M0	I	13	D
17	P	57	M	M	T3N2M0	IV	26.5	D
18	OF	79	M	M	T2N0M0	II	41.5	A
19	T	61	M	H	T2N1M0	III	30	A

Tabla 1. Resumen de los datos clínicos de 19 casos de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral.

Localización: T, lengua; OF, suelo de la boca; L, labio; G, encía; P, paladar; AM, mucosa alveolar. Sexo: M, varón; F, mujer. HD (Diferenciación Histológica): H, Buena; M, Moderada; P, Pobre; Tiempo (de seguimiento, medido en meses); Situación: A, vivo y sin recidiva; D, muerto o con recidiva no controlable. TS: Estadio tumoral. Las lesiones fueron clasificadas según el sistema TNM de la UICC (1997).

Table 1. Summary of clinical data of 19 cases with squamous cell carcinoma of the oral cavity.

Site: T, tongue; OF, oral floor; L, lip; G, gingiva; P, palate; AM, alveolar mucosa. Sex: M, male; F, female. HD (Histological differentiation): H, High; M, Moderate; P, Poor; Time (of surveillance); Status: A, alive without recurrence; D: dead or non-controllable recurrence. TS: Tumor Stage. Lesions were classified according to the TNM classification of the International Union Against Cancer (UICC, 1997).

	TNM				Total
	I	II	III	IV	
ErbB-4 -	4	6	3	2	15
ErbB-4 +			1	3	4
Total	4	6	4	5	19

Tabla 3. Asociación entre la inmunoexpresión de ErbB-4 y el estadio TNM ( $\chi^2 = 4,225$ ; p = 0,042)

Table 3. Association between ErbB-4 immunostaining and TNM stage ( $\chi^2 = 4.225$ ; P = 0.042)

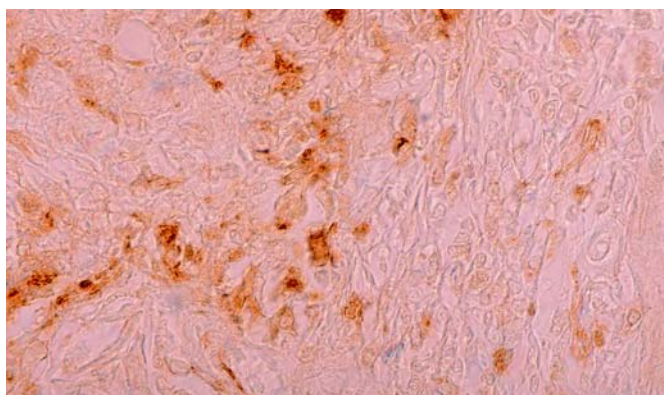


Fig. 1. Localización inmunohistoquímica de ErbB-3 en el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral.

*Immunohistochemical localization of ErbB-3 in oral squamous cell carcinoma.*

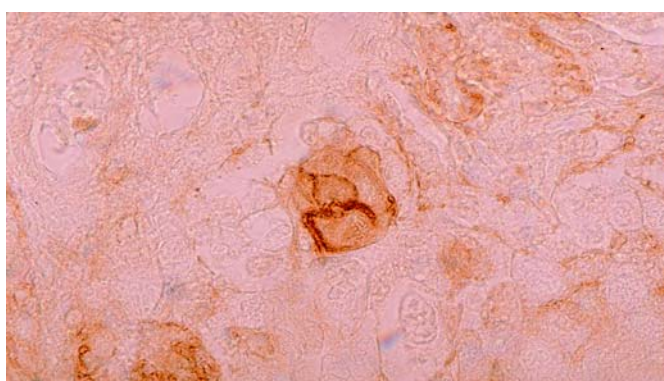


Fig. 2. Localización inmunohistoquímica de ErbB-4 en el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral.

*Immunohistochemical localization of ErbB-4 in oral squamous cell carcinoma.*

Caso /Case	ErbB-3	ErbB-4
1	-	++ (pocas células / few cells) M/C
2	+ M/C	+ M/C
3	++ (pocas células / few cells) C	-
4	+ M/C	-
5	++ M/C	++ M/C
6	-	-
7	++ M/C	++ M/C
8	++ M/C	++ M/C
9	+ M/C	+ C
10	-	-
11	++ M/C	+ C
12	+ M/C	+ C
13	+ C	-
14	-	-
15	-	-
16	+ C	+ C
17	+ C	-
18	+ M/C	+ M/C
19	-	-

Tabla 2. Resultados inmunohistoquímicos de 19 casos de carcinomas orales de células escamosas.

-: inmunoexpresión negativa M: tinción membranaria  
 +: bajo grado de expresión C: tinción citoplásmica  
 ++: alto grado de expresión

Table 2. Immunohistochemical data of 19 cases with squamous cell carcinoma of the oral cavity.

-: negative M: Membrane staining  
 +: low grade expression C: Cytoplasmic staining  
 ++: high grade expression

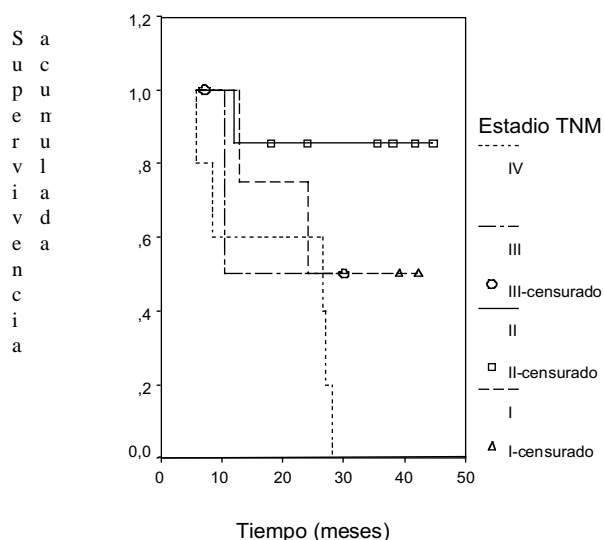


Fig. 3. Curvas de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier (n = 19 pacientes con CCE de la cavidad oral) en función del estadio TNM (estadístico de log-rank = 7,97; P = 0,04).

*Kaplan-Meier estimate of survival (n = 19 patients with OSCC) related to TNM stage (log-rank statistic = 7.97; P = 0.04).*

Estadio: Stage; censurado: censored; Tiempo (meses): Time (months); supervivencia acumulada: cumulated survival.

marcaje citoplasmático observado por nosotros en algunos casos. Estos receptores están involucrados en la proliferación y diferenciación celular, y su activación aberrante o sobre-expresión puede contribuir al desarrollo y progresión tumoral (5-7, 9-11, 13). El factor de crecimiento epidérmico se une al receptor ErbB-1 y desencadena varias vías de transducción de señales, una de las cuales conduce a la activación de factores de transducción de señales y activación de la transcripción (Stat) (8). El incremento en la expresión del proto-oncogén ErbB-2 ha sido observada en cánceres de mama, ovario, estómago, páncreas, tracto urinario, riñón, pulmón, esófago, glándulas salivales y cavidad oral, y ha sido frecuentemente asociado con

un mal pronóstico (5, 14, 15). También ha sido referida una expresión anormal de ErbB-3 en algunos carcinomas (16-18), entre ellos de la cavidad oral (19, 20). La misma situación ha sido comprobada para ErbB-4 (12, 18, 21-23). La coexpresión ocasional de más de una proteína ErbB en el mismo tumor, ha sido también descrita (8).

La relevancia pronóstica de la sobre-expresión de erbB es controvertida. La expresión de ErbB-3 en el CCE de la cavidad oral ha sido correlacionada con metástasis ganglionares, modo de invasión e índice de supervivencia, pero parece ser independiente del tamaño tumoral o del grado histológico de diferenciación (20). Sin embargo, en otras series de CCE de la cavidad oral no se ha encontrado correlación entre la ocurrencia de las proteínas codificadas por los oncogenes ErbB-1, ErbB-2 y ErbB-3 y factores pronósticos comunes (tamaño del tumor, estado de los ganglios linfáticos, metástasis, estadio UICC y grado de diferenciación) (24). Sin embargo, parece existir una correlación estadísticamente significativa entre el período de supervivencia libre de enfermedad y el número de copias promedio de los genes que codifican ErbB-2 y ErbB-3, pero no de ErbB-1 (24). En contraste con estos resultados, Field et al. (25) no encontraron correlación entre la amplificación de erbB y las variables clinicopatológicas y supervivencia. En relación con la expresión de ErbB-4 en el CCE, éste ha sido observado variablemente co-localizado con ErbB-2 y ErbB-3, pero su expresión fue independiente de las características de los tejidos normales o neoplásicos (6). En el presente estudio, la inmunorreactividad para ErbB-3 fue observada en una muestra de mucosa normal, al igual que lo que ocurrió con ErbB-4. En los casos de CCE, ErbB-3 fue detectado en 13 de 19 casos (68%) y ErbB-4 en 10 de 19 (52%) y sobre-expresado en 5 de 19 (26%) y en 4 de 19 (21%), respectivamente. Estos datos están en consonancia con algunos de los estudios mencionados (6, 20). Nuestros datos no han exhibido correlación entre la expresión de ErbB-3 o ErbB-4 y diversas variables clinicopatológicas estudiadas (edad, sexo, grado de diferenciación histopatológica y estado de la enfermedad al final del período de seguimiento), en línea con lo observado por otros (6). Sin embargo, hemos observado la existencia de una significativa coexpresión de ambas proteínas y una correlación positiva entre sobreexpresión de ErbB-4 y estadio TNM, si bien no han sido identificadas como factores pronósticos independientes. En conclusión, el presente estudio sugiere que el oncogén *c-erbB-4* puede contribuir al crecimiento y progresión del carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, si bien este hallazgo debe ser corroborado con estudios realizados con series de mayor tamaño y periodos de seguimiento suficientemente largos.

---

## ENGLISH

---

# Expression of ErbB-3 and ErbB-4 protooncogene proteins in oral squamous cell carcinoma: a pilot study

DE VICENTE JC, ESTEBAN I, GERMANÀ P, GERMANÀ A, VEGA JA. EXPRESSION OF ERBB-3 AND ERBB-4 PROTOONCOGENE PROTEINS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA: A PILOT STUDY. MED ORAL 2003;8:374-81.

## SUMMARY

**Background:** To examine the occurrence of ErbB-3 and ErbB-4 in oral squamous cell carcinoma, as well as investigate statistical correlations between the expression of these proto-oncogen proteins and clinical and pathological tumor characteristics.

**Study design:** Nineteen oral squamous cell carcinomas (SCC) were analyzed using immunohistochemistry.

**Results:** Positive immunostaining for ErbB-3 was found in 13/19 (68%) cases and for ErbB-4 in 10/19 (52%). The intensity of immunostaining for ErbB-3 positive cases was low in 8 (42.1%) and high in 5 (26.3%) cases, and for ErbB-4 ones was low in 6 (31.6%) and high in 4 (21%) of the 19 cases. ErbB-4 overexpression and TNM stage showed a significant correlation (Spearman's correlation coefficient = 0.467;  $P = 0.04$ ). The Kaplan-Meier analysis showed that the overexpression of ErbB-3 and ErbB-4 had no an influence on survival ( $P > 0.05$ ), but TNM stage was inversely related to survival ( $P = 0.04$ ). There was a significant association between the expression of ErbB-3 and ErbB-4 ( $\chi^2 = 6.193$ ,  $P = 0.037$ ).

**Conclusion:** The results of the present study suggest that *c-erbB-4* may contribute to tumor growth and progression.

**Key words:** *Proto-oncogenes, ErbB-3, ErbB-4, immunohistochemistry, oral cancer.*

## BACKGROUND

Head and neck squamous cell carcinoma (SCC) is the sixth most common solid cancer in the world, and more than 500,000 new cases are diagnosed worldwide (1). Carcinoma of the oral cavity accounts for 30% of all head and neck cancers (2), and it arises from a clonal population of cells that accumulate many genetic alterations (six to ten) in a multistep process (3). Proto-oncogene activation and anti-oncogene inactivation have been extensively investigated in head and neck tumors (4).

Recently, there has been an increasing interest in the expression of growth factor receptors codified by *c-erbB* proto-oncogenes in the development of SCC and salivary gland tumors (5-7). The type I tyrosine kinase receptors codified by *ErbB* or *HER*

proto-oncogenes include the epidermal growth factor (EGF) receptor (EGFR, HER1, or ErbB-1), ErbB-2 (HER-2 or neu), ErbB-3 (HER-3), and ErbB-4 (HER-4). EGF binds to ErbB-1, while neural differentiation factor (NDF) is the preferred ligand for ErbB-3 and ErbB-4 (8, 9). Variations in the expression of these molecules at the mRNA or protein level have been reported in SCC, including salivary glands (10-12), and expression of more than one ErbB protein in head and neck carcinomas has been reported (12). Thus, overexpression of ErbB-1 is regarded as a sign of relatively poor prognosis of adenoid cystic carcinoma (11), and ErbB-2 has also been considered as a prognostic marker for mucoepidermoid and adenoid cystic carcinomas (10). However, no data are so far available about the possible changes in ErbB-3 or ErbB-4 in the salivary gland tumors, neither more than one ErbB protein is expressed in the same tumor.

Characteristically, oral cavity tumors that are similar from a histopathological viewpoint show different clinical courses in different patients. It is therefore important to find new clinical and molecular diagnostic and prognostic tools. The present study was designed to investigate immunohistochemically the occurrence of ErbB-3 and ErbB-4 in human oral SCC, and to examine whether the expression of these proteins has any correlation with clinical and pathological tumor characteristics.

## MATERIAL AND METHODS

### *Patients*

This study is based on samples prospectively collected from 19 consecutive patients suffering from a primary oral squamous cell carcinoma (OSCC) who were diagnosed at the Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Asturias Central University Hospital, Oviedo, Spain, and treated with curative intent from January to June of 1995. Inclusion criteria were surgical treatment performed according to standard procedures, complete clinicopathologic data and availability of sufficient paraffin-embedded tumor material for this study. Patients with distant metastases were excluded from the study. Clinicopathologic information on each case, including age, gender, smoking and alcohol intake history, tumor size, regional nodal status, location, histologic grade, treatment, and presence or absence of tumoral recurrence was obtained from patient files. Data of case patients are summarized in Table 1. The follow-up period was from July of 1995 and July of 2000, with an average follow-up period of 26.6 months, ranging from 6 to 44.5 months. All patients had been treated surgically with curative intention (primary tumor resection and neck node dissection), and 5 underwent postoperative radiotherapy, having received 40-70 Gy. The recurrence-free survival and the survival measured in months, were quantified on each case. Clinical outcome was measured by two end points: death caused by disease recurrence and non-treatable disease presence at the end of the follow-up time. Among these 19 patients, 9 died as a result of a recurrent disease, while the rest were alive without tumor recurrence at the end of the follow-up period.

### *Immunohistochemistry*

The specimens obtained from surgery were fixed in 10% formaldehyde, and routinely processed to paraffin embedding.

Then, sections of 10  $\mu$ m thickness were obtained from each specimen and processed for indirect peroxidase immunohistochemistry as follows: The sections were rinsed in 0.05 M HCl-Tris-buffer (TBS; pH 7.5) containing 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 and exposed for 2 minutes to 0.1% trypsin solution. Thereafter, endogenous peroxidase activity and the non-specific binding were blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 50% fetal calf serum (Sigma), respectively. The sections were then incubated overnight with the primary antibodies in a humid chamber at 4°C. We used commercially available rabbit polyclonal antibodies against erbB3, and erbB4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:100. These antibodies recognize specific aminoacidic sequences of the COOH terminus of the precursor form of human ErbB-3 p160 and ErbB-4 (supplier's notice).

After incubation with the primary antibodies, sections were washed in the same buffer as above and incubated with peroxidase-labeled sheep anti-rabbit IgG (Amersham, Buckinghamshire, England), diluted 1:100 for 1 hour at room temperature. Finally, sections were rinsed and the immunoreaction visualized using 3-3' diaminobenzidine (DAB) as a chromogen. For control purposes representative sections were processed in the same way omitting the primary antibody, or replacing the primary antibody with a non-immune rabbit serum. Under these conditions no specific immunostaining was observed. Breast carcinoma samples processed in the same manner were used as a positive controls.

All slides were independently reviewed by two investigators without knowledge of the clinical outcome. Occasional disagreements were discussed to reach a consensus. In case of persistent differences between them, the mean of the two opinions was considered. Immunostaining for ErbB-3 and ErbB-4 were measured as the percentage of positively membranous and cytoplasmic staining, counting of at least 700 tumors cells in ten consecutive fields, and assigned to three following categories: undetectable or negligible expression, 0-10%; low intensity of expression, 11-50%; and overexpression, 51-100%. Moreover, three samples of normal mucosa were included in the study and used as controls.

### *Statistical analysis*

An SPSS for Windows computer program (version 10.0 of SPSS Ins., Chicago, IL) was used for statistical analyses. Associations between categorical variables (intensity of immunostaining of ErbB-3 and ErbB-4, histological grade of differentiation, and tumor stage) were examined with the chi-squared or Fisher's exact test (if  $N < 5$ ). Statistical correlations between the intensity of immunostaining of ErbB-3 and ErbB-4, TNM stage, and histological grade of differentiation was investigated using Spearman's correlation coefficient. Survival curves were estimated using the method of Kaplan-Meier and compared using the log-rank statistic. Survival time was calculated as the time from initial treatment to the time of last follow-up contact or date of death for those who died of disease or showed a non-treatable recurrence and from the date of treatment until the last date of contact for the remainder subjects (censored) who are the patients with no evidence of disease. All patients that were alive at the end of the follow-up time were followed at

least by 24 months. Tests were considered significant when their *P* values were less than 0.05.

## RESULTS

### *Healthy oral mucosa:*

Immunoreactivity for ErbB-3 was observed in one case of normal mucosa, and ErbB-4 immunoreactivity was detected also in one of three specimens of health tissue. The staining of ErbB-3 was moderate and cytoplasmic. ErbB-4 case showed a weak membranous and cytoplasmic immunostaining with non-specific nuclear staining.

### *Squamous cell carcinoma of oral cavity (OSCC):*

The expression of ErbB-3 and ErbB-4 immunoreactivity in OSCC varied among different cases. ErbB-3 immunostaining was found in 13 of 19 cases (68%) (Figure 1) and was negative in 6 (32%). Within the ErbB-3 positive cases it was low in 8 (42%) and high in 5 (26%) cases. ErbB-4 immunoreactivity (Figure 2) was observed in 10 of 19 cases (52%) and was negative in 9 (47%). The intensity of immunostaining for this protein was low in 6 (31.6%) and high in 4 (21%) of the 19 cases (Table 2). ErbB-3 and ErbB-4 overexpressions were not associated with age, gender of the patients and histological grade of differentiation. Also, there was no association between tumor stage and ErbB-3 ( $P = 0.87$ ). However, ErbB-4 overexpression and TNM stage showed a significant correlation (Spearman's correlation coefficient = 0.467;  $P = 0.04$ ) and association ( $\chi^2 = 4.225$ ,  $P = 0.042$ ; Table 3). The Kaplan-Meier analysis showed that the overexpression of ErbB-3 and ErbB-4 had no influence on survival ( $P > 0.05$ ). However, in the survival analysis TNM stage were inversely related to survival ( $P = 0.04$ ) (Figure 3). ErbB-4 was found to positively correlate with TNM stage, but ErbB-4 itself did not reach statistical significance in the survival analysis. Co-overexpression of ErbB-3 and ErbB-4 was noted in 3 of 19 (15%) patients and its absence was seen in 13 of 19 cases (68%). There was a significant association between the expression of ErbB-3 and ErbB-4 ( $\chi^2 = 6.193$ ,  $P = 0.037$ ).

## DISCUSSION

The ErbB type 1 tyrosine kinase receptors are expressed in a large number of normal tissues as well as in different tumors (12). Although they are membrane receptors that is also showed by our results, the epitopes for this antibodies are cytoplasmics and they are synthesized by cells themselves. This is the reason for the cytoplasmic immunoreactivity observed in some of our cases. These receptors are involved in cell proliferation and differentiation, and their aberrant activation or overexpression may contribute to tumor development and progression (5-7, 9-11, 13). EGF binds to its receptor, ErbB-1, and triggers various signal transduction pathways, one of which leads to the activation of signal transducer and activation of transcription (Stat) factors (8). Increase in ErbB-2 proto-oncogene expression has been observed in breast, ovary, stomach, pancreas, urinary bladder, kidney, lungs, esophagus, salivary glands and oral cavity carcinomas, and has been often associated with a poor prognosis (5,14,15). Also, an abnormal expression of ErbB-3

has been reported in some carcinomas (16-18) and oral SCC (19, 20), and the same is true for ErbB-4 (12,18, 21-23). Occasional coexpression of more than one ErbB protein in the same tumor has been also reported (8).

The prognostic value of erbB overexpression in oral SCC is controversial. The expression of ErbB-3 in oral SCC has been correlated with lymph node metastasis, mode of invasion and survival rate, but it seems to be independent of the tumor size or histological grade of differentiation (20). Nevertheless, in other OSCC series, no correlation was found between occurrence of ErbB-1, ErbB-2 and ErbB-3 oncogenes and common prognostic factors for oral cancer (tumor size, nodal status, metastasis, UICC stage and grading) (24). However, there seems to exist a statistical correlation between disease-free survival time and average gene copy number of ErbB-2 and ErbB-3, but no ErbB-1 (24). In contrast to these results Field *et al* (25) found no correlation between erbB amplification and clinicopathological variables and survival. Regarding the expression of ErbB-4 in SCC, it has been found variably colocalized with ErbB-2 and ErbB-3, but its expression was independent of the normal or neoplastic characteristics of the tissues (6). In the current study, immunoreactivity for ErbB-3 was observed in one sample of normal mucosa, and ErbB-4 immunoreactivity was detected in one of three samples of health tissue too. In SCC, ErbB-3 was detected in 13/19 (68%) and of ErbB-4 in 10/19 (52%) cases, and overexpressed in 5/19 (26%) and 4/19 (21%), respectively. These data partially agree with the mentioned studies (6, 20). Moreover, our findings showing no-correlation between the expression of ErbB-3 or ErbB-4 and several of the clinicopathological features studied (age, gender, histological grade and disease status at the end of the follow-up period) are thoroughly in line with others (6). However, significant co-expression of both proteins and positive correlation between overexpression of ErbB-4 and TNM status were observed in the present study, but were not recognized as independent prognostic factors.

In conclusion, the results of the present study suggest that *c-erbB-4* may contribute to tumor growth and progression in OSCC. However, these findings should be corroborate with other studies and larger samples as well as longer follow-up periods.

## BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and Neck Cancer. *New Engl J Med* 1993;328:184-92.
2. Alvi A, Myers EN, Johnson JT. Cancer of the Oral Cavity. En: *Cancer of the Head and Neck* Myers EN, Suen JY, eds. Philadelphia: WB Saunders Co; 1996. p. 321-60.
3. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinogenesis* 1993;7:139-46.
4. Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000;53:165-72.
5. Hou L, Shi D, Tu SM, Zhang HZ, Hung MC, Ling D. Oral cancer progression and *c-erbB-2/neu* proto-oncogene expression. *Cancer Lett* 1992;65:215-20.
6. Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. Expression of *c-erbB* proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1997;17:4539-46.
7. Kilpi A, Rich AM, Kontinen YT, Reade PC. Expression of *c-erbB-2* protein in keratinocytes of oral mucosal lichen planus and subsequent squamous cell carcinoma. *Eur J Oral Sci* 1996;104:278-84.

8. Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM, Hynes NE. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1999;274:17209-18.
  9. Tan M, Grijalva R, Yu D. Heregulin beta 1-activated phosphatidylinositol 3-kinase enhances aggregation of MCF-7 breast cancer cells independent of extracellular signal-regulated kinase. *Cancer Res* 1999;59:1620-5.
  10. Kernohan NM, Blessing K, King G, Corbett IP, Miller ID. Expression of c-erbB2 oncoprotein in salivary gland tumors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1991;163:77-80.
  11. Shintani S, Funayama T, Yoshihama Y, Alcalde RE, Ootsuki K, Terakado N, *et al.* Expression of c-erbB family gene products in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: an immunohistochemical study. *Anticancer Res* 1995;15:2623-6.
  12. Srinivasan R, Poulson R, Hurst HC, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumor types. *J Pathol* 1998;185:236-45.
  13. Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, *et al.* ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: Implications for breast cancer. *EMBO J* 1996;15:254-64.
  14. Friess H, Fukuda A, Tang WH, Eichenberger A, Furlan N, Zimmermann A, *et al.* Concomitant analysis of the epidermal growth factor receptor family in esophageal cancer: overexpression of epidermal growth factor receptor mRNA but not of c-erbB-2 and c-erbB-3. *World J Surg* 1999;23:1010-18.
  15. Shrestha P, Huang JW, Tsuji T, Shinozaki F, Maeda K, Sasaki K, *et al.* Rare expression of the c-erbB-2 oncoprotein in salivary gland tumors: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 1992;21:477-80.
  16. Ciardiello F, Kim N, Saeki T, Dono R, Persico MG, Plowman GD, *et al.* Differential expression of epidermal growth factor related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7792-6.
  17. Haugen DR, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. Expression of c-erbB-3 and c-erbB-4 proteins in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res* 1996;56:1184-8.
  18. Knowlden JM, Gee JM, Seery LT, Farrow L, Gullick WJ, Ellis IO, *et al.* c-erbB3 and c-erbB4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. *Oncogene* 1998;17:1949-57.
  19. Sakurai K, Urade M, Takahashi Y, Kishimoto H, Noguchi K, Yasoshima H, *et al.* Increased expression of c-erbB-3 protein and proliferating cell nuclear antigen during development of verrucous carcinoma of the oral mucosa. *Cancer* 2000;89:2597-605.
  20. Shintani S, Funayama T, Yoshihama Y, Alcalde RE, Matsumura T. Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 1995;95:79-83.
  21. Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Han CP, Lee WH, Chen SL. The expression of type I growth receptors in the squamous neoplastic changes of uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1999;73:62-71.
  22. Gullick WJ, Srinivasan R. The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:43-53.
  23. Suo Z, Emilsen E, Tveit KM, Nesland JM. Type 1 protein tyrosine kinases in benign and malignant breast lesions. *Histopathology* 1998;33:514-21.
  24. Werkmeister R, Brandt B, Joos U. The erbB oncogenes as prognostic markers in oral squamous cell carcinomas. *Am J Surg* 1996;172:681-3.
  25. Field JK, Spandidos DA, Yiagnisis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM. C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1992;12:613-9.
-