



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO
BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

**PREDICCIÓN DE RESPUESTA AL
TRATAMIENTO EN PACIENTES CON
CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y
CUELLO**

**MIGUEL ANGEL PAVÓN RIBAS
2009**

VI. DISCUSIÓN

VI DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LOS NIVELES EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL SISTEMA DE REPARACIÓN NHEJ EN BIOPSIAS PRE-TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN SEGUIDA DE RT/QRT O CIRUGÍA

1.1. LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL COMPLEJO DNA-PK PREDICE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA.

En el estudio prospectivo, los tumores que presentan una respuesta tumoral a la QTI superior al 50% tienen niveles de mRNA de Ku70, Ku80 y DNA-PKcs significativamente más elevados que los tumores con una respuesta tumoral a la QTI inferior al 50%. El nivel de mRNA de Ku70 es un factor de riesgo independiente de la recidiva tumoral. Los pacientes con tumores que expresan un nivel elevado de mRNA de Ku70 o Ku80 presentan una mayor SLRL que los pacientes con tumores que expresan un nivel bajo de estos genes. La capacidad de Ku70 de predecir la recidiva tumoral aumenta cuando en el análisis se incluyen únicamente a aquellos pacientes que al finalizar la QTI siguieron un tratamiento genotóxico conservador, excluyendo a los pacientes tratados con cirugía radical. Cuando sólo se incluyó a estos pacientes en el análisis, se observó un riesgo de recidiva aproximadamente 6 veces mayor en pacientes con tumores con niveles altos que en aquellos con niveles bajos de mRNA de Ku70 (TR: 28,2 vs TR: 4,7. Tabla 9) que cuando incluimos en el análisis todos los pacientes. Estos resultados indican que Ku70 predice la recidiva tumoral en pacientes que reciben tratamiento genotóxico y que la cirugía radical altera los resultados clínicos esperados que pasan a depender de otros factores no relacionados directamente con la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento genotóxico.

En el estudio retrospectivo, analizamos el nivel de expresión de las proteínas Ku70 y Ku80, en una cohorte independiente de pacientes, más numerosa y con un seguimiento más prolongado que en el estudio prospectivo. Este hecho permitió realizar una observación más exhaustiva de la relación entre los niveles de expresión de estas proteínas y la respuesta tumoral, la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) y la supervivencia global (SG). De acuerdo con los resultados del estudio prospectivo, los tumores con una respuesta superior al 50% presentan un porcentaje de células tumorales positivas para Ku70 o Ku80 más elevado que los tumores con una respuesta tumoral

inferior al 50%. Dichas diferencias alcanzan significación estadística únicamente para la proteína Ku70.

Además, el porcentaje de células tumorales positivas para Ku70 es un factor de riesgo independiente tanto de la recidiva tumoral como de la muerte del paciente. Los pacientes con tumores que expresan un porcentaje alto de células positivas para Ku70 presentan una mayor SLRL y SG que los pacientes con tumores que expresan un porcentaje bajo de células positivas para Ku70.

Estos resultados indican que el nivel de expresión de Ku70 es un marcador predictivo de la respuesta tumoral, de la supervivencia libre de recidiva local y de la supervivencia global en pacientes tratados con QTI, seguida de RT/QRT o cirugía. Otros factores pronóstico clásicos como la afectación ganglionar o la localización, evaluados en este estudio, están asociados únicamente con la supervivencia global del paciente, no mostrando asociación con la supervivencia libre de recidiva local. Las diferencias entre los resultados de respuesta tumoral, SLRL y SG indican que, además de la sensibilidad de las células tumorales a los agentes genotóxicos, existen otros factores que pueden influir en el comportamiento biológico del tumor y en la supervivencia global del paciente como son la afectación de los ganglios linfáticos o la aparición de metástasis a distancia. En CECC, se ha descrito que, la afectación ganglionar es un factor de mal pronóstico; sin embargo, no es útil para predecir la evolución clínica de los pacientes tratados con quimioterapia de inducción, seguida de RT/QRT o cirugía.^{102, 103}

Por otro lado, nuestros resultados son consistentes con publicaciones previas que describen que la quimioterapia de inducción predice la respuesta tumoral al tratamiento subsiguiente con radioterapia (RT) y la supervivencia global del paciente.^{18, 103, 160} Estos hallazgos indican que el nivel de expresión de Ku70 predice la evolución clínica de los pacientes con CECC tratados con quimioterapia de inducción, seguida de RT/QRT o cirugía, e identifica, de este modo, a los pacientes que obtendrán un beneficio clínico de dicho tratamiento.

1.2. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO DNA-PK CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL PACIENTE SOMETIDO A TRATAMIENTO GENOTÓXICO EN DIFERENTES TIPOS TUMORALES

Hasta el momento, no se había analizado la capacidad de los genes del sistema NHEJ de predecir la evolución clínica de los pacientes con CECC en estadios avanzados, tratados con quimioterapia de inducción seguida de RT/QRT o cirugía. Bjork-Eriksson y col (1999) analizan la expresión de la proteína DNA-PKcs en cultivos primarios de CECC

de pacientes en estadio IV tratados con RT y no encuentran ninguna asociación significativa entre los niveles de DNA-PKcs y la radiosensibilidad “in vitro” de las células tumorales.¹⁶¹ Algunos estudios clínicos en otros tipos tumorales asocian los niveles de expresión de los genes del sistema NHEJ con la sensibilidad del tumor al tratamiento. De acuerdo con nuestros resultados en CECC, en carcinoma de esófago, niveles elevados de la proteína DNA-PKcs se asocian con un aumento de la respuesta tumoral a la quimioradioterapia.¹⁶² Por otra parte, la expresión elevada de las proteínas Ku80 y DNA-PKcs se asocia de modo significativo con un incremento de la supervivencia en pacientes con carcinoma de amígdala tratados con radioterapia.¹⁶³ Sin embargo, también se han publicado estudios con hallazgos en sentido opuesto a nuestros resultados y a los anteriormente descritos. Así, en pacientes con carcinoma de nasofaringe tratados con quimioradioterapia, niveles elevados de Ku70 y DNA-PKcs en el tumor se asocian con una menor SLRL.¹⁶⁴ En este sentido, hay que destacar que los carcinomas de nasofaringe se consideran un subtipo de tumores de cabeza y cuello con unas características biológicas y clínicas claramente diferenciadas de los CECC.⁹ Otros estudios que presentan resultados opuestos a los de este trabajo realizados en carcinomas de cuello de útero, muestran que niveles elevados de las proteínas del complejo DNA-PK se asocian con una disminución de la respuesta tumoral y de la supervivencia global en pacientes tratados con radioterapia.^{165,166}

1.3. NHEJ PARTICIPA EN LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS TUMORALES AL DAÑO GENOTÓXICO DE UN MODO DEPENDIENTE DEL TIPO CELULAR

Los resultados de este estudio indican que Ku70, y en menor medida DNA-PKcs y Ku80, juegan un papel importante en la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento genotóxico; sin embargo, la dirección de los resultados tiene un sentido contrario a lo esperado. Una de las hipótesis de partida proponía que una elevada expresión del sistema NHEJ aumentaría la capacidad de las células tumorales de reparar el daño al DNA producido por el tratamiento genotóxico y, como consecuencia, disminuiría la sensibilidad del tumor. La inactivación de los genes del sistema NHEJ en células tumorales en cultivo se asocia con un aumento de su radiosensibilidad, mientras que la restauración de la actividad del sistema de reparación recupera la resistencia.¹⁶⁷ Con objeto de encontrar una posible explicación mecanística, a la dirección inesperada de nuestros resultados, hemos realizado una revisión exhaustiva de la literatura descrita hasta ahora dirigida al estudio de la implicación de NHEJ en el proceso de respuesta al

Discusión

daño genotóxico. Existen tanto resultados consistentes como inconsistentes con nuestros hallazgos. De modo general, la literatura describe que la respuesta de los mecanismos de reparación de DNA a la terapia genotóxica depende en gran medida del tipo celular, de su estado de diferenciación o incluso de su grado de activación funcional.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ A continuación, se describen una serie de estudios en los que la inactivación o bajos niveles de expresión de los genes del sistema NHEJ pueden disminuir o aumentar la sensibilidad celular a los agentes genotóxicos dependiendo del tipo celular analizado.

De acuerdo con nuestros resultados, la inactivación de Ku70 incrementa la viabilidad de la línea celular DT40, de linfocito B de pollo, expuesta a dosis elevadas de radiación- γ o metilmetanosulfonato.⁷⁴ En el mismo sentido, en timocitos de ratones DNA-PKcs $-/-$ tratados con radiación ionizante se ha descrito un aumento de su resistencia en comparación con timocitos DNA-PKcs $+/+$, mediada por la inactivación de la vía apoptótica dependiente de p53.⁹⁷ En fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en DNA-PKcs que expresan E1A está inhibida la apoptosis inducida por radiación- γ .⁹⁸ Además, el cisplatino induce muerte celular en fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados Ku80 $+/+$, en células CHO Ku80 $+/+$ o en células SCID DNA-PK $+/+$ humano generadas por transferencia cromosómica, mientras que las mismas líneas deficientes en los respectivos genes de reparación presentan resistencia.⁹⁹ La señal de muerte celular inducida por cisplatino está mediada por el complejo DNA-PKcs y puede trasladarse a las células vecinas, a través de uniones célula-célula, mientras que en células deficientes para Ku80 o DNA-PKcs se observa un aumento de la resistencia al fármaco.⁹⁹ De acuerdo con el papel del complejo DNA-PK en apoptosis, se ha descrito que la exposición de fibroblastos embrionarios de ratón o de líneas celulares de glioma a radiación- γ produce una señal de fosforilación de p53, a través de DNA-PK y Chk2, que a su vez participa en la subsiguiente señal de inducción de apoptosis.^{171, 172} Del mismo modo, en líneas celulares de glioblastoma y carcinoma de próstata, la apoptosis inducida por IGFBP-3 se bloquea por inactivación de DNA-PK.¹⁷³ Además, en células de carcinoma de mama tratadas con radiación ionizante se activa un complejo proteico formado por clusterina, Ku70 y Ku80 que induce una señal de muerte en células que presentan un daño severo no reparable.¹⁷⁴

En relación con los trabajos con hallazgos opuestos a nuestros resultados, se ha descrito que en líneas celulares de carcinoma de esófago, niveles de expresión bajos de Ku70 o una disminución en la actividad de DNA-PKcs correlacionan con un aumento de la

sensibilidad a la radioterapia.¹⁷⁵ Por otra parte, la inactivación de Ku70 o DNA-PKcs mediante siRNA aumenta la sensibilidad al cisplatino, etopósido o topotecan en la línea celular de carcinoma de cérvix HeLa.¹⁷⁶ A su vez, en cultivos primarios de leucemia linfocítica B-crónica, la utilización de inhibidores de DNA-PKcs aumenta la sensibilidad de las células a la radiación- γ , etopósido o neocarzinostatina, que son agentes inductores de roturas de doble cadena en el DNA.¹⁷⁷ De modo similar, las células madre embrionarias Ku70 $-/-$ presentan un aumento de la sensibilidad a la radiación- γ en comparación con las células madre embrionarias Ku70 $-/+$ o Ku70 $+/+$.¹⁷⁸ Todos estos hallazgos serían consistentes con el papel de NHEJ, fundamentalmente, en la reparación lesiones al DNA producidas por la terapia genotóxica.^{93, 170} En células CHO, fibroblastos humanos SV40⁺ y fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en p53, DNA-PKcs no solo contribuye al proceso de reparación de DNA, sino que también participa en la inducción de una señal antiapoptótica dependiente de NF-KB que protege a las células de la muerte inducida por inhibidores de la topoisomerasa.¹⁷⁹ En el mismo sentido, DNA-PKcs inhibe la apoptosis inducida por choque térmico (“heat shock”) en células HeLa, CHO o fibroblastos de pulmón de ratón.¹⁸⁰

Por consiguiente, la aparente contradicción entre los trabajos que apoyan o que cuestionan los hallazgos obtenidos en nuestro estudio queda resuelta cuando se considera que la respuesta celular inducida por daño genotóxico es dependiente del tipo celular. De acuerdo con esta afirmación, la respuesta al daño al DNA producida por agentes inductores de roturas de doble cadena (RDC), en la que participa NHEJ, es dependiente del tipo celular. La activación del complejo DNA-PK inducida por radiación o por agentes genotóxicos puede inducir apoptosis o parada de ciclo. Los tipos celulares cuya función fisiológica implica una rápida proliferación (por ejemplo los linfocitos) cuando son sometidos a daño genotóxico, activan vías de apoptosis, eliminando las células dañadas que podrían acumular mutaciones e iniciar un proceso de transformación. En cambio, en los tipos celulares que llevan a cabo un papel de apoyo hacia otros tipos celulares (por ejemplo, los fibroblastos que proporcionan factores de crecimiento a las células epiteliales), el tratamiento con agentes genotóxicos, induce un programa de senescencia que permite que las células mantengan su función de apoyo hasta que finalmente son eliminadas, evento que al mismo tiempo evita que las células dañadas progresen y puedan iniciar un proceso de transformación. En este sentido, las células madre embrionarias de ratón DNA-PKcs $-/-$ presentan el mismo grado de sensibilidad a la radiación ionizante que las células DNA-PKcs $+/+$, mientras que

fibroblastos DNA-PKcs $-/-$ obtenidos a partir del mismo ratón son más sensibles a la radiación ionizante que las células silvestres.¹⁶⁹ De este modo, células que presentan el mismo “background” genético (al derivar de un mismo modelo de ratón) pero de linajes celulares distintos responden de manera diferente al tratamiento genotóxico. Además, en algunos tipos celulares la función de las proteínas de NHEJ varía dependiendo del estado de activación de las células. En células humanas de mieloma múltiple, Ku80 sensibiliza las células al daño al DNA, mientras que en células de mieloma múltiple CD40 activadas, Ku80 y Ku70 son translocados a la membrana donde tienen un efecto antiapoptótico cuando se produce daño al DNA por irradiación o exposición a doxorubicina.¹⁸¹

En resumen, a pesar de que nuestros resultados fueron, en un principio, inesperados, la participación del sistema de reparación NHEJ en el proceso de inducción de apoptosis, juntamente con su implicación en el proceso de reparación del DNA, justificaría que los tumores con niveles elevados de Ku70 presenten una mayor sensibilidad a la quimioterapia o radioterapia que los tumores con niveles bajos de Ku70. Niveles de expresión elevados de estas proteínas podrían aumentar la señal apoptótica favoreciendo de este modo que las células tumorales dañadas fueran eliminadas y que los pacientes obtuvieran beneficio clínico del tratamiento genotóxico. En cambio, en otros tipos tumorales en los que las vías de inducción de apoptosis se encuentran bloqueadas, la actividad predominante de NHEJ sería la de reparar el daño al DNA, de modo que niveles de expresión altos de estas proteínas aumentarían la capacidad de las células tumorales de reparar las lesiones, siendo, en consecuencia, más resistentes al tratamiento genotóxico.

1.4. IMPLICACIÓN DE PROTEÍNAS DISTINTAS A LAS QUE PARTICIPAN EN NHEJ EN LA RESPUESTA CELULAR AL TRATAMIENTO GENOTÓXICO

Analizando la posible implicación de otros genes de reparación en el proceso de respuesta celular al daño genotóxico dependiente del tipo celular, cabe destacar el papel desarrollado por p53. P53 es uno de los genes más estudiados en relación con la respuesta a la radioterapia y a la quimioterapia. Del mismo modo que el complejo DNA-PK, p53 está implicado en distintos procesos biológicos como son la reparación del DNA, la inducción de apoptosis y el mantenimiento de la estabilidad genómica.^{97, 98} Además, su actividad está conectada funcionalmente con el sistema NHEJ de reparación de DNA. P53 es un marcador predictivo de la respuesta tumoral a la quimioterapia

neoadyuvante en pacientes con CECC, ya que los tumores que no responden al tratamiento tienen una mayor prevalencia de mutaciones en p53 que los tumores que reponden.¹⁸² En tipos tumorales distintos al CECC, la mutación en p53 puede generar sensibilidad (pulmón, mama y ovario), o bien resistencia (testículo, glioma y vejiga) al tratamiento genotóxico, confirmando que la respuesta celular al daño genotóxico es dependiente del tipo celular.¹⁸³⁻¹⁸⁸ De modo similar al sistema NHEJ, los resultados que se obtienen considerando la inactivación mutacional de p53 serían inesperados si sólo se tuviese en cuenta su actividad en el proceso de reparación del DNA y no se considerase su papel en la inducción de apoptosis.

1.5. POSIBLE UTILIDAD CLÍNICA DE KU70 COMO MARCADOR PREDICTIVO

Independientemente del papel que Ku70 juega en la respuesta al daño genotóxico, nuestros resultados apoyan su uso como marcador de predicción de la evolución clínica de los pacientes con CECC, en estadios avanzados, tratados con quimioterapia de inducción seguida de RT/QRT o cirugía. No obstante, estos hallazgos deberían ser validados mediante estudios independientes para confirmar la utilidad clínica de este marcador, tal y como ocurre con otros marcadores predictivos (por ejemplo: p53 o la infección por VPH) descritos en la literatura, que aún no se han introducido en la práctica clínica.

Por otro lado, la elevada complejidad mecanística de los determinantes de sensibilidad al daño al DNA requiere la realización de estudios funcionales que permitan diseccionar las vías de señalización implicadas en el proceso de respuesta celular del CECC al tratamiento genotóxico para esclarecer si, mas allá de los datos correlativos obtenidos, existe una relación causal como consecuencia de la participación del sistema NHEJ en la inducción de apoptosis.

En resumen, los resultados de este estudio muestran que, en biopsias de CECC localmente avanzados, los niveles de mRNA o el porcentaje de células tumorales positivas para Ku70 pueden identificar a aquellos pacientes portadores de tumores con una elevada probabilidad de responder al tratamiento, y con mayor supervivencia libre de recidiva local y/o mayor supervivencia global. La determinación de estos niveles en biopsias pre-tratamiento identificaría a los pacientes con probable beneficio clínico por el tratamiento conservador, de quimioterapia de inducción, basada en 5-FU y cisplatino, seguida de RT/QRT, distinguiéndolos de los que no obtendrían beneficio clínico por

Discusión

tratamiento conservador, y serían candidatos a cirugía radical, o bien a un tratamiento alternativo.

2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR MICROARRAYS EN BIOPSIAS PRE-TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO

2.1. IDENTIFICACIÓN DE TRES SUBTIPOS DE CECC RELACIONADOS CON SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL Y SUPERVIVENCIA GLOBAL.

En el estudio prospectivo se han identificado tres subtipos de tumores con un perfil de expresión génica relacionado con la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) y la supervivencia global (SG) de los pacientes.

Los pacientes portadores de tumores del cluster 1 presentan una SLRL menor que los pacientes con tumores del cluster 2 o del cluster 3. Además, la clasificación en clusters es un factor de riesgo independiente de recidiva del tumor primario. Los pacientes con tumores del cluster 1 tienen un riesgo, aproximadamente, cuatro veces mayor de padecer una recidiva del tumor primario que los pacientes de los clusters 2 y 3. Otros factores pronóstico clásicos, como la afectación ganglionar o el tamaño tumoral, no se asocian con la SLRL en la cohorte de pacientes evaluada.

En nuestra muestra, también es evidente la tendencia hacia una mayor supervivencia global de los pacientes del cluster 3, respecto a los de los clusters 1 y 2, mientras que la supervivencia global en los pacientes de los clusters 1 y 2 es similar. Además, la clasificación en clusters es un factor de riesgo independiente de muerte, de modo que, los pacientes con tumores de los clusters 1 y 2 presentan un riesgo de muerte, aproximadamente, tres veces mayor que los pacientes del cluster 3.

Al realizar el análisis incluyendo únicamente a los pacientes que siguieron un tratamiento genotóxico conservador una vez finalizada la QTI, es decir, excluyendo a los pacientes tratados con cirugía, obtuvimos unos resultados similares tanto para la SLRL como para la SG. Ello sugiere que los genes que caracterizan el patrón de expresión de los tumores de cada uno de los clusters identificados, además de determinar la mayor o menor agresividad de los distintos subtipos tumorales, juegan un papel importante en la respuesta tumoral al tratamiento genotóxico.

En definitiva, a partir del perfil de expresión se han identificado tres subtipos de CECC con distinta evolución clínica. Los pacientes con tumores del cluster 3 son los que obtienen mayor beneficio clínico del tratamiento con QRT o QTI seguida de RT/QRT o cirugía, ya que presentan una SLRL y una SG mayor que el resto de los pacientes. En cambio, los pacientes con tumores del cluster 1 presentan una evolución clínica desfavorable cuando se someten al mismo tratamiento. En este sentido, los pacientes del

Discusión

cluster 1 tienen una supervivencia libre de recidiva local más corta, lo que se asocia con una disminución de su supervivencia global.

Los tumores del cluster 2 tienen una evolución clínica intermedia entre los del cluster 1 y los del 3. Así, mientras que los pacientes del cluster 2 tienen una SLRL elevada y similar a la del cluster 3, su supervivencia global es baja, aproximándose en este caso a la del cluster 1. La diferencia entre la SLRL y la SG, que presentan los pacientes del cluster 2, indica que en la evolución clínica del paciente, pueden influir la aparición tardía de afectación ganglionar o de metástasis a distancia, u otros factores independientes de los que determinan la respuesta tumoral. De este modo, se reduciría la supervivencia global de este grupo de pacientes, a pesar de que hayan conseguido estar libres de recidiva tumoral durante un tiempo prolongado.

2.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS TRES SUBTIPOS DE CECC IDENTIFICADOS

2.2.1. Los tumores del cluster 1 se asocian con una evolución clínica desfavorable

Los tumores que pertenecen cluster 1 se caracterizan por una expresión génica compatible con mayor capacidad de migración e invasividad, una transición epitelio-mesénquima, la activación de la vía secretora y menor grado de diferenciación escamosa en comparación con los tumores del cluster 2 y 3.(Tabla 26)

En relación con su mayor capacidad de migración e invasividad: En los tumores del cluster 1 están activados procesos biológicos tales como la adhesión celular, la vía de señalización mediada por integrinas, la motilidad celular, las adhesiones focales, la interacción con receptores de la matriz extracelular, la comunicación celular y la regulación del citosqueleto de actina. Todos estos procesos se han relacionado previamente con la progresión, invasividad y capacidad migratoria de las células tumorales. En este sentido, los tumores del cluster 1 sobre-expresan serpina E1 (SERPINE1), galectina 1 (LGALS1), FHL2 y integrina- β 1 (ITGB1), cuya expresión aumenta la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales.¹⁸⁹⁻¹⁹³ SERPINE1 forma parte del sistema del plasminógeno, que juega un papel importante en estos dos procesos, permitiendo que las células tumorales atraviesen la barrera de proteínas que constituye la matriz extracelular.¹⁹⁴ Por otro lado, LGALS1 codifica para una proteína

de la familia de las galectinas, implicada en la progresión tumoral, migración y respuesta inmune asociada al tumor.¹⁹⁵

Los tumores del cluster 1 presentan, además, características de transición epitelio-mesénquima: La transición epitelio-mesénquima (TEM) es el proceso a través del cual las células epiteliales pierden sus características propias, como la polaridad apical-basal y el crecimiento en capas sobre la lámina basal, y adquieren características de células mesenquimales como son el crecimiento difuso y el aumento de la motilidad celular.¹⁹⁶ ¹⁹⁷ En este sentido, los tumores del cluster 1 sobre-expresan genes cuyos productos son típicamente mesenquimales como la integrina- β 1 (ITGB1), la fibronectina IIIB (FNDC3B), la trombospondina 1 (THBS1), la serpina E1 (SERPINE1) y la galectina 1 (LGALS1), y genes involucrados en la síntesis de colágeno como la lisina hidroxilasa 2 (PLOD2) o la α 1-prolil-4-hidroxilasa (P4HA1). También sobre-expresan diversos genes de la vía de señalización de TGF β (THBS1, inhibina- β A y P4HA1) y de la vía TNF α (TNFAIP6 y TNFRSF12A) que participan en la inducción del proceso de transición epitelio-mesénquima. Estos resultados son consistentes con hallazgos previos, en los que la transición epitelio-mesénquima se asocia con un subgrupo de CECC con peor evolución clínica, que presentan una disminución de la supervivencia libre de enfermedad.¹²⁶ Además se ha descrito que la TEM, se asocia con un aumento de la invasividad tumoral y la aparición de afectación ganglionar en CECC.¹⁹⁸

Los tumores del cluster 1 tienen sobre-activada la vía secretora: Un grupo significativo de genes, sobre-expresados en el cluster 1, codifican proteínas que se localizan en el aparato de Golgi o en el retículo endoplasmático. El retículo endoplasmático y más directamente el aparato de Golgi juegan un papel central en la vía secretora, una ruta que permite transportar proteínas del interior de la célula hacia el espacio extracelular, donde son liberadas. En este sentido, los genes sobre-expresados en el cluster 1 codifican para un gran número de proteínas que participan en la vía secretora o proteínas que para desarrollar su función han de secretarse al espacio extracelular como la tirosina sulfotransferasa 1 (TPST1), la ATPasa 2c1 (ATP2C1), la galectina 1 (LGALS1), la TNFAIP6, la calumenina (CALU), la caveolina (CAV1), la α 1-prolil-4-hidroxilasa (P4HA1), la secretogranina V (SCG5), la trombospondina 1 (THBS1) y la lisina hidroxilasa 2 (PLOD2). En particular, el gen TPST1 codifica para

Discusión

una proteína con actividad tirosina sulfotransferasa localizada en Golgi. La sulfatación de tirosinas es una modificación muy habitual en proteínas que se secretan al espacio extracelular y participan en los procesos de interacción de las células con la matriz extracelular.¹⁹⁹ Por su parte, ATPase 2C1 (ATP2C1) forma parte de las bombas de Ca²⁺/Mn²⁺ de la membrana del Golgi.²⁰⁰ Calumenina (CALU) pertenece a la familia de las proteínas EF-Hand que también participan en la vía secretora.²⁰¹ Además, los tumores del cluster 1 infra-expresan NSF que regula la formación de las vesículas de secreción.²⁰² Estos resultados indican que los tumores del cluster 1 presentan una sobre-activación de la vía secretora. De acuerdo con nuestros resultados, estudios previos muestran que las células tumorales presentan alteraciones en el tráfico de proteínas así como en la estructura del complejo de Golgi y del retículo endoplasmático.²⁰³⁻²⁰⁵

Los tumores del cluster 1 presentan una menor diferenciación que los de los clusters 2 y 3: Durante el proceso de transformación neoplásica, las células del epitelio escamoso normal sufren una serie de cambios morfológicos asociados con la pérdida de la diferenciación celular. El análisis de ontologías muestra que los tumores del cluster 1 infra-expresan genes implicados en el proceso de queratinización, la morfogénesis de la epidermis y la diferenciación de los queratinocitos. Estos hallazgos indican que el cluster 1 incluye tumores con un grado de diferenciación escamosa menor que la de los clusters 2 ó 3. En este sentido, los tumores del cluster 1 infra-expresan transglutaminasa 3 (TGM3) y citoqueratina 13 (KRT13), proteínas que participan en los procesos de diferenciación de las células epiteliales.^{206, 207} También, de modo consistente con esta interpretación, los tumores del cluster 1 sobre-expresan el gen de la ATPasa 2C1 (ATP2C1), cuya inactivación induce la diferenciación de los queratinocitos normales cultivados “in vitro”.²⁰⁸ Además, los tumores del cluster 1 sobre-expresan FHL2, cuya inactivación induce la diferenciación de líneas celulares de carcinoma gástrico o colon.²⁰⁹

Entre los genes infra-expresados en el cluster 1 también encontramos enzimas implicados en procesos de detoxificación como son la oxidasa dual 2 (DUOX2), el citocromo P450 2C9 (CYP2C9), el citocromo P450 2C18 (CYP2C18) y la carbonil reductasa 3 (CBR3).²¹⁰⁻²¹²

Algunos de los genes sobre-expresados en el cluster 1 son factores de mal pronóstico: De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, los genes cuya sobre-expresión

es característica del perfil de expresión de los tumores del cluster 1 se han asociado previamente con resistencia de las células tumorales al tratamiento genotóxico, o han sido identificados como factores de mal pronóstico en diversos tipos tumorales. De este modo, en tumores subcutáneos de ratón, generados mediante la inyección de líneas humanas de CECC, niveles elevados de expresión de serpina E1 (SERPINE1) se asocian con resistencia a radiación, al aumentar la dosis necesaria para conseguir el control local del tumor.²¹³ Además, la sobre-expresión de serpina E1 es un factor de mal pronóstico en CECC ya que se asocia con una disminución de la supervivencia libre de enfermedad del paciente.²¹⁴ Por otra parte, la sobre-expresión de galectina 1 es un factor de mal pronóstico en CECC que se asocia con una disminución de la supervivencia global.²¹⁵ En otros tipos tumorales, los marcadores del cluster 1 suelen asociarse también con un comportamiento tumoral agresivo o con mal pronóstico. Así, en líneas celulares de glioma humano, la sobre-expresión de FHL2 estimula la proliferación, el crecimiento independiente de anclaje y la migración celular.²¹⁶ La pérdida de expresión de SASH1 en carcinoma de colon es un factor de mal pronóstico asociado con la aparición de metástasis y la disminución de la supervivencia global.²¹⁷ La sobre-expresión de calumenina (CALU) es un factor de mal pronóstico en diversos tipos tumorales y su sobre-expresión se asocia con un aumento de la resistencia al cisplatino en la línea celular de carcinoma de cérvix A431.²¹⁸ A su vez, la sobre-expresión de trombospondina 1 (THBS1) es un factor de mal pronóstico en carcinomas hepatocelulares.²¹⁹ En cambio, en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) la pérdida de la expresión tumoral de trombospondina se asocia con una disminución de la supervivencia global.²²⁰ En el mismo sentido la pérdida de expresión de carbonil reductasa 3 (CBR3), infra-expresado en los tumores del cluster 1, es un factor de mal pronóstico en tumores epiteliales de ovario.²²¹

En resumen, las principales características que identifican a los tumores del cluster 1 son la alteración de procesos biológicos asociados con un aumento de la migración e invasividad tumoral, la transición epitelio-mesénquima, la pérdida de diferenciación celular y la activación de la vía secretora. Todos estos procesos biológicos definen un grupo de tumores que presentan una disminución de la supervivencia libre de recidiva local y de la supervivencia global de los pacientes y que, por tanto, no obtendrían un beneficio clínico relevante del tratamiento genotóxico actual, basado en cisplatino, 5-FU y RT.

2.2.2. Los tumores del cluster 3 se asocian con una evolución clínica favorable

Los tumores que pertenecen al cluster 3 se caracterizan por una expresión génica compatible con un mayor grado de diferenciación escamosa y por la sobre-expresión de genes localizados en las regiones cromosómicas 1q21 y 19q13, en comparación con los tumores de los clusters 1 y 2 (Tabla 26).

En relación con su mayor grado de diferenciación celular: En los tumores del cluster 3 están sobre-activados procesos biológicos como la diferenciación de los queratinocitos, la queratinización y la morfogénesis de la epidermis. Además, la mayoría de estos genes se localizan en estructuras características de las células epiteliales diferenciadas, como son los desmosomas, el filamento intermedio de actina o la cubierta cornificada. Estos resultados indican que los tumores del cluster 3 presentan un mayor grado de diferenciación escamosa que la de los clusters 1 y 2. En este sentido, los tumores del cluster 3 sobre-expresan SLURP-1, defensina- β 1 (DEFB1), aquoporina 3 (AQP3), SPINK5, cistatina A (CSTA), HOP, involucrina (IVL) y CRCT1, cuyos productos proteicos participan en el proceso de diferenciación y morfogénesis de las células epiteliales.²²²⁻²²⁵ SLURP-1 modula la actividad de los receptores nicotínicos acetilcolinérgicos de los queratinocitos, participando en la regulación de la adhesión celular, la motilidad y los ciclos de biogénesis, diferenciación y eliminación de los queratinocitos.^{226, 227} Por otro lado, cuando se induce “in vitro” la diferenciación celular de las líneas inmortalizadas de queratinocitos humanos HaCaT y PHK16-0b, la expresión de defensina- β 1 (DEFB1) aumenta, mientras que su expresión está disminuida en carcinomas escamosos de la mucosa oral.^{228, 229} Además, los productos de los genes involucrina (IVL), cistatina A (CSTA), periplaquina (PPL), “small proline rich protein 1A” (SPRR1A), escielina (SCEL), las proteínas de unión a calcio A14 (S100A12) y A9 (S100A9) son precursores de la cubierta cornificada, una estructura desarrollada a partir de la membrana plasmática de los queratinocitos que entran en su última fase de diferenciación.²³⁰⁻²³³ La transglutaminasa 1(TGM1) participa, también, en la formación de la cubierta cornificada, induciendo la formación de enlaces entre las proteínas descritas anteriormente.

Los tumores del cluster 3 sobre-expresan, además, genes localizados en las regiones cromosómicas 1q21 y 19q13: Un número elevado de genes sobre-expresados en estos tumores se encuentran localizados en las regiones cromosómicas 1q21 (CRCT1, IVL, S100A12 y S100A9) y 19q13 (CEACAM7, EPS8L1, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, LGALS7, LYPD3 y SULT2B1). Nuestros resultados sugieren que en este subtipo tumoral las regiones cromosómicas 1q21 y 19q13 son susceptibles a padecer alteraciones durante el proceso patogénesis del CECC.

En la región 1q21 se ha identificado una elevada densidad de genes implicados en el proceso de diferenciación de los queratinocitos.^{223, 234} Además, en CECC se ha descrito una sobre-expresión de los genes que localizan en la región 1q21 en comparación con las mucosas normales.²³⁵

En el CECC, la región 19q13 es una de las regiones cromosómicas en las que se observan alteraciones durante la transición de mucosa normal a tejido tumoral o de tumor primario a metástasis ganglionar.¹³⁸ En la región 19q13 localizan los genes de la familia de las kalicreínas, constituida por una serie de proteasas que participan en la interacción de las células con la matriz extracelular, modulando la invasividad de las células tumorales y la progresión tumoral. Los tumores del cluster 3 sobre-expresan kalicreína 5 (KLK5), kalicreína 6 (KLK6), kalicreína 7 (KLK7), kalicreína 8 (KLK8), kalicreína 10 (KLK10), kalicreína 11 (KLK11), kalicreína 12 (KLK12) y kalicreína 13 (KLK13). Algunas kalicreínas pueden estimular el crecimiento de las células tumorales (KLK2, KLK3 y KLK4) mientras que otras actúan como supresores de tumores (KLK10).^{236, 237} La sobre-expresión de KLK10 en una línea celular de carcinoma de mama MDA-MB-231 reduce el crecimiento independiente de anclaje y la formación de tumores en ratones atímicos.

De modo consistente con nuestros resultados, algunos de los genes sobre-expresados en el cluster 3 son factores de buen pronóstico: La sobre-expresión de cistatina A (CSTA) es un factor de buen pronóstico en pacientes con CECC.^{238, 239} En pacientes con adenocarcinomas de esófago tratados con quimiorradioterapia se han descrito dos subtipos de tumores relacionados con la pérdida de expresión de los genes de la región 1q21.²⁴⁰ Los pacientes con adenocarcinoma de esófago del subtipo I, que presentan una disminución en los niveles de expresión de los genes localizados en 1q21 como la involucrina (IVL) y CRCT1, tienen una supervivencia global y supervivencia libre de

Discusión

enfermedad menor que los tumores del subtipo II, en los que se observan unos niveles de expresión de dichos genes similares a los de la mucosa normal.

La sobre-expresión de las kaliceínas es un factor de buen o de mal pronóstico dependiendo del tipo celular y del tipo de kaliceína expresada. Así, la sobre-expresión de KLK8, KLK13 y KLK11 se asocia con buen pronóstico en tumores de ovario, mama y próstata. Su expresión se asocian con un aumento de la supervivencia libre de recidiva tumoral y de la supervivencia global de los pacientes. En cambio la sobre-expresión de KLK5 y de KLK10 son marcadores de mal pronóstico en tumores de ovario y mama. Además, KLK10 está sobre-expresada en un subtipo de tumores de CECC que presentan una disminución de la supervivencia libre de recidiva local.¹¹⁰

En resumen, los tumores del cluster 3 se caracterizan por un elevado grado de diferenciación celular y por la sobre-expresión de genes que localizan en las regiones cromosómicas 1q21 y 19q13, los cuales codifican para proteínas relacionadas con la diferenciación escamosa. Estas características se traducen en una evolución clínica favorable de los pacientes cuando son tratados con quimioterapia de inducción, seguida de RT/QRT o cirugía, o con quimioradioterapia concomitante, ya que se observa un aumento de su supervivencia libre de recidiva local y de su supervivencia global.

2.2.3. Los tumores del cluster 2 se asocian con una evolución clínica intermedia

De los tres subtipos de tumores identificados en este estudio, el que representa el cluster 2 es el de más difícil caracterización molecular y además presenta una evolución clínica intermedia entre la de los tumores de los clusters 1 y 3 (Tabla 26).

Algunas de las características que diferencian los tumores del cluster 2 respecto a las de los cluster 1 y 3 son la infra-expresión de FHL2 (sobre-expresado en el cluster 1) y la infra-expresión de histidina deaminasa (CDA) y “polo-like kinasa 2” (PLK2) (sobre-expresado en el cluster 3).

El análisis de ontologías muestra, además, que los tumores del cluster 2 sobre-expresan genes implicados en el metabolismo de los aminoácidos (MCCC1), en la formación de los filamentos intermedios del citoesqueleto (citoqueratina 15 y citoqueratina 19), en la respuesta al daño al DNA y de un gen implicado en el desarrollo del carcinoma colorrectal (DVL3). A su vez, los tumores del cluster 2 infra-expresan genes implicados en la angiogénesis, como la epirregulina (EREG) y el factor de crecimiento endotelial C

(VEGFC), en la cascada de señalización proteína quinasa como la quinasa STK17A, CD59 y PLK2, en la organización del citoesqueleto como la actinina- α 1 (ACTN1), la PDLIM2 y la pleckstrina, y en la formación de adhesiones focales (ACTN1).

En resumen, el cluster 2 representa a un subgrupo de tumores de difícil caracterización, al presentar menos diferencias, tanto moleculares como clínicas, con el resto de tumores. Además los pacientes portadores de tumores del cluster 2, tienen una evolución clínica intermedia entre los de los clusters 1 y 3. De este modo, los pacientes del cluster 2 presentan una supervivencia libre de recidiva local similar a la de los pacientes con tumores del cluster 3 y superior a la de los pacientes con tumores del cluster 1. En cambio la supervivencia global de dichos pacientes es similar a la de los pacientes con peor evolución clínica (cluster 1), la cual es significativamente más corta que la de los pacientes de evolución más favorable (cluster 3).

Tabla 26. Características biológicas de los CECC de los clusters 1, 2 y 3

	GENES SOBRE-EXPRESADOS <i>p</i> ajustada <0,05	PROCESO ACTIVADO	GENES INFRA-EXPRESADOS <i>p</i> ajustada <0,05	PROCESO INACTIVADO
CLUSTER 1	SERPINE1, LGALS1, FHL2, FNDC3B y ITGB1	Aumento de la migración e invasividad	TGM3 y KRT13	Disminución de la diferenciación escamosa
	ITGB1, FNDC3B, THBS1, SERPINE1, LGALS1, PLOD2, P4HA1, INHBA, TNFAIP6 y TNFRSF12A	Inducción de la TEM (Transición epitelio-mesénquima)	DUOX2, CYP2C9, CYP2C18 y CBR3	Disminución de la detoxificación
	TPST1, ATP2C1, LGALS1, TNFAIP6, CALU, CAV1, P4HA1, SCG5, THBS1 y PLOD2.	Activación de la vía secretora	NSF, HPGD, SASH1, ITIH4, DBI, RAB25, PPF1BP2 y ATP10B	
CLUSTER 2	MCC1	Aumento del metabolismo de aminoácidos	EREG y VEGFC	Disminución de la angiogénesis
	KRT15 y KRT19	Aumento de la formación de los filamentos intermedios	STK17A, CD59 y PLK2	Inactivación de la cascada de señalización proteína quinasa
	DVL3	Proteína activada en cáncer colorectal	ACTN1, PDLIM2 y PLEK2	Disminución de la organización del citoesqueleto
	LMO4 y C1orf115		ACTN1	Disminución de la formación de adhesiones focales
CLUSTER 3	SLURP-1, DEFB1, AQP3, SPINK5, CSTA, HOP, IVL, CRCT1, PPL, SPRR1A, SCEL, S100A12 y S100A9	Aumento de la diferenciación escamosa	ATP6V1D, STK17A, UPPP1, CDA, PTGS1, CAB39, FHL2 y RGS20	
	CRCT1, IVL, S100A12 y S100A9.	Genes localizados en 1q21		
	CEACAM7, EFSBL1, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, LGALS7, LYPD3 y SUL12B1.	Genes localizados en 19q13	*No se han detectado genes infra-expresados con una <i>p</i> ajustada < 0,05	
	CLIC3, SLC39A2, RHCG, GDDP3, IL1RN, AQP3, DUOX1, TMPRSS11D, IL1F5, SLP1, TGM1, CSTB, SFT2D2, EFSBL1, DEFB1, CD24, HSPB8, LGALS7, PLK2, MOSPD1, LTB4R, KRT16, KCNK7, NPEPPS, BBOX1, P11, KRT6C y RAB25			

2.3. MARCADORES PREDICTIVOS DE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON CECC TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN, SEGUIDA DE RT/QRT O QUIMIORADIOTERAPIA CONCOMITANTE

Una vez identificados los genes característicos del perfil de expresión del cluster 1 y los del cluster 3, seleccionamos de entre estos genes aquellos con mayor capacidad de predecir la recidiva tumoral a los 2 años y la supervivencia de los pacientes a los 3 años, aplicando un análisis de curvas ROC.

Los genes tirosina sulfotransferasa 1 (TPST1), trombospondina 1 (THBS1), liprina- β 1 (PPFIBP1), fibronectina IIIB (FNDC3B) o α 1-prolil-4-hidroxilasa (P4HA1) fueron identificados como marcadores de evolución clínica desfavorable. Su sobre-expresión se asocia con un aumento del riesgo de recidiva local a los 2 años y de muerte a los 3 años de seguimiento. En cambio, los genes oxidasa dual 1 (DUOX1), la proteína de membrana LYPD3 o la GTPasa RAB25 fueron identificados como marcadores de evolución clínica favorable. Su sobre-expresión se asocia con una disminución del riesgo de recidiva local a los 2 años y de muerte a los 3 años de seguimiento.

Por tanto, estos ocho marcadores serían buenos candidatos a la hora de predecir la evolución clínica de los pacientes con CECC en estadio avanzado, tratados con QTI seguida de QT/RT o cirugía, o con QRT concomitante. No obstante, previamente a su introducción en la clínica, es necesaria su validación en estudios prospectivos mediante PCR cuantitativa o inmunohistoquímica.

2.4. GENES PREDICTORES DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL, DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y DE LA RESPUESTA TUMORAL A LA QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN, SEGUIDA DE RT/QRT O CIRUGÍA

En un análisis independiente a la clasificación en clusters, determinamos qué genes estaban implicados en la recidiva del tumor a los 2 años, en la muerte del paciente a los 3 años y en la respuesta tumoral a la quimioterapia de inducción, seguida de RT/QRT o cirugía. A pesar de que no se alcanzó suficiente poder estadístico para identificar genes con una p ajustada menor a 0,05; hemos identificado una serie de genes con una p no ajustada $<0,001$. Los genes identificados en estos tres análisis deben ser validados en un estudio independiente con PCR cuantitativa o IHQ para determinar su utilidad como marcadores predictivos de la recidiva tumoral, de la supervivencia y/o de la respuesta tumoral a la QTI.

Una de las posibles razones por las que no alcanzamos significación estadística en los análisis de recidiva a dos años, de muerte del paciente a los tres años o de respuesta a la quimioterapia de inducción podría ser la coexistencia dentro de la población de estudio

de diferentes subtipos tumorales con un comportamiento biológico distinto. Esto sería consistente con el resultado obtenido en el análisis de cluster, en el que hemos identificado tres subtipos tumorales con características moleculares diferentes, que influyen de modo distinto sobre la SLRL y la SG del paciente. Por otro lado, el tamaño muestral utilizado en este estudio no ha permitido realizar una estratificación de las características clínicas y biológicas identificadas como relevantes en estudios previos, como son la infección por el virus del papiloma humano (VPH), la localización tumoral, la afectación ganglionar o la modalidad de tratamiento, variables que pueden influir sobre la evolución clínica de los pacientes incluidos en el estudio.

No obstante, la sobre-expresión de tirosina sulfotransferasa 1 (TPST1), característica de los tumores del cluster 1, se ha identificado, también, en este análisis independiente como un factor de riesgo de recidiva tumoral a los 2 años de seguimiento, y sería, por tanto, un buen candidato a validar como marcador predictivo de la recidiva tumoral en pacientes con CECC tratados con QTI seguida de RT/QRT o cirugía, o QRT.

2.5. PROCESOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS CON LA PATOGÉNESIS DEL CECC

A pesar de que el estudio de los cambios de expresión asociados con la transformación neoplásica de los CECC no ha sido un objetivo prioritario de este estudio, ya que está dirigido fundamentalmente a la identificación de marcadores predictivos de la evolución clínica del paciente, también hemos realizado un análisis de las diferencias de expresión entre los tumores y la mucosa normal. En el análisis de cluster no supervisado, que clasifica a las muestras según su perfil de expresión, las mucosas se agrupan formando un pequeño subcluster, dentro del cluster 3 constituido por aquellos tumores con mayor grado de diferenciación celular. La comparación de todas las biosias tumorales de CECC frente a las muestras de mucosa normal identificó 56 genes con una *p* ajustada menor que 0,05.

El análisis de ontologías indica que en los CECC se activan genes implicados en la organización de la matriz extracelular. Durante el proceso de tumorigénesis se producen alteraciones en la organización, remodelación y degradación de la matriz extracelular. Las proteasas que degradan la matriz extracelular, como las de la familia de las metaloproteasas, facilitan que las células tumorales puedan atravesar la barrera proteica que forma la matriz extracelular e invadir tejidos adyacentes o producir metástasis a distancia.²⁴¹ En este sentido, los tumores, en comparación con el tejido normal, sobre-expresan la metaloproteinasa 1 (MMP1). A través de la degradación de

la matriz extracelular y la sobre-expresión de MMP1, la capacidad de crecimiento y la invasividad de las células tumorales aumenta.²⁴² De modo consistente con nuestros resultados, diversos estudios muestran que en CECC se produce una sobre-expresión de la metaloproteinasa 1, que a su vez se asocia con un aumento de la capacidad de migración e invasividad de las células tumorales.^{243, 244}

Además, el análisis de ontologías muestra que en los CECC se encuentran activados los “checkpoints”, el ciclo celular y la reparación del DNA por recombinación homóloga. Los “checkpoints”, junto a los sistemas de reparación del DNA, contribuyen a mantener la integridad genómica, bloqueando el ciclo celular de la célula que presenta daño en el DNA, evitando que progrese y replique su DNA, hasta que la lesión haya sido reparada.⁷⁹ Las alteraciones de los “checkpoints” y los mecanismos de reparación del DNA favorecen la aparición de alteraciones genéticas y cromosómicas que pueden activar a oncogenes o inactivar genes supresores iniciando de este modo el proceso de transformación neoplásica de las células normales del epitelio escamoso. En CECC, la alteración de los mecanismos de control de los “checkpoint” viene acompañada por un aumento de la inestabilidad cromosómica.²⁴⁵ Además, en células de CECC, los mecanismos de control de los “checkpoint” juegan un papel importante en la respuesta a fármacos genotóxicos como el paclitaxel, el carboplatino o la radioterapia.^{246, 247} No obstante, a pesar de que el análisis de ontologías muestra que en los tumores se encuentran activados los “checkpoints”, el ciclo celular y la reparación del DNA por recombinación homóloga, entre los genes que presentan una *p* ajustada < 0,05 no hemos identificado ningún gen característico de estos procesos. Para determinar, de un modo más concluyente si la sobre-activación de los “checkpoints” o del sistema de reparación por recombinación homóloga pueden jugar un papel importante en el proceso de patogénesis del CECC, sería necesario realizar estudios funcionales.

En comparación con la mucosa normal, los CECC también sobre-expresan DCC1 que junto a Ctf18p y Ctf8p forma un complejo de replicación alternativo (RFC) que participa en el proceso de segregación de los cromosomas durante la división celular.²⁴⁸ DCC1 participa además, en el proceso de mantenimiento de los telómeros.²⁴⁹

La proteína inducible por interferon IFI6, también sobre-expresada en los tumores, tiene actividad antiapoptótica, ya que inhibe la vía apoptótica mitocondrial, en células tumorales de mieloma o carcinoma gástrico.^{250, 251}

De modo consistente, con nuestros resultados, estudios previos muestran que en CECC están sobre-expresados la inhibina A (INHBA), IFI6 y la metaloproteinasa (MMP1).¹³⁷

Por otro lado, el análisis de ontologías indica que en la transición de la célula del epitelio escamoso normal hasta célula tumoral se produce una pérdida de la capacidad de diferenciación, de la organización del citoesqueleto de actina y de la morfogénesis tisular. De acuerdo con nuestros hallazgos, durante el proceso de transformación neoplásica las células del epitelio escamoso que recubre el tracto aerodigestivo pierden, en mayor o menor medida, el proceso de maduración en capas y el proceso de diferenciación celular.¹⁰ En este sentido, los tumores infra-expresan la proteína epitelial de membrana 1 (EMP1) que participa en el proceso de diferenciación del epitelio escamoso y que se encuentra infraexpresada en CECC.^{235, 252}

Además en los tumores están infra-expresados diversos genes de detoxificación como el citocromo P450 2C9 (CYP2C9), el citocromo P450 2C18 (CYP2C18), el citocromo P450 3A2 (CYP3A5P2) y la oxidasa dual 1 (DUOX1).²¹¹

2.6. COMPARACIÓN DE NUESTROS HALLAZGOS CON ESTUDIOS PREVIOS DE MICROARRAYS EN CECC

Algunos de los genes expresados diferencialmente en los tumores del cluster 1 o en los del cluster 3 forman parte del grupo de genes predictores de metástasis ganglionares descrito por Roepman y col.(2005) en pacientes con CECC.¹³¹ Así, la sobre-expresión de la subunidad $\alpha 1$ de la prolil-4-hidroxilasa (P4HA1), la monoxigenasa MICAL2 y la serpina E1 (SERPINE1), que hemos observado en los tumores del cluster 1, correlaciona en el estudio de Roepman y col.(2005) con la presencia de metástasis ganglionar. Por el contrario, en este mismo estudio la expresión de “polo-like kinasa 2” (PLK2), de periplaquina (PPL), de SLPI, del canal de cloro intracelular III (CLIC3), de SPINK5, de la proteína de unión a calcio A9 (S100A9), de HOP, de la involucrina (IVL) y de la kalicreína (KLK12), sobre-expresados en nuestros tumores del cluster 3, está inversamente relacionada con la presencia de metástasis ganglionar. Por otra parte, la expresión de TGM3, infra-expresado en los tumores del cluster 1, esta también inversamente relacionada con la aparición de metástasis ganglionares. La comparación de nuestros resultados con los de Roepman y col. (2005) indica que algunos de los genes característicos del cluster 1 y del cluster 3 están asociados con la aparición de metástasis y confirman de este modo el valor pronóstico de estos marcadores para predecir la evolución clínica de los pacientes con CECC.

Por otra parte, entre los genes sobre-expresados en el cluster 1 encontramos genes implicados en el proceso de transición epitelio-mesénquima y proteínas estromales. En

este sentido, nuestros resultados estarían de acuerdo con el estudio de Chung y col.(2006) que identifican a un grupo de tumores de mal pronóstico que presentan características de transición epitelio-mesénquima junto a una sobre-activación de la vía de NF-KB.¹²⁶

Cabe destacar el distinto enfoque de nuestro estudio en comparación con los estudios de Roepman y col.(2005) y de Chung y col. (2006), ya que incluimos únicamente a pacientes con CECC en estadios localmente, de modo que los marcadores identificados en nuestro estudio, además de tener un posible valor pronóstico del comportamiento biológico del tumor, son marcadores predictivos de la evolución clínica de los pacientes tratados con quimioterapia de inducción, seguida de RT/QRT o cirugía, o quimioradioterapia concomitante.

2.7. UTILIDAD CLÍNICA DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO

En el estudio de microarrays hemos identificado tres subtipos de CECC con un perfil de expresión característico, especialmente en el caso del cluster 1 y del cluster 3, que está relacionado con la supervivencia libre de recidiva local y la supervivencia global de los pacientes portadores de estos tumores, tras su tratamiento con quimioterapia de inducción, seguida de RT/QRT o cirugía, o con quimioradioterapia concomitante. Además, hemos identificado un grupo mínimo de ocho genes (TPST1, THBS1, PPF1BP1, FNDC3B, P4HA1, DUOX1, LYPD3 y RAB25) con el mayor grado de sensibilidad y especificidad para predecir la supervivencia libre de recidiva local a 2 años o la supervivencia global de los pacientes a 3 años.

Los marcadores identificados son capaces de predecir la evolución clínica de los pacientes con CECC en estadios avanzados, tratados con quimioradioterapia o quimioterapia de inducción, seguida de RT/QT o cirugía. Es decir, el análisis por microarrays de los niveles de expresión de estos marcadores en biopsias tumorales pre-tratamiento podría identificar, de modo previo al inicio de la terapia, aquellos pacientes que fueran a obtener un beneficio clínico del tratamiento genotóxico conservador y distinguirlos de los pacientes con escasa probabilidad de presentar una evolución clínica favorable, de modo que estos últimos podrían ser tratados desde el inicio con cirugía, o bien ser candidatos a un tratamiento alternativo.

No obstante, los resultados obtenidos en este estudio de microarrays deben ser validados en estudios prospectivos independientes para confirmar la utilidad clínica de estos marcadores. La utilización de un número mayor de muestras permitiría, además, realizar

Discusión

un análisis más completo, estratificando aquellas variables que se ha demostrado previamente que contribuyen a determinar la evolución clínica de los pacientes de CECC tratados con quimiorradioterapia concomitante o quimioterapia de inducción seguida de QRT/RT y cirugía. Finalmente, tal evaluación permitiría caracterizar de un modo más preciso los diferentes subtipos tumorales que se engloban dentro del carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Este análisis sería especialmente útil para definir si el subtipo de tumores del cluster 2, identificado en nuestro estudio, constituye un subtipo biológico con un comportamiento clínico propio, o por el contrario agrupa a tumores de características heterogéneas que comparten algunas de las características de los otros dos subtipos de tumores identificados.

Finalmente, deben realizarse estudios independientes, para determinar la sensibilidad y especificidad, de estos marcadores como predictores de la evolución clínica del paciente sometido a tratamiento genotóxico. Además, la utilización de técnicas más cercanas a la práctica clínica como la PCR cuantitativa o la inmunohistoquímica facilitaría su posible futura introducción en la práctica clínica.

VII. CONCLUSIONES

VII CONCLUSIONES

1. EL ESTUDIO DEL NIVEL DE EXPRESIÓN, DE LOS GENES DEL SISTEMA DE REPARACIÓN NO HOMÓLOGA POR UNIÓN DE EXTREMOS, EN BIOPSIAS PRE-TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO LOCALMENTE AVANZADO, TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN, SEGUIDA DE RADIOTERAPIA / QUIMIORADIOTERAPIA O CIRUGÍA RADICAL, HA GENERADO LAS SIGUIENTES CONCLUSIONES:

- El nivel de mRNA de Ku70, Ku80 o DNA-PKcs es significativamente más elevado en tumores con una respuesta tumoral a los tres meses superior al 50 % que en aquellos con respuesta inferior al 50 %.
- El nivel de mRNA de Ku70 es un factor de riesgo independiente de recidiva tumoral.
- Los pacientes cuyos tumores expresan mayor nivel de mRNA de Ku70 presentan un riesgo menor de padecer una recidiva local, durante un seguimiento medio de 2 años, que los pacientes cuyos tumores presentan un nivel bajo.
- El nivel de mRNA de Ku70 posee mayor capacidad de predecir la recidiva tumoral cuando solo se incluyen en el análisis a los pacientes que han seguido tratamiento genotóxico, excluyendo a los pacientes quirúrgicos.
- El porcentaje de células tumorales positivas para Ku70 es significativamente mayor en tumores con una respuesta tumoral superior al 50 % que en aquellos con respuesta inferior al 50 %.
- El porcentaje de células tumorales positivas para la proteína Ku70 es un factor de riesgo independiente de recidiva tumoral y de muerte.
- Los pacientes cuyos tumores tienen un mayor porcentaje de células tumorales positivas para la proteína Ku70 presentan menor riesgo de muerte y de padecer una recidiva local, durante 4 años de seguimiento, que aquellos cuyos tumores presentan un porcentaje bajo.

2. EL ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN POR MICROARRAYS EN BIOPSIAS PRE-TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO EN ESTADIOS LOCALMENTE AVANZADOS, TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN, SEGUIDA DE TRATAMIENTO GENOTÓXICO CONSERVADOR O CIRUGÍA, O QUIMIORADIOTERAPIA CONCOMITANTE, HA GENERADO LAS SIGUIENTES CONCLUSIONES:

- Se han identificado tres subtipos tumorales (cluster 1, cluster 2 y cluster 3) que presentan diferencias significativas en la supervivencia libre de recidiva local y en la supervivencia global de los pacientes.
- La clasificación en clusters es un factor de riesgo independiente de la recidiva local y de muerte en estos pacientes, después de un seguimiento medio de 1 año y 7 meses.
- Los tumores del cluster 1 se caracterizan por una mayor migración e invasividad, una transición epitelio-mesénquima, la activación de la vía secretora y un menor grado de diferenciación escamosa. Los pacientes con este subtipo tumoral tienen una evolución clínica desfavorable, ya que presentan una supervivencia libre de recidiva local y una supervivencia global menor que la de los pacientes de los clusters 2 y 3.
- Los tumores del cluster 3 se caracterizan por un mayor grado de diferenciación escamosa y por la sobre-expresión de genes localizados en las regiones cromosómicas 1q21 y 19q13. Los pacientes con este subtipo tumoral tienen una evolución clínica favorable, ya que presentan una supervivencia libre de recidiva local y una supervivencia global mayor que la de los pacientes de los clusters 1 y 2.
- Los genes tirosina sulfotransferasa 1 (TPST1), trombospondina 1 (THBS1), liprina β 1 (PPF1BP1), fibronectina IIIB (FNDC3B) o α 1-prolil 4-hidroxilasa (P4HA1) cuando se sobre-expresan son factores de mal pronóstico. Su sobre-expresión aumenta el riesgo de recidiva local a 2 años y de muerte a 3 años.
- Los genes oxidasa dual 1 (DUOX1), LYPD3 o RAB25 cuando se sobreexpresan son factores de buen pronóstico. Su sobre-expresión disminuye el riesgo de recidiva local a 2 años y de muerte a 3 años.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008;371(9625):1695-709. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18486742.
2. McMahon S, Chen AY. Head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(1):21-4. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12716033.
3. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5(2):127-35. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15685196.
4. Abello PT, J. Otorrinolaringología, vol. 1. Barcelona: Doyma, 1992.
5. Cummings C, Fredrickson J, Harker L, Schuller DE. Otolaryngology-Head and Neck Surgery, vol. 1: Moby-Year Book, Inc, 1993.
6. Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin* 2005;55(4):242-58; quiz 61-2, 64. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16020425.
7. Moisa, II. Neuroendocrine tumors of the larynx. *Head Neck* 1991;13(6):498-508. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1665150.
8. Laurie SA, Licitra L. Systemic therapy in the palliative management of advanced salivary gland cancers. *J Clin Oncol* 2006;24(17):2673-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16763282.
9. Spano JP, Busson P, Atlan D, Bourhis J, Pignon JP, Esteban C, et al. Nasopharyngeal carcinomas: an update. *Eur J Cancer* 2003;39(15):2121-35. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14522369.
10. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005.
11. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa., ed. 2nd eds. Berlin: Springer-Verlag, 1997.
12. Paparella MM, Schunrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WL. Otolaryngology, vol. 1. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991.
13. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer* 1975;36(4):1386-92. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1175136.
14. Silverman S, Jr., Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984;53(3):563-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6537892.
15. Einhorn J, Wersall J. Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. *Cancer* 1967;20(12):2189-93. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6073896.
16. Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, Ang KK, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(22):3693-704. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16832122.
17. Posner MR. Paradigm shift in the treatment of head and neck cancer: the role of neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist* 2005;10 Suppl 3:11-9. Available from

Bibliografia

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16368867.

18. Ensley JF, Jacobs JR, Weaver A, Kinzie J, Crissman J, Kish JA, et al. Correlation between response to cisplatin-combination chemotherapy and subsequent radiotherapy in previously untreated patients with advanced squamous cell cancers of the head and neck. *Cancer* 1984;54(5):811-4. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6204738.

19. Altundag O, Gullu I, Altundag K, Yalcin S, Ozyar E, Cengiz M, et al. Induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil followed by chemoradiotherapy or radiotherapy alone in the treatment of locoregionally advanced resectable cancers of the larynx and hypopharynx: results of single-center study of 45 patients. *Head Neck* 2005;27(1):15-21. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15515158.

20. Veterans. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *N Engl J Med* 1991;324(24):1685-90. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2034244.

21. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 2003;349(22):2091-8. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14645636.

22. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56(11):2488-92. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8653682.

23. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, et al. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994;54(5):1156-8. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8118798.

24. Garnis C, Baldwin C, Zhang L, Rosin MP, Lam WL. Use of complete coverage array comparative genomic hybridization to define copy number alterations on chromosome 3p in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2003;63(24):8582-5. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14695166.

25. Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S, et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med* 1996;2(6):682-5. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8640560.

26. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(16):3630-3. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8705996.

27. Nakanishi H, Wang XL, Imai FL, Kato J, Shiiba M, Miya T, et al. Localization of a novel tumor suppressor gene loci on chromosome 9p21-22 in oral cancer. *Anticancer Res* 1999;19(1A):29-34. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10226521.

28. Mao L, Fan YH, Lotan R, Hong WK. Frequent abnormalities of FHIT, a candidate tumor suppressor gene, in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 1996;56(22):5128-31. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8912845.

29. Hogg RP, Honorio S, Martinez A, Agathangelou A, Dallol A, Fullwood P, et al. Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in

head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2002;38(12):1585-92. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12142046.

30. Lee JI, Soria JC, Hassan K, Liu D, Tang X, El-Naggar A, et al. Loss of Fhit expression is a predictor of poor outcome in tongue cancer. *Cancer Res* 2001;61(3):837-41. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1221865.

31. Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, Goodman SN, Westra WH, Schwab D, et al. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(21):1580-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8901856.

32. Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res* 1992;52(21):5997-6000. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1394225.

33. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995;13(4):1009-22. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7707100.

34. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(17):2666-72. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16763281.

35. Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol* 2000;53(4):165-72. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11040937.

36. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(2 Suppl):21-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15142631.

37. Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994;74(1):152-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8004570.

38. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(9):502-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12736744.

39. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000;36(4):311-27. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10899669.

40. Erber R, Klein W, Andl T, Enders C, Born AI, Conradt C, et al. Aberrant p21(CIP1/WAF1) protein accumulation in head-and-neck cancer. *Int J Cancer* 1997;74(4):383-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9291426.

41. Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Sato S, Nikai H. Expression of p53 and p21CIP1/WAF1 proteins in oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Oncol Rep* 1999;6(3):539-45. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10203588.

42. Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, Lee JS, Lippman SM, Kayser S, et al. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 1996;56(24):5600-4. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8971162.

Bibliografia

43. Soria JC, Morat L, Commo F, Dabit D, Perie S, Sabatier L, et al. Telomerase activation cooperates with inactivation of p16 in early head and neck tumorigenesis. *Br J Cancer* 2001;84(4):504-11. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1207046.
44. Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirekapan S, Sriuranpong V, Sakuntabhai A, Yenrudi S, et al. Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(15):3530-3. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8758922.
45. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6(5):963-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13094644.
46. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Rigante M, Artuso A, et al. Multistep laryngeal carcinogenesis helps our understanding of the field cancerisation phenomenon: a review. *Eur J Cancer* 2004;40(16):2383-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15519509.
47. Herrero R. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003(31):47-51. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12807945.
48. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(6):407-20. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18334711.
49. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006;24(17):2606-11. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16763272.
50. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol* 2004;31(6):744-54. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15599852.
51. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, et al. Response to therapy and outcomes in oropharyngeal cancer are associated with biomarkers including human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, gender, and smoking. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69(2 Suppl):S109-11. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17848274.
52. Szentirmay Z, Polus K, Tamas L, Szentkuti G, Kurcsics J, Csernak E, et al. Human papillomavirus in head and neck cancer: molecular biology and clinicopathological correlations. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(1):19-34. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15785870.
53. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-50. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12044010.
54. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 2001;75(9):4467-72. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11287602.
55. Schmidt-Ullrich RK. Molecular targets in radiation oncology. *Oncogene* 2003;22(37):5730-3. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12947382.

56. Rhys Evans PH, Montgomery PQ, Gullane PJ. Principles and Practice of Head and Neck Oncology. London: Martin Dunitz, Taylor & Francis Group, 2006.
57. Urba SG, Forastiere AA, Wolf GT, Esclamado RM, McLaughlin PW, Thornton AF. Intensive induction chemotherapy and radiation for organ preservation in patients with advanced resectable head and neck carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12(5):946-53. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8164046.
58. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):330-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12724731.
59. Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O, Koyama Y, Hirota Y, Ayusawa D, et al. Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J Biol Chem* 1987;262(17):8235-41. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2954951.
60. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther* 1987;34(2):155-66. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=317449.
61. Pinto AL, Lippard SJ. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta* 1985;780(3):167-80. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3896310.
62. Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993;15(3):191-219. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8142057.
63. McHugh PJ, Sones WR, Hartley JA. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2000;20(10):3425-33. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10779332.
64. Schrijvers D, Vermorken JB. Role of taxoids in head and neck cancer. *Oncologist* 2000;5(3):199-208. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10884498.
65. Schrijvers D, Vermorken JB. Taxanes in the treatment of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 2005;17(3):218-24. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15818164.
66. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15189136.
67. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003;193(1-2):3-34. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14599765.
68. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1(1):22-33. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11900249.
69. Mills KD, Ferguson DO, Alt FW. The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev* 2003;194:77-95. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12846809.
70. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411(6835):366-74. Available from

Bibliografía

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1357144.

71. Haber JE. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 2000;16(6):259-64. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10827453.

72. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002;23(5):687-96. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12016139.

73. Sonoda E, Takata M, Yamashita YM, Morrison C, Takeda S. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(15):8388-94. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11459980.

74. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 1998;17(18):5497-508. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9736627.

75. Hefferin ML, Tomkinson AE. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* 2005;4(6):639-48. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15907771.

76. Gaymes TJ, North PS, Brady N, Hickson ID, Mufti GJ, Rassool FV. Increased error-prone non homologous DNA end-joining--a proposed mechanism of chromosomal instability in Bloom's syndrome. *Oncogene* 2002;21(16):2525-33. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11971187.

77. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001;27(3):247-54. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11242102.

78. Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, Obe G. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 2004;104(1-4):7-13. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15162009.

79. Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *Embo J* 2008;27(4):589-605. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18285820.

80. Melo J, Toczyski D. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(2):237-45. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11891124.

81. Shimada M, Nakanishi M. DNA damage checkpoints and cancer. *J Mol Histol* 2006;37(5-7):253-60. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16841236.

82. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396(6712):643-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9872311.

83. Bockmuhl U, Petersen I. DNA ploidy and chromosomal alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2002;441(6):541-50. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12461610.

84. Sudbo J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A. DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *N Engl J Med* 2001;344(17):1270-8. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1320386.

85. De la Torre C, Pincheira J, Lopez-Saez JF. Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks. *Histol Histopathol* 2003;18(1):225-43. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12507302.

86. Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, et al. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 2000;404(6777):510-4. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10761921.

87. Gao Y, Ferguson DO, Xie W, Manis JP, Sekiguchi J, Frank KM, et al. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* 2000;404(6780):897-900. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10786799.

88. Ferguson DO, Sekiguchi JM, Chang S, Frank KM, Gao Y, DePinho RA, et al. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(12):6630-3. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10823907.

89. Schwartz M, Zlotorynski E, Goldberg M, Ozeri E, Rahat A, le Sage C, et al. Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes Dev* 2005;19(22):2715-26. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16291645.

90. Feldser DM, Hackett JA, Greider CW. Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nat Rev Cancer* 2003;3(8):623-7. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12894250.

91. Bailey SM, Meyne J, Chen DJ, Kurimasa A, Li GC, Lehnert BE, et al. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(26):14899-904. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10611310.

92. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003;426(6963):194-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14608368.

93. Gudkov AV, Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(2):117-29. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12563311.

94. Coultas L, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* 2000;5(6):491-507. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11303908.

95. Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 2003;24(10):1571-80. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12919958.

96. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7265-79. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14576837.

97. Wang S, Guo M, Ouyang H, Li X, Cordon-Cardo C, Kurimasa A, et al. The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(4):1584-8. Available from

Bibliografía

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10677503.

98. Woo RA, Jack MT, Xu Y, Burma S, Chen DJ, Lee PW. DNA damage-induced apoptosis requires the DNA-dependent protein kinase, and is mediated by the latent population of p53. *Embo J* 2002;21(12):3000-8. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12065413.

99. Jensen R, Glazer PM. Cell-interdependent cisplatin killing by Ku/DNA-dependent protein kinase signaling transduced through gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(16):6134-9. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15069205.

100. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362(6423):849-52. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8479523.

101. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;362(6423):847-9. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8479522.

102. Layland MK, Sessions DG, Lenox J. The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope* 2005;115(4):629-39. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15805872.

103. Hasina R, Lingen MW. Head and neck cancer: the pursuit of molecular diagnostic markers. *Semin Oncol* 2004;31(6):718-25. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15599849.

104. Sudbo J, Lippman SM, Lee JJ, Mao L, Kildal W, Sudbo A, et al. The influence of resection and aneuploidy on mortality in oral leukoplakia. *N Engl J Med* 2004;350(14):1405-13. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15070790.

105. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2):467-75. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15734974.

106. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24(5):736-47. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16401683.

107. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(19):3128-37. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18474878.

108. He Y, Zeng Q, Drenning SD, Melhem MF, Tweardy DJ, Huang L, et al. Inhibition of human squamous cell carcinoma growth in vivo by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promoter. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(14):1080-7. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9672256.

109. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24(25):4170-6. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16943533.

110. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* 2004;5(5):489-500. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15144956.
111. Bentzen SM, Atasoy BM, Daley FM, Dische S, Richman PI, Saunders MI, et al. Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2005;23(24):5560-7. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16110017.
112. Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, Pallente M, Ensley JF, Koontongkaew S, et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene* 2000;19(28):3220-4. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10918578.
113. Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohyama H, Kohno Y, Posner M, et al. Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 2001;20(43):6196-204. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11593428.
114. Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, et al. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21(17):2634-40. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11965536.
115. Mendez E, Cheng C, Farwell DG, Ricks S, Agoff SN, Futran ND, et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002;95(7):1482-94. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12237917.
116. Ha PK, Benoit NE, Yochem R, Sciubba J, Zahurak M, Sidransky D, et al. A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(8):3058-64. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12912957.
117. Gonzalez HE, Gujrati M, Frederick M, Henderson Y, Arumugam J, Spring PW, et al. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129(7):754-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12874078.
118. El-Naggar AK, Kim HW, Clayman GL, Coombes MM, Le B, Lai S, et al. Differential expression profiling of head and neck squamous carcinoma: significance in their phenotypic and biological classification. *Oncogene* 2002;21(53):8206-19. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12444558.
119. Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, Misra J, Ohyama H, Todd R, et al. Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol* 2003;39(3):259-68. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12618198.
120. Sok JC, Kuriakose MA, Mahajan VB, Pearlman AN, DeLacure MD, Chen FA. Tissue-specific gene expression of head and neck squamous cell carcinoma in vivo by complementary DNA microarray analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129(7):760-70. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12874079.
121. Kuriakose MA, Chen WT, He ZM, Sikora AG, Zhang P, Zhang ZY, et al. Selection and validation of differentially expressed genes in head and neck cancer. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(11):1372-83. Available from

Bibliografia

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15170515.

122. Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, et al. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* 2000;110(3 Pt 1):374-81. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10718422.

123. Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J, et al. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer* 2005;113(5):789-97. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15499618.

124. Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 2004;64(1):55-63. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14729608.

125. Belbin TJ, Singh B, Barber I, Socci N, Wenig B, Smith R, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Cancer Res* 2002;62(4):1184-90. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11861402.

126. Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, et al. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006;66(16):8210-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16912200.

127. Pramana J, Van den Brekel MW, van Velthuysen ML, Wessels LF, Nuyten DS, Hofland I, et al. Gene expression profiling to predict outcome after chemoradiation in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69(5):1544-52. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17931799.

128. Slebos RJ, Yi Y, Ely K, Carter J, Evjen A, Zhang X, et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(3 Pt 1):701-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16467079.

129. Pyeon D, Newton MA, Lambert PF, den Boon JA, Sengupta S, Marsit CJ, et al. Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers. *Cancer Res* 2007;67(10):4605-19. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17510386.

130. O'Donnell RK, Kupferman M, Wei SJ, Singhal S, Weber R, O'Malley B, et al. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene* 2005;24(7):1244-51. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15558013.

131. Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, et al. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2005;37(2):182-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15640797.

132. Roepman P, de Jager A, Groot Koerkamp MJ, Kummer JA, Slootweg PJ, Holstege FC. Maintenance of head and neck tumor gene expression profiles upon lymph node metastasis. *Cancer Res* 2006;66(23):11110-4. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17145852.

133. Cromer A, Carles A, Millon R, Ganguli G, Chalmel F, Lemaire F, et al. Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray

- analysis. *Oncogene* 2004;23(14):2484-98. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14676830.
134. Braakhuis BJ, Senft A, de Bree R, de Vries J, Ylstra B, Cloos J, et al. Expression profiling and prediction of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2006;59(12):1254-60. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16679350.
135. Warner GC, Reis PP, Jurisica I, Sultan M, Arora S, Macmillan C, et al. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis. *Int J Cancer* 2004;110(6):857-68. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15170668.
136. Schmalbach CE, Chepeha DB, Giordano TJ, Rubin MA, Teknos TN, Bradford CR, et al. Molecular profiling and the identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130(3):295-302. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15023835.
137. Ye H, Yu T, Temam S, Ziober BL, Wang J, Schwartz JL, et al. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics* 2008;9:69. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18254958.
138. Yu YH, Kuo HK, Chang KW. The evolving transcriptome of head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *PLoS ONE* 2008;3(9):e3215. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18791647.
139. Roepman P, Kemmeren P, Wessels LF, Slootweg PJ, Holstege FC. Multiple robust signatures for detecting lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2006;66(4):2361-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16489042.
140. Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 2003;106(5):683-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12866027.
141. Akervall J, Guo X, Qian CN, Schoumans J, Leeser B, Kort E, et al. Genetic and expression profiles of squamous cell carcinoma of the head and neck correlate with cisplatin sensitivity and resistance in cell lines and patients. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8204-13. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15623595.
142. Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck* 2001;23(3):238-53. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11428456.
143. Korabiowska M, Voltmann J, Honig JF, Bortkiewicz P, Konig F, Cordon-Cardo C, et al. Altered expression of DNA double-strand repair genes Ku70 and Ku80 in carcinomas of the oral cavity. *Anticancer Res* 2006;26(3A):2101-5. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16827151.
144. Shin KH, Kang MK, Kim RH, Kameta A, Baluda MA, Park NH. Abnormal DNA end-joining activity in human head and neck cancer. *Int J Mol Med* 2006;17(5):917-24. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16596281.
145. Whitaker SJ, Powell SN, McMillan TJ. Molecular assays of radiation-induced DNA damage. *Eur J Cancer* 1991;27(7):922-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1834130.
146. Peters GJ, van Triest B, Backus HH, Kuiper CM, van der Wilt CL, Pinedo HM. Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell

Bibliografia

- lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Eur J Cancer* 2000;36(7):916-24. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10785598.
147. Sorenson CM, Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 1988;48(16):4484-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3395999.
148. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2001;2(3):196-206. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11256071.
149. Peng Y, Zhang Q, Nagasawa H, Okayasu R, Liber HL, Bedford JS. Silencing expression of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase by small interfering RNA sensitizes human cells for radiation-induced chromosome damage, cell killing, and mutation. *Cancer Res* 2002;62(22):6400-4. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12438223.
150. Chu G. Double strand break repair. *J Biol Chem* 1997;272(39):24097-100. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9305850.
151. Brown KD, Lataxes TA, Shangary S, Mannino JL, Giardina JF, Chen J, et al. Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a p53/ataxia-telangiectasia-mutated protein-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2000;275(9):6651-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10692474.
152. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(3):205-16. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10655437.
153. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11846609.
154. Castleman KR. Concepts in imaging and microscopy: color image processing for microscopy. *Biol Bull* 1998;194(2):100-7. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9604311.
155. Maximova OA, Taffs RE, Pomeroy KL, Piccardo P, Asher DM. Computerized morphometric analysis of pathological prion protein deposition in scrapie-infected hamster brain. *J Histochem Cytochem* 2006;54(1):97-107. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16148313.
156. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4(2):249-64. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12925520.
157. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003;31(4):e15. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12582260.
158. Pertea G, Huang X, Liang F, Antonescu V, Sultana R, Karamycheva S, et al. TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics* 2003;19(5):651-2. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12651724.

159. Falcon S, Gentleman R. Using GOSTats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* 2007;23(2):257-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17098774.
160. Spaulding MB, Fischer SG, Wolf GT. Tumor response, toxicity, and survival after neoadjuvant organ-preserving chemotherapy for advanced laryngeal carcinoma. The Department of Veterans Affairs Cooperative Laryngeal Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1994;12(8):1592-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8040671.
161. Bjork-Eriksson T, West C, Nilsson A, Magnusson B, Svensson M, Karlsson E, et al. The immunohistochemical expression of DNA-PKCS and Ku (p70/p80) in head and neck cancers: relationships with radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45(4):1005-10. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10571209.
162. Noguchi T, Shibata T, Fumoto S, Uchida Y, Mueller W, Takeno S. DNA-PKcs expression in esophageal cancer as a predictor for chemoradiation therapeutic sensitivity. *Ann Surg Oncol* 2002;9(10):1017-22. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12464596.
163. Friesland S, Kanter-Lewensohn L, Tell R, Munck-Wikland E, Lewensohn R, Nilsson A. Expression of Ku86 confers favorable outcome of tonsillar carcinoma treated with radiotherapy. *Head Neck* 2003;25(4):313-21. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12658736.
164. Lee SW, Cho KJ, Park JH, Kim SY, Nam SY, Lee BJ, et al. Expressions of Ku70 and DNA-PKcs as prognostic indicators of local control in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62(5):1451-7. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16029807.
165. Harima Y, Sawada S, Miyazaki Y, Kin K, Ishihara H, Imamura M, et al. Expression of Ku80 in cervical cancer correlates with response to radiotherapy and survival. *Am J Clin Oncol* 2003;26(4):e80-5. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12902903.
166. Wilson CR, Davidson SE, Margison GP, Jackson SP, Hendry JH, West CM. Expression of Ku70 correlates with survival in carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* 2000;83(12):1702-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11104569.
167. Salles B, Calsou P, Frit P, Muller C. The DNA repair complex DNA-PK, a pharmacological target in cancer chemotherapy and radiotherapy. *Pathol Biol (Paris)* 2006;54(4):185-93. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16563661.
168. Smith GC, Divecha N, Lakin ND, Jackson SP. DNA-dependent protein kinase and related proteins. *Biochem Soc Symp* 1999;64:91-104. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10207623.
169. Gao Y, Chaudhuri J, Zhu C, Davidson L, Weaver DT, Alt FW. A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity* 1998;9(3):367-76. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9768756.
170. Dip R, Naegeli H. More than just strand breaks: the recognition of structural DNA discontinuities by DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Faseb J* 2005;19(7):704-15. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15857885.
171. Jack MT, Woo RA, Hirao A, Cheung A, Mak TW, Lee PW. Chk2 is dispensable for p53-mediated G1 arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response. *Proc Natl Acad Sci U S A*

Bibliografia

2002;99(15):9825-9. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12097646.

172. Jack MT, Woo RA, Motoyama N, Takai H, Lee PW. DNA-dependent protein kinase and checkpoint kinase 2 synergistically activate a latent population of p53 upon DNA damage. *J Biol Chem* 2004;279(15):15269-73. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14752107.

173. Cobb LJ, Liu B, Lee KW, Cohen P. Phosphorylation by DNA-dependent protein kinase is critical for apoptosis induction by insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res* 2006;66(22):10878-84. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17108124.

174. Yang CR, Leskov K, Hosley-Eberlein K, Criswell T, Pink JJ, Kinsella TJ, et al. Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(11):5907-12. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10823943.

175. Zhao HJ, Hosoi Y, Miyachi H, Ishii K, Yoshida M, Nemoto K, et al. DNA-dependent protein kinase activity correlates with Ku70 expression and radiation sensitivity in esophageal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2000;6(3):1073-8. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10741736.

176. Tian X, Chen G, Xing H, Weng D, Guo Y, Ma D. The relationship between the down-regulation of DNA-PKcs or Ku70 and the chemosensitization in human cervical carcinoma cell line HeLa. *Oncol Rep* 2007;18(4):927-32. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17786356.

177. Deriano L, Guipaud O, Merle-Beral H, Binet JL, Ricoul M, Potocki-Veronese G, et al. Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. *Blood* 2005;105(12):4776-83. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15718417.

178. Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(15):8076-81. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9223317.

179. Panta GR, Kaur S, Cavin LG, Cortes ML, Mercurio F, Lothstein L, et al. ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF-kappaB through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Mol Cell Biol* 2004;24(5):1823-35. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14966265.

180. Nueda A, Hudson F, Mivechi NF, Dynan WS. DNA-dependent protein kinase protects against heat-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274(21):14988-96. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10329701.

181. Tai YT, Podar K, Kraeft SK, Wang F, Young G, Lin B, et al. Translocation of Ku86/Ku70 to the multiple myeloma cell membrane: functional implications. *Exp Hematol* 2002;30(3):212-20. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11882358.

182. Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, Carnot F, Houllier AM, Soussi T, et al. p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol* 2000;18(7):1465-73. Available from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10735894.

183. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Oliver J, Martini N, Gralla R, et al. Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell

- lung cancer. *Cancer Res* 1995;55(21):5038-42. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7585548.
184. Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995;1(10):1029-34. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7489358.
185. Buttitta F, Marchetti A, Gadducci A, Pellegrini S, Morganti M, Carnicelli V, et al. p53 alterations are predictive of chemoresistance and aggressiveness in ovarian carcinomas: a molecular and immunohistochemical study. *Br J Cancer* 1997;75(2):230-5. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9010031.
186. Eid H, Van der Looij M, Institoris E, Gezci L, Bodrogi I, Olah E, et al. Is p53 expression, detected by immunohistochemistry, an important parameter of response to treatment in testis cancer? *Anticancer Res* 1997;17(4A):2663-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9252698.
187. Tada M, Matsumoto R, Iggo RD, Onimaru R, Shirato H, Sawamura Y, et al. Selective sensitivity to radiation of cerebral glioblastomas harboring p53 mutations. *Cancer Res* 1998;58(9):1793-7. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9581814.
188. Cote RJ, Esrig D, Groshen S, Jones PA, Skinner DG. p53 and treatment of bladder cancer. *Nature* 1997;385(6612):123-5. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8990112.
189. Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002;2(2):91-100. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12635172.
190. Durand MK, Bodker JS, Christensen A, Dupont DM, Hansen M, Jensen JK, et al. Plasminogen activator inhibitor-I and tumour growth, invasion, and metastasis. *Thromb Haemost* 2004;91(3):438-49. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14983218.
191. Kleiber K, Strebhardt K, Martin BT. The biological relevance of FHL2 in tumour cells and its role as a putative cancer target. *Anticancer Res* 2007;27(1A):55-61. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17352216.
192. Jones J, Berkhoff S, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, et al. Transient down-regulation of beta1 integrin subtypes on kidney carcinoma cells is induced by mechanical contact with endothelial cell membranes. *J Cell Mol Med* 2007;11(4):826-38. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17760843.
193. Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, Wong TY, et al. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 2008;27(26):3746-53. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18223683.
194. Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL. The cell biology of the plasminogen system. *Faseb J* 1995;9(10):939-45. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7615163.
195. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5(1):29-41. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15630413.
196. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*

Bibliografia

- 2007;213(2):374-83. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17680632.
197. Berx G, Raspe E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(8):587-97. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17978854.
198. Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer* 2008;112(9):2088-100. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18327819.
199. Ouyang Y, Lane WS, Moore KL. Tyrosylprotein sulfotransferase: purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(6):2896-901. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9501187.
200. Ramos-Castaneda J, Park YN, Liu M, Hauser K, Rudolph H, Shull GE, et al. Deficiency of ATP2C1, a Golgi ion pump, induces secretory pathway defects in endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation and sensitivity to ER stress. *J Biol Chem* 2005;280(10):9467-73. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15623514.
201. Vorum H, Hager H, Christensen BM, Nielsen S, Honore B. Human calumenin localizes to the secretory pathway and is secreted to the medium. *Exp Cell Res* 1999;248(2):473-81. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10222138.
202. Huynh H, Bottini N, Williams S, Cherepanov V, Musumeci L, Saito K, et al. Control of vesicle fusion by a tyrosine phosphatase. *Nat Cell Biol* 2004;6(9):831-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15322554.
203. Egea G, Franci C, Gambus G, Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX. cis-Golgi resident proteins and O-glycans are abnormally compartmentalized in the RER of colon cancer cells. *J Cell Sci* 1993;105 (Pt 3):819-30. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7691849.
204. Franci C, Egea G, Arribas R, Reuser AJ, Real FX. Lysosomal alpha-glucosidase: cell-specific processing and altered maturation in HT-29 colon cancer cells. *Biochem J* 1996;314 (Pt 1):33-40. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8660303.
205. Seguchi T, Goto Y, Ono M, Fujiwara T, Shimada T, Kung HF, et al. Brefeldin A-resistant mutants of human epidermoid carcinoma cell line with structural changes of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 1992;267(16):11626-30. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1597488.
206. Zhang J, Zhi HY, Ding F, Luo AP, Liu ZH. Transglutaminase 3 expression in C57BL/6J mouse embryo epidermis and the correlation with its differentiation. *Cell Res* 2005;15(2):105-10. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15740639.
207. Romano V, Raimondi E, Bosco P, Feo S, Di Pietro C, Leube RE, et al. Chromosomal mapping of human cytokeratin 13 gene (KRT13). *Genomics* 1992;14(2):495-7. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1385306.
208. Yoshida M, Yamasaki K, Daiho T, Iizuka H, Suzuki H. ATP2C1 is specifically localized in the basal layer of normal epidermis and its depletion triggers keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci* 2006;43(1):21-33. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16621454.

209. Wang J, Yang Y, Xia HH, Gu Q, Lin MC, Jiang B, et al. Suppression of FHL2 expression induces cell differentiation and inhibits gastric and colon carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132(3):1066-76. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17383428.

210. Forrest GL, Gonzalez B. Carbonyl reductase. *Chem Biol Interact* 2000;129(1-2):21-40. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1154733.

211. Rokutan K, Kawahara T, Kuwano Y, Tominaga K, Nishida K, Teshima-Kondo S. Nox enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract. *Semin Immunopathol* 2008;30(3):315-27. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18521607.

212. Agundez JA. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab* 2004;5(3):211-24. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15180491.

213. Bayer C, Schilling D, Hoetzel J, Egermann HP, Zips D, Yaromina A, et al. PAI-1 levels predict response to fractionated irradiation in 10 human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Radiother Oncol* 2008;86(3):361-8. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18077030.

214. Speleman L, Kerrebijn JD, Look MP, Meeuwis CA, Foekens JA, Berns EM. Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2007;29(4):341-50. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17163465.

215. Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, Chen EY, et al. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol* 2005;23(35):8932-41. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16219933.

216. Li M, Wang J, Ng SS, Chan CY, Chen AC, Xia HP, et al. The four-and-a-half-LIM protein 2 (FHL2) is overexpressed in gliomas and associated with oncogenic activities. *Glia* 2008;56(12):1328-38. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18615633.

217. Rimkus C, Martini M, Friederichs J, Rosenberg R, Doll D, Siewert JR, et al. Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer. *Br J Cancer* 2006;95(10):1419-23. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17088907.

218. Castagna A, Antonioli P, Astner H, Hamdan M, Righetti SC, Perego P, et al. A proteomic approach to cisplatin resistance in the cervix squamous cell carcinoma cell line A431. *Proteomics* 2004;4(10):3246-67. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15378690.

219. Poon RT, Chung KK, Cheung ST, Lau CP, Tong SW, Leung KL, et al. Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(12 Pt 1):4150-7. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15217952.

220. Yamaguchi M, Sugio K, Ondo K, Yano T, Sugimachi K. Reduced expression of thrombospondin-1 correlates with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002;36(2):143-50. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11955648.

Bibliografía

221. Umemoto M, Yokoyama Y, Sato S, Tsuchida S, Al-Mulla F, Saito Y. Carbonyl reductase as a significant predictor of survival and lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2001;85(7):1032-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11592776.
222. Lemaire F, Millon R, Muller D, Rabouel Y, Bracco L, Abecassis J, et al. Loss of HOP tumour suppressor expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2004;91(2):258-61. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15213722.
223. Marenholz I, Zirra M, Fischer DF, Backendorf C, Ziegler A, Mischke D. Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library. *Genome Res* 2001;11(3):341-55. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11230159.
224. Bollag WB, Xie D, Zheng X, Zhong X. A potential role for the phospholipase D2-aquaporin-3 signaling module in early keratinocyte differentiation: production of a phosphatidylglycerol signaling lipid. *J Invest Dermatol* 2007;127(12):2823-31. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17597824.
225. Raghunath M, Tontsidou L, Oji V, Aufenvenne K, Schurmeyer-Horst F, Jayakumar A, et al. SPINK5 and Netherton syndrome: novel mutations, demonstration of missing LEKTI, and differential expression of transglutaminases. *J Invest Dermatol* 2004;123(3):474-83. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15304086.
226. Arredondo J, Chernyavsky AI, Webber RJ, Grando SA. Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2005;125(6):1236-41. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16354194.
227. Chimienti F, Hogg RC, Plantard L, Lehmann C, Brakch N, Fischer J, et al. Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum Mol Genet* 2003;12(22):3017-24. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14506129.
228. Abiko Y, Nishimura M, Kusano K, Yamazaki M, Arakawa T, Takuma T, et al. Upregulated expression of human beta defensin-1 and -3 mRNA during differentiation of keratinocyte immortalized cell lines, HaCaT and PHK16-0b. *J Dermatol Sci* 2003;31(3):225-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12727027.
229. Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Reich R, Martini M, Allam JP, et al. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37(7):660-3. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18346877.
230. Takahashi H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Roxithromycin suppresses involucrin expression by modulation of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB activities of keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2005;39(3):175-82. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16140218.
231. Steven AC, Steinert PM. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 2):693-700. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8207091.
232. Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol* 2004;123(1):23-33. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15191538.
233. Kvedar JC, Manabe M, Phillips SB, Ross BS, Baden HP. Characterization of sciellin, a precursor to the cornified envelope of human keratinocytes. *Differentiation* 1992;49(3):195-204. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1377656.

234. Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 1996;106(5):989-92. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8618063.

235. Lemaire F, Millon R, Young J, Cromer A, Wasylyk C, Schultz I, et al. Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Br J Cancer* 2003;89(10):1940-9. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14612907.

236. Borgono CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4(11):876-90. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15516960.

237. Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res* 2004;2(5):257-80. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15192120.

238. Strojjan P, Budihna M, Smid L, Svetic B, Vrhovec I, Kos J, et al. Prognostic significance of cysteine proteinases cathepsins B and L and their endogenous inhibitors stefins A and B in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2000;6(3):1052-62. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10741734.

239. Strojjan P, Anicin A, Svetic B, Pohar M, Smid L, Kos J. Stefin a and stefin B: markers for prognosis in operable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68(5):1335-41. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17418975.

240. Luthra MG, Ajani JA, Izzo J, Ensor J, Wu TT, Rashid A, et al. Decreased expression of gene cluster at chromosome 1q21 defines molecular subgroups of chemoradiotherapy response in esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2007;13(3):912-9. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17289885.

241. Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28(7):639-48. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16470875.

242. Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett* 2003;194(1):1-11. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12706853.

243. Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(7):2730-4. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7708715.

244. Yoshizaki T, Sato H, Maruyama Y, Muroso S, Furukawa M, Park CS, et al. Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma. *Cancer* 1997;79(1):139-44. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8988738.

245. Minhas KM, Singh B, Jiang WW, Sidransky D, Califano JA. Spindle assembly checkpoint defects and chromosomal instability in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003;107(1):46-52. Available from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12925955.

Bibliografía

246. Coleman SC, Stewart ZA, Day TA, Netterville JL, Burkey BB, Pietenpol JA. Analysis of cell-cycle checkpoint pathways in head and neck cancer cell lines: implications for therapeutic strategies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128(2):167-76. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11843726.
247. Zou J, Qiao X, Ye H, Yang Y, Zheng X, Zhao H, et al. Antisense inhibition of ATM gene enhances the radiosensitivity of head and neck squamous cell carcinoma in mice. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:56. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18950535.
248. Mayer ML, Gygi SP, Aebersold R, Hieter P. Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 2001;7(5):959-70. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11389843.
249. Gatbonton T, Imbesi M, Nelson M, Akey JM, Ruderfer DM, Kruglyak L, et al. Telomere length as a quantitative trait: genome-wide survey and genetic mapping of telomere length-control genes in yeast. *PLoS Genet* 2006;2(3):e35. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16552446.
250. Tahara E, Jr., Tahara H, Kanno M, Naka K, Takeda Y, Matsuzaki T, et al. G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54(8):729-40. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15685448.
251. Cheriya V, Glaser KB, Waring JF, Baz R, Hussein MA, Borden EC. G1P3, an IFN-induced survival factor, antagonizes TRAIL-induced apoptosis in human myeloma cells. *J Clin Invest* 2007;117(10):3107-17. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17823654.
252. Chen Y, Medvedev A, Ruzanov P, Marvin KW, Jetten AM. cDNA cloning, genomic structure, and chromosome mapping of the human epithelial membrane protein CL-20 gene (EMP1), a member of the PMP22 family. *Genomics* 1997;41(1):40-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9126480.