

The logo of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), featuring the letters 'UAB' in a bold, sans-serif font. The letter 'A' is stylized with a vertical bar through its center.

Universitat Autònoma  
de Barcelona

**UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES PRONÓSTICO EN  
CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO  
LOCALMENTE AVANZADO : PAPEL DE RAB25 Y  
SERPINA-1.**

**TESIS DOCTORAL  
MARTA TÉLLEZ GABRIEL  
2012**





**UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES PRONÓSTICO EN  
CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO  
LOCALMENTE AVANZADO : PAPEL DE RAB25 Y  
SERPINA-1.**

**Memória presentada por Marta Téllez Gabriel para optar al título de  
Doctora**

**Co-directores**

**Dr. Ramon Mangués Bafalluy    Dr. Miguel Angel Pavón Ribas**

**Tutor**

**Enric Querol Murillo**

**Autora**

**Marta Téllez Gabriel**



## **AGRADECIMIENTOS**

**Als meus pares**

*There are somethings in life that are out of your control that you can't change and you have got to live with. The choice that we have though, is either to give up or keep on going.*

Sempre penses en aquest dia, el dia que "et toca escriure els agraïments", perquè això vol dir que ja està que ara si has acabat, que finalment acaba la marató, que un dia vas començar amb més o menys consciència del que et trobaries pel camí. Per a mi, ha estat un camí complicat, ple de canvis als que m'havia d'anar adaptant si volia tirar això endavant, l'altra opció era deixar-ho, però per sort he tingut sempre al meu voltant un munt de persones que m'han donat els ànims suficients per continuar, sobretot en els moments més durs.

Quan vaig entrar al GOA i el Ramon i la Matilde em van explicar el que havia de fer, vaig sortir amb més dubtes dels que entrava.."Ku70"?CECC?predictores de respuesta?"...la cosa pintava "xunga"..Però de seguida t'enganxes, de seguida comences a veure de què va tot i sobretot de la implicació que, per petita que sigui, pot tenir la teva feina. Haig de reconèixer que no és un camí de floretes i què els resultats no et cauen del cel, i a vegades, per molt que treballis no sempre implica que tindràs els resultats que vols i es molt fàcil desanimar-se, ho dic per experiència. Però us asseguro que si he après alguna cosa durant aquests anys es que de vegades el resultat no és el més important, sinó les coses que vas aprenent en el camí. He après a saber valorar moltíssim el que t'aporta cada experiència, perquè totes elles tenen coses positives, inclús la més negativa, té la seva part positiva, aquella que et fa pensar que allò que fas continua tenint sentit.

Primerament m'agradaria agrair als meus codirectors de tesi el Dr.Ramon Mangues i el Dr Miquel Angel Pavon la possibilitat de treballar en el projecte de Cap i Coll. Gràcies per la confiança que m'heu donat alhora de dissenyar experiments o pendre desicions. I sobretot gràcies per l'sprint d'última hora per enllestir la feina.

També m'agradaria agrair al Dr Enric Querol la seva acceptació per a ser el tutor de la meva tesi.

A part del "ku70", "Rab25", PCR's ...al GOA també he compartit moments amb els meus companys, tots ells excel·lents, sempre disposats a ajudar-te en tot i a entendre aquells moments de tensió, moments en els que estàs com una "boja" amunt i avall pel laboratori alterant a tothom que passa..Per això us vull donar les gràcies a tots.

Vull agrair al Carlos tot el que m'ha estat ajudant durant aquests anys, impossible fer la tesi sense la seva ajuda. Com ell diu, sóc un "terremoto"!Gràcies per adaptar-te a qualssevol canvi d'última hora en els experiments, per la teva implicació i dedicació, per estar sempre disposat a ajudar-me i per no desistir malgrat les mil vegades que he dit que no necessitava ajut, també gràcies per entendre la meva tossuderia! La convivència sovint es complicada, però amb tú no m'ha donat aquesta sensació, sempre m'has facilitat les coses.

Gràcies a : la Mónica, per preocupar-te, per fer-me de "mami". A la Rosa, perquè el seu bon humor t'anima en moltes situacions. A la M<sup>a</sup> Jose , donar-li molts ànims per continuar, estic segura que et sortirà una tesi magnífica. A la Patri, perquè durant aquest any ens em anat ajudant en moltes coses que em viscut de la mateixa manera, que si final de tesi, que si lloguer de pis..A la Rebeca, gràcies per ser la millor "en tirar-te piropos" i treure't sempre un somriure i fer-te pujar els colors! A la Montse, per les llargues xerrades per telèfon i les sessions d'esport compartides. Ànims que a tú també per acabar la tesi! A la Virtu, per ser la meva compi els "findes" i perquè t'asseguro que hi ha detalls que mai s'obliden a la vida. A la Matilde, per ensenyar-me un munt de coses durant els meus primers anys de tesi, i què tot i no haver continuat treballant juntes m'han servit un munt per a després. A l'Alberto Gallardo, per la seva paciència i generositat alhora d'ajudar a evaluar les "d'inmunos". A la resta de companys, M<sup>a</sup> Carme, Olga, Isolda, Everton i Marcelo, que tot i no haver compartit molt temps, m'heu ajudat sempre que ho he necessitat. També vull agrair a antics companys que hem coincidit al GOA, com el Israel , la M<sup>a</sup> Carmen i la Mariona. Al meu amic Cristo, moltíssimes gràcies per ser allà

sempre, per treure'm un somriure, donar-me ànims, escoltar-me, per els petits detalls que t'alegren el dia.

M'agradaria donar les gràcies de manera molt especial, tot i que no crec que trobi les suficients paraules, al Miquel Àngel, primer company i després co-director de la meva tesi. Et vull donar les gràcies, primerament per acceptar el repte de treure una tesi en tant poc temps, per la teva implicació, per la infinitat de coses que m'has ensenyat, que t'asseguro que per a mi tenen un valor incalculable. Per què no només has estat un bon company a nivell laboral, sinó també m'has ajudat un munt en situacions complicades, sobretot en aquests darrers 6 mesos, gràcies per els teus consells, tot i que no et pensis, sempre he reflexionat les coses que m'has dit. Gràcies per els moments de màxima tensió que m'has ajudat a relativitzar les coses i veure que la única manera de continuar endavant era "pas a pas" i no "a lo bruto" com solo fer jo..Gràcies per fer de "l'R" la forma més divertida de programar. Per la teva paciència, que ha estat màxima. Es una mostra molt petita del meu agraïment, però sinó seria una llista infinita.

Vull donar gràcies al Miquel pel seu suport incondicional, per ser un mirall en el què a tots ens agradaria veure'ns reflexats, per això i per moltes altres coses que em compartit i hem après junts en tot aquest temps. Probablement ets de les persones que més sap l'esforç que això m'ha suposat. Gràcies també a la seva família.

També vull agrair el suport dels meus amics i amigues, que han sabut comprendre sempre la meva feina i m'han recolzat en tot moment. Espero que a partir d'ara pugui passar més temps amb vosaltres.

Gràcies a l'Albert per què ha estat una de les persones amb més paciència, sobretot durant aquests últims mesos. Gràcies per haver compartit situacions a les que ningú li agraden. Gràcies per estar sempre allà, perquè en qualssevol

dels moments que t'he necessitat no m'has fallat. Gràcies per ensenyar-me i demostrar-me les cosetes importants a la vida. Et dec moltíssim.

Vull acabar donant les gràcies a la meva família (avis, tiets..) però sobretot als meus pares, que son els que m'han ensenyat a ser perseverant amb les coses, per lluitar per allò que un vol, per no rendir-se mai. Gràcies per guiar-me sempre, per ser la meva referència, per animar-me, per confiar en mi i en les coses que faig, per la vostra paciència. A l'Ester, la meva germana vull donar-li també les gràcies, perquè tot i que son els grans els que ensenyen coses als petits, de vegades són ells qui donen lliçons.

Espero no oblidarme de ningú, però en tot cas vull agrair a tots i cadascun de vosaltres el suport que m'heu donat, sense el qual us ben asseguro que això no hagués estat possible, així que en certa manera, aquesta tesi també és una mica vostra. Felicitats a tots.





# Índice

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>I INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
1. ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO. ....	13
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL. ....	13
1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO. ....	13
1.3. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DEL CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO. 15	
1.3.1. Clínica y diagnóstico. ....	15
1.3.2. Determinación del estadio tumoral.....	16
1.4. PATOLOGÍA DEL CECC.....	16
2. BASES MOLECULARES DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO. ....	20
2.1. MODELO DE PATOGÉNESIS.....	20
2.1.1. Alteraciones en las vías de señalización.....	21
2.1.1.1. Potencial replicativo ilimitado: p53 y Rb.....	22
2.1.1.2. Alteraciones en la señalización de los factores de crecimiento: las vías EGFR y TGFβ. ....	23
2.1.1.3. Capacidad de evadir la apoptosis: PI3K-PTEN-AKT.....	24
2.1.1.4. Angiogénesis, invasión y metástasis. ....	24
2.2. MODELO DE PATOGÉNESIS ASOCIADA A LA INFECCIÓN POR VPH.....	26
3. TRATAMIENTO DEL CECC .....	28
3.1. TRATAMIENTO DE LOS ESTADIOS INICIALES (I y II).....	28
3.2. TRATAMIENTO DE LOS ESTADIOS AVANZADOS (III y IV) .....	29
3.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA RADIOTERAPIA. ....	31
3.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA QUIMIOTERAPIA. ....	32
3.4.1. 5-Fluorouracilo (5-FU). ....	32
3.4.2. Cisplatino (CDDP). ....	33
3.4.3. Taxanos ( <i>Docetaxel</i> y <i>Paclitaxel</i> ). ....	33
3.4.4. Inhibidores de <i>EGFR</i> .....	34
4. FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS EN EL CECC.....	36
4.1. FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS CLÍNICOS. ....	36
4.2.1. Virus del papiloma humano (VPH).....	38

# Índice

---

4.2.2. <i>Epidermal growth factor receptor (EGFR)</i> . .....	38
4.2.3. <i>P16</i> . .....	39
4.2.4. <i>P53</i> . .....	39
4.3. <i>PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CECC</i> . .....	41
5. RESULTADOS PREVIOS. ....	44
<b>II OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
<b>III MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y RÉGIMEN DE TRATAMIENTO. ....	47
1.1. <i>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES</i> . ....	47
1.2. <i>RÉGIMEN DE TRATAMIENTO</i> . .....	47
2. RECOGIDA DE BIOPSIAS DE TEJIDO FRESCO, EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA.....	48
2.1. <i>RECOGIDA DE BIOPSIAS DE TEJIDO FRESCO</i> . .....	48
2.2. <i>EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA</i> . ....	49
2.3. <i>ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL RNA</i> .....	50
3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN: MICROARRAYS. ....	51
3.1. <i>MARCAJE, PURIFICACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DEL RNA</i> . ....	52
3.2. <i>HIBRIDACIÓN, REVELADO Y ESCANEADO DE LOS MICROARRAYS</i> .....	56
3.3. <i>ANÁLISIS DE IMÁGENES Y CONTROL DE CALIDAD</i> . ....	57
4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN POR PCR CUANTITATIVA. ....	59
4.1. <i>REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN</i> . ....	59
4.2. <i>PRIMERS Y SONDAS: TECNOLOGÍA TaqMan</i> . .....	59
4.3. <i>ANÁLISIS POR PCR CUANTITATIVA</i> . ....	61
5. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA. ....	62
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	64
7. ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR MICROARRAYS. ....	65
7.1. <i>PRE-PROCESADO DE LOS EXPERIMENTOS DE MICROARRAYS</i> . ....	66
7.2. <i>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL</i> . .....	67
7.3. <i>ANÁLISIS DE ANOTACIONES FUNCIONALES</i> . .....	67
8. <i>GENE SET ENRICHMENT ANALYSIS (GSEA)</i> Y CÁLCULO DEL <i>AVERAGE SCORE</i> . ...	68
9. CULTIVO CELULAR.....	70
9.1. <i>LÍNEAS CELULARES</i> . .....	70
9.2. <i>DESCONGELACIÓN, SUBCULTIVO Y CONGELACIÓN DE CÉLULAS</i> . .....	70

## Índice

---

9.3. DETECCIÓN DE MYCOPLASMA Y TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS INFECTADAS. ....	71
9.4. ANÁLISIS DE LOS PERFILES GENÉTICOS O FINGERPRINTS DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CECC. ....	72
10. ANÁLISIS DE LA TASA DE PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD CELULAR. ....	75
10.1. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE PROLIFERACIÓN CELULAR. ....	75
10.2. ENSAYO DE XTT. ....	76
11. TEST DE APOPTOSIS. ....	77
12. WESTERN BLOT. ....	77
12.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS. ....	77
12.2. CUANTIFICACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS. ....	78
12.3. ELECTROFORESIS SDS-PAGE. ....	78
12.4. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS. ....	79
12.5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS. ....	80
13. OBTENCIÓN DE CLONES ESTABLES. ....	81
13.1. TRANSFECCIÓN. ....	81
13.2. SELECCIÓN DE CLONES. ....	83
14. ENSAYOS DE DISPERSIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR. ....	84
14.1. SCATTERING. ....	84
14.2. TRANSWELLS. ....	84
<b>IV RESULTADOS</b> .....	<b>85</b>
1. BIOMARCADORES ASOCIADOS CON LA RECIDIVA TUMORAL Y LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO. ....	88
1.1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN POR PCR CUANTITATIVA DE RAB25, SERPINA-1, DUOX-1, THBS-1, LGALS1, TPST1, TGM3 Y FHL2 EN BIOPSIAS TUMORALES DE PACIENTES ANALIZADOS PREVIAMENTE MEDIANTE UN ESTUDIO DE MICROARRAYS (COHORTE I). ....	88
1.1.1. Características de los pacientes. ....	88
1.1.2. Asociación entre los niveles de expresión de RAB25, SERPINA-1, DUOX-1, THBS-1, LGALS1, TPST1, TGM3 y FHL2 y la evolución clínica del paciente. ....	90
1.2. ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAB25, SERPINA-1 Y DUOX-1 CON LA SLRL, SLP Y SG EN UNA COHORTE DE 110 PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO. ....	94

# Índice

---

1.2.1. Identificación de un perfil de expresión en los pacientes del grupo de pronóstico intermedio. ....	101
<i>1.3. DETERMINACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO DE RAB25 Y SERPINA-1 POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN UN ESTUDIO RETROSPECTIVO (COHORTE IV). ...</i>	<i>102</i>
1.3.1. Características de los pacientes. ....	102
1.3.2. Asociación de la proteína Rab25 con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de los pacientes con CECC. ....	103
1.3.3. Asociación de la proteína Serpina-1 con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de los pacientes con CECC.....	104
2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA FIRMA GENÉTICA CON VALOR PRONÓSTICO .....	105
<i>2.1. CARACTERÍSTICAS DEL TRAINING SET Y VALIDATION SET.....</i>	<i>105</i>
<i>2.2. DISEÑO DE FIRMAS GENÉTICAS CON VALOR PRONÓSTICO: SELECCIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN FUNCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LOS PACIENTES. ....</i>	<i>106</i>
2.2.1. Validación de la firma genética asociada a la supervivencia global. ....	107
2.2.2. Validación de la firma genética asociada con la recidiva local. ....	109
3. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE MUCOSAS NORMALES Y TUMORES DE CECC LOCALMENTE AVANZADO.....	109
4. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DE LA MANIPULACIÓN DE GENES CON CAPACIDAD PRONÓSTICA Y PREDICTIVA EN LÍNEAS DE CECC. ....	113
<i>4.1 CARACTERIZACIÓN DE UN PANEL DE LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO.....</i>	<i>113</i>
4.1.1. Identificación del fenotipo <i>EMT</i> en líneas de CECC.....	113
4.1.2. Diferencias en el perfil de expresión génica entre líneas celulares de CECC: genotipo <i>EMT</i> vs no <i>EMT</i> .....	115
4.1.3. Diferencias en el perfil de expresión génica entre líneas celulares de CECC.....	117
<i>4.2. CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR TRATAMIENTO CON CISPLATINO Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAB25, SERPINA-1, DUOX-1, RAB11A, THBS-1, LGALS1, TGM3 Y FHL2 EN LÍNEAS CELULARES DE CECC.</i>	<i>118</i>
<i>4.3. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD POR TRATAMIENTO CON CETUXIMAB O LA COMBINACIÓN DE CETUXIMAB CON CISPLATINO EN LAS LÍNEAS DE CECC. ..</i>	<i>120</i>

# Índice

---

4.4. ESTUDIO FUNCIONAL IN VITRO PARA DETERMINAR EL PAPEL DE LA PROTEÍNA RAB25 EN LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS TUMORALES AL TRATAMIENTO CON CISPLATINO.....	122
4.4.1. Sobreexpresión e infraexpresión de <i>RAB25</i> en líneas de CECC.....	122
4.4.2. Caracterización de los clones de <i>RAB25</i> .....	124
4.4.2.1. La sobreexpresión de <i>RAB25</i> aumenta la tasa de proliferación celular en las líneas de CECC.....	124
4.4.2.2. La sobreexpresión de <i>RAB25</i> aumenta la sensibilidad al cisplatino de la línea UM-SCC-74B de CECC. ....	124
4.4.2.3. La sobreexpresión de <i>RAB25</i> disminuye la capacidad de dispersión, migración e invasión de las células de CECC.....	126
<b>V DISCUSIÓN .....</b>	<b>87</b>
IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO. ....	129
<i>RAB25</i> ES UN MARCADOR DE BUEN PRONÓSTICO EN CECC LOCALMENTE AVANZADO. ....	131
<i>SERPINA-1</i> ES UN MARCADOR DE MAL PRONÓSTICO EN CECC LOCALMENTE AVANZADO.....	134
INCREMENTO DE LA CAPACIDAD PRONÓSTICA Y PREDICTIVA MEDIANTE LA DETERMINACIÓN CONJUNTA DE <i>RAB25</i> Y <i>SERPINA-1</i> . ....	137
LA TRANSFORMACIÓN DESDE LA MUCOSA NORMAL HASTA CECC LOCALMENTE AVANZADO ESTA ASOCIADA CON LA PÉRDIDA DE EXPRESIÓN GÉNICA. ....	139
DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA FIRMA GENÉTICA CON VALOR PRONÓSTICO. ....	140
IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS MARCADORES IDENTIFICADOS. ....	142
CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CECC CON PATRONES DE EXPRESIÓN SIMILARES A LOS TUMORES CON FENOTIPO MESENQUIMAL O CON FENOTIPO EPITELIAL. ....	144
ASOCIACIÓN ENTRE NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES CON CAPACIDAD PRONÓSTICA Y LA SENSIBILIDAD AL CISPLATINO Y/O <i>CETUXIMAB</i> EN LÍNEAS DE CECC.....	145
LA SOBREEXPRESIÓN DE <i>RAB25</i> AUMENTA LA PROLIFERACIÓN, DISMINUYE LA DISPERSIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR Y POTENCIA LA CITOTOXICIDAD POR CISPLATINO EN CÉLULAS DE CECC.....	146
<b>VI CONCLUSIÓN .....</b>	<b>129</b>
<b>VII BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>152</b>



### ABREVIATURAS

**5-FU:** 5-Fluorouracilo

**aRNA:** *amplified RNA*

**ATP:** Adenosina trifosfato

**CDDP:** cis-diamminedichloroplatino o cisplatino

**cDNA:** *complementary DNA*

**CECC:** Carcinoma escamoso de cabeza y cuello

**cPCR:** PCR cuantitativa

**C<sub>T</sub>** *Cycle threshold* o Ciclo Umbral

**DAB:** diaminobenzidina

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Media*

**DNA:** *desoxiribonucleic acid*

**dTMP:** deoxitimidina monofosfato

**DTT:** dithiothreitol

**dTTP:** deoxitimidina trifosfato

**dUMP:** deoxiuridina monofosfato

**EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor*

**FdUMP:** fluorodeoxiuridina monofosfato

**FBS:** *Fetal Bovine Serum* o suero fetal bovino

**FDR:** *False Discovery Rate*

**GFP:** *Green Fluorescent Protein*

**GO:** *Gene Ontology*

**IC:** Intervalo de confianza

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**IVT:** *in vitro*

**KEGG:** *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

**LOH:** *Lose Of Heterozygosity* o pérdida de heterocigosidad

**MEC:** Matriz extracelular

**mRNA:** RNA mensajero

**N<sub>0</sub>:** afectación ganglionar negativa

**N<sub>+</sub>:** afectación ganglionar positiva

**NES:** *Normalized Enrichment Scores*

**NSCLC:** *Non Small Cells Lung Cancer* o carcinoma de pulmón no microcítico

**O/N:** *Over night*

## Abreviaturas

---

**PETscan:** *Positron Emission Tomography*

**PCR:** Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de la polimerasa

**QRT:** Quimioradioterapia

**QTI:** Quimioterapia de inducción

**RNA:** *ribonucleic acid*

**rRNA:** RNA ribosómico

**RIN:** *RNA Integrity Number*

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**ROC:** *Receiver Operating Characteristics*

**ROS:** *Reactive Oxygen Species* o especies reactivas de oxígeno

**RT:** Radioterapia

**SDS:** *Sodium Dodecyl Sulfate*

**SG:** Supervivencia Global

**shRNA:** *short hairpin RNA*

**SLP:** Supervivencia Libre de Progresión

**SLRL:** Supervivencia Libre de Recidiva Local

**ssDNA:** DNA de cadena sencilla

**T.A:** Temperatura Ambiente

**TC:** Tomografía Computarizada

**TEM:** Transición epitelio-mesénquima.

**TEMED:** Tetramethylethylenediamine

**TNM:** Tamaño tumoral /Afectación ganglionar/ Metástasis

**TS:** Timidilato Sintasa

**VPH:** Virus del Papiloma Humano

**VPH+:** Positivo para el virus del papiloma humano

**VPH-:** Negativo para el virus del papiloma humano

**WT:** *Wild Type*

**XTT:** 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro- 5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium- 5-carboxanilide





### ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE RNA CON TRIZOL (INVITROGEN, PAISLEY, UK) Y DE PURIFICACIÓN CON COLUMNAS RNAEASY (QIAGEN, VALENCIA, USA) .....	49
TABLA 2. PROTOCOLOS DE MARCAJE, PURIFICACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DEL RNA REALIZADOS CON EL KIT "GENECHIP® 3' IVT EXPRESS KIT" .....	54
TABLA 3. PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN, REVELADO Y ESCANEADO DE LOS MICROARRAYS, REALIZADO EN LA PLATAFORMA DE AFFYMETRIX DEL SERVICIO DE TRANSCRIPTÓMICA DEL HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU. ....	57
TABLA 4. PROTOCOLO DE LA RETROTRANSCRIPCIÓN PARA LA SÍNTESIS DE cDNA A PARTIR DE RNA. ....	59
TABLA 5. DESCRIPCIÓN DE LAS REGIONES DE AMPLIFICACIÓN E HIBRIDACIÓN DE LAS SONDAS Y PRIMERS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE mRNA POR PCR CUANTITATIVA.....	61
TABLA 6. PROTOCOLO DE PCR CUANTITATIVA.....	61
TABLA 7. ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA.....	64
TABLA 8. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS DE BIOCONDUCTOR UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE DATOS DE LOS EXPERIMENTOS DE MICROARRAYS.....	66
TABLA 9. LÍNEAS CELULARES, ORIGEN TUMORAL Y MEDIO DE CULTIVO USADO. ....	70
TABLA 10. EXTRACCIÓN DE DNA CON EL KIT WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION (PROMEGA, MADISON, USA). ....	73
TABLA 11. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE FINGERPRINTS DE LAS DIFERENTES LÍNEAS DE CECC CON EL KIT CELL ID (PROMEGA, MADISON, USA). ....	74
TABLA 12. PERFILES GENÉTICOS ORIGINALES DE LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES. ....	75
TABLA 13. ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT. ...	81
TABLA 14. PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN. CANTIDADES OPTIMIZADAS PARA TRANSFECTAR LAS CÉLULAS UM-SCC-74B, Y SCC-9 CON LOS PLÁSMIDOS pCDNA3-RAB25 Y pCDNA3-VACIO CON LIPOFECTAMINE 2000 (INVITROGEN, PAISLEY, UK). ....	82
TABLA 15. MÉTODO PARA LA SELECCIÓN DE CLONES QUE EXPRESAN EL PLÁSMIDO QUE LLEVA CLONADO EL GEN RAB25.....	83
TABLA 16. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR MICROARRAYS (COHORTE I). ....	89
TABLA 17. VALORES DE PROBABILIDAD ( <i>P VALOR</i> ) OBTENIDOS APLICANDO EL MODELO DE KAPLAN-MEIER, PARA LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (SLRL), LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP) Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) PARA CADA UNO DE LOS GENES ANALIZADOS POR cPCR.....	93
TABLA 18. ANÁLISIS DE MODELOS DE COX UNIVARIANTES Y MULTIVARIANTES PARA EL ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (SLRL), LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP) Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) EN FUNCIÓN DE PARÁMETROS CLÍNICOS Y NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES SERPINA-1, RAB25 Y DUOX-1 (COHORTE I). ....	94
TABLA 19. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO DE LOS MARCADORES RAB25, SERPINA-1 Y DUOX-1 (COHORTE I, COHORTE II Y COHORTE III).....	95
TABLA 20. ANÁLISIS DE MODELOS DE COX UNIVARIANTES Y MULTIVARIANTES PARA EL ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (SLRL), LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP) Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) EN FUNCIÓN DE PARÁMETROS CLÍNICOS Y NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES SERPINA-1, RAB25 Y DUOX-1 (COHORTES I+II+III). ....	96
TABLA 21. TABLA DE FRECUENCIAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE RAB25 Y SERPINA-1. ....	98
TABLA 22. VALORES DE PROBABILIDAD ( <i>P VALOR</i> ) OBTENIDOS AL APLICAR EL MODELO DE KAPLAN-MEIER PARA LA SLRL, SLP Y LA SG Y DISTRIBUIR A LOS PACIENTES EN TRES GRUPOS EN FUNCIÓN DE LA CONSIDERACIÓN CONJUNTA DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAB25 Y SERPINA-1.....	100
TABLA 23. GENES ASOCIADOS CON LA SG ( $P < 0,05$ ), OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO DE PRONÓSTICO INTERMEDIO, COMPARANDO SU NIVEL DE EXPRESIÓN EN PACIENTES VIVOS RESPECTO A LOS FALLECIDOS.....	101
TABLA 24. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO RETROSPECTIVO (COHORTE IV). ....	102
TABLA 25. GENES INCLUIDOS EN LAS FIRMAS PRONÓSTICAS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (SLRL).....	107

## Índice de tablas

---

TABLA 26. PROCESOS BIOLÓGICOS SOBREENEXPRESADOS (FONDO GRIS) E INFRAEXPRESADOS (FONDO BLANCO) ( $P < 0,01$ ) EN LAS MUESTRAS TUMORALES RESPECTO A LAS MUCOSAS NORMALES. ....	110
TABLA 27. PROCESOS BIOLÓGICOS SOBREENEXPRESADOS (FONDO GRIS) E INFRAEXPRESADOS (FONDO BLANCO) ( $P < 0,01$ ) EN LA LÍNEA SCC-9 RESPECTO A LAS LÍNEAS UM-SCC-22A Y UM-SCC-22B. ....	117
TABLA 28. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE <i>PEARSON</i> PARA EL MODELO LINEAL BIVARIANTE ENTRE LA $IC_{50}$ Y LA EXPRESIÓN DE <i>RAB25</i> , <i>SERPINA-1</i> , <i>DUOX-1</i> , <i>RAB11A</i> , <i>THBS-1</i> , <i>LGALS1</i> , <i>TGM3</i> Y <i>FHL2</i> EN LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE CECC. ....	120

### ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. INCIDENCIA DEL CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO (CECC) EN LA POBLACIÓN MUNDIAL EN EL AÑO 2008 POR CADA 100.000 HABITANTES. BASE DE DATOS GLOBOCAN 2008 (DESCRIPTIVE EPIDEMIOLOGY GROUP, IARC).....	14
FIGURA 2. INCIDENCIA DEL CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO DEPENDIENDO DEL ÁREA GEOGRÁFICA. BASE DE DATOS GLOBOCAN 2008 (DESCRIPTIVE EPIDEMIOLOGY GROUP, IARC <a href="http://www-dep.iarc.fr">HTTP://WWW-DEP.IARC.FR</a> ). ....	14
FIGURA 3. COMBINACIÓN DE <i>PET SCAN</i> Y TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA (TC) PARA LA DETERMINACIÓN DEL ESTADIO DEL TUMOR (A) Y DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO (B Y C) EN CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO LOCALMENTE AVANZADO. ADAPTADO DE ARGIRIS, KARAMOUZIS ET AL [4].....	15
FIGURA 4. LAS CÉLULAS TUMORALES DEL CECC PIERDEN EL PROCESO DE MADURACIÓN EN ESTRATOS, INVADEN EL ESPACIO SUBMUCOSO Y SECRETAN QUERATINA, QUE SE ACUMULA FORMANDO DEPÓSITOS (INDICADOS CON FLECHAS) CARACTERÍSTICOS DE LOS CECC CON UN ELEVADO GRADO DE DIFERENCIACIÓN ESCAMOSA. IMAGEN TOMADA AL MICROSCÓPIO ÓPTICO (40X) (TINCIÓN HEMATOXILINA – EOSINA).....	17
FIGURA 5. HISTOLOGÍA DE LAS DIFERENTES ETAPAS DE PROGRESIÓN DE UN CECC (TINCIÓN HEMATOXILINA – EOSINA). ADAPTADO DE ARGIRIS ET AL. (2008) <sup>1</sup> . ....	18
FIGURA 6. HISTOLOGÍA DE DOS BIOPSIAS DE CECC CON DIFERENTE GRADO DE DIFERENCIACIÓN. A) TUMOR BIEN DIFERENCIADO Y B) TUMOR MAL DIFERENCIADO. IMÁGENES TOMADAS AL MICROSCOPIO ÓPTICO (20 X) (TINCIÓN HEMATOXILINA – EOSINA). ....	19
FIGURA 7. MODELO DE PATOGÉNESIS DEL CECC. SE MUESTRAN LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN CADA UNA DE LAS ETAPAS DE CARCINOGENÉISIS. <i>LOH</i> ( <i>LOSE OF HETEROZIGOSITY</i> O PÉRDIDA DE HETEROZIGOSIDAD). MODIFICADO DE CALIFANO <i>ET AL</i> [21]. ....	20
FIGURA 8. <i>FIELD CANCERIZATION</i> O CANCERIZACIÓN POR CAMPOS. LOS CAMPOS ESTÁN REPRESENTADOS POR LAS CÉLULAS AZUL CLARO Y EL TUMOR POR LAS CÉLULAS AZUL OSCURO. LA LÍNEA ROJA DELIMITA EL LUGAR EN EL QUE SE REALIZA LA RESECCIÓN QUIRÚRGICA. ADAPTADO DE LEEMANS <i>ET AL</i> [24].....	21
FIGURA 9. ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ALTERADAS EN EL CECC. ADAPTADO DE STADLER <i>ET AL</i> [53] . ....	25
FIGURA 10. DESREGULACIÓN DEL CICLO CELULAR INDUCIDA POR LA INFECCIÓN DE VPH . ....	26
FIGURA 11. PROTOCOLO DE TRATAMIENTO UTILIZADO EN EL HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU EN PACIENTES CON CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO LOCALMENTE AVANZADO. ....	31
FIGURA 12. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS DIFERENTES FÁRMACOS QUIMIOTERAPÉUTICOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CECC. ....	35
FIGURA 13. A) IDENTIFICACIÓN DE LOS TRES SUBTIPOS (CLUSTERS) TUMORALES EN CECC EN FUNCIÓN DE SU PATRÓN DE EXPRESIÓN (CLUSTER 1, CLUSTER 2 Y CLUSTER 3). B) DIFERENCIAS EN LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLRL), SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP) Y SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) EN FUNCIÓN DE LA CLASIFICACIÓN EN CLUSTERS ( <i>LOG-RANK TEST</i> ). FIGURAS ADAPTADAS DE PAVON ET AL, [160]. ....	45
FIGURA 14. ELECTOFOGRAMA OBTENIDO CON EL <i>BIOANALYZER</i> EN EL QUE SE DETALLAN LAS DIFERENTES REGIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE RNA. EL PRIMER PICO CORRESPONDE AL MARCADOR, SEGUIDO DEL PICO CORRESPONDIENTE A LOS RNAs DE BAJO PESO MOLECULAR (RNAR 5S; RNAT; MICRORNA). ESTE ES MÁS O MENOS APARENTE SEGÚN EL MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE RNA QUE SE UTILICE. LOS DOS PICOS QUE MUESTRAN MAYOR INTENSIDAD CORRESPONDEN A LOS RNA RIBOSÓMICOS 18S Y 28S. LA APARICIÓN DE ALGUNA SEÑAL A UN TIEMPO DE ELUCIÓN MAYOR QUE EL DEL RNAR 28S ES UN INDICADOR DE CONTAMINACIÓN CON DNA GENÓMICO. ....	51
FIGURA 15. ELECTOFOGRAMAS QUE SE OBTIENEN EN FUNCIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA. (A) RNA ÍNTEGRO, (B) RNA PARCIALMENTE DEGRADADO Y (C) RNA COMPLETAMENTE DEGRADADO.....	51
FIGURA 16 . ESQUEMA DEL PROCESO DE MARCAJE E HIBRIDACIÓN DE LOS CHIPS DE AFFYMETRIX, UTILIZANDO EL <i>KIT</i> DE MARCAJE "GENECHIP® 3' IVT EXPRESS <i>KIT</i> ". FIGURA ADAPTADA DEL MANUAL DE GENECHIP® 3' IVT EXPRESS <i>KIT</i> DE AFFYMETRIX. ....	53
FIGURA 17 . ELEMENTOS NECESARIOS PARA PURIFICAR EL ARNA. A) PLACA DE 96 POCILLOS CÓNCAVA ( <i>U-BOTTOM PLATE</i> , AMBION). B) SOPORTE MAGNÉTICO ( <i>96 - MAGNETIC STAND</i> , AMBION). C) AGITADOR DE PLACAS. IMÁGENES ADAPTADAS DE AGILENT ( <a href="http://www.agilent.com">HTTP://WWW.AGILENT.COM</a> ) .....	55
FIGURA 18. CONTROL DE CALIDAD DEL ARNA MARCADO. A) ELECTROFOGRAMA TÍPICO DE UNA MUESTRA DE ARNA MARCADO SIN FRAGMENTAR. B) ELECTROFOGRAMA CARACTERÍSTICO DEL MISMO ARNA UNA VEZ FRAGMENTADO. ....	56

## Índice de figuras

FIGURA 19. EQUIPOS DE LA PLATAFORMA AFFYMETRIX PARA MICROARRAYS. A) HORNO DE HIBRIDACIÓN, B) ESTACIÓN DE FLUIDOS 450 Y C) ESCÁNER AFFYMETRIX 3000. IMÁGENES ADAPTADAS DE AFFYMETRIX ( <a href="http://www.affymetrix.com">HTTP://WWW.AFFYMETRIX.COM</a> ). .....	56
FIGURA 20. ANÁLISIS DE IMAGEN Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS MICROARRAYS. A) IMAGEN DE ESCANEADO DE UN CHIP. B) PLOT DE INTENSIDADES DE TODAS LAS SONDAS PRESENTES EN CADA UNO DE LOS CHIPS ESCANEADOS. C) REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PATRÓN DE DEGRADACIÓN 3'/5' DE TODAS LAS SONDAS PRESENTES EN CADA EXPERIMENTO. ....	58
FIGURA 21. REACCIÓN DE PCR CUANTITATIVA. A) LOS PRIMERS Y LA SONDA HIBRIDAN ESPECÍFICAMENTE CON LA SECUENCIA A AMPLIFICAR. LA POLIMERASA EMPIEZA A SINTETIZAR DNA A PARTIR DE LOS PRIMERS (B) Y CUANDO ENCUENTRA LA SONDA LA DEGRADA UTILIZANDO SU ACTIVIDAD EXONUCLEASA (C), LIBERANDO DE ESTE MODO EL FLUORÓFORO (F). UNA VEZ SEPARADO DEL QUENCHER (Q), EL FLUORÓFORO EMITE UNA SEÑAL QUE ES CAPTURADA POR UN DETECTOR DE FLUORESCENCIA. ....	60
FIGURA 22. BOX PLOT DE LOS NIVELES DE INTENSIDAD DE TODAS LAS SONDAS PRESENTES EN CADA UNO DE LOS MICROARRAYS. A) ANTES DE REALIZAR EL PRE-PROCESADO DE LOS MICROARRAYS. B) DESPUÉS DEL PRE-PROCESADO CON EL MÉTODO RMA. ....	66
FIGURA 23. ELEMENTOS PRINCIPALES DE LA HERRAMIENTA GSEA. A) FENOTIPOS, B) GENE SET Y C) ENPLOT. FIGURA ADAPTADA DE SUBRAMANIAN, A ET AL. ....	68
FIGURA 24. PERFIL DE PICOS OBTENIDO DE LA AMPLIFICACIÓN DE 2 NG DE DNA GENÓMICO DE LA LÍNEA CELULAR FADU CON EL SISTEMA CELL ID (PROMEGA, MADISON, USA). ....	74
FIGURA 25. ESQUEMA DE LOS ELEMENTOS NECESARIOS PARA REALIZAR UNA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS. 79	
FIGURA 26. A) PLÁSMIDO pCDNA3 EN EL QUE SE HA SUBCLONADO EL GEN RAB25 UTILIZANDO LAS DIANAS HINDIII-BAMHI. RAB25 LLEVA EL EPÍTOPO HA QUE PERMITE LA DISTINCIÓN DE LA EXPRESIÓN EXÓGENA Y ENDÓGENA DE LA PROTEÍNA DE INTERÉS, MEDIANTE LA DETECCIÓN CON UN ANTICUERPO ESPECÍFICO (ANTI-HA) POR WESTERN BLOT. EL ELEMENTO G418 CODIFICA PARA EL GEN QUE CONFIERE RESISTENCIA A GENETICINA PARA LA POSTERIOR SELECCIÓN DE CLONES ESTABLES. B) ESQUEMA DE LOS ELEMENTOS NECESARIOS PARA SELECCIONAR CLONES; PINZAS, CILINDROS (SIGMA ALDRICH, TRES CANTOS, ESPAÑA) Y PLACA DE CULTIVO CON CLONES BIEN SEPARADOS. ....	82
FIGURA 27. ESQUEMA DE LAS DIFERENTES PARTES QUE COMPONEN UN TRANSWELL. ....	85
FIGURA 28. ESQUEMA INDICATIVO DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y VALIDACIÓN. <sup>A</sup> PCR CUANTITATIVA. <sup>B</sup> INMUNOHISTOQUÍMICA. ....	87
FIGURA 29. BOX PLOTS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS EN LOS 3 SUBTIPOS TUMORALES (CLUSTERS) IDENTIFICADOS EN EL ESTUDIO DE MICROARRAYS. LAS LÍNEAS DISCONTINUAS INDICAN EL VALOR DE CORTE ESTABLECIDO PARA LA CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES EN DOS GRUPOS. EL VALOR DE LA SIGNIFICANCIA P SE OBTIENE DE APLICAR LA PRUEBA ESTADÍSTICA DE KRUSKAL-WALLIS. ....	91
FIGURA 30. CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (SLRL), LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP) Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG), DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE SERPINA-1 (A), RAB25 (B) Y DUOX-1 (C) EN EL TUMOR. P = VALOR DE PROBABILIDAD ESTADÍSTICA. ....	92
FIGURA 31. CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA LA SLRL (A-B), SLP (C-D) Y SG (E-F) EN FUNCIÓN DE LOS NIVELES DE RAB25 Y SERPINA-1 DICOTOMIZADOS. P = VALOR DE PROBABILIDAD ESTADÍSTICA. ....	98
FIGURA 32. CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA LA SLRL (A Y D), SLP (B Y E) Y SG (C Y F) CONSIDERANDO CONJUNTAMENTE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAB25 Y SERPINA-1. GRUPO A: SERPINA-1 < 2,3 Y RAB25 > 1,7. GRUPO B: SERPINA-1 > 2,3 Y RAB25 < 1,7. GRUPO C: SERPINA-1 < 2,3 Y RAB25 < 1,7. GRUPO D: SERPINA-1 > 2,3 Y RAB25 > 1,7. ....	100
FIGURA 33. INMUNOHISTOQUÍMICA DE RAB25 EN TUMORES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO. A) TUMOR QUE PRESENTA ELEVADA EXPRESIÓN DE RAB25 Y B) TUMOR QUE NO EXPRESA LA PROTEÍNA RAB25. ...	103
FIGURA 34. CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA LA SLRL (B) Y SG (C) EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RAB25 EN TUMORES DE CECC (COHORTE IV). P = VALOR DE PROBABILIDAD ESTADÍSTICA. ....	103
FIGURA 35. INMUNOHISTOQUÍMICA DE SERPINA-1 EN TUMORES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO. DIFERENTES INTENSIDADES DE TINCIÓN PARA PROTEÍNA. A) TUMOR CON UNA TINCIÓN DE BAJA INTENSIDAD Y B) TUMOR CON TINCIÓN DE INTENSIDAD ALTA. ....	104
FIGURA 36. CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA LA SLRL (B) Y SG (C) EN FUNCIÓN DE LA INTENSIDAD DE TINCIÓN PARA LA PROTEÍNA SERPINA-1 EN TUMORES DE CECC (COHORTE IV). ....	104
FIGURA 37. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE GSEA PARA LA VALIDACIÓN DE LA FIRMA PRONÓSTICA EN RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL UTILIZANDO LOS DATOS DE EXPRESIÓN DEL ESTUDIO DE CHUNG ET AL.	

## Índice de figuras

A) <i>ENRICHMENT PLOT</i> . B) SUBGRUPO DE GENES DE BUEN PRONÓSTICO CUYA EXPRESIÓN SE ASOCIA CON LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO DE <i>CHUNG ET AL (2006)</i> .....	108
FIGURA 38. CURVAS DE <i>KAPLAN-MEIER</i> PARA LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE UNA FIRMA GENÉTICA DE 16 GENES. <i>AVERAGE SCORE</i> (VALOR MEDIO DE EXPRESIÓN DE LOS 16 GENES INCLUIDOS EN LA FIRMA GENÉTICA). <i>P</i> = VALOR DE PROBABILIDAD ESTADÍSTICA.....	109
FIGURA 39. <i>BOX PLOTS</i> QUE INDICAN DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE <i>RAB25</i> ENTRE MUCOSAS NORMALES Y TUMORES DE CECC, EN 4 ESTUDIOS DE MICROARRAYS PREVIAMENTE DESCRITOS. A[174], B[172], C[173] Y D[171]. <i>P</i> = VALOR DE PROBABILIDAD ESTADÍSTICA OBTENIDO DE APLICAR EL TEST ESTADÍSTICO DE <i>MANN WITHNNEY</i> .....	112
FIGURA 40. A) IMÁGENES DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CECC EN CRECIMIENTO EXPONENCIAL, TOMADAS CON EL MICROSCOPIO DE LUZ VISIBLE (40X). B) DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE TEM EN LAS DIFERENTES LÍNEAS DE CECC MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i> . C) IMÁGENES DE TINCIÓN IMMUNOCITOQUÍMICA DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CECC PARA LAS PROTEÍNAS E-CADHERINA, N-CADHERINA Y VIMENTINA. ....	115
FIGURA 41. RESULTADOS DEL ANÁLISIS POR <i>GSEA</i> PARA VALIDAR LA FIRMA GENÉTICA QUE DEFINE EL FENOTIPO TEM EN LÍNEAS DE CECC [180]. A) <i>ENRICHMENT PLOT</i> PARA LA VALIDACIÓN DE GENES SOBREEXPRESADOS EN LAS LÍNEAS CON FENOTIPO EPITELIAL. B) <i>ENRICHMENT PLOT</i> PARA LA VALIDACIÓN DE GENES INFRAEXPRESADOS EN LAS LÍNEAS CON FENOTIPO MESENQUIMAL.....	116
FIGURA 42. CURVAS DOSIS-RESPUESTA ASOCIADAS AL TRATAMIENTO DURANTE 48 HORAS CON CISPLATINO DE LAS DIFERENTES LÍNEAS DE CECC Y TABLA DE LOS VALORES DE $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) DE CISPLATINO PARA CADA LÍNEA CELULAR. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR. ....	118
FIGURA 43. HISTOGRAMAS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN OBTENIDOS POR cPCR ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) PARA LOS GENES <i>RAB25</i> , <i>SERPINA-1</i> , <i>DUOX-1</i> , <i>RAB11A</i> , <i>THBS-1</i> , <i>LGALS1</i> , <i>TGM3</i> Y <i>FHL2</i> EN LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES. LA LÍNEA <i>UM-SCC-22A</i> SE UTILIZÓ COMO REFERENCIA. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR. ....	119
FIGURA 44. CURVAS DOSIS-RESPUESTA OBTENIDAS AL TRATAR LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DURANTE 120H CON UN RANGO CRECIENTE DE CONCENTRACIONES DE <i>CETUXIMAB</i> . LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR.....	121
FIGURA 45. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DEL <i>CETUXIMAB</i> Y CISPLATINO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE CECC. [ <i>CETUXIMAB</i> ] = 10 NM, LAS CONCENTRACIONES DE CISPLATINO CORRESPONDEN A LA LÍNEA A LA $IC_{50}/2$ , $IC_{50}$ , $2IC_{50}$ DE CADA LÍNEA. * $P < 0,05$ . LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR.....	122
FIGURA 47. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MRNA DE <i>RAB25</i> POR cPCR DE LAS LÍNEAS UM-SCC-74B (A) Y SCC-9 (B) TRANSFECTADAS CON EL PLÁSMIDO <i>pCDNA 3.1 HA-RAB25</i> , 72 HORAS DESPUÉS DE LA TRANSFECCIÓN. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR. ....	123
FIGURA 48. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MRNA DE <i>RAB25</i> POR cPCR DE LAS LÍNEAS UM-SCC-22A (A) Y UM-SCC-22B (B), 72 HORAS DESPUÉS DE LA TRANSFECCIÓN CON EL PLÁSMIDO <i>MU6PRO-SHRAB25</i> . LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR. ....	123
FIGURA 49. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LAS LÍNEAS UM-SCC-74B (A) Y SCC-9 (B) Y LAS CORRESPONDIENTES LÍNEAS DERIVADAS CON UNA SOBREEXPRESIÓN DE <i>RAB25</i> . * $P < 0,05$ , OBTENIDA DE APLICAR LA PRUEBA ESTADÍSTICA DE <i>U-MANN WHITNEY</i> (N=6). LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. ....	124
FIGURA 50. CURVAS DOSIS-RESPUESTA Y TABLA DE LOS VALORES DE $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) OBTENIDOS AL EXPONER DURANTE 48H A UN RANGO CRECIENTE DE CONCENTRACIONES DE CISPLATINO LAS LÍNEAS UM-SCC-74B Y SCC-9 Y SUS CLONES QUE SOBREEXPRESAN <i>RAB25</i> , EVALUADO POR ENSAYO DE <i>XTT</i> . LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. ....	125
FIGURA 51. IMÁGENES TOMADAS AL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA (10X) DEL EXPERIMENTO DE RECUENTO APOPTÓTICO, POR TINCIÓN NUCLEAR CON <i>DAPI</i> EN LA LÍNEA UM-SCC-74B Y LOS CLONES CON SOBREEXPRESIÓN DE <i>RAB25</i> (UM-SCC-74B CLON10 Y UM-SCC-74B CLON20) 24 HORAS DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL CISPLATINO. (CONTROL: CÉLULAS TRATADAS CON VEHÍCULO).....	126
FIGURA 52. EXPERIMENTO DE <i>SCATTERING</i> PARA LAS LÍNEAS UM-SCC-74B, SCC-9 Y SUS RESPECTIVOS CLONES QUE SOBREEXPRESAN <i>RAB25</i> . IMÁGENES TOMADAS EN UN MICROSCOPIO DE LUZ VISIBLE (40X). ....	126
FIGURA 53. IMÁGENES TOMADAS AL MICROSCOPIO DE LUZ VISIBLE (20X) DE LAS CÉLULAS CAPACES DE MIGRAR A TRAVÉS DE LA MEMBRANA (A) Y LAS CAPACES DE ATRAVESAR LA MEMBRANA RECUBIERTA CON MATRIGEL™ (B) EN EL ENSAYO DE <i>TRANSWELLS</i> . LÍNEAS CELULARES UM-SCC-74B Y UM-SCC-74B CLON20. ....	127



# **INTRODUCCIÓN**



# I INTRODUCCIÓN

## 1. ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO.

### 1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) engloba todos aquellos carcinomas originados en la cavidad oral, orofaringe, laringe e hipofaringe.

El desarrollo del CECC esta asociado principalmente al consumo de tabaco, alcohol y la exposición al virus del papiloma humano (VPH). Estos factores carcinogénicos producen la expresión anormal de proto-oncogenes o genes supresores de tumores, los cuales a su vez, activan los mecanismos responsables de la proliferación celular y la transformación maligna del epitelio normal escamoso[1].

Aproximadamente el 70% de los pacientes con CECC presentan estadios avanzados de la enfermedad en su diagnóstico, generalmente con afectación en los nódulos linfáticos próximos al tumor primario. Raramente se observan metástasis a distancia en las etapas iniciales de la enfermedad[2].

La supervivencia de los pacientes con CECC depende del control locoregional de la enfermedad que se consiga con el tratamiento, la presencia de metástasis a distancia y la aparición de tumores secundarios.

### 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello se sitúa en la sexta posición en cuanto a casos de cáncer diagnosticados cada año en el mundo [3] (Figura 1). La incidencia varía en función del área geográfica (Figura 2).

En España, como en la mayoría de países del sur de Europa, la incidencia es elevada, detectándose 40 nuevos casos por cada 100.000 habitantes al año (Figura 2).

En un 75% de los casos, el desarrollo de CECC esta asociado al consumo de tabaco y alcohol. Ambos factores de riesgo tienen un efecto sinérgico [4, 5]. La incidencia del CECC es mucho mayor en hombres que en mujeres debido a la incorporación tardía de la mujer al consumo de tabaco y alcohol (Figura 1). Algunos polimorfismos genéticos en los enzimas encargados de la metabolización del tabaco y del alcohol pueden incrementar el riesgo de aparición de CECC [6].

## Introducción

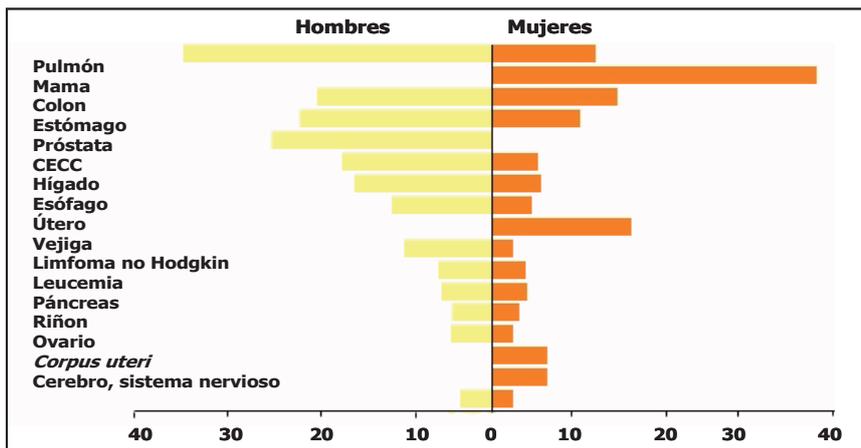


Figura 1. Incidencia del carcinoma de cabeza y cuello (CECC) en la población mundial en el año 2008 por cada 100.000 habitantes. Base de datos Globocan 2008 (Descriptive Epidemiology Group, IARC).

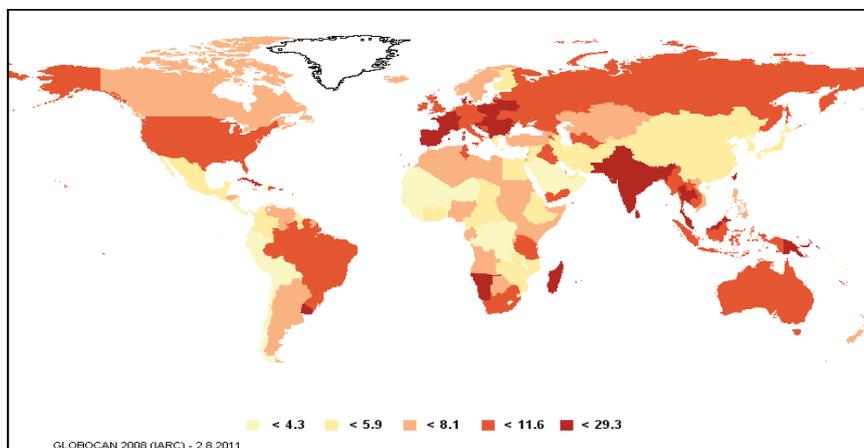


Figura 2. Incidencia del carcinoma de cabeza y cuello dependiendo del área geográfica. Base de datos Globocan 2008 (Descriptive Epidemiology Group, IARC <http://www-dep.iarc.fr>).

A pesar de ser una enfermedad mayoritariamente de carácter no hereditario también se ha detectado un componente genético [7]. El riesgo de sufrir un CECC aumenta en aquellos individuos que padecen síndromes que aumentan la susceptibilidad de desarrollar cáncer, como la anemia de Fanconi, la ataxia telangiectasia, el carcinoma colorectal no poliposo y la enfermedad de Li-Fraumeni [7, 8].

En los últimos años, se ha descrito la infección por el virus del papiloma humano (VPH) como un nuevo factor o cofactor de riesgo asociado al desarrollo de CECC [4, 5]. La asociación de VPH y CECC es más notable en cáncer de lengua, tiene carácter intermedio para el resto de componentes de la orofaringe y es menor en laringe y la cavidad oral [9]. El papel del VPH en el desarrollo del carcinoma es independiente al de otros carcinógenos [10]. La mayoría de casos de CECC asociados a VPH corresponden a individuos que no son fumadores, ni bebedores que a menudo presentan tumores

poco diferenciados y con histología basaloide. Los subtipos 16 y 18 de VPH son altamente oncogénicos.

### 1.3. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DEL CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO.

#### 1.3.1. Clínica y diagnóstico.

La sintomatología del CECC aparece tardíamente y depende en gran medida de la localización y extensión del tumor. A menudo, algunos síntomas como el dolor facial, de cabeza u oído pueden ser confundidos con patologías de carácter benigno. Según la localización, el paciente puede presentar molestias en la deglución, disfagia, odinofagia, disfonías, aparición de ulceraciones o sensación de cuerpo extraño.

Cuando existe sospecha de CECC, la exploración clínica se inicia con la inspección por palpación, seguida de exploración endoscópica. La endoscopia permite valorar macroscópicamente la morfología del tumor, su tamaño, la extensión y la movilidad de las cuerdas vocales y se acompaña de la obtención de una biopsia para poder confirmar el diagnóstico mediante examen histológico. El estudio de imagen, por resonancia magnética nuclear (RMN) y/o tomografía computarizada (TC), resulta útil para definir el alcance de la lesión y permite detectar la existencia de metástasis, que no son detectables por los métodos descritos anteriormente [11].

La identificación de adenopatías linfáticas en el cuello, no detectables en un examen clínico, es de extrema importancia ya que determina el tratamiento de la enfermedad. La técnica de *PET scan* (*Positron Emission Tomography Scan*) es la más eficaz para su identificación. La combinación de *PET scan* y la TC es la metodología más precisa para la detección de lesiones malignas en cabeza y cuello, además permite realizar un seguimiento de la respuesta al tratamiento y la detección de recidivas tumorales (Figura 3) [11].

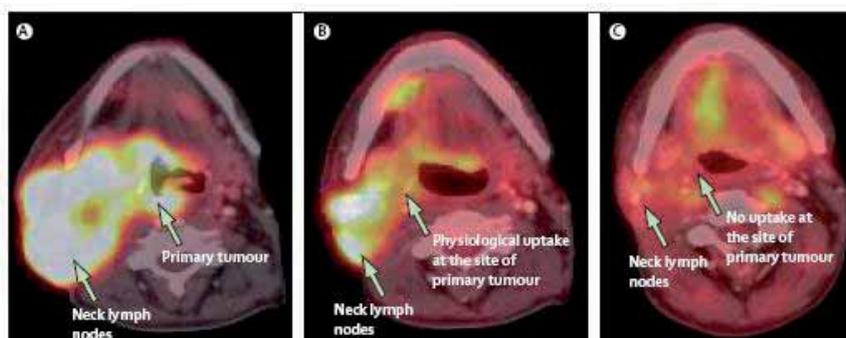


Figura 3. Combinación de *PET scan* y tomografía computarizada (TC) para la determinación del estadio del tumor (A) y de la respuesta al tratamiento (B y C) en carcinoma escamoso de cabeza y cuello localmente avanzado. Adaptado de Argiris, Karamouzis et al [4].

### **1.3.2. Determinación del estadio tumoral.**

El sistema de clasificación TNM establecido por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (<http://www.cancerstaging.org/>) se utiliza para determinar el estadio tumoral de los CECC. Este sistema de clasificación tiene en cuenta el tamaño del tumor primario (T), la afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). Inicialmente, se definen los tres parámetros descritos de manera independiente y, posteriormente, se agrupan los tumores en cuatro estadios. Los estadios I y II se consideran iniciales mientras que los III y IV son avanzados. Dentro del estadio IV se han definido tres subcategorías. El estadio IVA agrupa a tumores localmente avanzados que son abordables mediante cirugía radical y son, por tanto, operables. El estadio IVB agrupa a aquellos tumores localmente avanzados que se definen como no operables, ya que técnicamente no es posible researlos quirúrgicamente. El estadio IVC agrupa a aquellos pacientes en estadio IV que presentan metástasis a distancia.

La mayoría de los CECCs se diagnostican en estadios localmente avanzados (III, IVA y IVB). Frecuentemente el primer signo de la enfermedad es la aparición de una adenopatía cervical. El estadio tumoral posee valor pronóstico y se utiliza habitualmente en la práctica clínica para definir el protocolo terapéutico que debe seguir el paciente una vez establecido su diagnóstico [12]. A pesar de que la clasificación TNM es muy útil para definir la extensión anatómica del carcinoma, no aporta información patológica ni biológica sobre el comportamiento del tumor.

### **1.4. PATOLOGÍA DEL CECC.**

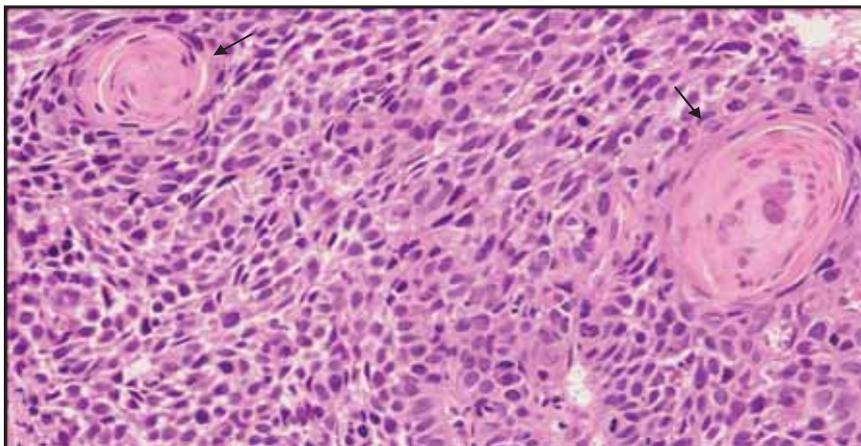
El 90% de los tumores de cabeza y cuello presentan una histología de tipo escamoso-celular, clasificándose bajo el grupo de carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) [3]. También existen otros subtipos de carcinoma de cabeza y cuello no escamosos que se presentan con baja frecuencia, como aquellos que se originan a partir de las glándulas o de las células neuroendocrinas presentes en la mucosa, y cuyo manejo terapéutico difiere considerablemente del tipo escamoso usual [13, 14]. Los tumores de nasofaringe también son otro subgrupo de tumores de cabeza y cuello. Estos presentan una epidemiología, patología, tratamiento clínico y evolución que difiere de los de tipo escamoso habituales [15]. Por esta razón se han excluido de nuestro estudio y no se describen en este trabajo.

## Introducción

---

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello se origina a partir del epitelio escamoso que recubre el tracto aerodigestivo superior [16]. La cavidad oral, la orofaringe y la hipofaringe están recubiertas por epitelio escamoso estratificado no-queratinizante. En cambio la laringe está recubierta por epitelio respiratorio ciliado, el cual a medida que avanza la edad del individuo se va sustituyendo por epitelio escamoso estratificado queratinizante, mediante un proceso de metaplasia.

En condiciones normales, el epitelio escamoso presenta una maduración en capas bien definidas, desde un estrato basal de células con escaso citoplasma y núcleo blástico hasta los estratos superficiales compuestos por células con un amplio citoplasma y núcleo pequeño e hiper cromático. El carcinoma escamoso usual presenta una proliferación desordenada de las células del epitelio escamoso, perdiendo en gran medida la capacidad de maduración en estratos (Figura 4). Las células de CECC presentan un citoplasma amplio eosinófilo, puentes de unión intercelular y queratinización. En el carcinoma escamoso invasivo se pierde la organización de la membrana basal y las células tumorales invaden el espacio submucoso.

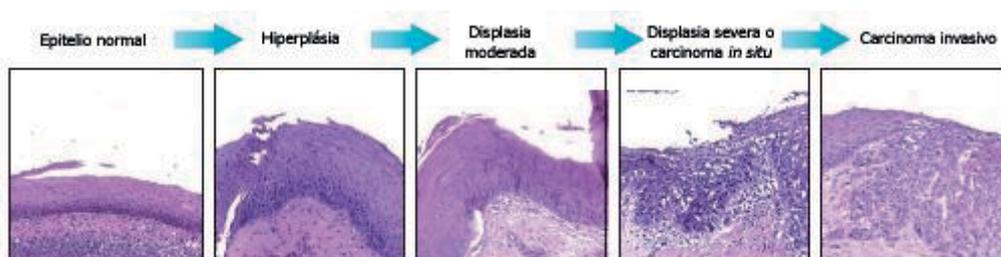


**Figura 4.** Las células tumorales del CECC pierden el proceso de maduración en estratos, invaden el espacio submucoso y secretan queratina, que se acumula formando depósitos (indicados con flechas) característicos de los CECC con un elevado grado de diferenciación escamosa. Imagen tomada al microscopio óptico (40X) (tinción hematoxilina – eosina).

La exposición continua del epitelio escamoso normal a los carcinógenos del tabaco y del alcohol induce una serie de cambios histológicos en la mucosa normal, previos al proceso de transformación neoplásica. El más común de estos cambios es la hiperplasia que se caracteriza por un aumento de la densidad celular del epitelio, así como por la acumulación de queratina en la superficie de la mucosa (Figura 5). No se considera una lesión neoplásica y su aparición, generalmente, es de carácter reversible. Cuando la acumulación de queratina es evidente, estas lesiones se denominan leucoplasias. La presencia de leucoplasias se asocia con un aumento del

## Introducción

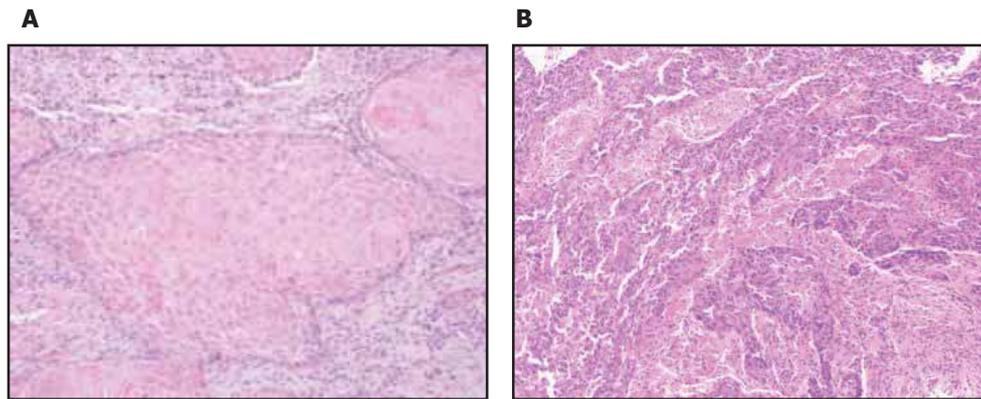
riesgo de desarrollar displasia o carcinoma escamoso [17], [18]. No obstante, su riesgo de malignización no es muy elevado y difiere mucho entre estudios. La hiperplasia también puede manifestarse mediante la aparición de manchas rojizas en la mucosa aerodigestiva que se denominan eritroplasias. Las eritroplasias son menos frecuentes que las leucoplasias pero se asocian de modo significativo con la aparición de displasias o carcinomas escamosos [19].



**Figura 5. Histología de las diferentes etapas de progresión de un CECC (tinción hematoxilina – eosina). Adaptado de Argiris *et al.* (2008)<sup>1</sup>.**

La displasia es una lesión pre-maligna que se caracteriza por la falta de maduración en estratos de la mucosa, así como por la presencia de atipias celulares, como el pleomorfismo nuclear y las alteraciones del tamaño del citoplasma. Las displasias pueden clasificarse según su grado de diferenciación en moderadas, medias o severas, y aumentan considerablemente el riesgo de desarrollar un CECC. Las displasias severas que presentan una pérdida aguda de la maduración del epitelio y una elevada presencia de atipias celulares se consideran carcinomas *in situ*. Cuando las células tumorales invaden el espacio submucoso se produce la transición de carcinoma *in situ* a carcinoma invasivo [4].

Los CECC se clasifican según su grado de diferenciación escamosa en bien diferenciados, moderadamente diferenciados o mal diferenciados (indiferenciados) (Figura 6) [20]. El grado de diferenciación se establece según el grado de queratinización, la presencia de puentes intercelulares, el pleomorfismo celular, la presencia de figuras mitóticas y el tipo de crecimiento en los márgenes tumorales (crecimiento expansivo o infiltrante). Los tumores bien diferenciados son frecuentes en la cavidad oral y la laringe, mientras que los mal diferenciados suelen localizarse en la faringe.



**Figura 6. Histología de dos biopsias de CECC con diferente grado de diferenciación.**  
**A) Tumor bien diferenciado y B) Tumor mal diferenciado.**  
**Imágenes tomadas al microscopio óptico (20 X) (tinción hematoxilina – eosina).**

Los CECC que son VPH+ presentan algunas diferencias histológicas respecto a los VPH- . Los primeros tienen una histología de tipo basaloide y no presentan depósitos de queratina.

Menos del 5% de los CECC presentan una morfología atípica y se clasifican bajo subtipos diferentes (CE verrucoso, CE sarcomatoide, CE basaloide) [4, 16]. Dicha clasificación responde al hecho de que estos tumores manifiestan un comportamiento biológico distinto y su manejo terapéutico difiere considerablemente de los de tipo escamoso más común.

## 2. BASES MOLECULARES DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO.

### 2.1. MODELO DE PATOGÉNESIS.

El desarrollo del CECC es un proceso secuencial iniciado a partir de la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de proto-oncogenes que confieren a las células una ventaja proliferativa y/o de supervivencia. Los clones celulares resultantes acumulan una serie de mutaciones genéticas, en las distintas etapas de la progresión (Figura 7), conduciendo a la transformación de las células epiteliales, de la mucosa normal, en células tumorales que crecen de manera desordenada y originan un tumor. Las alteraciones genéticas y cromosómicas se manifiestan a través de una serie de cambios histológicos en la mucosa normal, que tras una serie de etapas intermedias (hiperplasia, displasia y carcinoma *in situ*), se transforma en un carcinoma invasivo.

En 1996, Califano propuso el primer modelo que asociaba las alteraciones genéticas con los cambios morfológicos observados en el epitelio escamoso. El modelo postulaba que la pérdida de heterocigosidad en las regiones cromosómicas 9p21 y 17p13, y la deleción en 3p, se asociaban con etapas tempranas de la carcinogénesis (hiperplasia y displasia), mientras que alteraciones en las regiones cromosómicas 11q13, 13q21, 18q, 3q26 y 8p23, así como la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 8 estarían asociadas con etapas más avanzadas (carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo) [21] (Figura 7). Ha *et al*/sugirieron, mediante un estudio de microarrays, que la mayor parte de alteraciones genéticas, en el proceso de carcinogénesis, se dan en la transición de mucosa normal a lesión premaligna y no en la etapa de transformación de una lesión premaligna en un carcinoma invasivo [22].

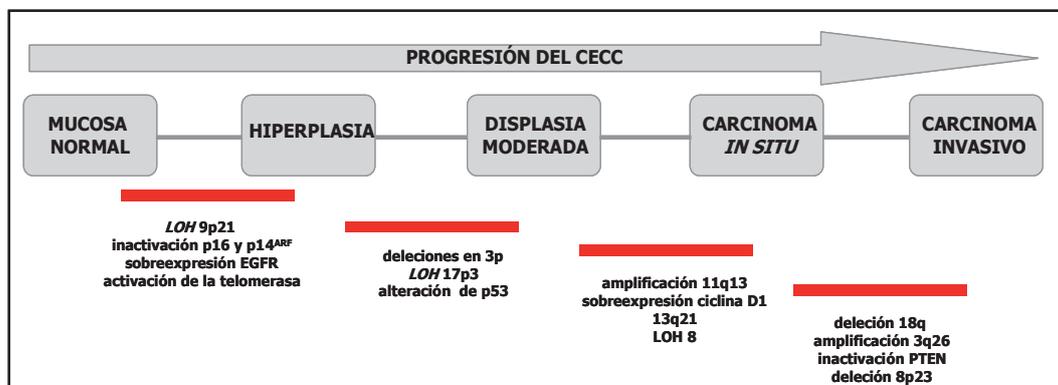
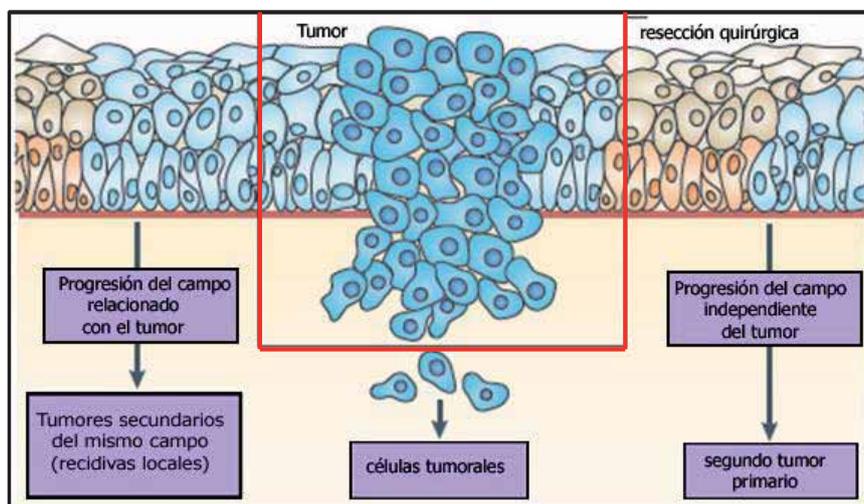


Figura 7. Modelo de patogénesis del CECC. Se muestran las alteraciones genéticas en cada una de las etapas de carcinogénesis. LOH (*Lose of Heterozygosity* o pérdida de heterocigosidad). Modificado de Califano *et al* [21].

## Introducción

En 1935, Slaughter definió, por primera vez, el término *field cancerization* (cancerización por campos) para referirse a la tendencia de los pacientes a desarrollar recidivas locales una vez tratado el CECC y a la probabilidad de que se desarrollen múltiples tumores independientes en la mucosa de cabeza y cuello [23]. En términos moleculares el fenómeno de *field cancerization* se caracteriza por la presencia de una o más áreas de la mucosa (*fields* o campos) formadas por células epiteliales que tienen asociadas alteraciones genéticas o epigenéticas (Figura 8). Cabe destacar que estas áreas genéticamente alteradas suelen estar en los márgenes de las resecciones quirúrgicas, motivo por el cual permanecen en el epitelio del paciente aún después del tratamiento con cirugía, aumentando así el riesgo de padecer recidivas o tumores secundarios.



**Figura 8. *Field cancerization* o cancerización por campos. Los campos están representados por las células azul claro y el tumor por las células azul oscuro. La línea roja delimita el lugar en el que se realiza la resección quirúrgica. Adaptado de Leemans *et al* [24].**

Un campo precursor es de origen monoclonal y no presenta un crecimiento invasivo ni comportamiento metastásico, siendo preneoplásico por definición y pudiendo tener o carecer de alteraciones histológicas características de una displasia. Para que un campo se convierta en un carcinoma es necesario que adquiera una serie de cambios genéticos. Se desconocen qué alteraciones genéticas específicas se asocian con riesgo de que un campo precursor derive en un carcinoma.

### 2.1.1. Alteraciones en las vías de señalización.

De manera general el proceso de carcinogénesis se debe a la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos en genes que actúan en las vías de señalización relacionadas

con la transformación maligna, confiriendo así a las células fenotipos como el potencial replicativo ilimitado, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad frente a los factores de inhibición del crecimiento, habilidad para evadir la apoptosis, capacidad de invasión, de desarrollar metástasis y de generar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) [25].

### **2.1.1.1. Potencial replicativo ilimitado: p53 y Rb.**

La alteración en la regulación del ciclo celular es clave para que las células tumorales adquieran la capacidad de división ilimitada [26]. En el CECC las mutaciones en los genes *P53* y *RB* son los responsables de la desregulación del ciclo celular.

Entre el 60 – 80% de los CECC contienen mutaciones en el gen *P53*. Estas alteraciones son debidas a la pérdida de heterozigosidad en la región 17p, a mutaciones puntuales en el mismo gen [27, 28] o a su inactivación por metilación o por unión a su inhibidor *MDM2* [29]. La proteína p53 está implicada en múltiples funciones, entre las que destacan la regulación del ciclo y de la proliferación celular, la activación de los mecanismos de reparación del DNA y la inducción de muerte por apoptosis (Figura 9). Las alteraciones genéticas que inhiben la función de p53, representan una de las primeras causas de carcinogénesis. Su inactivación produce inestabilidad genética facilitando, de este modo, la aparición de otras mutaciones secundarias. No obstante, en el 20% de los casos de CECC, p53 permanece activa. En estos tumores se postula que son otras proteínas de la vía de p53 las que están alteradas o bien que la progresión maligna es independiente de esta vía [24].

La región cromosómica 9p21 se encuentra frecuentemente alterada en los CECC, debido a mutaciones o metilaciones combinadas con pérdida cromosómica o, en la mayoría de los casos, con pérdida de heterozigosidad (LOH). Las alteraciones en 9p21 son un evento temprano en la progresión del CECC, observándose en un elevado número de lesiones premalignas y en el 70% de los casos de CECC [30, 31]. En esta región, se encuentra localizado el gen supresor de tumores *CDKN2A*, que codifica para las proteínas p16 y p14<sup>ARF</sup>. La proteína p16 participa en el ciclo celular inhibiendo las ciclinas dependientes de quinasas 4 y 6 (Cdk-4 y Cdk-6), lo que inhibe la fosforilación de la proteína Rb, bloqueando así, la progresión del ciclo celular de la fase G<sub>1</sub> a la S [32]. p14<sup>ARF</sup> impide que p53 se una a su inhibidor Mdm2 ejerciendo de este modo un efecto antiproliferativo. Las alteraciones genéticas que inactivan los genes *P16* y *P14<sup>ARF</sup>*, conducen a la desregulación del ciclo celular y favorecen la proliferación descontrolada de las células.

Además, un 40% de los CECC, presentan amplificaciones en el cromosoma 11q13, región en la que se encuentra el gen que codifica para la proteína ciclina D1. La sobreexpresión de ciclina D1 induce la fosforilación de Rb mediada por las quinasas Cdk-4 y Cdk-6. Esta alteración genética ocurre en etapas avanzadas de la progresión y favorece la inmortalización celular.

### **2.1.1.2. Alteraciones en la señalización de los factores de crecimiento: las vías EGFR y TGF $\beta$ .**

La activación de las vías Ras-MAPK, PI3K-PTEN-AKT y fosfolipasa C a través de EGFR son eventos frecuentes asociados con la progresión del CECC.

EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) se encuentra sobreexpresado en la mayoría de los CECC [33-35]. Sin embargo, el hecho de que esta proteína tenga múltiples sitios de fosforilación, que permiten la interacción con distintos efectores, dificulta la identificación de las vías que promueven la progresión tumoral [36].

La mutación EGFRvIII (*EGFR variant III*) del receptor, se encuentra en el 42% de los CECC y da lugar a un incremento en la tasa proliferativa [37]. Además, en un 10 – 30% de los CECC, la región cromosómica 7p11.2 está amplificada, lo cual correlaciona con la sobreexpresión de *EGFR* y su activación oncogénica [38].

La unión de EGFR a su ligando induce la dimerización del receptor, que a su vez se autofosforila y activa diversas vías de señalización, entre las que destacan la vía de las MAP quinasas (MAPK) y la vía de PI3 quinasa/AKT (PI3K/AKT) [39] (Figura 9). Estas vías regulan múltiples procesos biológicos como son la proliferación celular, la angiogénesis y la apoptosis, y su alteración contribuye de manera fundamental al proceso de malignización. En el CECC, la sobre-expresión de EGFR aumenta la proliferación, favorece la progresión del tumor hacia estadios más avanzados y el desarrollo de metástasis [40].

También se ha relacionado el CECC con amplificaciones y mutaciones en el gen que codifica para el factor de crecimiento *MET*, el cual activa las vías de AKT y Ras, interconectándose de esta manera con la señalización mediada por EGFR [41]. Este último hallazgo añade mayor complejidad a la identificación de las proteínas clave en las redes moleculares de receptores de tirosina quinasas involucradas en el CECC.

Otra vía asociada con la proliferación celular relacionada con el CECC, en este caso con carácter inhibitorio, es la de *TGF $\beta$* . A menudo los receptores de este factor de crecimiento están infraexpresados en los tumores de cabeza y cuello en etapas iniciales de la enfermedad [42].

En cambio, Cohen y colaboradores [43] han encontrado una correlación entre la vía de señalización de *TGFβ* y el factor de transcripción *NF-κβ*, el cual proporciona una señal de supervivencia a las células. Estos autores demostraron que la supresión de la vía *TGFβ* se asociaba con la activación de *NF-κβ*, promoviendo así la supervivencia celular y por tanto la progresión tumoral.

### **2.1.1.3. Capacidad de evadir la apoptosis: PI3K-PTEN-AKT.**

Las proteínas PI3K, concretamente las de la clase Ia, son heterodímeros acoplados a un receptor tirosina quinasa que se activa una vez este se fosforila (Figura 9).

Una de las subunidades catalíticas del complejo PI3K es p110α. Esta subunidad está codificada por el gen *PI3KCA*, que se encuentra en el cromosoma 3q26, un locus que presenta ganancia de función en CECC. Además se ha descrito que entre el 10 – 20% de los CECC tienen mutaciones somáticas en el gen *PI3KCA*. En experimentos *in vitro* se ha demostrado que células portadoras de mutaciones en este gen, presentan un aumento de la actividad quinasa, así como un incremento de la migración y la capacidad invasiva [44].

Además, un 10% de los CECC presentan mutaciones o deleciones en el gen *PTEN*. La inactivación de PTEN da lugar a una activación constitutiva de la vía PI3K [45].

Tanto las mutaciones que activan *PI3KCA* como las que inactivan *PTEN* producen una activación de la vía AKT que genera señales que aumentan la proliferación y la supervivencia, a la vez que inhiben la apoptosis.

### **2.1.1.4. Angiogénesis, invasión y metástasis.**

La angiogénesis, proceso mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos, es indispensable para que el tumor reciba los elementos necesarios para su crecimiento. Hay muchos factores que inducen angiogénesis, pero el más importante es *VEGF-A* [46]. Numerosos estudios han relacionado la sobreexpresión de *VEGF-A* con un mal pronóstico en el CECC. También se ha descrito que los oncogenes *INT-2*, *HST-1* y *BCL-1*, localizados en la región cromosómica 11q13, juegan un papel relevante en la proliferación celular y la angiogénesis [47]. La amplificación de *INT-2* y *HST-1* se produce en un 30-52% de los CECCs.

La característica que mejor define el cáncer es la capacidad de las células tumorales para escapar de sus límites biológicos e invadir los tejidos circundantes. Las células invasivas pueden migrar hacia espacios loco-regionales o distantes por difusión directa o bien por diseminación a través del sistema vascular o linfático, generando así

## Introducción

tumores secundarios o metástasis. Este proceso se asocia con una serie de etapas en las que las células tumorales deben superar diferentes barreras [48]. En este proceso están involucrados diferentes tipos celulares del estroma tumoral, tales como fibroblastos, células endoteliales e inflamatorias, y elementos no celulares como las proteínas de la matriz extracelular (MEC) que crean el espacio o microambiente necesario para el desarrollo de la neoplasia maligna [25]. Deleciones en la región cromosómica 8p23, donde se encuentra localizado el gen *CSMD1*, se asocian con un aumento de la capacidad de invasión y metástasis en CECC [49].

La transición epitelio-mesénquima (TEM) se ha descrito como un proceso clave para la que las células tumorales adquieran capacidad de invasión y puedan metastatizar [50]. Numerosos estudios apuntan a que *TGFβ* induce la transición epitelio-mesénquima [51], aumentando de este modo la capacidad de invasión y de generar metástasis de las células tumorales. En cuanto al papel que *TGFβ* juega en la angiogénesis, parece confuso, ya que en función del contexto celular actúa como factor pro-angiogénico o anti-angiogénico. En el CECC se ha descrito que promueve la angiogénesis [52].

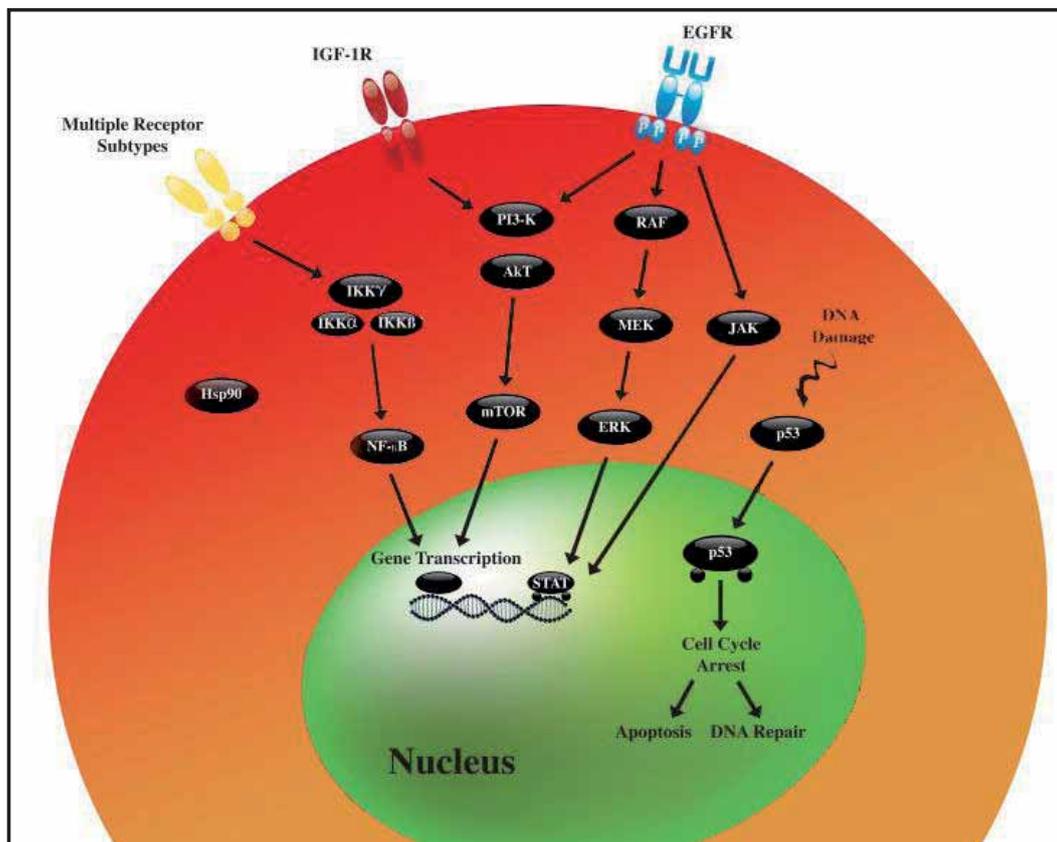


Figura 9. Esquema de las principales vías de señalización alteradas en el CECC. Adaptado de Stadler *et al* [53].

### 2.2. MODELO DE PATOGENESIS ASOCIADA A LA INFECCIÓN POR VPH

Existen evidencias que sugieren que los CECC VPH positivos (VPH+) representan una entidad tumoral diferente de los CECC VPH negativos (VPH-), ya que los procesos moleculares que subyacen en las etapas de carcinogénesis son distintos.

El CECC VPH+ tiene una histología basaloide, no queratinizante y no presenta mutaciones en *P53*. También se ha descrito la existencia de diferencias en los perfiles de expresión génica y defectos cromosómicos entre tumores VPH+ y VPH- [54].

En estos tumores, las proteínas virales E6 y E7 son las responsables de la transformación maligna a través de la inactivación de los genes supresores de tumores *P53* y *RB*, respectivamente [55] (Figura 10).

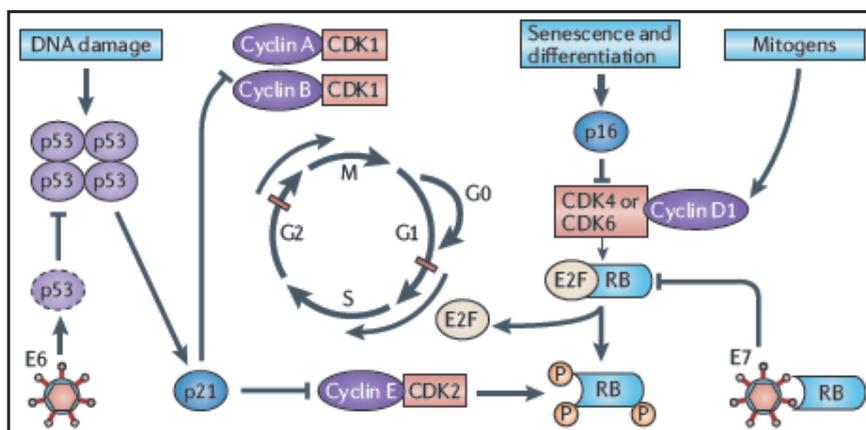


Figura 10. Desregulación del ciclo celular inducida por la infección de VPH .

La proteína E6 forma un complejo con p53 e induce su degradación, promoviendo así la desregulación del ciclo celular, la transformación maligna y un aumento de la inestabilidad genómica. E6 también se une a la proteína pro-apoptótica Bak y la degrada, causando una disminución de la señalización apoptótica. Además la proteína E6 es capaz de activar la telomerasa, enzima crítico para la inmortalización de las células [56].

La oncoproteína E7 interacciona con las proteínas de la familia del gen del retinoblastoma (Rb, p107 y p130). La proteína Rb regula la progresión del ciclo celular a través de la inhibición del factor de transcripción E2F, el cual activa la síntesis de DNA. La unión de la proteína viral E7 a Rb, libera el factor de transcripción E2F, promoviendo la síntesis de DNA en las células infectadas. Las proteínas p107 y p130, que controlan la transición del ciclo celular en las fases G0/G1, G1/S y G2/M, son inactivadas por la oncoproteína E7, liberando a las células infectadas de los puntos de control interfásico

## Introducción

---

descritos. E7 también puede activar a la ciclina A, que a su vez inhibe p16 produciendo un aumento de la progresión de las células a través del ciclo celular.

En resumen, las oncoproteínas virales E7 y E6 liberan a la célula de los puntos de control interfásicos, promoviendo un aumento de la proliferación celular e inhibiendo la señalización apoptótica. La pérdida de control del ciclo celular genera una pérdida de fidelidad en la replicación del DNA que favorece la aparición de mutaciones y alteraciones cromosómicas que confieren a las células infectadas una serie de cambios genéticos adicionales que permiten su progresión hasta un estado neoplásico [56].

### 3. TRATAMIENTO DEL CECC

#### 3.1. TRATAMIENTO DE LOS ESTADIOS INICIALES (I y II)

Los estadios iniciales del CECC (I y II) representan un tercio de los pacientes diagnosticados y se tratan mediante radioterapia (RT) o cirugía. Ambos tratamientos permiten preservar la función del órgano (calidad de la voz y capacidad de deglución) y obtener tasas de curación elevadas [4, 57]. No obstante, no se han descrito estudios randomizados en pacientes con tumores en estadios iniciales, que comparen ambos tratamientos. Por este motivo, no se ha podido determinar cual de los dos tratamientos es más eficaz en el control locoregional de la enfermedad, y si se traduce en diferencias en la supervivencia global de los pacientes o en la tasa de preservación del órgano [58]. Además, la radioterapia es un tratamiento habitualmente utilizado en CECC después de la exéresis quirúrgica del tumor con el fin de prevenir la proliferación de posibles células remanentes después de la operación [59].

La elección del tratamiento aplicado, RT o cirugía, depende de la localización del tumor primario y de las posibilidades de que el tratamiento afecte a la función del órgano tratado. Para tratar tumores pequeños fácilmente accesibles localizados en la cavidad oral, faringe y laringe es posible utilizar cirugía sin comprometer la función del órgano seccionado, obteniéndose, de este modo, buenos resultados clínicos [60] [61]. En los casos de CECC sospechosos de presentar micrometástasis ganglionares a pesar de que no presenten características histológicas anormales se suele seguir el protocolo de resección de los nódulos linfáticos cervicales [62-64]. Actualmente los avances técnicos en microcirugía permiten tratar a los pacientes en estadios iniciales de carcinoma de laringe causándoles menos repercusión en la calidad de voz que las técnicas de cirugía clásicas o la radioterapia (RT) [65].

La radioterapia consigue un gran control del tumor y tasas elevadas de curación en los primeros estadios de cánceres de glotis, base de la lengua y paladar. Los avances en técnicas de imagen para el diagnóstico como la TC, la RMN y el *PET scan* han supuesto una mejora en el tratamiento con RT, puesto que permiten la delimitación del tumor, y por tanto de la zona a irradiar de una manera más precisa [4].

Finalmente, los carcinomas de orofaringe e hipofaringe suelen tratarse mediante RT ya que este tratamiento se asocia a una menor morbilidad [66, 67].

### 3.2. TRATAMIENTO DE LOS ESTADIOS AVANZADOS (III y IV)

En pacientes con CECC en estadios iniciales el tratamiento con cirugía o RT permite alcanzar una tasa de curación elevada. No obstante, dos terceras partes de los pacientes se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad y tienen una supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) bajas tras el tratamiento con RT o cirugía. Aproximadamente el 50% de los pacientes presentan recidivas locales 2 años después del tratamiento y el 30% desarrollan metástasis a distancia [68, 69].

La quimioterapia (QT) se ha integrado en el tratamiento de los estadios avanzados, en combinación con la cirugía y/o radioterapia [70], desplazando a la cirugía radical como primera y única aproximación terapéutica.

Su introducción ha permitido aumentar la tasa de preservación de la función del órgano, sin que ello conlleve una disminución del porcentaje de curación obtenido con los protocolos clásicos de cirugía radical seguida de radioterapia (RT) [71].

Los resultados de diferentes estudios randomizados han confirmado que incluir la QT mejora la eficiencia del tratamiento de aquellos pacientes con CECC avanzado demostrando beneficios significativos en la preservación de órgano [72-74], un aumento en la progresión libre de enfermedad [72, 75], un mejor control locoregional [75] y tiempos de SG más largos [75-79].

Actualmente, los protocolos de tratamiento más utilizados en pacientes con CECC en estadios localmente avanzados son la quimioterapia de inducción (QTI), seguida de RT o cirugía, y la quimioradioterapia concomitante (QRT) [71].

La quimioterapia de inducción (QTI) o neoadyuvante consiste en la administración de tres ciclos sucesivos de quimioterapia (generalmente cisplatino y 5-Fluorouracilo) seguidos de RT o cirugía, dependiendo de la respuesta que presente el tumor. La QTI predice la respuesta tumoral a la RT posterior y la supervivencia global de los pacientes [80, 81]. Los pacientes con tumores que responden a la QTI son candidatos a un tratamiento conservador con RT, mientras que los pacientes con tumores no respondedores son tratados mediante cirugía radical y frecuentemente con RT post-operatoria. La QTI seguida de RT aumenta significativamente la tasa de preservación de la función del órgano, mejora el control de la enfermedad metastásica y mantiene la misma tasa de supervivencia global (SG) de los pacientes que con el uso de la cirugía radical como único tratamiento [72].

En los últimos años, diversos estudios randomizados sugieren que la QRT concomitante mejora la supervivencia global de los pacientes y el control locoregional de la

enfermedad, cuando se compara con la QTI seguida de RT o cirugía, o con la cirugía seguida de RT [74]. No obstante, la QRT no es tan eficaz como la QTI seguida de RT o cirugía en el control de las metástasis a distancia, y su elevada toxicidad dificulta la práctica de la cirugía de rescate en aquellos pacientes en los que el tumor recidiva [4]. También se han desarrollado combinaciones terapéuticas en las que se aplica QTI seguida de QRT o cirugía [71]. Estos protocolos intentan aprovechar la capacidad de la QTI para distinguir los tumores respondedores de los no respondedores y la mayor tasa de control locoregional de la enfermedad que se obtiene con la QRT. La QRT concomitante, cómo único tratamiento, suele reservarse para aquellos pacientes que desde su diagnóstico se definen como no operables y que por tanto, no obtendrían ningún beneficio al recibir un protocolo de inducción.

La adición de taxanos, como el *docetaxel* o el *paclitaxel*, al tratamiento estándar de QT mejora la respuesta y la supervivencia del paciente [71, 82].

En los últimos años se han incorporado al tratamiento del CECC fármacos que inhiben la actividad del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*). El *Cetuximab*, anticuerpo monoclonal *anti-EGFR*, fue el primer nuevo agente terapéutico, con diana dirigida, aceptado para el tratamiento de CECC, justificado por los resultados de un estudio randomizado en el que se demostró una mejora en la supervivencia de los pacientes tratados con la combinación de RT y *Cetuximab*, respecto a aquellos a los que solo se les aplicaba RT [83]. La mejora en el control locoregional y la supervivencia que se conseguía con la adición de *Cetuximab* al tratamiento de RT, era comparable con los regímenes basados en cisplatino. Diferentes ensayos clínicos han evaluado la capacidad del *Cetuximab* para tratar CECC recurrentes o metastásicos, obteniéndose mejoras significativas en las tasas de respuesta cuando se añadía *Cetuximab* al tratamiento con cisplatino respecto al tratamiento con cisplatino como agente único [84].

También se han realizado diferentes estudios para evaluar la eficacia de los inhibidores de la actividad tirosina quinasa del receptor *EGFR* en el tratamiento de CECC. Varios ensayos clínicos en fase II han demostrado respuestas entre un 1% y un 11% de los casos con CECC recurrentes o metastásicos tratados con *Gefitinib* o *Erlotinib* [85-87] [88].

Por otra parte, ensayos clínicos recientes han evaluado la combinación del *Erlotinib* o *Gefitinib* con agentes quimioterápicos, otros agentes biológicos o RT, obteniendo resultados preliminares satisfactorios [89, 90].

## Introducción

En nuestro centro, el protocolo habitual para el tratamiento de los pacientes con CECC en estadio localmente avanzado, candidatos a cirugía radical, consiste en la administración de QTI seguida de RT, habiéndose substituido progresivamente la RT por la QRT (Figura 11). Los pacientes no operables siguen un tratamiento de QRT concomitante desde su inicio.

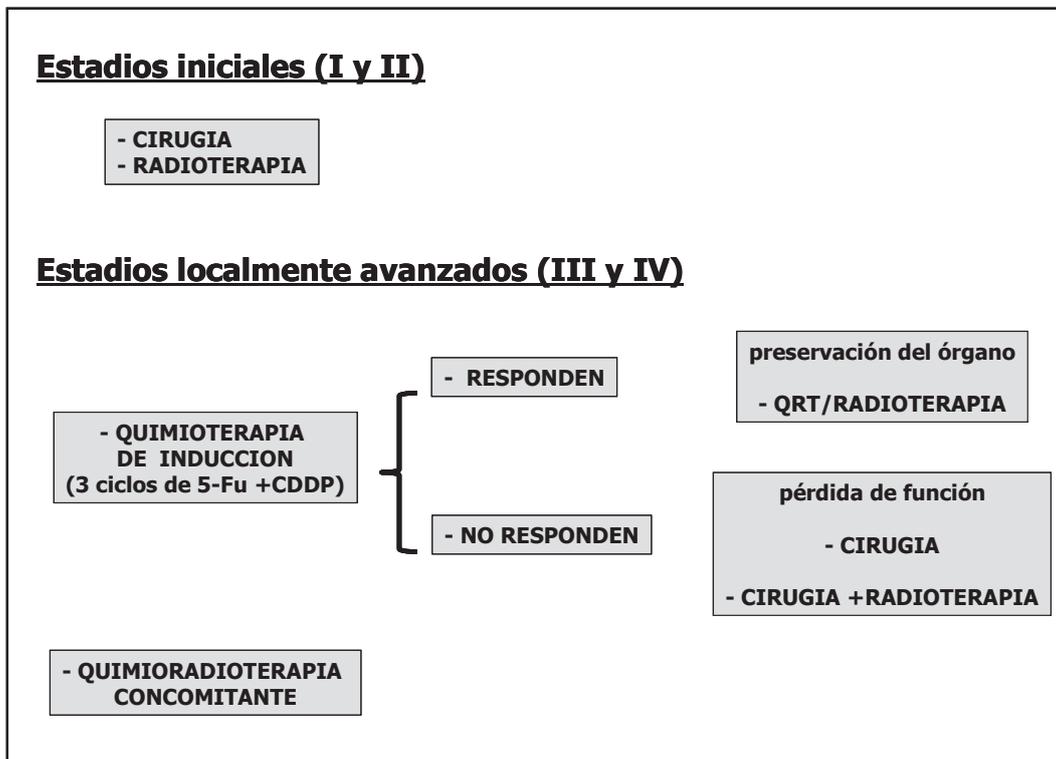


Figura 11. Protocolo de tratamiento utilizado en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello localmente avanzado.

### 3.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA RADIOTERAPIA.

La radioterapia (RT) es un tratamiento que se administra de manera localizada, cuyo mecanismo de acción está basado en su capacidad de producir daño en el DNA de las células tumorales. La radiación ionizante puede generar roturas en el DNA de modo directo, o a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que oxidan al DNA y acaban produciendo roturas en la doble hélice [91].

Una de las mayores limitaciones de la radioterapia es que los tumores sólidos generan áreas necróticas con déficit de oxígeno. Se ha descrito que el oxígeno incrementa la efectividad de la radiación, ya que ayuda a la formación de radicales libres que dañan al DNA. Por tanto las células tumorales en un medio hipóxico son más resistentes a la radioterapia que aquellas que están en condiciones normales de oxígeno [92].

La radioterapia hiperfraccionada es la estrategia radioterapéutica más utilizada para tratar los pacientes de CECC. Se basa en la aplicación de una dosis determinada repartida en pequeñas fracciones y subministrada en un tiempo corto para asegurar la no repoblación de las células tumorales.

### **3.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA QUIMIOTERAPIA.**

#### **3.4.1. 5-Fluorouracilo (5-FU).**

El 5-Fluorouracilo (5-FU) pertenece a la familia de fármacos conocidos como antimetabolitos (Figura 12). Este fármaco es un análogo pirimidínico que actúa inhibiendo de manera irreversible el enzima timidilato sintasa (TS). La inhibición de este enzima produce el bloqueo de la vía de síntesis del nucleótido timina, que es necesario para la replicación del DNA [93].

El 5-FU utiliza los sistemas celulares de transporte de nucleótidos para entrar al interior de la célula donde se metaboliza a fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) que es su forma activa. La inhibición de la TS produce una acumulación de deoxiuridina trifosfato (dUTP) e impide la formación de deoxitimidina trifosfato (dTTP), generando de este modo un desequilibrio en la síntesis del resto de desoxinucleótidos (dNTPs) necesarios para la síntesis de DNA. El aumento de dUTP, conjuntamente con la disminución del resto de dNTPs, produce alteraciones en la replicación del DNA, como son incorporaciones erróneas de dUTP [94]. Por otro lado, algunos metabolitos resultantes del metabolismo intracelular del 5-FU, como la fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP), pueden incorporarse al DNA como análogos del dTTP, impidiendo la progresión de la síntesis de DNA. La interrupción de la síntesis mantiene las dos hebras de DNA abiertas, facilitando la producción de roturas. Cuando los niveles de dTMP son bajos, el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (*NER*) produce ciclos fútiles sucesivos de reparación, para eliminar el FdUTP incorporado, que acaban generando roturas en la cadena de DNA, que sino son reparadas, conducen a la muerte de la célula tumoral [93, 94].

Como muchos otros antitumorales, el 5-FU tiene efectos sobre células normales que generan efectos adversos sistémicos. No obstante el 5-FU afecta más a las células tumorales que a las normales puesto que tienen una tasa de división más rápida y por tanto deben utilizar con más frecuencia la maquinaria de síntesis de nucleótidos. Dicho de otra manera, el 5-Fluorouracilo es un fármaco con mayor actividad en la fase S del ciclo celular, ya que es en esta fase cuando tiene lugar la síntesis de nucleótidos.

### 3.4.2. Cisplatino (CDDP).

El cisplatino o *cis*-diaminodicloroplatino(II) (CDDP) es un fármaco derivado del platino (Figura 12) que interacciona con las bases purínicas, generando enlaces intracadena e intercadena en el DNA [95].

La mayor parte de su capacidad genotóxica radica en la formación de enlaces intracadena, de los cuales los más comunes se dan entre dos guaninas, o entre una adenina y una guanina [96]. Los enlaces intracadena inhiben la replicación del DNA, produciendo una desestabilización de la estructura de doble hélice. Si esta alteración estructural no es reparada a tiempo, acaba produciendo roturas de doble cadena en el DNA, comprometiendo la viabilidad celular y en último término induciendo la activación de la vía apoptótica [97].

También se ha observado la interacción del cisplatino con proteínas celulares, en especial con proteínas del grupo de alta movilidad (*HMG proteins*), como un mecanismo de interferencia con la mitosis, aunque es probable que este no sea su principal vía de acción.

### 3.4.3. Taxanos (*Docetaxel* y *Paclitaxel*).

En los últimos años, los taxanos (*Docetaxel* y *Paclitaxel*) se han incorporado a la combinación de 5-FU y cisplatino para el tratamiento del CECC (Figura 12).

Los taxanos son fármacos antimitóticos, que promueven la polimerización de la tubulina, dando lugar a la formación de microtúbulos estables que no responden a los estímulos celulares y conducen a la célula hacia un proceso de muerte celular inducida [98].

El *Docetaxel* se une a los microtúbulos de manera reversible y con gran afinidad. Esta unión estabiliza los microtúbulos y evita su despolimerización. Esto lleva a un descenso de la tubulina libre, necesaria para la formación de microtúbulos y resulta en una inhibición de la división mitótica entre la metafase y la anafase, evitando así la proliferación de las células tumorales [99]. Las células al no poder completar la división celular, acaban entrando en un proceso de muerte apoptótica.

El efecto del *Paclitaxel* se basa también en la inhibición de la dinámica de polimerización/despolimerización de los microtúbulos. Este fármaco inhibe la síntesis de DNA y genera una parada del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub> [100].

### 3.4.4. Inhibidores de *EGFR*.

El 80% de los CECC sobreexpresan *EGFR* [40], por lo que la inhibición de la vía de señalización de *EGFR* representa una estrategia racional en el tratamiento del CECC. El *EGFR*, perteneciente a la familia de las proteínas HER, es una glicoproteína transmembrana expresada en la membrana plasmática que juega un papel fundamental en la mediación de señales extracelulares y la homeóstasis celular. Su estructura consiste en un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio tirosina quinasa intracelular [101].

Se han desarrollado diversos fármacos inhibidores de *EGFR*, que se pueden clasificar en dos grupos básicos: anticuerpos monoclonales anti-*EGFR* (*Cetuximab* y *Panitumumab*) e inhibidores de la actividad tirosina quinasa (*Gefitinib* y *Erlotinib*) [39] (Figura 12).

La actividad antitumoral de los anticuerpos monoclonales inhibidores de EGFR se da a dos niveles. Por una parte, impiden la unión de los ligando al dominio extracelular del *EGFR*, inhibiendo de esta manera la dimerización/activación del receptor y en última instancia induciendo la degradación del receptor [102]. El otro mecanismo por el que los anticuerpos anti-*EGFR* ejercen su actividad es a través de una acción indirecta mediada por la activación del sistema inmune [103].

Los inhibidores de la actividad tirosina quinasa son fármacos de bajo peso molecular que actúan directamente sobre las células tumorales sin desencadenar la respuesta inmune. La mayoría de estas moléculas inhibidoras mimetizan al nucleótido ATP (adenosina trifosfato), compitiendo de manera reversible o irreversible por su unión a la unidad catalítica del enzima tirosina quinasa.

En general los inhibidores de tirosina quinasa son menos específicos que los anticuerpos monoclonales, lo cual podría ser una ventaja para producir efecto antitumoral, pero a la vez se asocia con mayor toxicidad sistémica debida a la inhibición de varias vías de señalización, en las que están implicadas las tirosin quinasa, pudiendo interferir en las funciones celulares normales [104].

## Introducción

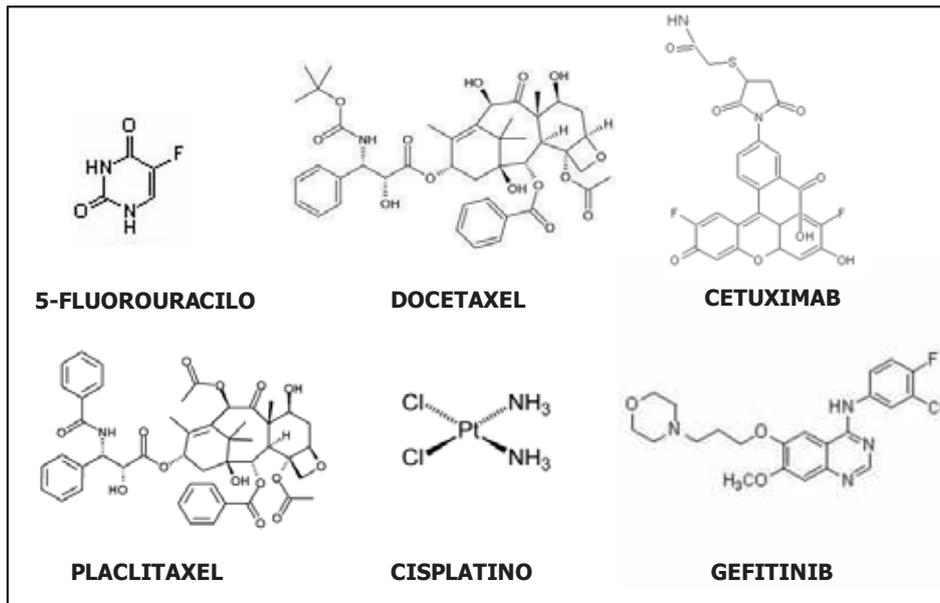


Figura 12. Estructura química de los diferentes fármacos quimioterapéuticos utilizados para el tratamiento del CECC.

### **4. FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS EN EL CECC.**

En oncología, los factores pronóstico son variables que informan sobre la probabilidad de que un carcinoma evolucione hacia una forma más o menos agresiva, sin tener en cuenta el tratamiento al que se somete al paciente. Un factor pronóstico está relacionado con la agresividad tumoral, capacidad de proliferación, migración y diseminación, más que con la respuesta de las células tumorales a un determinado tratamiento.

Por otro lado, los factores predictivos se relacionan con el efecto que produce un determinado agente terapéutico sobre las células tumorales, anticipando la respuesta tumoral y el mantenimiento de la respuesta a lo largo del tiempo o el desarrollo de resistencia. Los factores predictivos definen la probabilidad que tiene un determinado paciente de presentar una buena respuesta a un tratamiento terapéutico específico, estando relacionados con la sensibilidad de las células tumorales a dicho tratamiento y con el desarrollo de resistencia transcurrido un tiempo desde el inicio del tratamiento. Un factor puede considerarse predictivo cuando su evaluación proporciona información relativa al beneficio clínico obtenido por el paciente al someterse a un tratamiento terapéutico concreto.

Hasta la fecha, multitud de estudios han descrito factores pronóstico en CECC que ayudan a definir la evolución clínica de los pacientes, independientemente del tratamiento recibido. Sin embargo son pocos los marcadores capaces de predecir la respuesta tumoral y la evolución clínica de los pacientes tratados con quimioterapia o quimioradioterapia y de definir, de este modo, qué pacientes podrían beneficiarse del tratamiento genotóxico y los pacientes que deberían tratarse con cirugía o que serían candidatos a un tratamiento alternativo.

#### **4.1. FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS CLÍNICOS.**

Las lesiones pre-malignas (leucoplasias o eritroplasias) pueden utilizarse como factores pronóstico para determinar el riesgo de la aparición de CECC. El 8% de las lesiones leucoplásicas pueden progresar hasta carcinoma invasivo, sin embargo las eritroplasias tienen mayor potencial para desarrollar malignidad. Aproximadamente, un 90% de las eritroplasias conducen a displasias severas, carcinoma *in situ* o CECC invasivo [105].

Algunos estudios han observado que el grado de diferenciación de las células tumorales tiene valor pronóstico. Los CECCs se pueden clasificar histológicamente como bien, moderadamente o mal diferenciados. El grado histológico del tumor

## Introducción

---

depende de la diferenciación del epitelio escamoso, del pleomorfismo celular y del índice mitótico en las células tumorales. Los pacientes con tumores bien diferenciados presentan un menor riesgo de recidiva locoregional y una mayor supervivencia global, cuando se comparan con pacientes portadores de tumores indiferenciados [106]. El principal problema de los métodos histopatológicos es que las técnicas disponibles para determinar el grado tumoral dependen en gran medida del observador, hecho que limita su uso como factor pronóstico [1].

La presencia de metástasis extracapsulares en los nódulos linfáticos cervicales es el factor pronóstico que mejor predice la supervivencia, recidiva local y metástasis a distancia [1]. La afectación ganglionar se ha descrito como factor de mal pronóstico en el CECC [107].

La clasificación TNM es también un factor pronóstico en CECC. Está basada en agrupar a las neoplasias en estadios según el tamaño tumoral (T), la afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis a distancia (M) [12]. Los pacientes con CECC en estadios avanzados presentan una mayor tasa de recidiva local, una menor supervivencia global y una menor tasa de curación que los pacientes en estadios tempranos. Esta clasificación es el factor pronóstico más utilizado en la práctica clínica para definir el tratamiento de los pacientes con CECC.

A pesar de su valor pronóstico, en pacientes con CECC en estadios avanzados, el tamaño del tumor y la afectación ganglionar no pueden predecir de manera fiable la evolución clínica de los pacientes tratados con quimioterapia [12], [108].

Hasta la fecha, la respuesta a la quimioterapia de inducción es el único factor predictivo utilizado en la práctica clínica habitual. La respuesta a la QTI se asocia de manera significativa con la evolución clínica de los pacientes sometidos a tratamiento radioterápico. De este modo, la quimioterapia de inducción predice la respuesta tumoral al tratamiento posterior con radioterapia (RT) y la supervivencia global del paciente. La QTI identifica a los pacientes candidatos a obtener un beneficio clínico del tratamiento genotóxico, distinguiéndolos de los que deben tratarse con cirugía radical [80], [81].

### **4.2. FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS MOLECULARES.**

A día de hoy, se han descrito numerosos marcadores moleculares asociados al CECC pero ninguno ha sido introducido en la práctica clínica. Una posible razón para su falta de uso clínico puede estar en que la mayoría de estudios presentan un tamaño muestral pequeño, heterogéneo y tienen como objetivo identificar factores pronóstico y no factores predictivos. Como se ha descrito anteriormente, los factores pronóstico están relacionados con la progresión, la invasividad y la diseminación del tumor. Sin embargo, los factores predictivos se asocian con la capacidad de las células tumorales de responder al tratamiento genotóxico y de desarrollar resistencia, y no tienen por qué coincidir con los factores pronóstico.

A continuación, se detallan los biomarcadores con capacidad pronóstica para el CECC que han sido estudiados de una manera más extensa.

#### **4.2.1. Virus del papiloma humano (VPH).**

En los últimos años se ha incrementado el número de estudios que indican que el virus del papiloma humano (VPH) es un factor de riesgo para el desarrollo de CECC. El 26% de los pacientes con CECC presentan infección por VPH [109]. Además, varios estudios muestran que la infección por VPH es un factor pronóstico en CECC. Los pacientes con CECC portadores de VPH tienen mejor pronóstico que los pacientes con CECC negativos para el virus [110]. Por otra parte, en los carcinomas de orofaringe la infección por VPH tiene valor predictivo de respuesta al tratamiento. Los pacientes VPH+ sometidos a tratamiento quimioterapéutico presentan una mejor evolución clínica que los pacientes VPH- [111].

#### **4.2.2. Epidermal growth factor receptor (EGFR).**

La sobreexpresión de *EGFR* es un factor de mal pronóstico en CECC. Los pacientes que sobreexpresan *EGFR* presentan una mayor tasa de recidiva tumoral y un tiempo de supervivencia libre de enfermedad local menor que los pacientes cuyos tumores expresan niveles normales de *EGFR* [112] [113]. Además algunos grupos han demostrado que la sobreexpresión de *EGFR* confiere resistencia a diferentes modalidades terapéuticas, incluyendo la terapia dirigida contra este receptor [114-116]. Del mismo modo, el aumento del número de copias de *EGFR* es un factor de mal pronóstico en pacientes con CECC [117]. En estudios de microarrays se ha descrito un subtipo de pacientes, cuyos tumores sobreexpresan genes relacionados con la activación de la vía de señalización de *EGFR*, que presentan una supervivencia libre de

enfermedad menor que el resto de pacientes con CECC [118]. Un estudio de [119] muestra que la expresión de *EGFR* predice el control locoregional del tumor pero no la supervivencia global en pacientes con CECC tratados con radioterapia [119].

También se ha descrito una forma alterada de *EGFR*, *EGFRvIII*, que se presenta en aproximadamente el 40% de los casos de CECC [120]. Esta forma mutada no puede unir el ligando (EGF) y produce una señalización activada constitutivamente [121]. La forma *EGFRvIII* se asocia con la resistencia a *Cetuximab* en CECC [37].

### 4.2.3. *P16*.

La pérdida de heterocigosidad en la región 9p21, locus en el que se encuentra codificado el gen *CDKN2A* (que tiene como producto la proteína p16), se ha asociado con una mayor frecuencia de aparición de displasia, carcinoma *in situ* y CECC [31, 122, 123]. Este hallazgo sugiere que esta alteración genética puede estar involucrada en las etapas iniciales del desarrollo de esta enfermedad.

Numerosos estudios apuntan a que la pérdida de expresión de *p16*, por delección homocigótica o metilación, disminuye la supervivencia [32, 124-127]. Estas alteraciones genéticas están presentes en un 52 - 82% de los tumores de CECC. Además la delección de *p16* esta asociada con el desarrollo de metástasis a distancia [128]. Bazan *et al* [129], identificaron en un estudio prospectivo que la mutación en *p16* era un factor pronóstico independiente de recidiva tumoral y muerte. Sin embargo, algunos estudios en que se analizaron alteraciones o pérdida de expresión en *p16* presentan resultados contradictorios que plantean dudas a cerca del valor pronóstico de la inactivación de este gen [130, 131] .

Las diferencias en estos resultados pueden estar asociadas con el tipo de tejido analizado, la metodología usada en el análisis, o a diferencias en el protocolo de tratamiento seguido. Actualmente, todavía son necesarios más estudios para clarificar la capacidad pronóstica de *p16*.

Por otra parte, los pacientes infectados por VPH mantienen la expresión de *p16* y tienen una mayor tasa de supervivencia que los pacientes VPH negativos [132, 133].

### 4.2.4. *P53*

La expresión de *P53* en lesiones orales premalignas, especialmente en la región suprabasal del epitelio, se ha descrito como un factor predictor del desarrollo de malignidad [134]. Además, la existencia de cambios mutacionales en este oncogén en

## Introducción

---

los márgenes de las resecciones quirúrgicas de tumores primarios de CECC se asocia con un aumento del riesgo de recidiva local [135, 136].

Diversos estudios han demostrado que las mutaciones en el gen *P53* están asociadas con un alto riesgo de recidiva local, menor control locoregional y menor tasa de supervivencia global [28, 137-141] .

Por otra parte, la expresión de *P53* tiene mayor capacidad pronóstica en los pacientes que tienen el tumor localizado en la laringe. En estos pacientes la sobreexpresión de las formas mutadas de *P53* se asocia con tasas bajas de supervivencia local y de supervivencia libre de enfermedad [142, 143].

A pesar de los numerosos estudios que apoyan la eficacia pronóstica de *P53*, hay otros que defienden que ni la sobreexpresión de este gen ni la existencia de mutaciones son factores pronósticos independientes en CECC [144-147].

Como posibles causas de las discordancias entre estudios en cuanto al papel pronóstico de *P53* se argumentan las siguientes: 1) Fallos en la detección de mutaciones en *P53*. Muchas veces se utiliza la detección de la proteína p53 por inmunohistoquímica como indicador de mutaciones en el gen, a pesar de no ser un método totalmente específico y objetivo; 2) Variabilidad en los tratamientos aplicados a los pacientes en los distintos estudios; 3) Variaciones debidas a la etnia de los pacientes; 4) Diferencias en la manipulación y en las técnicas de análisis de los tejidos; y 5) Subjetividad en la determinación de los niveles de sobreexpresión proteica.

El hecho de que las vías de p53 y p16 representen los dos mecanismos principales de control del ciclo celular en la interfase G1-S y la existencia de numerosos estudios que confirman el poder pronóstico de ambos marcadores en diversos tipos tumorales, ha hecho que varios grupos de investigación se planteen si el análisis conjunto de estos dos marcadores aumenta su capacidad pronóstica. A pesar de que se observó un peor pronóstico en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (*NSCLC*) que presentan expresión aberrante tanto de *P53* como de *P16* [125, 148], un estudio prospectivo en 171 pacientes con CECC demostró que la presencia de ambas alteraciones no aumentaba el valor pronóstico en comparación con la presencia únicamente de la mutación en *P53* [125].

### 4.3. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CECC.

La tecnología de microarrays permite investigar simultáneamente la expresión de miles de genes en una misma muestra, generando un perfil de expresión genético para cualquier tipo de enfermedad. Estos perfiles permiten identificar grupos de genes que podrían desarrollarse como marcadores pronóstico de la enfermedad o predictores biológicos de la respuesta terapéutica. A continuación describimos los estudios más relevantes hechos en CECC.

En el estudio llevado a cabo por *Ziober et al* [149] se identificó un patrón de expresión válido para la predicción de CECC, mediante el análisis simultáneo de tumores de 13 pacientes y sus mucosas normales. El patrón incluía genes que habían sido previamente implicados en el desarrollo y progresión tumoral, como *laminin-5*, *SNAIL*, *LOXL2* y varias metaloproteinasas. En el estudio además se definió un grupo de 25 genes capaz de clasificar las muestras en tumorales y normales, que fue después validado con muestras independientes.

*Chung et al* [118] analizaron 60 muestras de tumores de pacientes con CECC e identificaron 4 grupos distintos en función de sus perfiles de expresión, que se asociaban con SLR y la SG. Además, identificaron patrones de expresión que podían predecir la presencia de metástasis linfáticas en CECC. En un estudio posterior, identificaron un subgrupo de tumores de mal pronóstico que presentaba activación de la vía NF- $\kappa$ B y características de transición epitelio-mesénquima [150].

*Ginos et al* [151, 152] identificaron varios perfiles de expresión génica mediante el análisis de 41 tumores de CECC. Entre los genes desregulados había un represor transcripcional implicado en la transición epitelio-mesénquima, y otros genes identificados en el grupo de pacientes que presentaban recurrencias, que estaban implicados en las interacciones del tumor con la matriz extracelular, como las lamininas o las integrinas.

*Cromer et al* [151] estudiaron 34 tumores de pacientes con CECC localizados en la hipofaringe e identificaron 164 genes diferencialmente expresados y potencialmente involucrados en la adquisición de la capacidad metastásica.

Por otra parte, *Gottschlich et al* [153] describieron, por primera vez, un patrón de expresión diferencial entre mucosa y tejido tumoral asociado a alteraciones

transcripcionales de genes relacionados con apoptosis, válido para el diagnóstico de CECC.

Roepman *et al*/ al comparar el perfil de expresión de pacientes operados y en estadios N<sub>0</sub> y N<sub>+</sub>, identificaron una firma genética de 102 genes capaz de predecir la aparición de metástasis ganglionares [154]. Entre los genes diferencialmente expresados se encontraron componentes de la matriz extracelular, adhesión celular y genes relacionados con la regulación de la muerte celular. Además, la mayoría de los genes que definían el fenotipo metastásico estaban infraexpresados. Este perfil genético se validó adicionalmente en 22 muestras tumorales.

Rickman *et al* [155] definieron, a partir del análisis de 186 tumores primarios de pacientes operados con presencia o ausencia de metástasis, un modelo predictor de cuatro genes (*PSMD10*, *HSD17B12*, *FLOT2* y *KRT17*) capaz de clasificar a los pacientes según su estado metastásico. Este modelo fue validado en un grupo independiente de 79 muestras.

Recientemente, Saintigny *et al* [156] analizaron el perfil genético de 81 pacientes con lesiones orales premalignas, e identificaron un perfil de expresión capaz de predecir el desarrollo de CECC en pacientes con lesiones orales premalignas.

A pesar de la multitud de estudios de microarrays realizados en CECC, la mayoría incluyen pocas muestras y su diseño es heterogéneo. En general, los estudios de expresión diferencial realizados con microarrays en CECC se centran en el estudio de genes diferencialmente expresados entre la mucosa normal y el tejido tumoral. Aunque estos genes identificados pueden jugar un papel importante en el inicio y/o progresión tumoral, no están necesariamente implicados en determinar la sensibilidad o resistencia de las células tumorales al tratamiento con agentes antineoplásicos. Otro problema que dificulta la posibilidad de validar estos marcadores en otros pacientes de CECC, es que en un mismo estudio se suelen incluir pacientes con CECC en estadios iniciales y otros en estadios avanzados, así como pacientes que han recibido protocolos terapéuticos diversos.

Existen pocos estudios enfocados a la predicción de respuesta de los pacientes con CECC a un determinado tratamiento con agentes antitumorales. La mayoría de ellos se

## Introducción

---

han desarrollado *in vitro* con líneas celulares como el de Akervall *et al* [157], que evaluó un panel de diez líneas celulares de CECC, identificando 60 genes asociados con resistencia al cisplatino. Estos genes participan en procesos de proliferación tumoral, adquisición de capacidad metastásica y resistencia a fármacos (*TIMP-2*, *Caveolina-2*, *PRAME* y *DAP*).

De Jong *et al* [158] llevaron a cabo un estudio de microarrays en el que analizaron un total de 52 muestras de pacientes con CECC en estadios iniciales, que fueron recogidas antes del tratamiento. En este análisis identificaron el gen *CD44* como predictor de recurrencia local después de tratar a los pacientes con radioterapia.

### 5. RESULTADOS PREVIOS.

Las hipótesis planteadas en esta tesis doctoral, y los experimentos realizados para evaluarlas, se basan en los resultados obtenidos en un estudio anterior realizado en nuestro grupo [159]. El objetivo principal de este estudio fue la identificación de perfiles de expresión y marcadores moleculares con validez pronóstica y predictiva de la evolución clínica de los pacientes con CECC. Se analizaron por microarrays 63 biopsias pre-tratamiento de pacientes con CECC localmente avanzado. Los pacientes incluidos en el estudio se trataron siguiendo uno de los dos protocolos estándar en clínica para este tipo de casos: QRT concomitante o QI seguida de QRT/RT o cirugía [160].

En este estudio se identificaron 3 subtipos o clusters de tumores distintos en función de su patrón de expresión. La clasificación en clusters se asoció de modo significativo con la SLRL, la SLP y la SG de los pacientes (Figura 13.A). Los pacientes de los clusters 2 y 3 tenían una probabilidad menor de padecer recidivas locales que la de los pacientes del cluster 1 (Figura 13.B). En cuanto la supervivencia global, los pacientes del cluster 3 presentaban un pronóstico más favorable que los pacientes del cluster 1 y 2 (Figura 13.B). Mediante un análisis de *Cox* multivariante se observó que la clasificación en cluster era un factor de riesgo independiente para la SLR ( $p < 0.001$ ) y la SG ( $p < 0.001$ ) y que tenía mayor poder de predicción de la respuesta al tratamiento que otras variables clínicas de uso habitual como la afectación ganglionar o el tamaño tumoral.

Los tumores del subtipo 1 eran los que se asociaban con peor pronóstico. La mayoría de los pacientes que pertenecían a este cluster sufrían recidivas locales durante los dos primeros años desde la finalización del tratamiento, lo cual resultaba en una menor supervivencia global. Este subtipo de tumores sobreexpresaba genes involucrados en adhesión celular, señalización por las vías de NF- $\kappa$ B, de integrinas y de proteínas de la matriz extracelular. También presentaban sobreexpresión de genes involucrados en la transición epitelio-mesénquima o en las vías de señalización de TGF $\beta$  y TNF $\alpha$ . Además, expresaban productos mesenquimales y proteínas implicadas en la síntesis del colágeno. Por otra parte los genes involucrados en la diferenciación de queratinocitos y la morfogénesis de la epidermis estaban infraexpresados en el cluster 1, indicando que en este cluster, los tumores presentaban poca diferenciación. En cambio, los tumores del cluster 2 presentaban sobreexpresión de genes involucrados en la oligomerización de proteínas y en la morfogénesis y ramificación de estructuras tubulares, así como un estado de diferenciación intermedio entre los otros dos subtipos de tumores (1 y 3).

## Introducción

Los tumores del cluster 3 presentaban un alto grado de diferenciación y sobreexpresaban genes localizados en las regiones cromosómicas 19q13 y 1q21. Este subtipo sobreexpresaba, además, genes que participan en la morfogénesis de la epidermis, la diferenciación de queratinocitos y la queratinización.

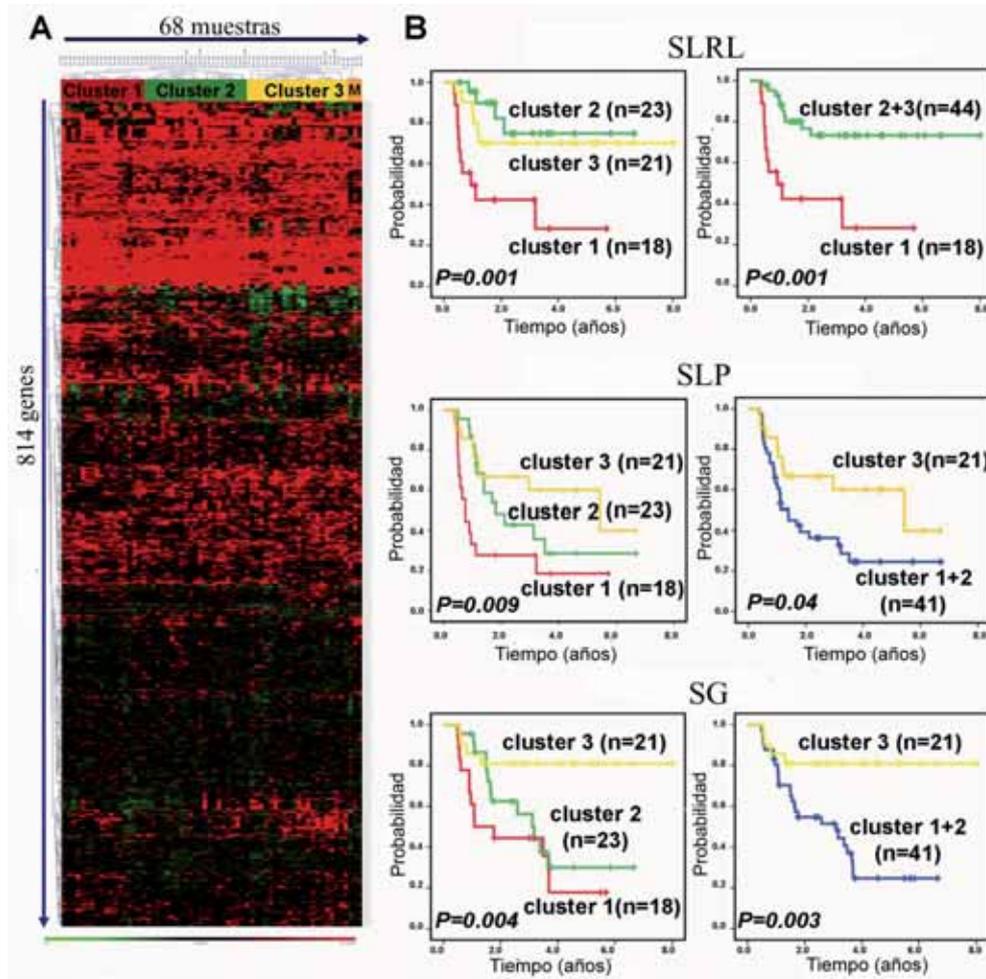


Figura 13. A) Identificación de los tres subtipos (clusters) tumorales en CECC en función de su patrón de expresión (Cluster 1, Cluster 2 y Cluster 3). B) Diferencias en la supervivencia libre de enfermedad (SLRL), supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) en función de la clasificación en clusters (*Log-rank test*). Figuras adaptadas de Pavon et al [161].



# **OBJETIVOS**



### II OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto de tesis doctoral es la determinación de marcadores moleculares, en biopsias pre-tratamiento, con capacidad pronóstica y predictiva de la respuesta a la terapia en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) localmente avanzado.

Los objetivos concretos planteados para la realización de este trabajo son los siguientes:

1. Estudio por PCR cuantitativa e inmunohistoquímica de la asociación entre el nivel de expresión de una serie de genes candidatos, identificados en un estudio previo de microarrays, y la supervivencia libre de recidiva local, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.
2. Desarrollo y validación, en series independientes de pacientes, de una firma genética con valor pronóstico para la supervivencia y la recidiva tumoral.
3. Caracterización molecular de un panel de líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.
4. Estudio de los efectos de la manipulación de genes con capacidad pronóstica sobre la proliferación, la invasión y la citotoxicidad producida por cisplatino, en células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello derivadas de pacientes.



# **MÉTODOS**



### **III MÉTODOS**

#### **1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y RÉGIMEN DE TRATAMIENTO.**

##### **1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.**

Para realizar este proyecto de tesis doctoral se ha trabajado con cuatro grupos de pacientes independientes (cohortes I, II, III y IV), de los que se ha analizado los niveles de expresión utilizando diferentes metodologías: microarrays, PCR cuantitativa e inmunohistoquímica.

La determinación de los niveles de expresión de diferentes genes por PCR cuantitativa (cPCR) se llevó cabo en tres cohortes independientes (cohortes I, II y III) de pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) en estadios localmente avanzados. El estudio de expresión de microarrays se realizó en dos cohortes de pacientes (cohorte II+III) con CECC en estadios localmente avanzados seleccionados de modo prospectivo a partir del año 2004. Los pacientes incluidos en estas tres cohortes presentaban un diagnóstico confirmado mediante análisis histopatológico y no habían recibido ningún tratamiento con anterioridad. Todos los pacientes eran candidatos a la administración de quimioterapia de inducción, seguida de RT/QRT o cirugía, o quimiorradioterapia concomitante desde un inicio.

Las muestras tumorales para la detección de distintas proteínas mediante inmunohistoquímica, se seleccionaron retrospectivamente a partir del año 1995. Seleccionamos pacientes con CECC localmente avanzado tratados con quimioterapia de inducción seguida de RT o cirugía y RT (cohorte IV).

Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de ética clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

##### **1.2. RÉGIMEN DE TRATAMIENTO.**

Los pacientes, que en el momento del diagnóstico se definieron como operables, recibieron un protocolo de inducción que consistió en la administración de tres ciclos de quimioterapia, seguida de cirugía o de un tratamiento conservador, según la respuesta que presentara el tumor. Los pacientes con tumores que respondieron a la quimioterapia de inducción continuaron su tratamiento con un protocolo conservador que consistió en la administración de radioterapia hiperfraccionada o de quimiorradioterapia concomitante. La cirugía radical se utilizó en aquellos pacientes con

tumores que no respondieron a la quimioterapia de inducción. Los pacientes que desde el diagnóstico se definieron como no operables eran candidatos a recibir quimioradioterapia concomitante desde un inicio.

El tratamiento de quimioterapia de inducción consistió en la administración de 3 ciclos de quimioterapia combinada con 5-Fluoruracilo (5-FU) y cisplatino (CDDP). En cada ciclo de quimioterapia de una semana de duración, se administró CDDP por vía intravenosa el día 1, a una dosis única de  $100 \text{ mg/m}^2$ , y 5-FU a una dosis de  $1000 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ , por infusión intravenosa continua durante 24 horas desde el día 2 hasta el día 6. El tratamiento se repitió cada tres semanas hasta completar tres ciclos. Los pacientes tratados entre 1995 y 2002, cuyos tumores respondieron a la quimioterapia de inducción, siguieron un protocolo de tratamiento con radioterapia (RT). En 2003, se incorporó la quimioradioterapia (QRT) como alternativa a la RT en pacientes respondedores. Progresivamente, la QRT fue desplazando a la RT como tratamiento de elección para estos mismos pacientes.

La radioterapia se administró localmente, al tumor primario y a aquellos ganglios regionales positivos, en 35 fracciones de 2 Gy durante una semana hasta alcanzar una dosis total de 70 Gy. Las áreas ganglionares no afectadas recibieron RT hasta una dosis total de 50 Gy.

La quimioradioterapia concomitante, se administró desde un inicio a los pacientes no operables, o bien, una vez finalizada la quimioterapia de inducción, y consistió en la administración de RT a las dosis descritas anteriormente, junto a tres ciclos de cisplatino a una dosis de  $100 \text{ mg/m}^2$  cada tres semanas.

## **2. RECOGIDA DE BIOPSIAS DE TEJIDO FRESCO, EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA.**

### **2.1. RECOGIDA DE BIOPSIAS DE TEJIDO FRESCO.**

Se obtuvieron biopsias tumorales, mediante endoscopia, de pacientes con CECC antes de que iniciaran el tratamiento de quimioterapia de inducción o quimioradioterapia concomitante. Para asegurar al máximo la integridad del RNA, las biopsias se congelaron inmediatamente después de su extracción, sumergiéndolas en *RNA later* (Invitrogen, Paisley, UK), una solución que contiene inhibidores de *RNAsas* y estabiliza el RNA. Las biopsias se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el momento de ser procesadas. Una parte de la biopsia se utilizó para confirmar, mediante diagnóstico histopatológico, la presencia de células tumorales. Aquellas muestras que no

presentaban un elevado porcentaje (>80%) de tejido tumoral se excluyeron del estudio. A partir de las biopsias congeladas se obtuvo RNA para los experimentos de cPCR y microarrays. Las biopsias de mucosa normal utilizadas en el estudio de microarrays se obtuvieron de localizaciones alejadas del tumor primario, donde no se apreciaba clínicamente ninguna alteración. Mediante análisis histopatológico se confirmó que las 5 mucosas sólo contenían tejido normal.

### 2.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA.

La extracción de RNA de tejido tumoral se realizó con Trizol (Invitrogen, Paisley, UK), siguiendo las indicaciones del fabricante (Tabla 1).

El primer paso consistió en disgregar el tejido de forma mecánica, con la ayuda de una cuchilla y un homogeneizador para facilitar la posterior lisis celular utilizando Trizol. La extracción de RNA de las líneas celulares se empezó por el paso de lisis celular. Seguidamente, mediante una extracción con cloroformo, se separó el RNA en la fase acuosa. Posteriormente, se realizaron los pasos de precipitación y lavado del RNA en isopropanol y etanol. Una vez obtenido el RNA, y con el fin de eliminar cualquier tipo de impureza que pudiera interferir en los posteriores análisis, se purificó mediante el sistema de extracción en columnas *RNAeasy* (Qiagen, Valencia, USA). El método de extracción en columnas utilizado, se basa en la retención del RNA en una columna de afinidad y tras una serie de pasos de limpieza, termina con la elución del RNA en agua libre de RNasas (Tabla 1).

**Tabla 1. Protocolos de extracción de RNA con Trizol (Invitrogen, Paisley, UK) y de purificación con columnas RNAeasy (Qiagen, Valencia, USA) .**

#### **Extracción de RNA con Trizol**

- 1- Disgregar y homogenizar 15-20 µg de tejido en 1ml de Trizol *Reagent*.
- 2- Centrifugar 2 min a 7.000 g a 4°C. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 3- Añadir 200 µl de cloroformo. Mezclar por inversión durante 15 s.
- 4- Centrifugar 30 min a 12.000 g a 4°C. Recuperar la fase acuosa (400-450 µl).
- 5- Añadir 450 µl de isopropanol frío. Mezclar por inversión durante 15 s.
- 6- Incubar durante 10 min a temperatura ambiente (T.A.).
- 7- Centrifugar 10 min a 12.000 g a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
- 10- Añadir 1 ml de etanol 75% frío. Agitar suavemente.
- 11- Centrifugar 10 min a 7.500 g a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
- 13- Secar el pellet a T.A. durante 10 minutos aproximadamente.
- 14- Resuspender el RNA en 100 – 200 µl (en función del tamaño del pellet) de H<sub>2</sub>O libre de RNasas.

### **Purificación de RNA con columnas *RNAeasy***

- 1- Añadir 350  $\mu$ l de buffer RLT\* al RNA obtenido. Mezclar bien con la pipeta.
- 2- Añadir 250  $\mu$ l de etanol 100%. Mezclar bien con la pipeta.
- 3- Pasar la solución (700  $\mu$ l) a una columna *RNAeasy* y centrifugar durante 15 segundos a 8.000 g a temperatura ambiente (T.A.). Descartar el sobrenadante.
- 4- Añadir 700  $\mu$ l de buffer RW1. Centrifugar 15 segundos a 8.000g a T.A.
- 5- Pasar la columna a un nuevo tubo colector y añadir 500  $\mu$ l de buffer RPE. Centrifugar durante 15 segundos a 8.000g a T.A. Descartar el sobrenadante.
- 6- Añadir 500  $\mu$ l de etanol 80%. Centrifugar 2 minutos a 8.000 g.
- 7- Pasar la columna a un nuevo tubo colector, abrir la tapa de la columna y centrifugar 5 minutos a la máxima velocidad.
- 8- Poner la columna en un tubo eppendorf y añadir 14  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada libre de *RNAasas*.
- 9- Incubar durante 3 minutos a T.A. y centrifugar 3 min a la máxima velocidad para eluir el RNA.
- 10- Realizar un segundo eluido añadiendo 14  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada y centrifugando a la máxima velocidad durante 1 minuto.
- 11- Reservar una alícuota de RNA para analizar su concentración e integridad y conservar el resto a -80°C.

\* El volumen de *buffer* añadido es en función del agua que se añade para resuspender el pellet resultante de la extracción de RNA. Véase protocolo *RNAeasy® Micro Handbook* (Quiagen)

### **2.3. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL RNA**

Se determinó la concentración y la pureza del RNA total obtenido midiendo su absorbancia a 260 nm y 280 nm, utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific, Waltham, USA). Una unidad de  $A_{260}$  es equivalente a 40  $\mu$ g/ml de RNA. El ratio  $A_{260}/A_{280}$  nos indica la pureza del RNA. Un ratio de 2 indica una pureza de RNA elevada. Cuando el RNA está contaminado con proteínas este ratio disminuye. Para los estudios de PCR cuantitativa o microarrays utilizamos RNA con un ratio superior a 1.6 o a 1.9, respectivamente.

Para determinar la integridad del RNA y descartar posibles contaminaciones, se utilizó el analizador *Bioanalyzer* y los *RNA 6000 nanochips* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Se trata de una medida indirecta que permite establecer la integridad del RNA mensajero (mRNA) midiendo la del RNA ribosómico (rRNA), mucho más abundante en el RNA total extraído de una muestra.

Con esta tecnología se obtiene un perfil para las diferentes secuencias de RNA/DNA, que conforman una misma muestra, separadas por peso molecular (Figura 14). Cuando la integridad del rRNA es adecuada, se asume que la del mRNA también lo es.

## Métodos

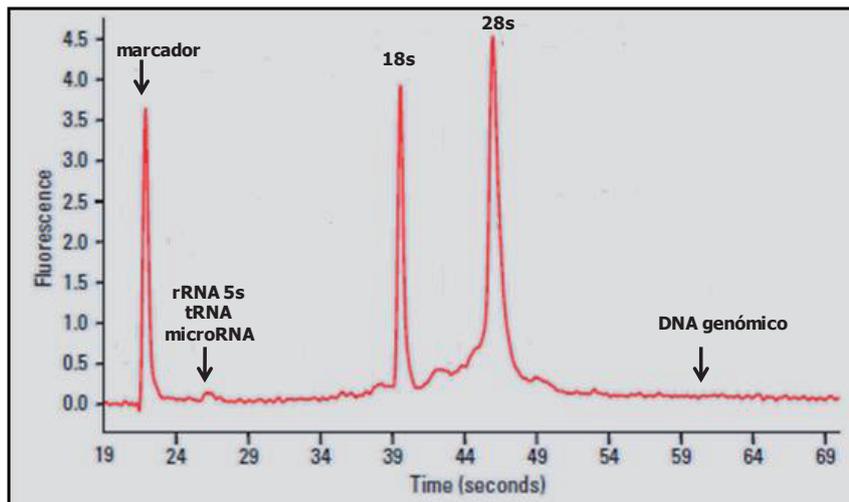


Figura 14. Electroferograma obtenido con el *Bioanalyzer* en el que se detallan las diferentes regiones para la determinación de la calidad de RNA. El primer pico corresponde al marcador, seguido del pico correspondiente a los RNAs de bajo peso molecular (RNAr 5s; RNAt; microRNA). Este es más o menos aparente según el método de purificación de RNA que se utilice. Los dos picos que muestran mayor intensidad corresponden a los RNA ribosómicos 18s y 28s. La aparición de alguna señal a un tiempo de elución mayor que el del RNAr 28s es un indicador de contaminación con DNA genómico.

Con el fin de estandarizar la interpretación de la integridad del RNA, Agilent ha establecido el *RIN* (*RNA Integrity Number*), un algoritmo para clasificar las muestras de RNA total analizadas en función de la integridad del RNA ribosómico ([www.agilent.com](http://www.agilent.com)). Este algoritmo genera valores en una escala de 1 a 10, con un valor de 1 para los RNAs que presentan más degradación y de 10 para aquellos RNAs más íntegros (Figura 15). Para el análisis de microarrays utilizamos RNAs con  $RIN > 7$ .

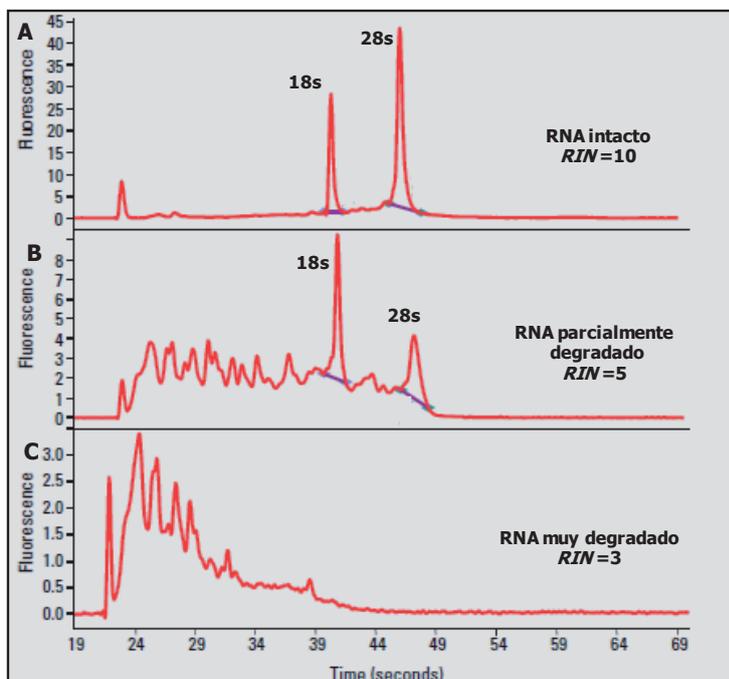


Figura 15. Electroferogramas que se obtienen en función de la integridad del RNA. (A) RNA íntegro, (B) RNA parcialmente degradado y (C) RNA completamente degradado.

### 3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN: MICROARRAYS.

El análisis por microarrays consiste en la hibridación de RNA previamente marcado, obtenido de una muestra problema, con un número elevado de secuencias de DNA conocidas, inmovilizadas de un modo ordenado sobre un soporte físico. En un único experimento, se obtiene información relativa a la expresión de miles de genes de una muestra problema.

Existen dos tipos de microarrays diferenciados comúnmente entre microarrays de un color y microarrays de dos colores. En los primeros, generalmente, se sintetiza sobre un soporte físico una serie de oligonucleótidos específicos de los genes a interrogar. Al hibridar sobre el microarray, RNA marcado de la muestra a analizar, se produce una emisión de fluorescencia cuya intensidad es mayor o menor dependiendo de la expresión del gen analizado. En los microarrays de dos colores, se dispone sobre un soporte físico, DNA complementario al RNA cuya expresión queremos analizar y se hibrida con dos muestras marcadas con fluorocromos distintos. En cada experimento se hibrida una muestra control y una muestra problema. Se trata de una hibridación por competición, obteniendo como resultado una señal que corresponde a la fusión de los dos fluorocromos utilizados en el marcaje.

Los experimentos de microarrays descritos en este estudio han sido realizados utilizando la plataforma Affymetrix de microarrays de un color y el chip *HG-U133 Plus 2.0* (Affymetrix, Santa Clara, USA). Esta plataforma está diseñada para la utilización de chips de oligonucleótidos sintetizados directamente sobre un soporte de cristal. Cada gen está representado por 12 pares de sondas de 22 *mer*; es decir, 12 sondas específicas de la región que se quiere detectar y 12 sondas control adicionales. La señal obtenida para un gen determinado es el resultado de integrar la señal del conjunto de sondas que lo representa. El chip *HG-U133 Plus 2.0* contiene 54.000 conjuntos de sondas y permite determinar la expresión de la mayoría de genes humanos descritos.

#### 3.1. MARCAJE, PURIFICACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DEL RNA.

El RNA obtenido a partir de las muestras de tumor, tejido normal o células fue procesado antes de ser analizado por microarrays. El primer paso consistió en una transcripción reversa del RNA total purificado, para obtener cDNA de cadena simple. Para ello se utilizó un *primer* que incorpora el promotor de la polimerasa T7 al cDNA. Seguidamente, se realizó la síntesis de la segunda cadena de cDNA. El tercer paso consistió en una reacción de transcripción *in vitro* para obtener aRNA (*amplified RNA*)

## Métodos

marcado con biotina. El aRNA biotinilado se purificó con el fin de eliminar sales, enzimas, nucleótidos no incorporados, de las reacciones anteriores y mejorar así la estabilidad del aRNA. Finalmente se realizó un paso de fragmentación, para obtener secuencias de 35 a 200 bases que posteriormente se hibridaron con el microarray *HG-U133-Plus 2.0* (Figura 16 y Tabla 2).

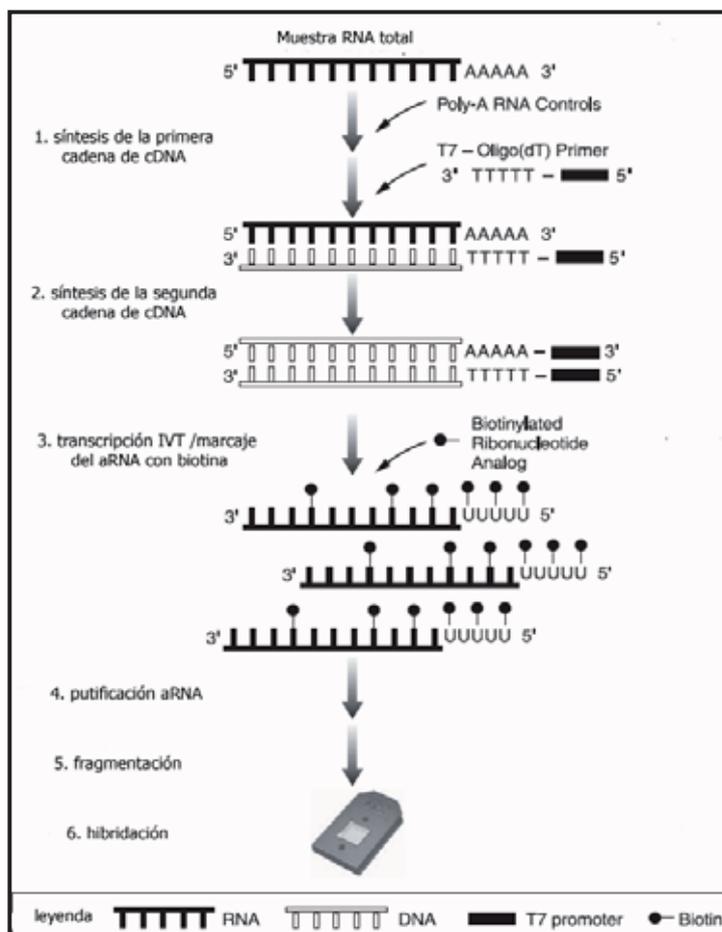


Figura 16 . Esquema del proceso de marcaje e hibridación de los chips de Affymetrix, utilizando el *kit* de marcaje "GeneChip® 3' IVT Express *Kit*". Figura adaptada del manual de GeneChip® 3' IVT Express *Kit* de Affymetrix.

## Métodos

**Tabla 2. Protocolos de marcaje, purificación y fragmentación del RNA realizados con el *kit* "GeneChip® 3' IVT Express *Kit*".**

### **Síntesis de cDNA de cadena sencilla:**

1- Preparar la siguiente reacción

250 ng RNA	Volumen variable (máximo 3µl)
dilución de controles <i>Poly A</i>	2 µl
agua libre de RNAsas	Volumen variable (hasta completar el volumen total)
<i>first- strand buffer mix</i>	4 µl
<i>first- strand enzyme mix</i>	1 µl
<hr/>	
VOLUMEN TOTAL	10 µl

2- Incubar la reacción durante 2 horas a 42°C en un termociclador. Incubar la muestra a 4°C y proceder al siguiente paso.

### **Síntesis de cDNA de doble cadena:**

1. Preparar la siguiente mezcla

agua libre de RNAsas	13 µl
<i>second- strand buffer mix</i>	5 µl
<i>second- strand enzyme mix</i>	2 µl
<hr/>	
VOLUMEN TOTAL	20 µl

2. Añadir la mezcla a los 10 µl de reacción anterior.

3. Incubar durante 1 h a 16°C y 10 minutos a 65°C en un termociclador. Incubar la muestra a 4°C y proceder al siguiente paso.

### **Transcripción *in vitro* (IVT) y marcaje de aRNA con biotina:**

1. Preparar la siguiente mezcla

<i>IVT Biotin Label</i>	4 µl
<i>IVT Labeling Buffer</i>	20 µl
<i>IVT Enzyme Mix</i>	6 µl
<hr/>	
VOLUMEN TOTAL	30 µl

2. Añadir la mezcla a los 30 µl de reacción anterior.

3. Incubar durante 16 horas a 40°C en un termociclador.

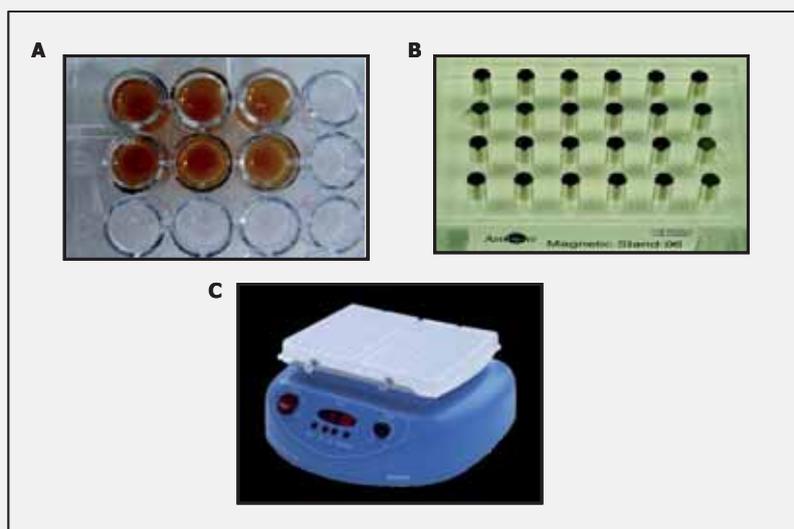
### **Purificación del aRNA:**

El proceso de purificación se realiza con bolas magnéticas que tienen la capacidad de retener las moléculas de aRNA marcadas (Figura 16).

1. Preparar la siguiente mezcla

RNA <i>Binding Beads</i>	10 $\mu$ l
aRNA <i>Binding Buffer</i>	50 $\mu$ l
<hr/>	
VOLUMEN TOTAL	60 $\mu$ l

2. Añadir la mezcla a las muestras de aRNA (60  $\mu$ l) y transferir a una placa con pocillos cóncavos (*U-Bottom plate*).
3. Para la unión del aRNA a las bolas magnéticas añadir 120  $\mu$ l de etanol 100% y agitar en un agitador de placas durante 2 minutos a 500 rpm.
4. Colocar la placa sobre una plataforma magnética durante 5 minutos para capturar las bolas magnéticas. Retirar el sobrenadante.
5. Añadir 100  $\mu$ l de aRNA *Wash Solution* a cada muestra y agitar durante 1 minuto a 900 rpm para hacer el lavado de las bolas.
6. Colocar la placa sobre una plataforma magnética durante 5 minutos para capturar las bolas magnéticas. Retirar el sobrenadante.
7. Repetir los pasos 5 y 6.
8. Agitar la placa en seco durante 1 minuto a 1.200 rpm para evaporar el etanol remanente.
9. Para eluir el aRNA purificado de las bolas magnéticas añadir 50  $\mu$ l de *Elution Solution* y agitar la placa 3 minutos a 1200 rpm.
10. Colocar la placa sobre una plataforma magnética durante 5 minutos para capturar las bolas magnéticas. Transferir el sobrenadante a un tubo de PCR libre de RNAsas. Reservar una alícuota para analizarla en el *Bioanalyzer*. Conservar a -80°C.



**Figura 17 . Elementos necesarios para purificar el aRNA.**  
**A) Placa de 96 pocillos cóncava (*U-Bottom plate*, Ambion).**  
**B) Soporte magnético (*96 - Magnetic Stand*, Ambion).**  
**C) Agitador de placas. Imágenes adaptadas de Agilent (<http://www.agilent.com>)**

## Métodos

### Fragmentación del aRNA:

1. Preparamos la siguiente reacción :

15 µg de aRNA	Volumen variable (máximo 32µl)
5X Array Fragmentation Buffer	8 µl
agua libre de RNAsas	Volumen variable (hasta completar el volumen total)
<hr/>	
VOLUMEN TOTAL	40 µl

2. Incubar a 94°C durante 35 minutos en un termociclador. Incubar a 4°C al finalizar la reacción y reservar una alícuota para analizar en el Bioanalyzer. Conservar el aRNA fragmentado a -80°C.

Una vez finalizada la preparación de la muestra, se determinó la calidad del aRNA y del aRNA fragmentado con el *Bioanalyzer* para comprobar que el proceso de marcaje y fragmentación había sido eficiente (Figura 18).

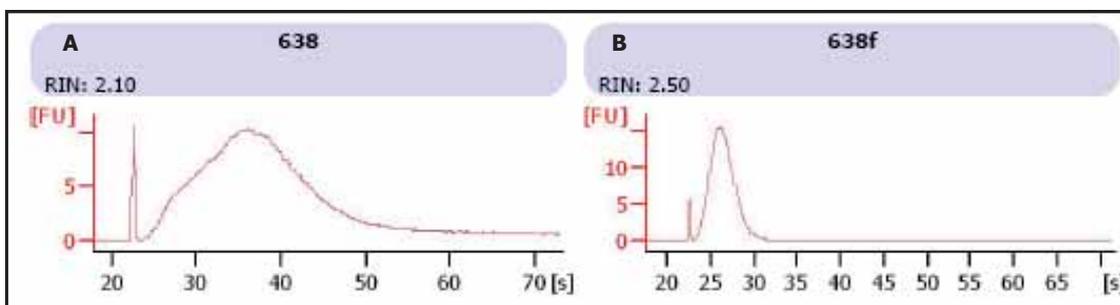


Figura 18. Control de calidad del aRNA marcado. A) Electroferograma típico de una muestra de aRNA marcado sin fragmentar. B) Electroferograma característico del mismo aRNA una vez fragmentado.

### 3.2. HIBRIDACIÓN, REVELADO Y ESCANEADO DE LOS MICROARRAYS.

Los pasos de hibridación, revelado y escaneado se llevaron a cabo en la Plataforma Affymetrix del Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, siguiendo las instrucciones del fabricante (Affymetrix, Santa Clara, USA) (Tabla 3).

La plataforma consta de un horno de hibridación, una estación de fluidos 450 para el lavado y revelado, y un escáner *Affymetrix 3000* (Figura 19).



Figura 19. Equipos de la Plataforma Affymetrix para microarrays. A) horno de hibridación, B) estación de fluidos 450 y C) escáner Affymetrix 3000. Imágenes adaptadas de Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

## Métodos

**Tabla 3. Protocolo de hibridación, revelado y escaneado de los microarrays, realizado en la Plataforma de Affymetrix del Servicio de Transcriptómica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.**

### **Hibridación:**

1- Preparación de la *Hybridization Mix* :

		<u>Concentración final</u>
aRNA fragmentado	10 µg	0.05 µg / µl
<i>Control Oligonucleotide B2</i> (3 nM)	4.2 µL	50pM
<i>20X Hybridization Controls</i> (bioB, bioC, bioD y cre)	12.5 µL	1.5, 5, 25 y 100 pM
<i>2 X Hybridization Mix</i>	125 µl	1X
DMSO	25 µl	10%
agua libre de RNAsas	volumen variable (hasta completar el volumen total)	
<hr/>		
VOLUMEN TOTAL	250µl	

2. Equilibrar los microarrays 10 minutos a T.A.
3. Calentar la *Hybridization Mix* a 99°C durante 5 minutos.
4. Aplicar 200 µl de *Pre-Hybridization Mix* al microarray e incubar a 45°C durante 10 minutos con una rotación de 60 rpm.
5. Transferir la *Hybridization Mix* a un bloque a 45°C durante 5 minutos.
6. Centrifugar la *Hybridization Mix* durante 5 min a máxima velocidad.
7. Vaciar el microarray y cargarlo con 200µl de *Hybridization Mix*, evitando coger el material insoluble situado en el fondo del tubo.
8. Incubar el chip en el horno de hibridación a 45°C con una rotación de 60 rpm durante 16 horas.

### **Revelado:**

1. Pasadas las 16 horas de hibridación retirar la *Hybridization Mix* y proceder al lavado.
2. Cargar con *Wash Buffer A* el microarray.
3. Programar el proceso de lavado y revelado en la estación de fluidos 450 siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante (Affymetrix).
4. Situar los 3 tubos, en la posición indicada, con los reactivos necesarios para el procedimiento: *Stain Cocktail 1*, *Stain Cocktail 2* y *Array Holding Buffer*.
5. Situar cada microarray en el módulo de la estación fluidica que corresponda e iniciar el programa.
6. Extraer el chip de la estación de fluidos y una vez comprobado que no contiene burbujas, escanearlo en el *GeneChip Scanner 3000*.

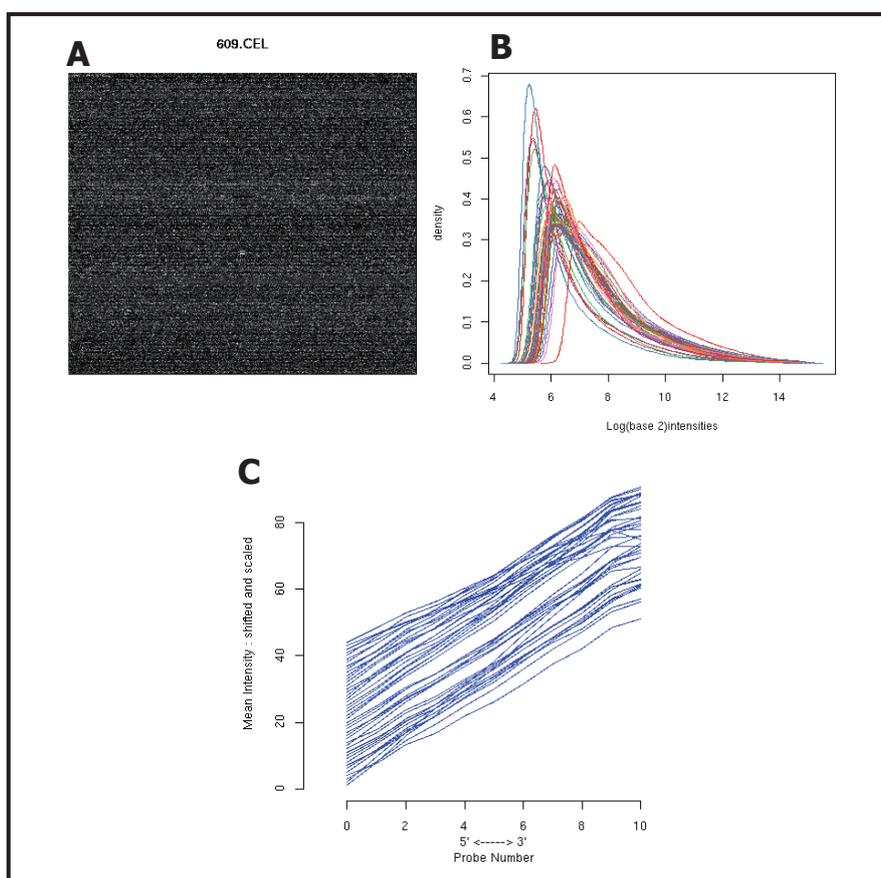
### **3.3. ANÁLISIS DE IMÁGENES Y CONTROL DE CALIDAD.**

Una vez escaneados los microarrays, se analizaron detalladamente cada una de las imágenes obtenidas para descartar posibles artefactos producidos durante el proceso de marcaje e hibridación de las sondas (Figura 20.A). El análisis de imagen de cada chip fue realizado con los paquetes informáticos *Affy* y *AffyPLM* de Bioconductor.

Todos aquellos chips que presentaban algún artefacto en la imagen fueron eliminados del estudio posterior.

## Métodos

Utilizando el paquete informático *simpleAffy* de Bioconductor, nos aseguramos de que todos los chips analizados superaban los controles de calidad descritos por el fabricante. Para descartar variaciones en el proceso de marcaje y revelado del chip, se analizaron las posibles diferencias en la distribución de las intensidades de todas las sondas presentadas en cada chip (Figura 20.B). Para que las muestras sean comparables con fiabilidad, la calidad del RNA debe ser igual en todas ellas. Para ello calculamos la relación entre la intensidad de todas las sondas situadas en el extremo 3' respecto a las sondas situadas en 5' en un mismo microarray. El patrón de degradación del RNA fue similar en todos los chips (Figura 20.C).



**Figura 20. Análisis de imagen y control de calidad de los microarrays. A) Imagen de escaneado de un chip. B) *Plot* de intensidades de todas las sondas presentes en cada uno de los chips escaneados. C) Representación gráfica del patrón de degradación 3'/5' de todas las sondas presentes en cada experimento.**

## 4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN POR PCR CUANTITATIVA.

### 4.1. REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN.

La síntesis de cDNA se realizó mediante una reacción de retrotranscripción (Tabla 4) utilizando el *High Capacity cDNA Archive Kit* (AppliedBiosystems, Foster City, USA).

Tabla 4. Protocolo de la retrotranscripción para la síntesis de cDNA a partir de RNA.

<b>Reacción de transcripción</b>	
1. Mezclar los siguientes componentes	
1.5 µg RNA	Volumen variable (según la concentración)
<i>RT Buffer</i> 10X	5 µl
dNTPs 25X	2 µl
<i>Random Hexamer Primers</i> 10x	5 µl
<i>RT Multiscribe</i>	125 U
<i>RNase Inhibitor</i>	40 U
agua libre de RNAsas	Volumen variable (hasta completar el volumen total)
<hr/>	
VOLUMEN TOTAL	50 µl
2. Condiciones del termociclador	
3. Conservar los cDNAs a - 80°C.	

### 4.2. PRIMERS Y SONDAS: TECNOLOGÍA *TaqMan*.

Para determinar los niveles de expresión de mRNA por PCR cuantitativa a tiempo real utilizamos sondas *TaqMan* (AppliedBiosystems, Foster City, USA).

La tecnología *Taqman* se basa en la utilización de una sonda marcada y un juego de dos primers específicos de la región que se desea analizar. Las sondas poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada *quencher*). Estas sondas marcadas hibridan específicamente en la parte central de la secuencia a amplificar. Cuando la DNA polimerasa, utilizada para la amplificación de PCR, se encuentra próxima a la sonda *Taqman*, la degrada utilizando su actividad exonucleasa 5'-3'. La separación del

*quencher* del fluoróforo permite que este último emita una señal de fluorescencia. Esta señal fluorescente es la que el equipo *ABI PRISM 7000* (Applied Biosystems, Foster City, USA) detecta siendo directamente proporcional a la cantidad de amplicón producido (Figura 21).

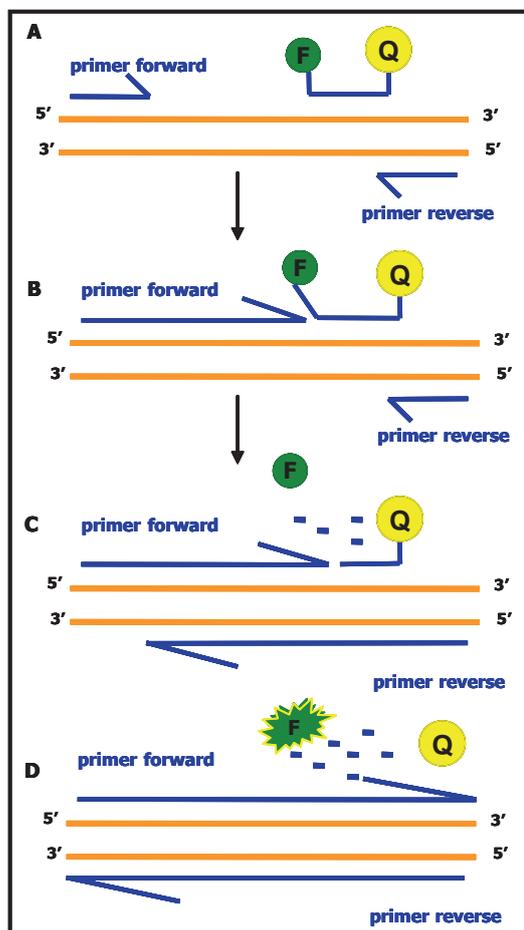


Figura 21. Reacción de PCR cuantitativa. A) Los *primers* y la sonda hibridan específicamente con la secuencia a amplificar. La polimerasa empieza a sintetizar DNA a partir de los primers (B) y cuando encuentra la sonda la degrada utilizando su actividad exonucleasa (C), liberando de este modo el fluoróforo (F). Una vez separado del *quencher* (Q), el fluoróforo emite una señal que es capturada por un detector de fluorescencia.

La detección de la señal de fluorescencia en cada ciclo de PCR a tiempo real permite conocer, a partir de la aplicación de una serie de algoritmos matemáticos, la cantidad de mRNA inicial que había en la reacción.

Para la amplificación de los genes *DUOX1*, *FHL2*, *HPRT1*, *RAB11A*, *RAB25*, *SERPINA-1*, *TGM-3* y *THBS1* se utilizaron juegos prediseñados de *primers* y sondas *Taqman*, del programa *Pre-designed Taqman Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Todas las sondas estaban marcadas con el fluoróforo *FAM*. La tabla 5 describe las características de las sondas *Taqman* utilizadas.

## Métodos

**Tabla 5. Descripción de las regiones de amplificación e hibridación de las sondas y *primers* utilizados para el análisis de los niveles de expresión de mRNA por PCR cuantitativa**

Gen	Ensayo <sup>a</sup>	RefSeq <sup>b</sup>	Región Inter-exónica	Tamaño del amplicón
<i>DUOX-1</i>	Hs00213694_m1	NM_017434.3	exón 22-23	87
<i>FHL2</i>	Hs00179935_m1	NM_001039492.2	exón 3-4	97
<i>HPRT-1</i>	Hs99999909_m1	NM_000194.2	exón 6-7	100
<i>LGALS1</i>	Hs00355202_m1	NM_002305.3	exón 3-4	63
<i>RAB11A</i>	Hs00900539_m1	NM_004663.3	exón 4-5	120
<i>RAB25</i>	Hs00220628_m1	NM_020387.2	exón 4-5	60
<i>RAB25</i>	Hs01040782_m1	NM_020387.2	exón 1-2	93
<i>SERPINA-1</i>	Hs01126607_g1	NM_000602.3	exón 8-9	71
<i>TGM3</i>	Hs00162752_m1	NM_003245.3	exón 5-6	76
<i>THBS-1</i>	Hs00962914_m1	NM_003246.2	exón 21-22	140
<i>TPST1</i>	Hs00234324_m1	NM_003596.3	exón 4-5	78

<sup>a</sup> Referencia del ensayo *Pre-designed Taqman Gene Expression Assay* (<http://www.appliedbiosystems.com>). <sup>b</sup> Secuencia de mRNA de referencia detectado. Disponible en la base de datos RefSeq (*NCBI: Reference Sequence Database*).

### 4.3. ANÁLISIS POR PCR CUANTITATIVA.

El análisis por PCR cuantitativa (cPCR) se llevó a cabo en un termociclador *ABI Prism 7000* (AppliedBiosystems, Foster City, USA), por triplicado, y en placas de 96 pocillos (*96wMultiply-PCR Plate*, Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Las reacciones se realizaron siguiendo las condiciones descritas en la tabla 6.

**Tabla 6. Protocolo de PCR cuantitativa.**

<b>Reacción de cPCR</b>	
1. Mezclar los siguientes componentes	
<i>Universal Taqman Master Mix 2X</i>	10 µl
<i>Specific primers and probe Mix</i>	1 µl
Agua libre de <i>RNAsas</i>	5 µl
<i>cDNA</i>	4 µl
<hr/>	
VOLUMEN TOTAL	20 µl
2. Programa <i>ABI Prism</i>	
<p>desnaturalización</p> <p>40 ciclos</p> <p>95°C</p> <p>15 seg</p> <p>60°C</p> <p>1min</p> <p>50°C</p> <p>10 min</p> <p>2 min</p>	

Para calcular el nivel de expresión génica se aplicó el método de comparación del  $C_T$  [162]. El  $C_T$  (*Cycle Threshold*) es el de ciclo de PCR en el cual la fluorescencia generada alcanza un umbral definido, de manera que una muestra que sobrepase el umbral en ciclos iniciales ( $C_T$  bajos) contiene una cantidad de mRNA mayor que otra muestra que alcance el umbral de fluorescencia en ciclos más tardíos ( $C_T$  altos).

Para una interpretación correcta de los ensayos de PCR cuantitativa es necesario utilizar un control endógeno, que normalice los datos y corrija las diferencias ocasionadas por variaciones en la eficiencia de la reacción de retrotranscripción, la extracción de RNA o la reacción de amplificación. La expresión del control endógeno debe permanecer invariable, independientemente de las diferentes condiciones experimentales o de las diferentes muestras que conforman un mismo experimento. En este estudio se utilizó el gen *HPRT1* como endógeno, que codifica para una enzima necesaria para la síntesis de nucleótidos purínicos a través de la vía de recuperación de purinas, y que se utiliza comúnmente como endógeno en experimentos de PCR cuantitativa [163].

El método de comparación de  $C_T$  es un método semicuantitativo. Los resultados de expresión del gen problema, en una muestra, se expresan de manera relativa a la expresión del mismo gen en una muestra de referencia llamada calibradora. En nuestros ensayos se utilizó como muestra calibradora la línea celular UM-SCC-22A de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

Para calcular los niveles de expresión se aplicó la fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . En esta fórmula  $\Delta CT$  es la diferencia entre los  $C_T$  del gen problema y endógeno, y  $\Delta\Delta CT$  la diferencia entre los  $\Delta CT$  de la muestra problema y la calibradora. De este modo, los niveles de expresión de un gen en cada muestra se presentan como aumento o disminución respecto a la expresión del gen de estudio en la línea UM-SCC-22A.

### **5. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA.**

La inmunocitoquímica se utiliza para la detección de proteínas en preparaciones celulares. La preparación de bloques celulares se realizó a partir de células en crecimiento exponencial. Primeramente, se tripsinizaron las células, se centrifugó la suspensión celular y al pellet resultante se le añadieron tres gotas de plasma humano (obtenido del banco de sangre del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) para disolverlo. A continuación se le añadieron tres gotas de trombina (Sigma Aldrich, Tres

Cantos, España) moviendo el tubo hasta obtener un coágulo. Una vez formado, este se incluyó en parafina.

La técnica de inmunohistoquímica (IHQ) está basada en la detección de proteínas en un corte de tejido o muestra biológica, mediante la utilización de anticuerpos específicos. Es una técnica utilizada de manera habitual en el diagnóstico histopatológico, que permite analizar en tejido parafinado o fresco, el nivel de expresión, la localización celular de la proteína y el tipo de células que expresan la proteína analizada.

Partiendo de los bloques de parafina, de los tumores de pacientes con CECC o de las preparaciones celulares, se hicieron secciones de 5 µm de grosor con el micrótopo, y se depositaron en un portaobjetos pre-tratado para IHQ (*Flex IHC microscope slides*, Dako, Glostrup, Dinamarca). Posteriormente, se incubaron los portaobjetos a 58°C durante 1 hora y se desparafinaron con xilol. A continuación se procedió a su rehidratación con concentraciones decrecientes de etanol.

Seguidamente se realizó el protocolo de tinción de forma automatizada con el *Autostainer Link48* (Dako, Glostrup, Dinamarca), siguiendo las indicaciones del fabricante. Previamente fue necesario realizar un paso de recuperación antigénica, en el que se restauró la reactividad de los antígenos que se habían podido perder durante el proceso de fijación y parafinación de la muestra. La recuperación antigénica se realizó utilizando el sistema *Dako PTLINK* e incubando las muestras durante 20 minutos a 97°C en tampón de citrato sódico a pH alto o bajo, dependiendo del anticuerpo primario. Se atemperaron las muestras con el tampón de lavado y se procedió a eliminar la actividad de la peroxidasa endógena utilizando una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Peroxidase-Blocking Reagent*) durante 5 minutos.

Después de un paso de lavado, se incubaron las muestras durante 45 minutos con el anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados en este estudio se detallan en la tabla 7. A continuación, se realizó un lavado y se incubaron las muestras con tampón *EnVision Flex* (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos. La tecnología *EnVision Flex* está basada en un polímero que lleva conjugados el enzima peroxidasa, para el paso final de revelado, y moléculas de anticuerpo secundario, tanto *anti-mouse* como *anti-rabbit*, de tal manera que el mismo reactivo sirve para detectar los dos tipos de anticuerpos primarios. Para aquellos anticuerpos con poca sensibilidad, se utilizó el sistema *EnVision Flex +*, que contiene un amplificador de señal acoplado al anticuerpo secundario, con el fin de aumentar las moléculas que reaccionaran con el revelador. Pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, se hizo un paso de

## Métodos

lavado y se incubó con el reactivo revelador DAB (diaminobenzidina) durante 10 minutos. Cuando el DAB reacciona con la enzima peroxidasa, que se encuentra ligado al polímero o anticuerpo secundario, dependiendo del uso de *EnVision Flex* o *EnVision Flex +*, produce un precipitado marrón visible. Después de lavar varias veces, se aplicó una solución de contratinción con hematoxilina para teñir los núcleos celulares, facilitando así la localización histológica y celular de la tinción específica.

Finalmente se deshidrataron las muestras con concentraciones crecientes de etanol y se hizo el montaje con medio *DPX* (Dako, Glostrup, Dinamarca) para fijar la preparación.

**Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunohistoquímica.**

Anticuerpo primario	Dilución	Tipo de recuperación antigénica	Anticuerpo secundario	Amplificador	Marca comercial
<b>Rab25</b>	1:1000	Flex TRS Low	HRP	No	AbNova
<b>Serpina-1</b>	1:750	Flex TRS High	HRP	No	Abcam
<b>N-cadherina</b>	1:50	Flex TRS Low	HRP	No	DAKO
<b>E-cadherina</b>	1:50	Flex TRS Low	HRP	No	DAKO
<b>Vimentina</b>	1:1000	Flex TRS Low	HRP	No	DAKO
<b>β- Integrina</b>	1:100	Flex TRS High	HRP	<i>Mouse</i>	BD Biosciencias

Para cuantificar la tinción inmunohistoquímica determinamos el porcentaje de células positivas presentes, mediante el conteo de células en diversos campos, y la intensidad de tinción (+ poco teñido, ++ teñido, +++ muy teñido). Las tinciones inmunohistoquímicas incluidas en este estudio fueron cuantificadas por un mínimo de tres investigadores con el fin de disminuir posibles variaciones producidas por el criterio del observador.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis de los datos obtenidos en este trabajo se realizó con el programa *SPSS* versión 19 (SPSS, IBM, Chicago, IL). Se emplearon diferentes tests estadísticos en función de los datos a analizar.

Para determinar si existían diferencias significativas entre dos o más grupos de muestras independientes en relación a la variable de estudio se utilizaron los tests estadísticos *U de Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis* respectivamente.

La existencia de correlación entre los niveles de expresión de los genes *RAB25*, *SERPINA-1*, *DUOX-1*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TPST1*, *TGM3* y *FHL2* en líneas de CECC y la

respuesta de estas al tratamiento con cisplatino, se analizó aplicando el coeficiente de correlación de *Pearson*.

Los niveles de expresión de los diferentes genes analizados por cPCR se dicotomizaron, según si los niveles de expresión eran superiores o inferiores a un valor de corte, previamente establecido.

Para los análisis estadísticos utilizamos diferentes parámetros relacionados con la supervivencia de los pacientes. La supervivencia libre de recidiva local (SLRL), se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la recidiva del tumor primario. La supervivencia libre de progresión (SLP), definida como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la recidiva del tumor primario, recidiva ganglionar o aparición de metástasis. La supervivencia global (SG) se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la muerte del paciente, o hasta el último punto de control del paciente.

Aplicamos el modelo de *Cox* univariante y multivariante para determinar la existencia o ausencia de diferencias significativas en la supervivencia libre de recidiva local (SLRL), supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG), entre los pacientes con diferentes niveles de expresión de los genes analizados por cPCR.

Aplicando el método de *Kaplan-Meier* generamos curvas de SLRL, PLE y SG los distintos grupos de pacientes evaluados. Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las curvas se aplicó el test de *Log-Rank*.

En cualquiera de los test estadísticos utilizados se consideró la existencia de diferencias significativas entre grupos cuando la probabilidad estadística era menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

### **7. ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR MICROARRAYS.**

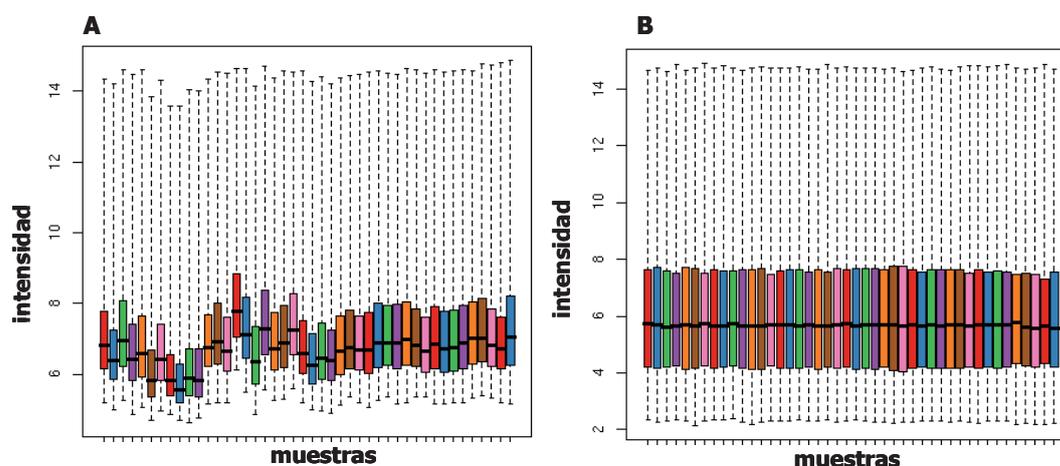
La normalización y el análisis de datos de los microarrays se llevó a cabo utilizando diferentes herramientas informáticas que se encuentran dentro del proyecto Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) y que se han implementado para su utilización con lenguaje "R" ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) (Tabla 8).

**Tabla 8. Herramientas informáticas de Bioconductor utilizadas en el análisis de datos de los experimentos de microarrays.**

Herramienta informática utilizada	Aplicación
<i>Biobase</i>	Aplicaciones básicas Bioconductor
<i>genefilter</i>	Filtrado no específico
<i>affy</i>	Normalización RMA
<i>Multtest</i>	Expresión diferencial
<i>Hgu133a2</i>	Anotaciones microarray HG-U133a2
<i>annaffy</i>	Herramientas análisis anotaciones
<i>annotate</i>	Anotaciones
<i>GOstats</i>	Análisis de ontologías

### 7.1. Pre-procesado de los experimentos de microarrays.

Con el fin de descartar variaciones intra-experimentales y/o inter-experimentales producidas durante el proceso de marcaje e hibridación de los microarrays, se llevó a cabo un pre-procesado de los datos utilizando el método *Robust Multi-array Analysis (RMA)* incluido en el paquete informático *affy*. Este método se inicia ajustando el *background* de cada chip [164]. Una vez hecha la corrección del *background*, se aplica la normalización por cuantiles, método desarrollado por Bolstad [115], para que todos los chips sean comparables entre ellos. Finalmente se integran las señales de las diferentes sondas representativas de cada gen en un solo valor, mediante el algoritmo *median polish* para obtener un valor de expresión único para cada gen [165]. En la figura 22 se muestran las diferencias de señal que presentaban los microarrays antes y después del pre-procesado.



**Figura 22. Box plot de los niveles de intensidad de todas las sondas presentes en cada uno de los microarrays. A) Antes de realizar el pre-procesado de los microarrays. B) Después del pre-procesado con el método RMA.**

### 7.2. Análisis de expresión diferencial.

Se aplicó la herramienta informática *limma* (<http://bioinf.wehi.edu.au/limma>) para determinar si había diferencias en los perfiles de expresión al comparar dos grupos de muestras previamente establecidos. Esta herramienta se basa en la aplicación de modelos lineales. En nuestro caso el modelo lineal aplicado fue un análisis de varianzas o regresión múltiple construido para cada gen.

En nuestro trabajo este método nos permitió determinar diferencias en la supervivencia global y supervivencia libre de recidiva de las muestras tumorales analizadas. También se utilizó para comparar las líneas celulares incluidas en el estudio de microarrays.

### 7.3. Análisis de anotaciones funcionales.

A partir de la lista de genes seleccionados, según las diferencias de expresión entre grupos, llevamos a cabo un análisis de ontologías utilizando el paquete informático *GOstats* [166]. *GOstats* está basado en la aplicación de tests hipergeométricos para determinar, dentro de una lista de genes seleccionados, aquellos términos biológicos que están sobre-representados en comparación con el total de genes presentes en el microarray. De este modo, es posible determinar la activación o inactivación de procesos biológicos o vías de señalización asociados a una condición experimental. *GOstats* permite analizar tres niveles de términos biológicos (proceso biológico, componente celular y función molecular) descritos en la base de datos de *Gene Ontology* (*GO*; <http://www.geneontology.org/>) y las vías metabólicas o de señalización descritas en la base de datos *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (*KEGG*; <http://www.genome.jp/kegg/>). Utilizamos *GOstats* para determinar en qué procesos biológicos estaban implicados los genes sobreexpresados o infraexpresados identificados previamente con el análisis de expresión diferencial. El análisis con *GOstats* se realizó seleccionando aquellos genes que presentaban una  $p < 0,01$  no ajustada en el análisis de expresión diferencial. De este modo, se identifican grupos de genes implicados en el mismo proceso biológico o vía de señalización. Para todos los análisis de anotaciones funcionales consideramos diferencias significativas con una probabilidad menor a 0,01 ( $p < 0,01$ ).

Todas las listas de genes incluidas en este trabajo han sido generadas utilizando los paquetes informáticos de Bioconductor: *annotate*, *Hgu133a2* y *annaffy* [166].

### 8. GENE SET ENRICHMENT ANALYSIS (GSEA) Y CÁLCULO DEL AVERAGE SCORE.

En nuestro estudio utilizamos la herramienta *GSEA* (*Gene Set Enrichment Analysis*) para identificar firmas genéticas con valor pronóstico para la supervivencia global y la recidiva tumoral, y posteriormente se validaron con el método de *average score* previamente descrito [167].

El análisis de *GSEA* se fundamenta en la utilización de la base de datos *Molecular Signature Database* (*MSigDB*). Esta base de datos está constituida por bloques de genes, llamados *gene sets* (*S*) que presentan una misma anotación. Es decir, son bloques de genes característicos de un fenotipo concreto identificados en otros estudios de microarrays o bien genes que presentan la misma anotación en *Gene Ontology*, función biológica o que comparten la misma localización cromosómica.

A partir de la matriz de expresión de un estudio de microarrays, *GSEA* determina el grado de correlación entre los niveles de expresión génica y una condición experimental o fenotipo concreto. Todos los genes de la matriz de expresión se ordenan en función de su asociación con alguno de los fenotipos analizados. Posteriormente, *GSEA* determina si algunos de los *genes sets* descritos en la base de datos *MSigDB* se encuentra significativamente enriquecido en alguno de los fenotipos analizados. El *enrichment score* refleja el grado en el que un *gene set* está sobrerrepresentado en los extremos de la lista de genes. Posteriormente se normalizan los *enrichment scores*, obteniendo los *normalized enrichment scores* (*NES*) a partir de los cuales se calcula el *false discovery rate* (*FDR*), con objeto de reducir la probabilidad de detectar falsos positivos [168] (Figura 23).

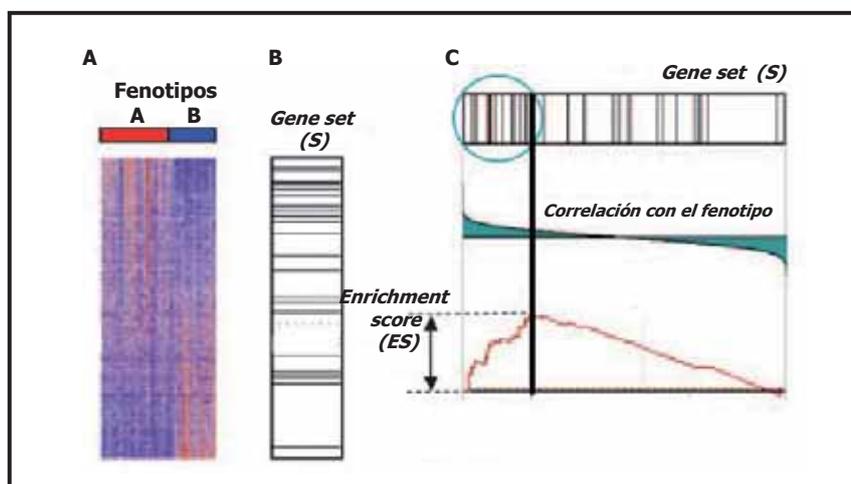


Figura 23. Elementos principales de la herramienta *GSEA*. A) Fenotipos, B) *Gene Set* y C) *EnPlot*. Figura adaptada de Subramanian, A *et al.*

## Métodos

---

En este estudio utilizamos la aplicación *GSEA* para el análisis de nuestras firmas pronósticas. Como *gene sets* utilizamos listas de genes previamente seleccionadas a partir de los estudios de expresión diferencial. Utilizamos los datos de expresión génica y variables clínicas obtenidas del estudio de Chung *et al* [150] para la validación de nuestras firmas genéticas. De este modo comprobamos si nuestras firmas pronósticas también se encontraban presentes en el estudio de Chung *et al*.

Una vez definida una firma pronóstica con un número mínimo de genes calculamos el valor medio de expresión de todos los genes en cada una de las muestras (*average score*) para integrar de este modo todas las señales de expresión en un solo valor.

Antes de calcular el promedio de expresión de toda la firma genética realizamos un proceso de normalización de los valores de expresión de cada gen. Para ello, se calculó el promedio de la expresión de cada gen, que a continuación se restó al valor de expresión del gen en cada una de las muestras. Por último calculamos la media de expresión de todos los genes incluidos en la firma genética para cada una de las muestras analizadas (*average score*).

Aplicando el modelo de *Cox* univariante determinamos si el valor de *average score* se asociaba a la supervivencia o a la recidiva tumoral de los pacientes.

Para poder realizar el análisis de *Kaplan-Meier* se dividieron los pacientes en 3 grupos distintos en función del *average score* tal y como se había descrito anteriormente (Merlos-Suarez. *Cell Stem Cell* 2011). El grupo 1 incluía aquellos pacientes con valores de *average score* inferiores a la diferencia entre el valor promedio y la desviación estándar (grupo 1 < (promedio (*av.score*) - desvest (*av.score*))). En el grupo 3 estaban los pacientes con un valor de *average score* mayor que el valor promedio (grupo 3 > promedio (*av.score*))). Finalmente, el grupo 2 incluía a todos los pacientes con valores de *average score* intermedios entre los 2 grupos anteriores ((promedio (*av.score*)- desvest (*av.score*)) < grupo 2 < promedio (*av.score*))). Evaluamos si existían diferencias en la SLRL, SLP y SG aplicando curvas de *Kaplan-Meier* y el test de *log Rank*.

### 9. CULTIVO CELULAR

#### 9.1. LÍNEAS CELULARES

En este estudio se ha trabajado con las siguientes líneas celulares de CECC, cuyo origen y condiciones de cultivo se describen en la tabla 9.

**Tabla 9. Líneas celulares, origen tumoral y medio de cultivo usado.**

Línea celular	Origen	Medio de cultivo
<b>UM-SCC-22A</b>	Hipofaringe. Tumor primario (T2N1)	DMEM + 2mM glutamina + 50 U/ml penicilina/estreptomicina + 10%FBS <sup>b</sup>
<b>UM-SCC-22B</b>	Hipofaringe. Metástasis de la línea UM-SCC-22A (T2N1)	DEMEM (Hepes) + 2mM glutamina + 50 U/ml penicilina/estreptomicina + 10%FBS
<b>FaDu</b>	Hipofaringe	RPMI 1640 +2mM glutamina + 50 U/ml penicilina/estreptomicina + 10%FBS
<b>OKF6-Tert1</b>	Mucosas orales normales inmortalizadas	Ker-SFM <sup>c</sup> + EGF <sup>d</sup> + CaCl <sub>2</sub> +extracto de pituitaria
<b>UM-SCC-74B</b> <b>UM-SCC-74B200</b> <sup>a</sup>	Laringe	DEMEM (Hepes) + 2mM glutamina + 50 U/ml penicilina/estreptomicina + 10%FBS exón 8-9
<b>SCC-9</b>	Lengua	DMEM:F12 (1:1) + 2mM glutamina + 50 U/ml penicilina/estreptomicina + 10%FBS +400ng/ml hidrocortisona
<b>SCC-25</b>	Lengua	DMEM:F12 (1:1) + 2mM glutamina + 50 U/ml penicilina/estreptomicina + 10%FBS +400ng/ml hidrocortisona

<sup>a</sup> Son la misma línea celular pero la UM-SCC-74B200 ha adquirido resistencia a cisplatino. <sup>b</sup> FBS = *fetal bovine serum*. <sup>c</sup> Ker-SFM = *Keratinocyte - Serum free media*. <sup>d</sup> EGF = *Epidermal Growth Factor*. Todos los reactivos para preparar los medios de cultivo son de Invitrogen.

Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37° C, con el medio de cultivo descrito para cada línea y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 9.2. DESCONGELACIÓN, SUBCULTIVO Y CONGELACIÓN DE CÉLULAS.

Para descongelar las células, primero se atemperó el criotubo y se mantuvo en un baño estéril a 37°C. Una vez descongelado, se transfirieron las células a un tubo que contenía medio y se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos. Este paso se realizó para eliminar el DMSO usado durante la congelación, que a temperatura ambiente produce citotoxicidad. Seguidamente se descartó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en el medio específico para cada línea celular que contenía el 20% de FBS y se transfirió la suspensión celular a un *flascón* de 75 cm<sup>3</sup> en el que las células, una vez adheridas, iniciaron su crecimiento.

A medida que las células proliferaban iban ocupando la superficie del *flascón*, una vez lleno se debía realizar un subcultivo o pase para evitar la senescencia de las células inducida en situaciones de alta densidad celular.

Para el subcultivo de las líneas celulares de CECC es preciso un paso previo de tripsinización para despegar las células del soporte plástico. Para subcultivar, primero se retiró el medio del *flascón*, se realizó un lavado con PBS estéril y se le añadió tripsina (Invitrogen, Paisley, UK), enzima que permite que las células se despeguen del *flascón*. Una vez recuperada la suspensión celular se transfirió a un tubo que contenía medio, que desactiva la acción de la tripsina, y después se centrifugó durante 5 minutos a 1.500 rpm. El *pellet* obtenido se diluyó en medio y la suspensión celular se repartió en volúmenes iguales en diferentes *flascón* es que se incubaron a 37°C para seguir siendo cultivadas.

El proceso de congelación de las células se realiza para conservar pases cortos ya que a medida que las células se dividen van acumulando alteraciones genéticas que pueden cambiar sus características e interferir en los resultados de los experimentos. Para poder congelar un *flascón* de células debía estar al 80% de confluencia aproximadamente. Primeramente, se tripsinizaron las células, se pusieron en medio y se centrifugaron. A continuación, se resuspendió el *pellet* en 1ml de FBS con 10% de DMSO (que actúa como crioprotector). Los viales de células se congelaron a -80°C sumergiéndolos en un recipiente con isopropanol *Frosty* (Nalgene, Waltham, USA), que permite que la temperatura baje de manera gradual en el interior del criotubo evitando así la formación de cristales de hielo en el interior celular y su lisis, cuando se almacena a -80°C.

### **9.3. DETECCIÓN DE *MYCOPLASMA* Y TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS INFECTADAS.**

La infección por *Mycoplasma sp.* es una de las contaminaciones más comunes en los cultivos celulares. A menudo, la infección de células por estos microorganismos interfiere en los resultados de los experimentos, ya que puede alterar la velocidad de crecimiento, inducir cambios morfológicos, aberraciones cromosómicas, alterar el metabolismo celular o disminuir la tasa de transfección. Por tanto, es importante la detección y erradicación de *Mycoplasma sp.* de los cultivos celulares.

Para evaluar si las líneas celulares estaban o no infectadas por *Mycoplasma* se utilizó el *LookOut Mycoplasma PCR Detection kit* (Sigma Aldrich, Tres Cantos, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de que el test diera positivo para la infección por *Mycoplasma*, las células fueron tratadas con el antibiótico *Plasmocin* (InvivoGen, San Diego, USA) para su erradicación. Inicialmente se realizó un tratamiento de eliminación de *Mycoplasma* añadiendo 25 µg/ml de *Plasmocin* al medio de cultivo durante 14 días y se realizó de nuevo el test para verificar la eliminación de la infección. Para prevenir nuevas infecciones se añadió al medio de cultivo 5 µg/ml de *Plasmocin* como concentración de mantenimiento.

El test de detección de *Mycoplasma* se realizó periódicamente, especialmente cuando se quería hacer *stocks* celulares.

#### **9.4. ANÁLISIS DE LOS PERFILES GENÉTICOS O *FINGERPRINTS* DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CECC.**

Antes de realizar experimentos con las diferentes líneas celulares se realizó un análisis de sus perfiles genéticos con el fin de verificar la identidad de cada una de ellas y descartar así contaminaciones cruzadas con otras líneas celulares.

El *DNA fingerprinting* está basado en el análisis de las regiones no codificantes del genoma. Estas regiones, altamente conservadas, presentan polimorfismos entre individuos. El análisis de diferentes marcadores situados en estas regiones repetitivas permite obtener un perfil genético que es exclusivo para cada individuo. Con el análisis de *fingerprinting* podemos determinar si las líneas celulares en cultivo conservan los mismos marcadores que los que tenían en pases originales a partir de los que se establecieron.

El *fingerprinting* de las diferentes líneas de CECC se realizó en la Plataforma de Genómica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau con el *kit Cell ID* (Promega, Madison, USA).

La metodología *Cell ID* permite la amplificación y detección simultánea de 9 locis humanos, correspondientes a 9 *Small Tandem Repeats (STR)* (D21S11, TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 y D5S818) y la Amelogenina para la determinación del sexo. Este *kit* lleva incorporado como control positivo el DNA de la línea K562, cuyo genotipo es conocido. Además incluimos un control negativo. Ambos controles sirven para confirmar la fiabilidad de la metodología del genotipado.

Previamente se realizó la extracción de DNA genómico de las células utilizando el *kit Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, USA) siguiendo el protocolo descrito (Tabla 10).

**Tabla 10. Extracción de DNA con el *kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, USA).**

### **Extracción de DNA**

1. Tripsinizar las células, centrifugar a 13.000 g para obtener un *pellet*.
2. Añadir 200  $\mu$ l de PBS para lavar el *pellet*. Centrifugar a 13.000 g, eliminar el sobrenadante y resuspender las células con ayuda de un *vórtex*.
3. Añadir 600  $\mu$ l de *Nuclei Lysis Solution* y lisar las células con ayuda de una pipeta.
4. Añadir 3  $\mu$ l de *RNase Solution* al lisado anterior y mezclar por inversión. Incubar la mezcla 30 minutos a 37°C. Dejar enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente.
5. Añadir 200  $\mu$ l de *Protein Precipitation Solution* y mezclar con *vórtex* a alta intensidad durante 20 segundos. Mantener la mezcla en hielo durante 5 minutos.
6. Centrifugar a 13.000 g durante 4 minutos. La proteína precipitada forma un *pellet* blanco.
7. Retirar el sobrenadante con cuidado, dónde está disuelto el DNA, transfiriéndolo en un *eppendorf* que contiene 600  $\mu$ l de isopropanol a T.A.
8. Mezclar la solución por inversión hasta que se observe que el DNA empieza a precipitar.
9. Centrifugar a 13.000 g durante 1 minuto a T.A. El DNA queda en forma de *pellet* blanco. Decantar el sobrenadante.
10. Añadir 600  $\mu$ l de etanol 70% e invertir varias veces el tubo para lavar el DNA. Centrifugar a 13.000 g durante 1 minuto.
11. Aspirar el sobrenadante sin despegar el *pellet* del fondo del *eppendorf*.
12. Secar el *pellet* con aire seco durante 15 minutos.
13. Añadir 100 $\mu$ l de *DNA Rehydration Solution* para rehidratar el DNA durante 1h a 65°C o incubando la solución *overnight* a T.A o a 4°C.
14. Conservar el DNA a -20°C.

Una vez obtenido el DNA, se cuantificó en el espectrofotómetro *Nanodrop*. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (AppliedBiosystems, Foster City, USA) utilizando 2 ng de DNA de cada muestra. Posteriormente, se detectaron los fragmentos amplificados, utilizando el *3130xl Genetic Analyzer* (AppliedBiosystems, Foster City, USA) según el protocolo descrito por el fabricante. Finalmente, se interpretaron los datos utilizando el programa *GeneMapper v4.0* que genera un perfil de picos representativos de cada uno de los alelos amplificados (Figura 24).

## Métodos

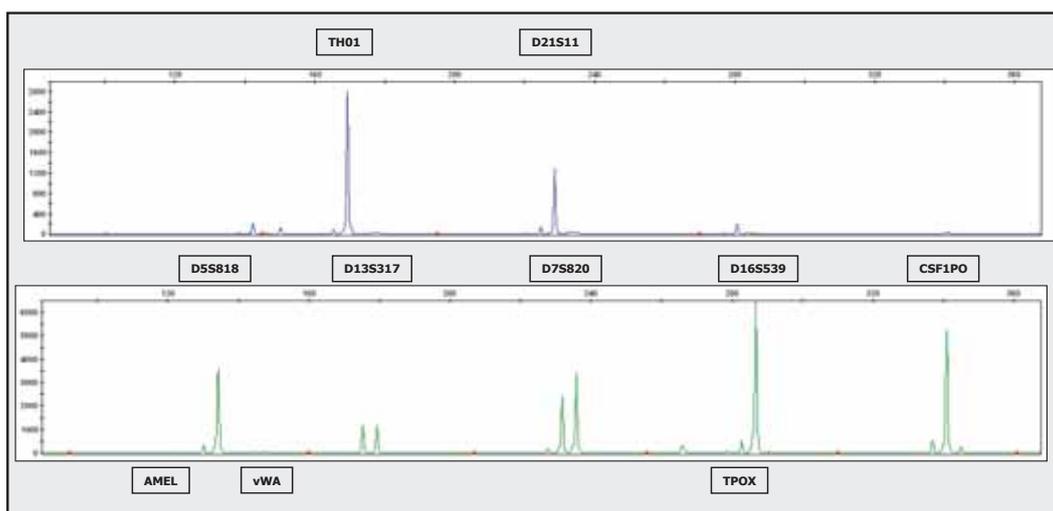


Figura 24. Perfil de picos obtenido de la amplificación de 2 ng de DNA genómico de la línea celular FaDu con el sistema *Cell ID* (Promega, Madison, USA).

Los resultados obtenidos en la determinación del perfil genético de las diferentes líneas celulares de CECC, con el *kit Cell ID* (Promega, Madison, USA) y los originales de cada línea celular se muestran en las tablas 11 y 12, respectivamente.

Tabla 11. Resultados del análisis de *fingerprints* de las diferentes líneas de CECC con el *kit Cell ID* (Promega, Madison, USA).

M <sup>a</sup> LC <sup>b</sup>	UM-SCC-22A	UM-SCC-22B	FaDu	UM-SCC-74B	UM-SCC-74B 200	SCC-9	SCC-25	K562 <sup>c</sup>
Amelogenina	X	X	ND	X	X	X,Y	X	X
CSF1PO	10	10	12	9, 12	9, 12	11	10	9, 10
D13S317	8, 12	8, 12	8, 9	12	12	9	13	8
D16S539	9, 11	9, 11	11	10, 12	10, 12	10, 11	11, 12	11, 12
D5S818	12	12	12	12	12	12	12	11, 12
D7S820	8,9	8,9	11,12	11	11	8	12	9, 11
TH01	6	6	8	6, 9.3	6, 9.3	8,9	8	9.3
TPOX	8, 11	8, 11	11	8	8	9,11	8,12	8,9
vWA	15, 18	15, 18	15,17	15,16	15,16	17	17,19	16
D21S11	28	28	31.2	30, 34.2	30, 34.2	ND	ND	29, 30, 31

<sup>a</sup> Marcador analizado, <sup>b</sup> Línea Celular y <sup>c</sup> línea celular usada como control interno de la técnica.

**Tabla 12. Perfiles genéticos originales de las diferentes líneas celulares.**

M <sup>a</sup> LC <sup>b</sup>	UM-SCC-22A <sup>1</sup>	UM-SCC-22B <sup>1</sup>	FaDu <sup>2</sup>	UM-SCC-74B <sup>3</sup>	UM-SCC-74B 200 <sup>3</sup>	SCC-9 <sup>2</sup>	SCC-25 <sup>2</sup>	K562 <sup>c</sup>
Amelogenina	X	X	ND	X	X	X,Y	X	X
CSF1PO	10, 10	10	12, 12	ND	ND	11	10	9, 10
D13S317	8, 12	8, 12	8, 9	12	12	9	13	8
D16S539	9, 11	9, 11	11,11	ND	ND	10, 11	11, 12	11, 12
D5S818	12, 12	12	12, 12	12	12	12	12	11, 12
D7S820	8,9	8, 9	11, 12	11	11	8	12	9, 11
TH01	6,6	6	8,8	ND	ND	8,9	8	9.3
TPOX	8, 11	8, 11	11, 11	ND	ND	9,11	8,12	8,9
vWA	15, 18	15, 18	15, 17	15, 16	15, 16	17	17,19	16
D21S11	28	28	ND	30, 34.2	30, 34.2	ND	ND	29, 30, 31

<sup>1</sup> Brenner *et al* [169], <sup>2</sup> ATCC y <sup>3</sup> Zhao *et al* [170]. <sup>a</sup> Marcador analizado, <sup>b</sup> Línea Celular y <sup>c</sup> línea celular usada como control interno de la técnica.

Comparando los valores de ambas tablas (11 y 12) verificamos que todas las líneas utilizadas en nuestro estudio eran las descritas originalmente, establecidas a partir de muestras tumorales obtenidas de pacientes con CECC.

## 10. ANÁLISIS DE LA TASA DE PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD CELULAR.

### 10.1. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

En condiciones normales las células tienen una tasa de proliferación constante. Cuando se altera el genotipo celular por sobreexpresión o infraexpresión de genes, o cuando se exponen a fármacos u otros factores, este parámetro puede verse alterado.

Para los experimentos de proliferación se sembraron 30.000 células/pocillo de cada una de las líneas celulares y se realizaron contajes a las 48, 96 y 144 horas después de sembrarlas, con un contador celular electrónico (*Cell Scepter*, Millipore, Darmstadt, Alemania).

Los valores obtenidos se representaron gráficamente como el número total de células a los distintos tiempos de medida, lo que permitió detectar posibles diferencias en las curvas de proliferación. Se realizaron 6 contajes en cada uno de los tiempos y para cada una de las líneas celulares analizadas.

### 10.2. ENSAYO DE *XTT*.

Para determinar el efecto antitumoral de un fármaco sobre las diferentes líneas celulares de CECC se utilizó el *XTT Cell Proliferation kit II* (Roche, Basel, Suiza).

Este ensayo permite evaluar la citotoxicidad *in vitro* de un determinado compuesto. Es un ensayo colorimétrico y está basado en la capacidad de las células viables de metabolizar la sal de *tetrazolium* (*XTT*), de color amarillo, en formazán, que es de color naranja. El cambio de color se puede cuantificar directamente por espectrofotometría a una longitud de onda entre 450 - 500 nm, y es directamente proporcional al número de células viables que existen en la muestra.

Inicialmente se sembraron 1.500 – 5.000 células/pocillo<sup>1</sup>, en función de la línea celular y del fármaco analizado, en placas de 96 pocillos en un volumen final de 100µl. Se incubaron las células durante 24 - 48 horas y posteriormente se expusieron a diferentes concentraciones de fármaco. Para el tratamiento con cisplatino (Sigma Aldrich, Tres cantos, España) utilizamos un rango de concentraciones de 2.5 a 40 µM y de 2 a 3000 nM para el *Cetuximab* (Merk, Darmstadt, Alemania).

Una vez finalizado el tiempo de exposición establecido para cada fármaco se añadieron 50 µl/pocillo del reactivo *XTT*. Tras 4 horas de incubación determinamos la absorbancia a 490 nm en un lector de placas y determinamos el porcentaje de células viables.

Para determinar el efecto del fármaco sobre la viabilidad celular se calculó el ratio entre el valor de absorbancia de las células tratadas a una concentración de fármaco determinada respecto al valor de absorbancia alcanzado en las células no tratadas, una vez restada la absorbancia del blanco (pocillos control sin células, únicamente con medio y reactivo *XTT*).

Los ensayos se realizaron cuatro días distintos, y por duplicado para verificar los resultados obtenidos y estimar la dispersión entre estos.

Para cada uno de los fármacos evaluados calculamos la  $IC_{50}$ , a partir del promedio de los valores de cada uno de los experimentos independientes, para cada una de las líneas celulares analizadas, que se define cómo la concentración del fármaco que mata o inhibe el crecimiento del 50% de las células en cultivo. El valor de  $IC_{50}$  se calculó a partir de curvas de dosis-respuesta de la concentración del fármaco frente al porcentaje de células viables con el programa *SigmaPlot 5.0* utilizando la ecuación sigmoideal de *Hill*.

---

<sup>1</sup> Para contar las células se utiliza el contador electrónico *Cell Scepter* (Millipore, Darmstadt, Alemania).

### **11. TEST DE APOPTOSIS.**

La mayor parte de los fármacos antitumorales inducen la apoptosis o muerte celular programada. Una de las características principales del proceso apoptótico es la condensación y fragmentación de la cromatina, lo cual es detectable por tinción con el colorante *DAPI* y posterior observación en el microscopio de fluorescencia.

Para evaluar la capacidad de inducción apoptótica del cisplatino, primero se sembraron 80.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y pasadas 48 horas (tiempo suficiente para que la mayoría de las células estuvieran en crecimiento exponencial) se añadió el cisplatino o vehículo (suero fisiológico) determinando su efecto a diferentes períodos de tiempo. A continuación, se recuperaron las células de los pocillos, tanto las que se encontraban en el sobrenadante como las que estaban adheridas a placa. Una vez centrifugadas durante 5 minutos a 1.500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado del *pellet* con PBS. El *pellet* celular fue resuspendido en una solución de PBS al 3,7% de paraformaldehído para fijar las células. Se repartió la muestra sobre un portaobjetos, se dejó secar en un bloque a 50°C y se añadió una gota de colorante *ProLong® Gold Antifade with DAPI* (Invitrogen, Paisley, UK) sobre de la preparación para teñir los núcleos. Finalmente se colocó un cubreobjetos encima del portaobjetos y se sellaron los extremos de este con laca de uñas. Antes de la observación en el microscopio de fluorescencia se mantuvieron durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

### **12. WESTERN BLOT.**

#### **12.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.**

El *Western Blot* es una técnica que permite determinar la expresión de proteínas específicas en un extracto proteico, utilizando anticuerpos que reconocen las proteínas de interés.

Para realizar los extractos de proteínas, primeramente se recuperó el sobrenadante que contenía las células en suspensión, y después las células adheridas a la placa con un paso de tripsinización. Ambas partes se juntaron en un mismo tubo, el cual se centrifugó durante 5 minutos a 1.500rpm. A continuación, se realizó un lavado del *pellet* celular con PBS y se resuspendió con tampón de extracción de proteínas (1M Tris/acetato, 1M sacarosa, 100mM EDTA pH 8.8, 100mM EGTA pH 8.8, 10% Tritón X-100, 100mM Naortovanadato, 1M  $\beta$ -glicerofosfato, 0.5 M NaF, 100mM Pirofosfato, 100mM Benzamidina, 1.74mg/ml PMSF, 2 mg/ml leupeptin y  $\beta$ -mercaptoetanol en

agua). Seguidamente, se sonicó la muestra durante 9 segundos y se mantuvo en hielo durante 20 minutos. Finalmente, se centrifugó el extracto celular durante 10 minutos a 14.000 rpm y a 4°C y se recuperó el sobrenadante que contenía la fracción proteica. Los extractos de proteína se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **12.2. CUANTIFICACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.**

Para determinar con fiabilidad el nivel de expresión de una proteína concreta por *WB*, es esencial cuantificar previamente cada extracto para trabajar con la misma cantidad de fracción total de proteína en todas las muestras y poder comparar entre ellas los resultados de expresión obtenidos en un mismo experimento.

La cuantificación de la cantidad de proteína en cada muestra se realizó utilizando el método colorimétrico de *Bradford*, basado en el cambio de color que experimenta el *Comassie Brilliant Blue* (BioRad, Hercules, USA) cuando se une a las proteínas. Este viraje de color marrón a azul se detecta por espectrofotometría, ya que el compuesto pasa de tener una longitud de absorción de 465 a una longitud máxima de 595 nm. La cantidad de coloración azul detectada es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en una muestra evaluada.

La cuantificación se realiza en una placa de 96 pocillos. En el diseño de la placa se incluye un *blanco* (agua), una recta patrón (pocillos con concentraciones crecientes y conocidas de albúmina) y 1 µl de las muestras a cuantificar. Una vez se añade el reactivo *Comassie Brilliant Blue*, se mide la absorbancia a 595 nm en un lector de placas. A partir de los valores obtenidos en la recta patrón y teniendo en cuenta la dilución utilizada en las muestras se calcula la concentración de proteína que hay en estas por interpolación. La cuantificación de las muestras se realiza por triplicado.

### **12.3. ELECTROFORESIS SDS-PAGE.**

La electroforesis *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) es una técnica que permite separar proteínas según su peso molecular en función de su movilidad electroforética. En este caso utilizamos el sistema *MiniProtean* (BioRad, Hercules, USA).

Para ello, se utilizaron geles de acrilamida de dos fases. La parte inferior del gel (de resolución) se preparó a un determinado porcentaje de acrilamida, en función del tamaño de las proteínas que se fuera a analizar. En nuestro estudio utilizamos geles entre al 15% de acrilamida. Además, se añadió 0,08% de bis-acrilamida, 0.375M de

## Métodos

Tris-HCL pH 8.8, 0.1% de SDS, 0.1% de APS, 0.07% de TEMED y agua. Esta mezcla se dejó polimerizar entre dos soportes de cristal durante 30 minutos aproximadamente. La parte superior del gel (de apilamiento) se preparó con 4% de acrilamida, 0.1% de bis-acrilamida, 0.125M de Tris-HCL pH 6.8, 0.2% de APS, 0.1% de TEMED y agua y se dejó polimerizar durante 10 minutos.

A continuación, preparamos las muestras que posteriormente fueron cargadas en el gel de acrilamida. Utilizamos una cantidad de 35  $\mu\text{g}$  de extracto proteico a los que se les añadió tampón de carga 6X (0.21M de Tris-HCL pH 6.8%, 8.4% de SDS, 6.3% de glicerol, 0.3% de azul de bromofenol y 2M de DTT) para evitar su difusión.

Las muestras se colocaron en un bloque seco a 100°C durante 3 minutos para desnaturalizarlas y se dejaron 5 minutos en hielo.

Seguidamente se cargaron las muestras y el marcador de pesos moleculares conocidos (BioRad, Hercules, USA) en los pocillos del gel de acrilamida, introducido previamente en una cubeta electroforética llena de tampón Tris-glicina (25mM Tris, 250mM glicina pH 8.3, 0.1% SDS). La electroforesis se realizó a 50 mA durante aproximadamente 1 hora (Figura 25).

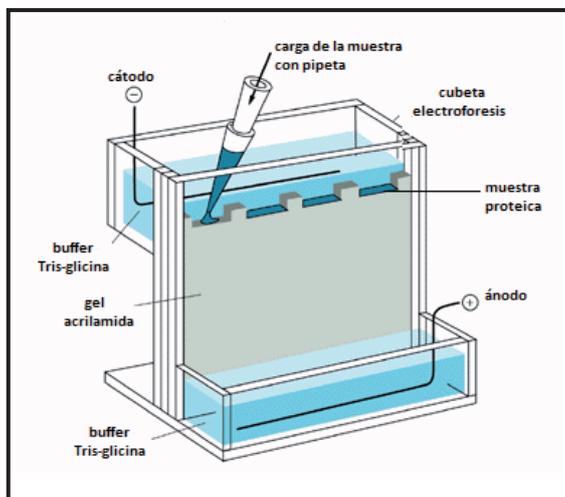


Figura 25. Esquema de los elementos necesarios para realizar una electroforesis de proteínas.

### 12.4. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS.

Para poder detectar las proteínas con anticuerpos, es necesario transferirlas previamente desde los geles *SDS-PAGE* a una membrana de nitrocelulosa (Protran®, Whatman, Oxon, UK). Esto se hace mediante el método de electrotransferencia que está basado en la combinación de un tampón, preparado con 39 mM de glicina, 48 mM de Tris base, 0.037% de SDS y 20% de metanol, y corriente eléctrica. De este modo, las proteínas migran desde el gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa, manteniendo la misma organización que tienen al finalizar la electroforesis. Los

elementos de la transferencia se apilan en el siguiente orden: esponja, dos papeles de filtro empapados de buffer de transferencia (glicina, SDS, Tris Base y metanol), gel, membrana de nitrocelulosa, dos papeles de filtro empapados de buffer de transferencia y otra esponja. Este montaje, llamado coloquialmente *sandwich*, se dispone en la cubeta de transferencia, llena de tampón de transferencia y se aplica una corriente eléctrica de 300 mA durante al menos 3 horas para asegurar que todas las proteínas se transfieren a la membrana.

### **12.5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.**

Una vez finalizada la transferencia y para comprobar que se había realizado con éxito, teñimos la membrana de nitrocelulosa en una solución 0,2% de colorante *Ponceau S* en ácido acético al 3% (Sigma Aldrich, Tres Cantos, España), durante 5 minutos en agitación. Posteriormente, se realizó un lavado con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Seguidamente, se procedió al paso de bloqueo con una solución al 5% de leche desnatada en polvo disuelta en TBS (132mM de NaCl, 20mM de Tris pH 7.5, 0.1% Tween 20) durante 2 horas en agitación, para bloquear los lugares de unión que quedaban libres tras la transferencia, evitando así, que los anticuerpos se unieran a ellos dando señal inespecífica. A continuación se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS y se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico (Tabla 13) diluido en TBS al 0,1% de BSA, durante 1 hora a T.A. o durante toda la noche (O/N) a 4°C. Pasado este tiempo se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK) correspondiente, preparado a una dilución 1:10000 en TBS al 1% de BSA durante 1 hora a T.A. Se hicieron tres lavados de 5 minutos con TBS y, finalmente, se reveló la membrana, para detectar las proteínas, con el *kit SuperSignal West Pico* (Thermo Scientific, Waltham, USA). Este *kit* está basado en la adición de un sustrato que es metabolizado por el enzima peroxidasa, que lleva conjugada el anticuerpo secundario, produciendo una señal quimioluminiscente. La intensidad de señal fue detectada con un fotodocumentador y analizada con el correspondiente *software* para el tratamiento de imágenes (G-BOX Syngene, Imagen Technologies).

Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por *Western Blot*.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Marca comercial
<b>GAPDH</b>	1:10000	Mouse	Chemicon International
<b>N-cadherina</b>	1:1000	Mouse	Dako
<b>E-cadherina</b>	1:1000	Mouse	BD
<b>Vimentina</b>	1:2500	Mouse	Dako

### 13. OBTENCIÓN DE CLONES ESTABLES.

#### 13.1. TRANSFECCIÓN.

Para estudiar la función de un gen, a menudo se evalúa el efecto de su sobreexpresión o infraexpresión. En cultivos celulares una de las metodologías para conseguir alguno de estos dos efectos es la transfección de las células con un plásmido en el que se haya clonado el gen de interés, en el caso de la sobreexpresión, o bien, plásmidos *short hairpin* RNA (shRNA) si se desea inhibir la expresión del gen.

Como vehículo de transfección para introducir la molécula de DNA exógeno en las líneas celulares se utilizó *Lipofectamine 2000* (Invitrogen, Paisley, UK). Es un agente lipídico-catiónico que forma complejos con el DNA. Estos complejos se fusionan con la membrana celular, que es también de carácter lipídico, y posteriormente se produce la liberación del DNA en el interior celular. En función de la línea celular la relación DNA: *Lipofectamine 2000* varía, de manera que es necesario una optimización previa de las condiciones probando diferentes ratios para conseguir una transfección efectiva.

La eficiencia de la transfección depende de muchos factores, entre los que se incluyen la línea celular, el tamaño del plásmido o del gen a transfectar, así como el pH del medio.

Para determinar el porcentaje de células transfectadas utilizamos un método indirecto, por el que se co-transfectó el plásmido portador del gen de interés con el plásmido *pEGF-N1* (Clontech, Mountain View, USA) que lleva insertado la proteína fluorescente *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Pasadas unas horas después de la transfección se observaron las células en el microscopio de fluorescencia, con el filtro *FITC*. La intensidad de color verde procedente de la proteína *GFP* indicó la eficiencia de la transfección. La máxima carga de DNA en cualquiera de los experimentos de transfección fue de 600 µg.



A partir del RNA extraído, se realizó una PCR a tiempo real, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4. Se utilizaron las sondas del gen endógeno *HPRT1* (Hs99999909\_m1) y del gen de interés *RAB25* (Hs00220628\_m1) para determinar su nivel de expresión.

### 13.2. SELECCIÓN DE CLONES.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de un gen a largo plazo es recomendable realizar transfecciones estables, con las que se consigue que el gen permanezca en el genoma de la célula y de su progenie, manteniéndose de este modo su expresión. Esto es posible gracias a que los plásmidos, además del gen de interés, llevan clonado otro gen que confiere resistencia a algún antibiótico, lo que permite su selección. Cuando se añade al cultivo el antibiótico, solo proliferaran aquellas células que han sido transfectadas, mientras que el resto mueren por ser sensibles al antibiótico. En nuestro estudio concreto, el plásmido utilizado lleva, a parte del gen *RAB25*, el gen *G418* que confiere resistencia a geneticina (Figura 25).

La concentración de geneticina adecuada para la selección se determinó previamente haciendo una curva de viabilidad para cada una de las líneas celulares transfectadas mediante un ensayo de *XTT*, como se ha descrito en el apartado 8. Una vez confirmada la sobreexpresión de *RAB25* por PCR cuantitativa, las células transfectadas se transfirieron a una placa de 60mm de diámetro y se les añadió medio DMEM que contenía geneticina a una concentración entre 750 µg/ml y 1000 µg/ml de (Invitrogen, Paisley, UK) para iniciar la selección de clones estables. El proceso de selección duró 14 días, y se realizó cambiando el medio con geneticina nueva cada 3 días. A continuación, se seleccionaron los clones aislados de transfecciones estables que se transfirieron a placas o *flascones* de cultivo de mayor volumen hasta obtener *stocks* congelados.

**Tabla 15. Método para la selección de clones que expresan el plásmido que lleva clonado el gen *RAB25*.**

#### **Selección de clones:**

1. Se retiró el medio de la placa y se lavó con PBS.
2. Se observó la placa en el microscopio, y con la ayuda de un rotulador, se marcaron clones celulares aislados.
3. Se dispusieron los cilindros de vidrio (*Cloning cylinders*, Sigma Aldrich), recubiertos de silicona en uno de los extremos encima de los clones celulares y se añadió tripsina para resuspender las células que quedaban incluidas dentro del cilindro (Figura 25).
4. Las células recuperadas de cada cilindro se sembraron en una nueva placa de 12 pocillos con medio de cultivo con geneticina

Antes de realizar cualquier experimento funcional para *RAB25*, se comprobó mediante PCR cuantitativa, que las células transfectadas mantenían la sobreexpresión de este gen.

### **14. ENSAYOS DE DISPERSIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR.**

La dispersión celular es un proceso dinámico, que se inicia cuando se rompen las uniones entre células, las cuales adquieren forma fibroblastoide y motilidad celular, características del proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM).

Para el estudio de estas características, se han desarrollado ensayos de migración e invasión mediante el cultivo de células en 2 compartimentos separados físicamente por una membrana porosa (*Transwell assays*) que permiten evaluar tanto la migración de las células tumorales como su capacidad de atravesar la matriz extracelular e invadir lugares alejados de su posición inicial. Cuando las células son capaces de degradar la membrana extracelular e invadir otros tejidos también aumenta su capacidad de intravasarse incorporándose al torrente sanguíneo para llegar a otros tejidos donde se extravasan, lo que forma parte del proceso metastático.

#### **14.1. SCATTERING.**

Para evaluar la capacidad de dispersión de las células, se realizaron experimentos de *scattering* en placas pretratadas con colágeno IV (Invitrogen, Paisley, UK).

Primeramente se sembraron 200.000 células/pocillo en placas de 60mm recubiertas de *polyhema* (Sigma Aldrich, Tres Cantos, España), evitando así la adhesión de las células y promoviendo la formación de grupos celulares. Pasadas 12 horas se transfirieron las células a placas de 60mm pre-tratadas con colágeno IV.

#### **14.2. TRANSWELLS.**

Los ensayos de *transwells* están diseñados para determinar la capacidad que tienen las células de migrar a través de una membrana porosa que separa dos medios de cultivo en condiciones diferentes.

En este estudio se utilizaron los *Transwell Permeable Supports* con una membrana de 8µm de tamaño de poro (Corning, Union City, USA).

Para evaluar la capacidad migratoria que tenían las células de estudio, primeramente se incubaron durante 24h con medio sin FBS. A continuación se añadió medio con un 20% de FBS en el compartimento inferior del *transwell*, se sembraron 7.000-10.000

## Métodos

---

células con medio sin FBS en el compartimento superior y se incubaron durante 24h (Figura 27).

Para visualizar las células que habían migrado a través de la membrana se hizo una tinción con cristal violeta. Para ello, primero se retiraron las células que habían quedado encima de la membrana porosa. Se visualizaron al microscopio y se hizo un conteo de cuatro campos distintos, haciendo el promedio de estos.

Para determinar la capacidad de invasión, primero tratamos la membrana porosa con BD Matrigel™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), que esta compuesta por una mezcla de componentes de la matriz extracelular. Posteriormente, se siguió el mismo protocolo explicado para los ensayos de migración.

La cuantificación de los ensayos *transwell* se realizó a partir de imágenes tomadas a 100x de las células teñidas y utilizando el programa *Photoshop*. Determinamos el tamaño del área de aquellas regiones que presentaba tinción por cristal violeta y que correspondían a las células con capacidad para atravesar la membrana y que se habían trasvasado al compartimento inferior del *transwell*.

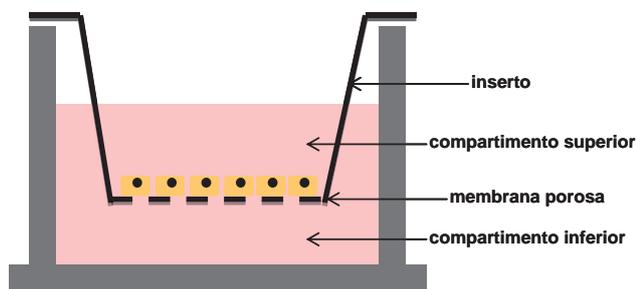


Figura 27. Esquema de las diferentes partes que componen un *transwell*.



# **RESULTADOS**



### IV RESULTADOS

El objetivo de esta tesis doctoral es la búsqueda de marcadores pronóstico y predictivos de respuesta en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) localmente avanzado. Primeramente se han realizado estudios de asociación de la expresión de estos marcadores con la evolución clínica del paciente, para después ser validados en cohortes independientes. En cada uno de estos estudios se ha utilizado una serie de pacientes distinta, compuesta de una o varias cohortes. En total se han utilizado seis cohortes diferentes (I, II, III, IV, Chung *et al* [150] y Rickman *et al* [171]). Las características clínicas de la serie de pacientes se introducen al inicio de cada estudio (cohorte I, punto 1.1; cohortes I+II+III, punto 1.2; cohorte IV, punto 1.3.1; cohortes de Chung *et al* y Rickman *et al*, punto 2). Con el objeto de facilitar la comprensión de las evaluaciones realizadas, a continuación, se presenta un esquema que describe la serie de pacientes utilizada en cada uno de los estudios. La selección de los pacientes incluidos en cada una de las series (conjunto de cohortes) evaluadas, se realizó en función de: el tipo de estudio (microarrays, PCR cuantitativa, inmunohistoquímica o *GSEA*); la calidad de la muestra (por ejemplo, en los estudios de microarrays la integridad del mRNA debe ser mayor que para PCR cuantitativa); la disponibilidad de la muestra (algunas de las muestras se agotaron en los estudios de microarrays de expresión o en los de inmunohistoquímica, por lo que en los estudios subsiguientes de expresión contamos con un número menor de muestras); y el tiempo de seguimiento de los pacientes (en algunos estudios se excluyeron las muestras con un seguimiento muy corto).

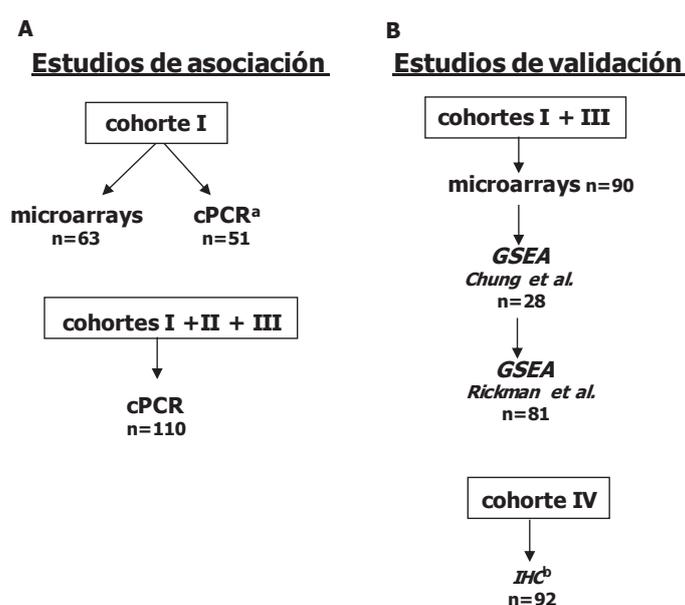


Figura 28. Esquema indicativo de los estudios de asociación y validación.  
<sup>a</sup>PCR cuantitativa. <sup>b</sup>Inmunohistoquímica

### **1. BIOMARCADORES ASOCIADOS CON LA RECIDIVA TUMORAL Y LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO.**

En un estudio de microarrays previo (cohorte I), realizado por nuestro grupo identificamos 3 subtipos de tumores (clusters) que presentaban diferencias en la evolución clínica de los pacientes (Introducción punto 5). Tras analizar el perfil de expresión del subtipo de tumores de mal pronóstico, seleccionamos una serie de genes candidatos a marcadores pronóstico y/o predictores, utilizando criterios estadísticos y biológicos. En primer lugar identificamos todos aquellos genes que tenían mayor sensibilidad y especificidad en su asociación con la aparición de recidivas tumorales o con la muerte del paciente una vez finalizado el tratamiento, que consistía en QRT o QTI seguida de RT/QRT/cirugía. Posteriormente, seleccionamos aquellos genes que participaban en los procesos biológicos que previamente identificamos como desregulados en el subtipo 1 de mal pronóstico.

Finalmente, los genes candidatos seleccionados para su posterior validación mediante PCR cuantitativa fueron *RAB25*, *SERPINA-1*, *DUOX-1*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TPST1*, *TGM3* y *FHL2*.

Para evaluar la sensibilidad y la especificidad de la técnica de microarrays, analizamos el nivel de mRNA de estos genes por PCR cuantitativa en el mismo grupo de pacientes (cohorte I). Además, con el objeto de confirmar la capacidad pronóstica de estos genes se analizaron los niveles de expresión por cPCR en una serie ampliada de pacientes (cohortes I + II + III).

#### **1.1. Análisis de los niveles de expresión por PCR cuantitativa de *RAB25*, *SERPINA-1*, *DUOX-1*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TPST1*, *TGM3* y *FHL2* en biopsias tumorales de pacientes analizados previamente mediante un estudio de microarrays (cohorte I).**

##### **1.1.1. Características de los pacientes.**

Para comprobar la validez pronóstica y predictiva de *RAB25*, *SERPINA-1*, *DUOX-1*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TPST1*, *TGM3* y *FHL2* se determinó el nivel de expresión de cada uno de estos genes por PCR cuantitativa en las biopsias tumorales analizadas previamente en el estudio de microarrays (cohorte I). Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían un diagnóstico confirmado por análisis histológico de CECC en estadio localmente avanzado.

## Resultados

Las biopsias tumorales analizadas fueron obtenidas antes de que los pacientes iniciasen el tratamiento con quimiorradioterapia o quimioterapia de inducción. Las características de los pacientes incluidos en el estudio se describen en la Tabla 16.

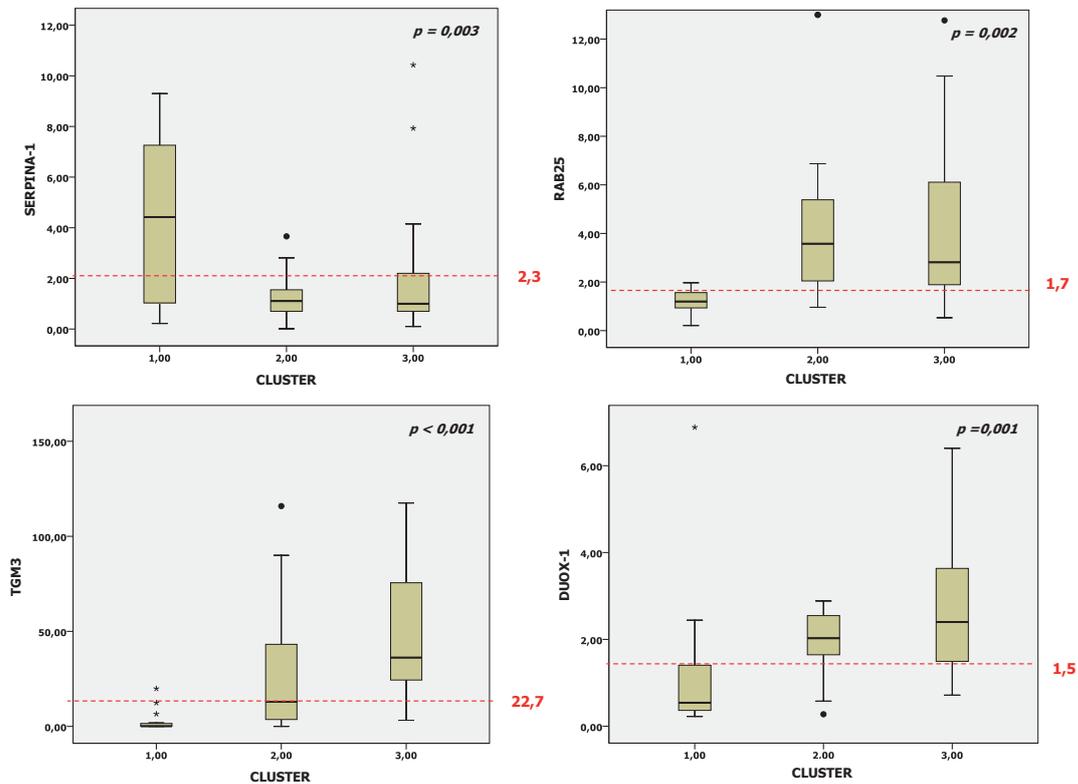
**Tabla 16. Características de los pacientes incluidos en el estudio de expresión por microarrays (cohorte I).**

Variable	Número de casos (%)
<b>Sexo</b>	
<b>Hombre</b>	56 (89%)
<b>Mujer</b>	7 (11%)
<b>Localización tumoral</b>	
<b>Cavidad oral</b>	11 (18%)
<b>Hipofaringe</b>	8 (13%)
<b>Laringe</b>	23 (36.5%)
<b>Orofaringe</b>	21 (33%)
<b>Tamaño tumoral</b>	
<b>T2</b>	13 (21%)
<b>T3</b>	30 (48%)
<b>T4</b>	20 (32%)
<b>Afectación ganglionar</b>	
<b>N<sup>+</sup></b>	53 (84%)
<b>N<sup>-</sup></b>	10 (16%)
<b>Estadio Tumoral (TNM)</b>	
<b>III</b>	15 (24%)
<b>IV</b>	48 (76%)
<b>Tratamiento</b>	
<b>QTI seguida de RT</b>	14 (22%)
<b>QRT</b>	15 (24%)
<b>Cirugía</b>	17 (27%)
<b>QRT concomitante</b>	17 (27%)
<b>Cluster</b>	
<b>1</b>	19 (30%)
<b>2</b>	23 (37%)
<b>3</b>	21 (33%)

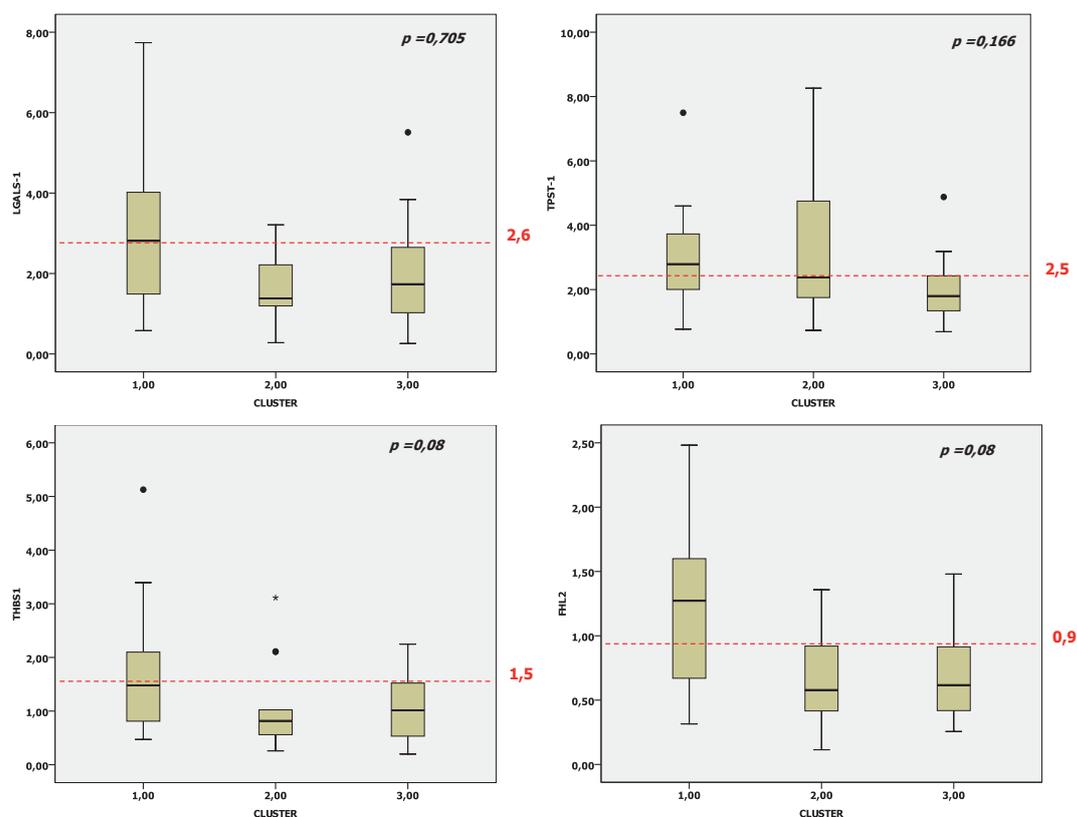
## Resultados

### 1.1.2. Asociación entre los niveles de expresión de *RAB25*, *SERPINA-1*, *DUOX-1*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TPST1*, *TGM3* y *FHL2* y la evolución clínica del paciente.

Realizamos un análisis de expresión por PCR cuantitativa en un total de 56 muestras tumorales de la cohorte I, de las que disponíamos de RNA una vez finalizado el estudio de microarrays. Los resultados obtenidos por PCR confirmaron la existencia de diferencias significativas en el nivel de expresión de los genes *DUOX-1*, *RAB25*, *SERPINA-1* y *TGM3* entre el subtipo tumoral 1 y los subtipos tumorales 2 y 3 (Figura 29). Para el resto de los genes analizados en este estudio, no se confirmó esta asociación.



## Resultados



**Figura 29.** *Box plots* de los niveles de expresión de los genes candidatos en los 3 subtipos tumorales (clusters) identificados en el estudio de microarrays. Las líneas discontinuas indican el valor de corte establecido para la clasificación de los pacientes en dos grupos. El valor de la significancia  $p$  se obtiene de aplicar la prueba estadística de *Kruskal-Wallis*.

A continuación, se estableció un valor de corte para cada gen separando los pacientes en dos grupos dependiendo de si los niveles de expresión de los tumores eran superiores o inferiores al valor establecido (Figura 29). La determinación del umbral para cada uno de los genes analizados se basó en criterios biológicos, con el objetivo de separar subgrupos de pacientes con características moleculares y evolución clínica similar. Aplicando análisis de *Kaplan-Meier* y modelos de *Cox* univariante y multivariante, determinamos la posible existencia de diferencias en la supervivencia libre de recidiva local (SLRL), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) al comparar los pacientes cuyos tumores presentaban niveles por encima del umbral con los que su expresión estaba por debajo de este valor.

La expresión de niveles elevados de *SERPINA-1* o *RAB25*, en las biopsias pretratamiento, se asoció de modo significativo con la SLRL ( $p=0,02$  y  $p=0,02$ ), la SLP ( $p=0,008$  y  $p=0,01$ ) y la SG ( $p=0,006$  y  $p=0,002$ ) (Figura 30. A-B y Tabla 17). De este

## Resultados

modo, pacientes con tumores que expresaban un nivel elevado de *SERPINA-1* tenían una mayor probabilidad de padecer una recidiva local, y de tener una supervivencia libre de progresión y una supervivencia global menor que los pacientes con un nivel de expresión tumoral más bajo. Por el contrario, la expresión elevada de *RAB25* se asoció con una menor probabilidad de que los pacientes sufrieran recidivas locales y una supervivencia libre de enfermedad y global más largas que los pacientes con un nivel de expresión por debajo del umbral establecido.

El nivel de expresión de *DUOX-1* se asoció únicamente con la SLRL ( $p=0,005$ ) y la SLP ( $p=0,04$ ). No se encontraron diferencias para la SG de los pacientes según el nivel de expresión de este gen (Figura 30.C y Tabla 17).

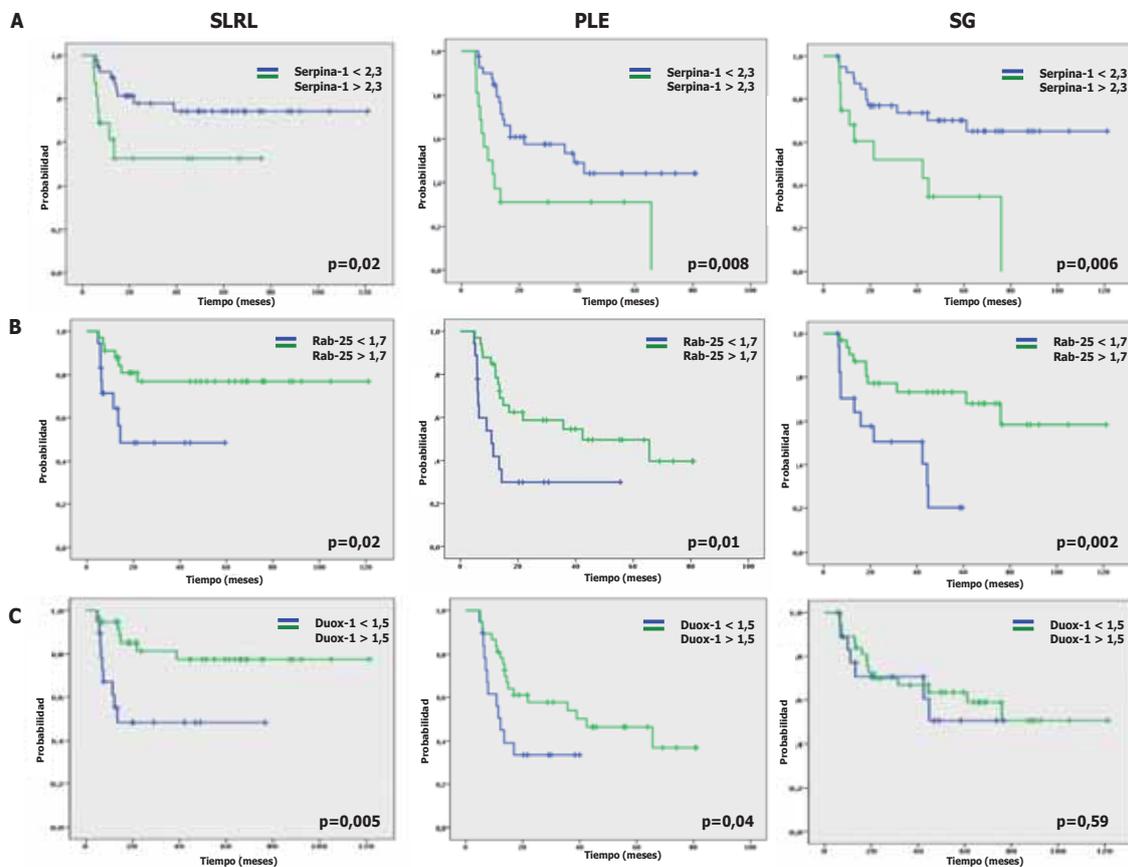


Figura 30. Curvas de *Kaplan-Meier* para la supervivencia libre de recidiva local (SLRL), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG), de los pacientes en función de los niveles de expresión de *SERPINA-1* (A), *RAB25* (B) y *DUOX-1* (C) en el tumor.  $p$  = valor de probabilidad estadística.

En cambio, el nivel de expresión de *TGM-3*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TPST1* y *FHL2* no estaba asociado con la SLRL, SLP y SG (Tabla 17).

## Resultados

Tabla 17. Valores de probabilidad (*p valor*) obtenidos aplicando el modelo de *Kaplan-Meier*, para la supervivencia libre de recidiva local (SLRL), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) para cada uno de los genes analizados por cPCR.

	VALOR DE CORTE	SLRL	SLP	SG
		<i>p valor</i>	<i>p valor</i>	<i>p valor</i>
<b>SERPINA -1</b>	2,3	0,02*	0,008**	0,006**
<b>RAB25</b>	1,7	0,02*	0,01*	0,002**
<b>THBS-1</b>	1,5	0,66	0,73	0,56
<b>DUOX-1</b>	1,5	0,005**	0,04*	0,59
<b>LGALS-1</b>	2,6	0,29	0,32	0,61
<b>TPST-1</b>	0,9	0,81	0,92	0,95
<b>TGM3</b>	81,8	0,46	0,84	0,82
<b>FHL2</b>	0,9	0,51	0,32	0,62

\*Existencia de diferencias significativas entre pacientes con niveles superiores o inferiores al valor de corte establecido con una  $p < 0,05$ . \*\*Existencia de diferencias significativas entre pacientes con niveles superiores o inferiores al valor de corte establecido con una  $p < 0,01$ .

El resultado del análisis de *Cox* univariante (Tabla 18) confirmó que los niveles de expresión de *SERPINA-1*, *RAB25* y *DUOX-1* estaban asociados con la SLRL ( $p=0,03$ ;  $p=0,02$  y  $p<0,01$  respectivamente). También se observaron diferencias significativas en cuanto a la SLP asociadas con los niveles de expresión de *SERPINA-1* ( $p=0,01$ ), *RAB25* ( $p=0,01$ ) o *DUOX-1* ( $p=0,05$ ) y la existencia de afectación ganglionar en el momento del diagnóstico ( $p=0,04$ ). Además, los pacientes con niveles de expresión de *SERPINA-1* superiores al valor de corte establecido tenían un tiempo de SG menor que los que tenían niveles de expresión inferiores ( $p<0,01$ ). En cambio, aquellos pacientes con niveles de *RAB25* superiores al valor de corte presentaban una SG mayor ( $p=0,04$ ).

El modelo de *Cox* multivariante (Tabla 18) mostró que el nivel de expresión de *RAB25* era un factor de riesgo independiente para la SLRL ( $p=0,01$ ), la SLP ( $p<0,01$ ) y la SG ( $p<0,01$ ). Además, el nivel de mRNA de *SERPINA-1* era un factor de riesgo independiente para la SLP ( $p<0,01$ ).

El resto de variables clínicas incluidas en el análisis no mostraron diferencias significativas (Tabla 18).

## Resultados

Tabla 18. Análisis de modelos de *Cox* univariantes y multivariantes para el análisis de la supervivencia libre de recidiva local (SLRL), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) en función de parámetros clínicos y niveles de expresión de los marcadores *SERPINA-1*, *RAB25* y *DUOX-1* (Cohorte I).

<b>SLRL</b>	<b>Cox Univariante</b>		<b>Cox Multivariante</b>	
	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>p</i></b>	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>p</i></b>
Afectación ganglionar ( N <sup>+</sup> vs N <sub>0</sub> )	4,1 (0,5 -31,5)	0,17	-----	0,07
Tamaño tumoral (T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> vs T <sub>3</sub> -T <sub>4</sub> )	0,9 (0,3 -3)	0,96	-----	0,74
Nivel mRNA <i>SERPINA-1</i> (>2,3 vs <2,3)	3 (1,1-8,2)	<b>0,03*</b>	-----	0,08
Nivel mRNA <i>RAB25</i> (>1,7vs <1,7)	0,3 (0,1 -0,8)	<b>0,02*</b>	3,6 (1,3-10,2)	<b>0,01*</b>
Nivel mRNA <i>DUOX-1</i> (>1,5 vs <1,5)	0,2 (0,1 -0,7)	<b>&lt;0,01*</b>	-----	0,11
<b>SLP</b>	<b>Cox Univariante</b>		<b>Cox Multivariante</b>	
	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>p</i></b>	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>p</i></b>
Afectación ganglionar ( N <sup>+</sup> vs N <sub>0</sub> )	4,3 (1 -18,1)	<b>0,04*</b>	-----	0,29
Tamaño tumoral (T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> vs T <sub>3</sub> -T <sub>4</sub> )	1,3 (0,5 -3,2)	0,53	-----	0,12
Nivel mRNA <i>SERPINA-1</i> (>2,3 vs <2,3)	2,6 (1,3-5,4)	<b>0,01*</b>	0,4 (0,2-0,8)	<b>&lt;0,01**</b>
Nivel mRNA <i>RAB25</i> (>1,7vs <1,7)	0,4 (0,2 -0,8)	<b>0,01*</b>	2,3 (1,3-4,1)	<b>&lt;0,01**</b>
Nivel mRNA <i>DUOX-1</i> (>1,5 vs <1,5)	0,4 (0,2 -1)	<b>0,05*</b>	-----	0,60
<b>SG</b>	<b>Cox Univariante</b>		<b>Cox Multivariante</b>	
	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>p</i></b>	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>p</i></b>
Afectación ganglionar ( N <sup>+</sup> vs N <sub>0</sub> )	5,6 (0,7 -41,9)	0,09	-----	0,18
Tamaño tumoral (T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> vs T <sub>3</sub> -T <sub>4</sub> )	1,1 (0,4 -2,9)	0,87	-----	0,81
Nivel mRNA <i>SERPINA-1</i> (>2,3 vs <2,3)	3,1 (1,3-7,2)	<b>&lt;0,01**</b>	-----	0,18
Nivel mRNA <i>RAB25</i> (>1,7vs <1,7)	0,2 (0,1 -0,6)	<b>0,04*</b>	4,4 (1,7 -11,1)	<b>&lt;0,01**</b>
Nivel mRNA <i>DUOX-1</i> (>1,5 vs <1,5)	0,7 (0,3 -1,9)	0,59	-----	0,19

\* Existencia de diferencias significativas  $p < 0,05$ . \*\* Existencia de diferencias significativas  $p < 0,01$ . HR: Hazard Ratio o tasa de riesgo, IC = Intervalo de confianza.

### 1.2. Asociación de los niveles de expresión de *RAB25*, *SERPINA-1* y *DUOX-1* con la SLRL, SLP y SG en una cohorte de 110 pacientes con CECC localmente avanzado.

## Resultados

Para confirmar la asociación entre los niveles de expresión de *RAB25*, *SERPINA-1* y *DUOX-1* con la SLRL, SLP y SG se analizaron de manera conjunta las muestras tumorales obtenidas de las cohortes I, II y III (n=110) (Tabla 19).

**Tabla 19. Características de los pacientes incluidos en el estudio de los marcadores *RAB25*, *SERPINA-1* y *DUOX-1* (cohorte I, cohorte II y cohorte III).**

Variable	Número de casos (%)
<b>Sexo</b>	
<b>Hombre</b>	102 (92,7%)
<b>Mujer</b>	8 (7,2%)
<b>Localización tumoral</b>	
<b>Cavidad oral</b>	15 (13,6%)
<b>Hipofaringe</b>	16 (14,5%)
<b>Laringe</b>	33 (30%)
<b>Orofaringe</b>	43 (39%)
<b>Otras localizaciones</b>	3 (2,7%)
<b>Tamaño tumoral</b>	
<b>T2</b>	28 (25,4%)
<b>T3</b>	49 (44,5%)
<b>T4</b>	33 (30%)
<b>Afectación ganglionar</b>	
<b>N<sup>+</sup></b>	88 (80%)
<b>N<sup>-</sup></b>	22 (20%)
<b>Estadio Tumoral (TNM)</b>	
<b>III</b>	28(25,4%)
<b>IV</b>	82 (73,6%)
<b>Tratamiento</b>	
<b>QTI</b>	4 (3,6%) <sup>1</sup>
<b>QTI seguida de</b>	
<b>RT</b>	20 (18,2%)
<b>QRT</b>	22 (20%)
<b>Cirugía</b>	27 (24,5%)
<b>QRT concomitante</b>	42 (38,2%)

<sup>1</sup> Pacientes incluidos en el estudio a lo largo del año 2011 con un tiempo de seguimiento muy corto.

## Resultados

El análisis de *Cox* univariante indicó que el nivel de expresión de *SERPINA-1* estaba relacionado con la SLRL y la SLP (Tabla 20). Aquellos pacientes con mayor expresión de *SERPINA-1* tenían un tiempo de SLRL ( $p < 0,01$ ) y de SLP ( $p = 0,01$ ) menor que los pacientes con un nivel de expresión menor. El nivel de expresión de *RAB25* se asoció de modo significativo con la SLRL, SLP y SG. Así, aquellos pacientes con un nivel tumoral de *RAB25* más elevado tenían una probabilidad menor de padecer recidivas locales ( $p = 0,01$ ), un mayor tiempo de supervivencia libre de progresión ( $p < 0,01$ ) y de supervivencia global ( $p = 0,01$ ) que los que tenían un nivel de expresión más bajo. No observamos diferencias significativas entre pacientes con un nivel de expresión alto y aquellos con un nivel de expresión bajo del marcador *DUOX-1* en cuanto a la SLRL, SLP o SG.

En cuanto al modelo de *Cox* multivariante el nivel de mRNA de *SERPINA-1* aparecía como factor pronóstico independiente para la SLRL y la SLP ( $p = 0,01$  y  $p < 0,01$  respectivamente), mientras que el nivel de mRNA de *RAB25* era un factor pronóstico independiente para la SLRL ( $p < 0,01$ ), SLP ( $p < 0,01$ ) y la SG ( $p < 0,01$ ) (Tabla 20).

**Tabla 20.** Análisis de modelos de *Cox* univariantes y multivariantes para el análisis de la supervivencia libre de recidiva local (SLRL), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) en función de parámetros clínicos y niveles de expresión de los marcadores *SERPINA-1*, *RAB25* y *DUOX-1* (Cohortes I+II+III).

<b>SLRL</b>	<b>Cox Univariante</b>		<b>Cox Multivariante</b>	
	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>P</i></b>	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>P</i></b>
Afectación ganglionar ( N <sup>+</sup> vs N <sub>0</sub> )	1,08 (1,9-2,3)	0,84	-----	0,54
Tamaño tumoral (T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> vs T <sub>3</sub> -T <sub>4</sub> )	1,80 (0,7-4,4)	0,15	-----	0,31
Niveles mRNA <i>SERPINA-1</i> (>2,3 vs <2,3)	1,04 (1-1,1)	<b>&lt;0,01**</b>	0,4 (0,2-0,8)	<b>0,01*</b>
Niveles mRNA <i>RAB25</i> (>1,7 vs <1,7)	0,42 (0,2-0,8)	<b>0,01*</b>	2,3 (1,3-4,8)	<b>0,01*</b>
Niveles mRNA <i>DUOX-1</i> (>1,5 vs <1,5)	0,97 (0,7-1,2)	0,79	-----	0,48
<b>SLP</b>	<b>Cox Univariante</b>		<b>Cox Multivariante</b>	
	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>P</i></b>	<b><u>HR (IC 95%)</u></b>	<b><i>P</i></b>

## Resultados

Afectación ganglionar ( N <sup>+</sup> vs N <sub>0</sub> )	1,3 (0,7 - 2,6) 0,75	-----	0,31
Tamaño tumoral (T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> vs T <sub>3</sub> -T <sub>4</sub> )	1,7 (0,9 - 3,3) 0,11	-----	0,33
Niveles mRNA <i>SERPINA-1</i> (>2,3 vs <2,3)	1,9 (1 - 1,1) <b>0,01*</b>	0,4 (0,2-0,8)	<b>&lt;0,01*</b>
Niveles mRNA <i>RAB25</i> (>1,7vs <1,7)	0,9 (0,9 - 1) <b>&lt;0,01**</b>	2,3 (1,3-4,8)	<b>&lt;0,01*</b>
Niveles mRNA <i>DUOX-1</i> (>1,5 vs <1,5)	0,9 (0,7 - 1,2) 0,34	-----	0,23
<b>SG</b>	<b>Cox Univariante</b>	<b>Cox Multivariante</b>	
	<b><u>HR (IC 95%)</u>    <u>P</u></b>	<b><u>HR (IC 95%)</u>    <u>P</u></b>	
Afectación ganglionar ( N <sup>+</sup> vs N <sub>0</sub> )	1,3 (0,6 - 3,1) 0,45	-----	0,50
Tamaño tumoral (T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> vs T <sub>3</sub> -T <sub>4</sub> )	1,3 (0,6 - 2,8) 0,50	-----	0,60
Niveles mRNA <i>SERPINA-1</i> (>2,3 vs <2,3)	1 (1-1,07) 0,08	-----	0,10
Niveles mRNA <i>RAB25</i> (>1,7vs <1,7)	0,3 (0,2 - 0,6) <b>0,01*</b>	3,2 (1,6 – 6,3)	<b>&lt;0,01**</b>
Niveles mRNA <i>DUOX-1</i> (>1,5 vs <1,5)	0,8 (0,69-1,05) 0,14	-----	0,20

\* Existencia de diferencias significativas  $p < 0,05$ . \*\* Existencia de diferencias significativas  $p < 0,01$ . HR: Hazard Ratio o tasa de riesgo, IC = Intervalo de confianza.

Los modelos de *Kaplan-Meier* presentaban diferencias significativas en la SLRL, SLP y SG, para *RAB25* y *SERPINA-1* en función del valor de corte establecido (Figura 29). Se observó que aquellos pacientes con un nivel de mRNA de *RAB25* >1,7 tenían una mayor SLRL, SLP y SG que los pacientes con un nivel de expresión de *RAB25* inferior a 1,7 (Figura 31. A, C y E). El nivel de expresión de *SERPINA-1* también se asoció de manera significativa con la SLRL, SLP y SG. De este modo, aquellos pacientes con un nivel de *SERPINA-1* >2,3 tenían un riesgo mayor de padecer recidivas locales y presentaban menores tiempos de supervivencia libre de progresión y de supervivencia global (Figura 31. B, D y F) que los pacientes con el nivel de expresión de *SERPINA-1* <2,3.

No observamos diferencias significativas en la SLRL, SLP o la SG asociadas a los niveles de expresión de *DUOX-1*.

A continuación, determinamos si el análisis conjunto *RAB25* (un marcador de buen pronóstico) y *SERPINA-1* (un marcador de mal pronóstico) mejoraba la capacidad pronóstica de la prueba respecto al análisis de estos marcadores de manera individual. Para ello, se clasificaron las 110 muestras tumorales, de las cohortes I+II+III, en

## Resultados

cuatro grupos (A, B, C y D) en función de los niveles de expresión de *SERPINA-1* y de *RAB25* (Tabla 21).

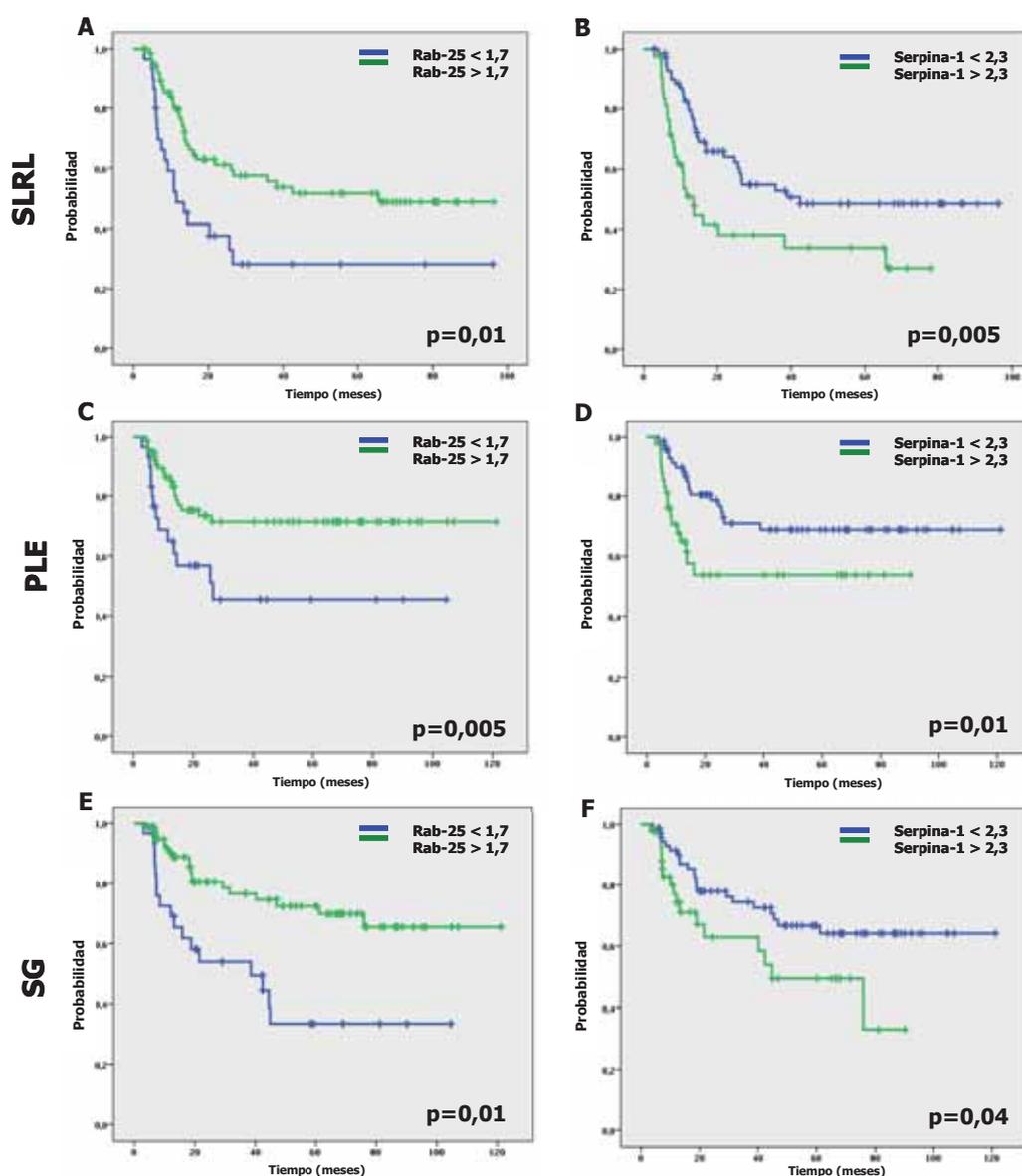


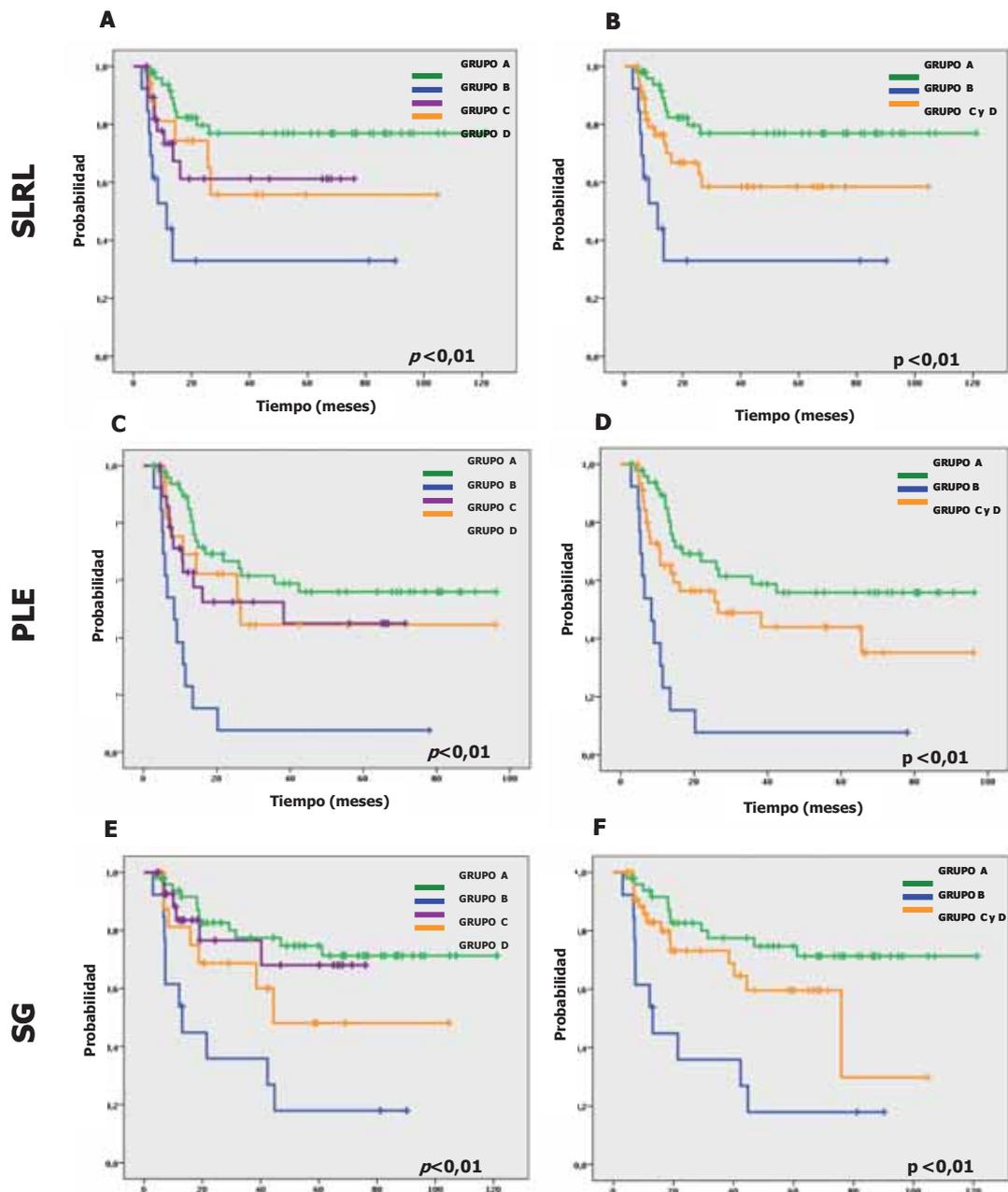
Figura 31. Curvas de *Kaplan-Meier* para la SLRL (A-B), SLP (C-D) y SG (E-F) en función de los niveles de *RAB25* y *SERPINA-1* dicotomizados.  $p$  = valor de probabilidad estadística.

Tabla 21. Tabla de frecuencias de los diferentes grupos de pacientes en función del nivel de expresión de *RAB25* y *SERPINA-1*.

## Resultados

Grupo	Nº pacientes (%)
1. <i>SERPINA-1</i> < 2,3 y <i>RAB25</i> >1,7	51 (46,4%)
2. <i>SERPINA-1</i> >2,3 y <i>RAB25</i> <1,7	13 (11,8%)
3. <i>SERPINA-1</i> <2,3 y <i>RAB25</i> <1,7	17 (15,5%)
4. <i>SERPINA-1</i> > 2,3 y <i>RAB25</i> >1,7	29 (26,4%)

Los niveles de expresión de *SERPINA-1* y *RAB25*, analizados de modo conjunto, se asociaron con la supervivencia libre de recidiva local ( $p < 0,01$ ), la supervivencia libre de progresión ( $p < 0,01$ ) y la supervivencia global ( $p < 0,01$ ) (Figura 32. A, C y E). No se observaron diferencias en cuanto a la SLRL ( $p = 0,8$ ), la SLP ( $p = 0,8$ ) o la SG ( $p = 0,5$ ) entre los grupos C y D (Figura 32. A, C y E), por lo que se realizó un análisis adicional en el que se combinaron ambos grupos.



## Resultados

Figura 32. Curvas de *Kaplan-Meier* para la SLRL (A y D), SLP (B y E) y SG (C y F) considerando conjuntamente los niveles de expresión de *RAB25* y *SERPINA-1*. Grupo A: *SERPINA-1* < 2,3 y *RAB25* >1,7. Grupo B: *SERPINA-1* >2,3 y *RAB25*<1,7. Grupo C: *SERPINA-1*<2,3 y *RAB25* <1,7. Grupo D: *SERPINA-1* > 2,3 y *RAB25* >1,7.

Tabla 22. Valores de probabilidad (*p valor*) obtenidos al aplicar el modelo de *Kaplan-Meier* para la SLRL, SLP y la SG y distribuir a los pacientes en tres grupos en función de la consideración conjunta de los niveles de expresión de *RAB25* y *SERPINA-1*.

	<u>SLRL</u>	<u>SLP</u>	<u>SG</u>
	<i>p valor</i>	<i>p valor</i>	<i>p valor</i>
<b>Grupo A vs Grupo B</b>	<b>&lt;0,01**</b>	<b>&lt;0,01**</b>	<b>&lt;0,01**</b>
<b>Grupo B vs Grupo C y D</b>	<b>0,02*</b>	<b>&lt;0,01**</b>	<b>0,01*</b>
<b>Grupo A vs Grupo C y D</b>	<b>0,05*</b>	0,07	0,1

\*Existencia de diferencias significativas  $p < 0,05$ . \*\* Existencia de diferencias significativas  $p < 0,01$ .

El análisis estadístico posterior, analizando los grupos A, B y C+D, mostró que existían diferencias significativas para la SLRL, la SLP y/o la SG entre los grupos de pacientes analizados (Figura 31. B, D y F) y (Tabla 22).

Los pacientes del grupo de mal pronóstico (grupo B) presentaban una mayor probabilidad de padecer recidivas locales ( $p < 0,01$  y  $p = 0,02$ ), una menor SLP ( $p < 0,01$  y  $p < 0,01$ ) y menor probabilidad de sobrevivir a la enfermedad que los pacientes del grupo de buen pronóstico (grupo A) ( $p < 0,01$ ) o que los pacientes de pronóstico intermedio (grupo C+D) ( $p = 0,01$ ).

Además, los pacientes del grupo de buen pronóstico (grupo A), tenían una menor probabilidad de padecer recidivas tumorales que los pacientes incluidos en el grupo de pronóstico intermedio (grupo C+D) ( $p = 0,05$ ). A pesar de que los pacientes del grupo de buen pronóstico presentaron una SLP y SG más favorable que los de pronóstico intermedio (Grupo C+D), dichas diferencias no alcanzaron la significancia estadística ( $p = 0,07$  y  $p = 0,1$ ).

Finalmente, aplicando el modelo de *Cox* multivariante observamos que la consideración conjunta de los niveles de *SERPINA-1* y *RAB25* era un factor de riesgo independiente del tamaño tumoral y la afectación ganglionar para la SLRL, la SLP y la SG. Aquellos pacientes de los grupos de pronóstico intermedio y de buen pronóstico tenían menor probabilidad de padecer recidivas tumorales que el grupo de mal pronóstico ( $HR = 0,4$ ,

## Resultados

$IC_{95\%} = 0,2-0,9$  y  $p=0,03$ ) y ( $HR = 0,2$ ,  $IC_{95\%} = 0,1-0,4$  y  $p<0,01$ ) respectivamente. Además los pacientes del grupo de mal pronóstico tenían una SLP y una SG inferior a los del grupo de pronóstico intermedio ( $HR = 0,3$ ,  $IC_{95\%} = 0,1-0,6$  y  $p<0,01$  y  $HR = 0,3$ ,  $IC_{95\%} = 0,1-0,7$  y  $p<0,01$ , respectivamente) y a los del grupo de buen pronóstico ( $HR = 0,2$ ,  $IC_{95\%} = 0,1-0,4$  y  $p<0,01$  y  $HR = 0,2$ ,  $IC_{95\%} = 0,1-0,4$  y  $p<0,01$ , respectivamente).

### 1.2.1. Identificación de un perfil de expresión en los pacientes del grupo de pronóstico intermedio.

La determinación del pronóstico de los pacientes en función de los niveles de *RAB25* y *SERPINA-1* analizados conjuntamente, permite clasificar a más del 50 % de los pacientes asignándolos al grupo de buen o de mal pronóstico. El resto de los pacientes quedan clasificados como un grupo de pronóstico intermedio.

Con objeto de identificar con mayor precisión los marcadores moleculares asociados con la evolución de los pacientes clasificados dentro del grupo de pronóstico intermedio, aplicamos un análisis de expresión diferencial, mediante el paquete informático *limma*, teniendo en cuenta los datos de expresión de los pacientes pertenecientes a los grupos C+D (Tabla 21). El análisis dio como resultado la identificación de ocho genes diferencialmente expresados en los pacientes de los grupos C+D, que estaban asociados con la SG ( $p<0,05$ ) (Tabla 23). Estos ocho genes se encontraban infraexpresados en los pacientes que estaban vivos en el momento del análisis.

**Tabla 23. Genes asociados con la SG ( $p<0,05$ ), obtenidos del análisis de expresión diferencial de los pacientes del grupo de pronóstico intermedio, comparando su nivel de expresión en pacientes vivos respecto a los fallecidos.**

Símbolo	logFC <sup>a</sup>	p valor <sup>b</sup>
<i>TYK2</i>	-0,40	0,04
<i>SYNCRIP</i>	-0,50	0,02
<i>TBC1D4</i>	-0,64	<0,01
<i>JUND</i>	-0,66	0,02
<i>IRAK1BP1</i>	-0,68	0,04
<i>HMG3</i>	-0,77	0,01
<i>SCYL3</i>	-0,80	0,01
<i>SMARCA2</i>	-1,12	0,01

<sup>a</sup> log FC = *log fold change*. Ratio entre los niveles de expresión de las dos condiciones comparadas (vivo/muerto).<sup>b</sup> p valor < 0,05.

### 1.3. Determinación del valor pronóstico de Rab25 y Serpina-1 por inmunohistoquímica en un estudio retrospectivo (cohorte IV).

#### 1.3.1. Características de los pacientes.

La determinación del valor pronóstico de Rab25 y Serpina-1 se realizó también mediante la detección de los niveles de expresión proteica por tinción inmunohistoquímica (IHQ) en un grupo de pacientes con CECC localmente avanzado, seleccionados de modo retrospectivo. La determinación de los niveles de Rab25 se realizó en 92 pacientes, mientras que para la detección de los niveles de Serpina-1 se utilizó un grupo menor de pacientes (n=49) debido a la falta de material biológico para analizar. Las características de estos pacientes se describen en la Tabla 24.

**Tabla 24. Características de los pacientes incluidos en el estudio retrospectivo (cohorte IV).**

Variable	Número de casos (%)
<b>Sexo</b>	
<b>Hombre</b>	86 (93,5%)
<b>Mujer</b>	6 (6,5%)
<b>Localización tumoral</b>	
<b>Cavidad oral</b>	8 (8,7%)
<b>Hipofaringe</b>	15 (16,3%)
<b>Laringe</b>	52 (56,5%)
<b>Orofaringe</b>	17 (18,5%)
<b>Tamaño tumoral</b>	
<b>T2</b>	11 (12%)
<b>T3</b>	56 (60,9%)
<b>T4</b>	25 (27,2%)
<b>Afectación ganglionar</b>	
<b>N<sup>+</sup></b>	51 (55,4%)
<b>N<sup>-</sup></b>	41 (44,6%)
<b>Estadio Tumoral (TNM)</b>	
<b>III</b>	54 (58,7%)
<b>IV</b>	38 (41,3%)
<b>Tratamiento</b>	
<b>QTI seguida de</b>	
<b>RT</b>	45 (48,9%)
<b>QRT</b>	3 (3,3%)

## Resultados

cirugía	43 (46,7%)
---------	------------

### 1.3.2. Asociación de la proteína Rab25 con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de los pacientes con CECC.

La tinción por IHQ de Rab25 presentó un patrón citoplasmático y de membrana (Figura 33). Para analizar la posible correlación entre la expresión de esta proteína y la SLRL, SLP o SG de los pacientes, se determinó la existencia o ausencia de células positivas para Rab25 en cada una de las muestras tumorales.

Observamos diferencias significativas para la SLP y la SG asociadas a la expresión de Rab25. Los pacientes con tumores que expresaban la proteína Rab25 tenían una supervivencia libre de progresión ( $p=0,01$ ) y una supervivencia global ( $p=0,05$ ) superiores a los pacientes en cuyos tumores la proteína Rab25 era indetectable (Figura 34. A-C, respectivamente).

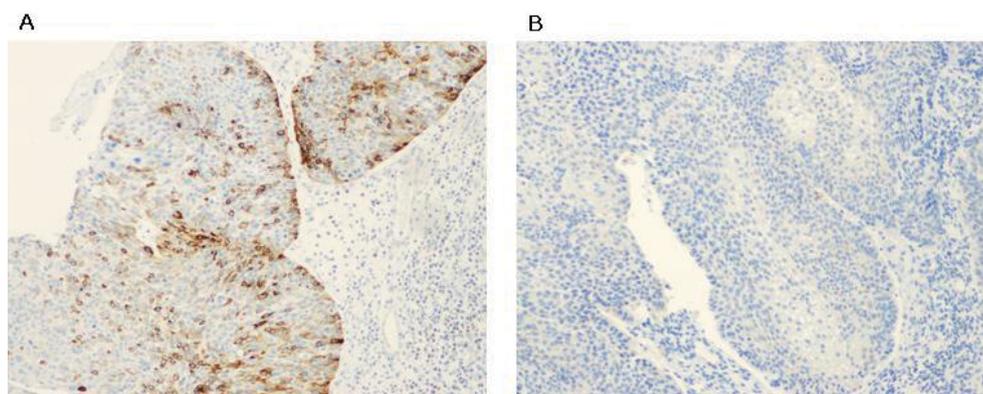


Figura 33. Inmunohistoquímica de Rab25 en tumores con CECC localmente avanzado. A) Tumor que presenta elevada expresión de Rab25 y B) Tumor que no expresa la proteína Rab25.

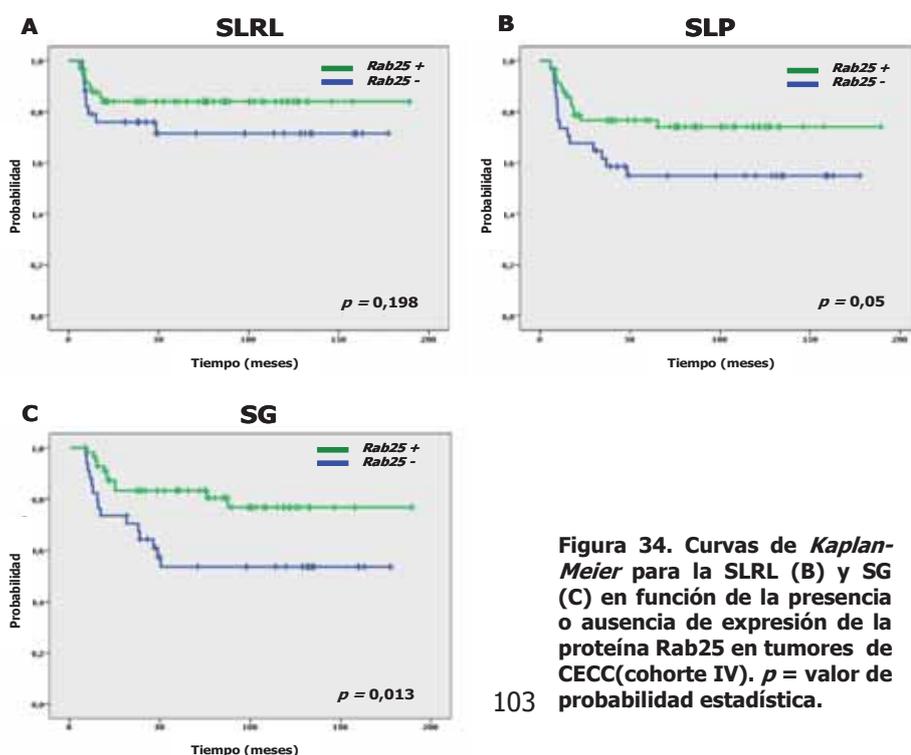
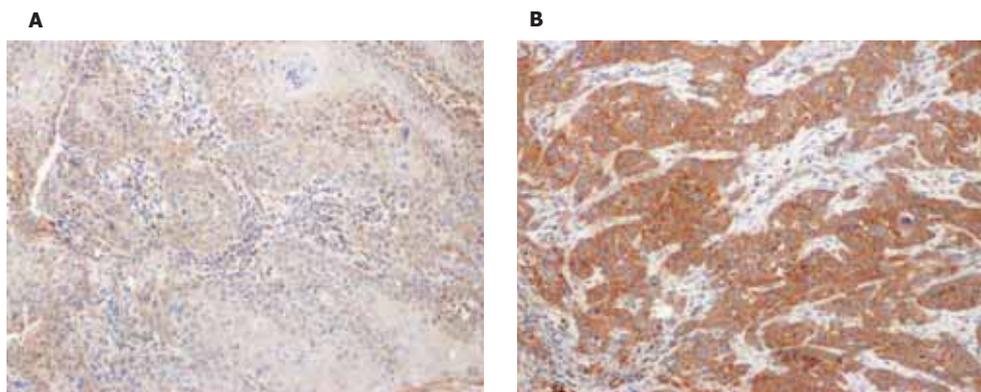


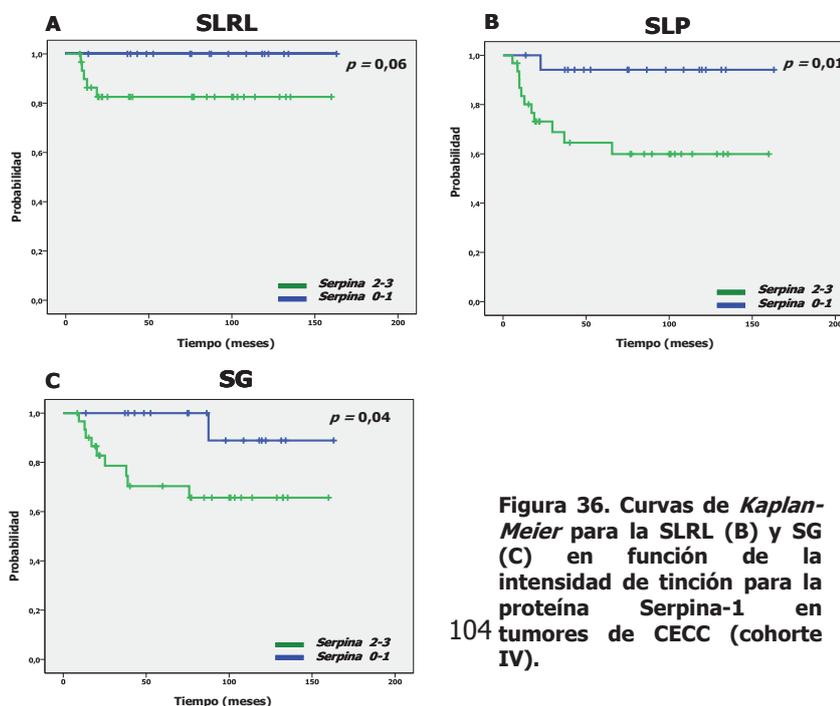
Figura 34. Curvas de *Kaplan-Meier* para la SLRL (B) y SG (C) en función de la presencia o ausencia de expresión de la proteína Rab25 en tumores de CECC (cohorte IV).  $p$  = valor de probabilidad estadística.

### 1.3.3. Asociación de la proteína Serpina-1 con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de los pacientes con CECC.

La proteína Serpina-1 detectada por IHQ presenta una localización citoplasmática (Figura 35). El análisis de la posible correlación entre la expresión de Serpina-1 y la SLRL, SLP o SG de los pacientes, se determinó a partir de la intensidad de la tinción de los cortes tumorales. Establecimos 4 niveles de intensidad, de menor a mayor intensidad: 0, 1, 2 y 3. El análisis de *Kaplan-Meier* con estos 4 grupos para detectar la existencia de diferencias significativas en la SG, SLRL y SLP, mostraba que los pacientes con tumores que tenían una intensidad de tinción 2 – 3 presentaban una SLP ( $p = 0,01$ ) y una SG ( $p = 0,04$ ) menores que aquellos pacientes en los que no se detectaba tinción para Serpina-1 o aquellos que presentaban intensidad 1 (Figura 36. A-C). Para la supervivencia libre de recidiva local había diferencias entre los pacientes con intensidades de tinción 2 – 3 vs 0 – 1, pero no alcanzaban la significancia estadística ( $p = 0,06$ ).



**Figura 35. Inmunohistoquímica de Serpina-1 en tumores con CECC localmente avanzado. Diferentes intensidades de tinción para proteína. A) Tumor con una tinción de baja intensidad y B) tumor con tinción de intensidad alta.**



**Figura 36. Curvas de *Kaplan-Meier* para la SLRL (B) y SG (C) en función de la intensidad de tinción para la proteína Serpina-1 en tumores de CECC (cohorte IV).**

## 2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA FIRMA GENÉTICA CON VALOR PRONÓSTICO

### 2.1. Características del *Training set* y *Validation set*.

Para generar firmas genéticas con valor pronóstico, partimos de los datos de expresión de un total de 90 pacientes, que estaban incluidos en la serie de 110 pacientes descrita en la Tabla 19. Estos pacientes correspondían a las cohortes I+III, que fueron incluidos en dos estudios de microarrays; el primero incluyó 63 muestras, mientras que el segundo incluyó 27 muestras. Ambos estudios se realizaron con la plataforma Affymetrix. Para el primer estudio se utilizó el chip *HG-U133 Plus 2.A* y el chip *HG-U133 Plus 2.0*. para el segundo estudio. Estos pacientes configuraron el *training set* o población de entrenamiento.

La validación de las firmas genéticas se realizó utilizando los datos de los perfiles de expresión de dos estudios independientes previamente descritos: *GSE2837* [150], obtenido de la base *Gene Expression Omnibus (GEO)* y *E-TABM-302* [171] disponible en la base de datos *Array Express (validation set)*.

El primero de los estudios (*GSE2837*) incluyó 28 muestras, incluidas en bloques de parafina, de pacientes con CECC en estadios localmente avanzados (III y IV), con un seguimiento medio de 33 meses que fueron tratados inicialmente con cirugía seguida de QRT/RT y que se analizaron utilizando el chip *Affymetrix Human Genome X3P GeneChip*. De estos pacientes disponíamos además de los datos de supervivencia global y recidiva tumoral.

El segundo *validation set (E-TABM-302)* incluía 81 pacientes con CECC en diferentes estadios de la enfermedad (I-IV), con un seguimiento medio de 80 meses, y tratados inicialmente con cirugía seguida de QRT/RT y que fueron analizados con el chip *HGU133\_Plus2* de *Affymetrix*. De estos pacientes se disponía de los datos de supervivencia global.

Las tablas 1 y 2 del anexo recogen de manera detallada las características clínicas de los pacientes de ambos estudios.

### **2.2. Diseño de firmas genéticas con valor pronóstico: selección de genes expresados diferencialmente en función de la supervivencia libre de recidiva local y la supervivencia global de los pacientes.**

Con objeto de identificar una firma genética asociada con la evolución clínica de los pacientes, realizamos un estudio de expresión diferencial a partir de los datos de expresión de las muestras analizadas por microarrays. El análisis se llevó a cabo con la herramienta *limma* de Bioconductor.

En el análisis de supervivencia incluimos 34 de los 90 pacientes analizados, por tener un seguimiento mínimo de 24 meses. En el estudio se compararon los niveles de expresión de los pacientes que habían fallecido con aquellos que permanecían vivos a los dos años de la finalización del tratamiento.

Como resultado obtuvimos una firma genética de 62 genes que presentaban diferencias significativas en los niveles de expresión entre los pacientes vivos y los que habían muerto en el momento del análisis ( $p < 0,05$ ) (Tabla 25 y 3 del anexo). La mayoría de estos genes se encontraban más expresados en los pacientes que permanecían vivos que en aquellos que habían fallecido, tratándose por lo tanto de marcadores de buen pronóstico.

De igual manera, se analizaron los datos de expresión para generar una firma genética capaz de predecir la recidiva tumoral. En este caso para el análisis de expresión diferencial se tuvieron en cuenta todas las muestras ( $n=90$ ) que habíamos analizado por microarrays. Se encontraron 48 genes que estaban expresados de manera diferencial entre aquellos pacientes que presentaban recidivas locales respecto a los que no habían recidivado en el momento del análisis (Tabla 25 y 4 del anexo).

## Resultados

**Tabla 25. Genes incluidos en las firmas pronósticas de la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de recidiva local (SLRL).**

<b>FIRMA SG<sup>a</sup></b>					<b>FIRMA SLRL<sup>b</sup></b>			
ABCE1	FLJ21511	LGALS7	PLA2G3	TIMELESS	AKAP1	GPX4	PHF8	TIMP3
AMMECR1	FLVCR2	LTB4R	PRSS2	TMCO3	C1orf115	HLF	PIK3C2B	TRIOBP
ARG1	GNA15	LY6G6C	PTK6	TNFAIP6	CENPM	ITGA5	PPFIBP2	USP34
ARSJ	GNB1	MTF1	QSOX1	TNFRSF10B	CLDN4	KRT13	RAB11FIP1	YIPF5
BAIAP2	HAS2	MTHFD2L	<b>RAB25</b>	TRY6	CRTC3	KRT15	<b>RAB25</b>	
BOP1	ICAM1	NAPA	RELA	TTC15	DSCR6	KRT19	RAPGEFL1	
CENTD1	IPPK	NDEL1	RHOD	TUBB2A	EIF2AK3	LGALS1	RASGRP1	
CLIP1	KCNK7	NT5E	RREB1	UBE2D3	EIF2B5	LMO4	RHCG	
DENND1A	KIF3C	OVOL1	SAMD4A	UNC93A	ELF3	LOC728210	RNASSET2	
EIF3K	KLF5	PDLIM7	SCYL3	VAV2	ERBB3	LOXL2	SCYL3	
EVPL	KLHL18	PIK3R3	SFT2D2	VDR	EVPL	MAN2A2	<b>SERPINE1</b>	
FBXO46	KRT6B	PKP3	STK3	ZMAT5	FADS3	MYH14	SYK	
FGFR3					FAM102A	NCOA1	SYNGR1	
FHL3					FGFR2	NUP210	TGFBI	

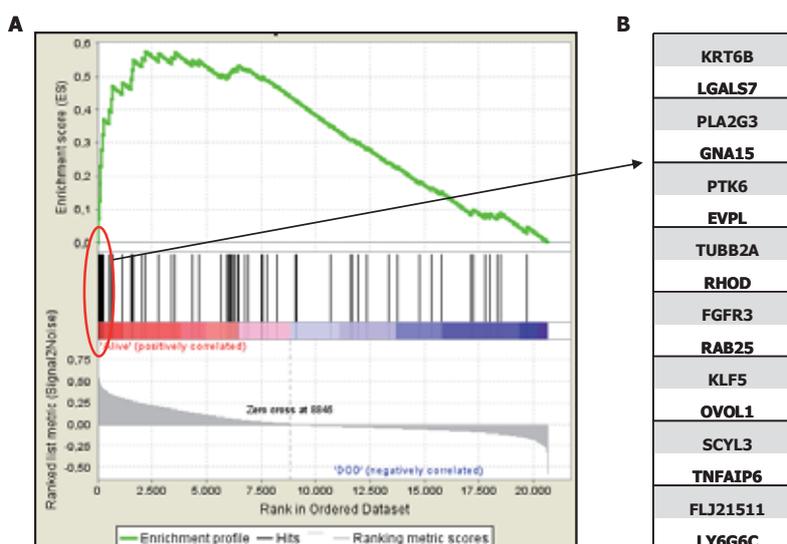
<sup>a</sup>FIRMA SG: genes diferencialmente expresados entre los pacientes muertos o vivos con un seguimiento mínimo de 24 meses ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup>FIRMA SLRL: genes diferencialmente expresados entre los pacientes con recidiva tumoral y pacientes sin recidiva ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.1. Validación de la firma genética asociada a la supervivencia global.

Con objeto de validar la firma pronóstica de SG identificada en el punto anterior, a la vez que seleccionar un grupo mínimo de genes asociados con la supervivencia de los pacientes, se realizó el análisis por *GSEA* (*Gene Set Enrichment Analysis*) utilizando los datos de expresión y supervivencia descritos para los pacientes incluidos en el estudio de microarrays *GSE2837*. El *GSEA* permite identificar bloques de genes que se encuentran enriquecidos en las muestras procedentes de dos condiciones experimentales o dos fenotipos a comparar.

Este estudio demostró un enriquecimiento de los genes de buen pronóstico pertenecientes a la firma de SG, cuya expresión era más elevada en el subgrupo de pacientes que permanecían vivos al finalizar el estudio de Chung *et al.* (*GSE2837*)[150]. En la figura 37. A se muestra el *Enrichment Plot* resultante del *GSEA*. En concreto, 16 genes de buen pronóstico incluidos en nuestra firma genética para la SG (Figura 37. B), se encontraban también sobreexpresados en los pacientes que permanecían vivos en el estudio de Chung *et al.* (2006).

## Resultados



**Figura 37. Resultados del análisis de GSEA para la validación de la firma pronóstica en relación con la supervivencia global utilizando los datos de expresión del estudio de Chung *et al.* A) Enrichment Plot. B) Subgrupo de genes de buen pronóstico cuya expresión se asocia con la supervivencia de los pacientes del estudio de Chung *et al.* (2006).**

Una vez identificado el grupo de 16 genes de buen pronóstico, validamos esta segunda firma genética asociada con la SG utilizando los datos obtenidos en un tercer estudio de microarrays independiente en el que se analizaron los niveles de expresión de las biopsias obtenidas de 81 pacientes con CECC (*E-TABM-302*) (Rickman, Millon *et al.* 2008).

Para cada una de las muestras incluidas en el estudio de Rickman *et al.* calculamos el valor medio de expresión de los 16 genes de la firma de buen pronóstico y su asociación con la supervivencia global de los pacientes incluidos en el estudio (*average score*; Métodos punto 8).

El modelo de *Cox* univariante mostró una asociación significativa entre el valor medio de expresión de la firma de 16 genes (*average score*) y la supervivencia global ( $HR = 0,55$ ,  $IC_{95\%} = 0,32-0,95$  y  $p=0,003$ ).

Distribuimos los pacientes en tres grupos en función de su valor de *average score* y determinamos la existencia de diferencias significativas en las curvas de supervivencia de los pacientes aplicando análisis de *Kaplan-Meier* y el test de *log-Rank* ( $p < 0,01$ ) (Figura 38). Los pacientes con unos niveles de expresión más bajos de la firma de 16 genes, presentaban un mayor riesgo de muerte que los que tenían niveles elevados o intermedios.

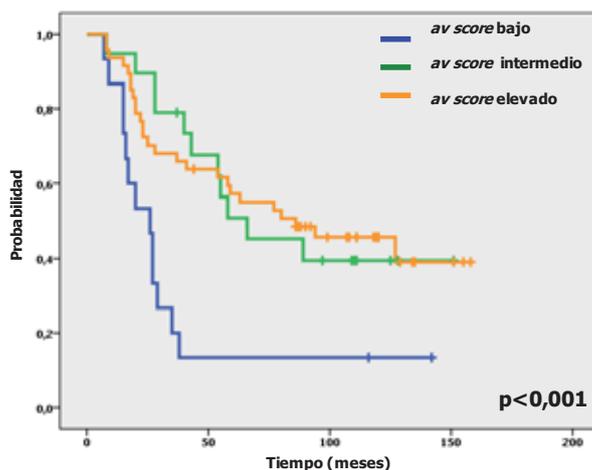


Figura 38. Curvas de *Kaplan-Meier* para la supervivencia global de los pacientes en función de los niveles de expresión de una firma genética de 16 genes. *Average score* (valor medio de expresión de los 16 genes incluidos en la firma genética).  $p$  = valor de probabilidad estadística.

### 2.2.2. Validación de la firma genética asociada con la recidiva local.

La validación de la firma genética de 45 genes asociada con la recidiva local de los pacientes con CECC se realizó únicamente con los datos de expresión del estudio de microarrays *GSE2837* [150], ya que en este caso no se disponía de los datos de recidiva local del estudio de Rickman *et al.*

Los resultados obtenidos aplicando el análisis de modelo de *Cox*, indicaban que había una asociación significativa ( $HR = 6,5$ ,  $IC_{95\%} = 1,1-37,8$  y  $p=0,03$ ) entre el valor medio de expresión de los 45 genes incluidos en la firma genética (*average score*) y la SLRL. No obstante, no observamos diferencias significativas en el análisis de *Kaplan-Meier* para la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) al clasificar los pacientes en tres grupos en función del *average score* (alto, bajo o medio) ( $p=0,33$ ).

## 3. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE MUCOSAS NORMALES Y TUMORES DE CECC LOCALMENTE AVANZADO

La transformación de tejido normal a tumoral esta constituido por diferentes etapas en las que tienen lugar cambios del nivel de expresión de distintos genes. Para detectar qué genes son importantes en este proceso de transformación tumoral, se realizó un análisis de expresión diferencial, entre las muestras tumorales ( $n=90$ ) y las mucosas normales ( $n=11$ ) incluidas en los dos estudios previos de microarrays, con la herramienta informática *limma*.

Los resultados obtenidos (Tabla 5 anexo) mostraban la existencia de 687 genes expresados de manera diferencial ( $p<0,01$ ) entre tumores y mucosas normales. De

## Resultados

estos, 167 genes estaban sobreexpresados en los tumores y 520 estaban infraexpresados.

El análisis con el programa *GOstats* (Tabla 26) dio como resultado que durante la transformación tumoral había varios procesos biológicos que se encontraban sobreexpresados como el desarrollo de la epidermis, la respuesta inmune, la remodelación tisular, los *checkpoint* mitóticos, las adhesiones célula-matriz, la adhesión celular o la regulación de la motilidad celular. Sin embargo, otros procesos biológicos como la diferenciación epitelial estaban infraexpresados.

**Tabla 26. Procesos biológicos sobreexpresados (fondo gris) e infraexpresados (fondo blanco) ( $p < 0,01$ ) en las muestras tumorales respecto a las mucosas normales.**

GO_BP_ID <sup>a</sup>	ExpCount <sup>b</sup>	Count <sup>c</sup>	Term <sup>d</sup>
GO:0006817	1	12	phosphate transport
GO:0006820	2	15	anion transport
GO:0032502	36	68	developmental process
GO:0048731	19	45	system development
GO:0008544	1	12	epidermis development
GO:0000270	0	6	peptidoglycan metabolic process
GO:0030574	0	5	collagen catabolic process
GO:0044266	0	5	multicellular organismal macromolecule catabolic process
GO:0044268	0	5	multicellular organismal protein metabolic process
GO:0044256	0	5	protein digestion
GO:0044243	0	5	multicellular organismal catabolic process
GO:0001501	2	9	skeletal development
GO:0043062	1	7	extracellular structure organization and biogenesis
GO:0032501	35	55	multicellular organismal process
GO:0001503	1	7	ossification
GO:0046888	0	3	negative regulation of hormone secretion
GO:0030199	0	3	collagen fibril organization
GO:0006955	8	19	immune response
GO:0051674	5	14	localization of cell
GO:0048771	1	7	tissue remodeling
GO:0007093	0	4	mitotic cell cycle checkpoint
GO:0007267	8	19	cell-cell signaling
GO:0007160	1	6	cell-matrix adhesion
GO:0007167	3	11	enzyme linked receptor protein signaling pathway
GO:0009888	2	8	tissue development
GO:0007155	8	19	cell adhesion
GO:0051270	1	5	regulation of cell motility
GO:0050792	0	3	regulation of viral life cycle
GO:0001944	2	8	vasculature development
GO:0040011	1	5	locomotion

## Resultados

GO_BP_ID <sup>a</sup>	ExpCount <sup>b</sup>	Count <sup>c</sup>	Term <sup>d</sup>
GO:0006118	12	26	electron transport
GO:0030855	1	7	epithelial cell differentiation
GO:0006081	1	5	aldehyde metabolic process
GO:0042354	0	4	L-fucose metabolic process
GO:0006118	12	26	electron transport

<sup>1</sup>GO: identificador de la base de datos *GOstats*; <sup>2</sup>Exp.Count: número de genes esperados que representan un proceso biológico; <sup>3</sup>Count: número de genes reales; y <sup>4</sup>Term: proceso biológico.

Entre los genes sobreexpresados en tumores encontramos *PLAU*, *PLAUR* y *SERPINA-1*, relacionados con el sistema plasminógeno y que en diferentes estudios se han relacionado con la progresión tumoral y el mal pronóstico de los pacientes. Además también encontramos la sobreexpresión de diferentes metaloproteinasas, implicadas en la degradación de la MEC y la progresión tumoral (*MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-10* y *MMP-13*).

En cuanto a los genes infraexpresados en tumores, encontramos *RAB25*, *DUOX-1* y *SERPINE-B2* que se han asociado con el buen pronóstico de los pacientes con CECC.

De nuevo, en estos resultados, aparecían los marcadores pronóstico, *RAB25* y *SERPINA-1* que hemos identificado previamente. El primero de ellos como un gen que pierde su expresión en el proceso de transformación tumoral, mientras que el segundo aparece como un gen sobreexpresado en los tumores.

Para confirmar el hallazgo de la asociación de los cambios de expresión en estos genes con el proceso de transformación neoplásica, partimos de los datos de expresión de diferentes estudios de microarrays [172-174] en los que se determinó la expresión diferencial entre muestras de CECC y mucosas normales. Analizamos la existencia o no de diferencias en la expresión de *RAB25* y *SERPINA-1* asociadas al proceso de transformación de la mucosa normal.

Los resultados confirmaron la existencia de diferencias significativas, en los cuatro estudios analizados, entre los tumores y las mucosas normales para el gen *RAB25* (Figura 39. A-D). Concretamente, las muestras tumorales presentaban una pérdida de expresión de *RAB25* respecto a las mucosas normales.

## Resultados

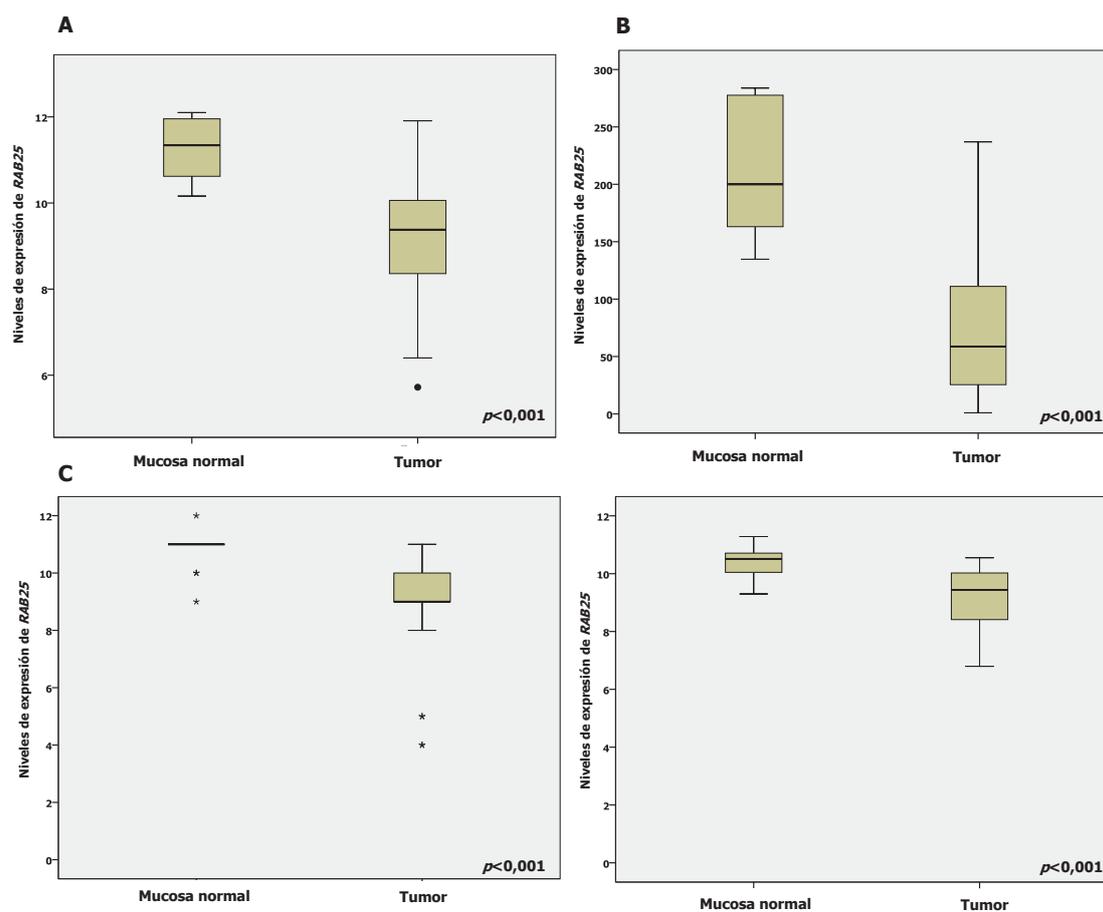


Figura 39. *Box plots* que indican diferencias en la expresión de *RAB25* entre mucosas normales y tumores de CECC, en 4 estudios de microarrays previamente descritos. A) Pavon *et al* [175], B) Ambatipudi *et al* [173], C) Thurlow *et al* [174] y D) Peng *et al* [172].  $p$  = valor de probabilidad estadística obtenido de aplicar el test estadístico de *Mann-Whitney*.

Además al analizar los datos de expresión del estudio hecho por Saintigny *et al* (*GSE26549*)[156], no observamos diferencias en los niveles de expresión de *RAB25* al comparar lesiones premalignas con diferentes grados (hiperplasias vs displasias) ( $p < 0,03$ ).

### **4. ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO DE LA MANIPULACIÓN DE GENES CON CAPACIDAD PRONÓSTICA Y PREDICTIVA EN LINEAS DE CECC.**

#### **4.1 Caracterización de un panel de líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello**

##### **4.1.1. Identificación del fenotipo *EMT* en líneas de CECC**

Con el objeto de identificar un modelo *in vitro* adecuado para evaluar funcionalmente alguno de los biomarcadores identificados en los estudios realizados con pacientes, caracterizamos un panel de 7 líneas celulares de CECC. Dos de estas líneas, UM-SCC-22A y UM-SCC-22B [169], fueron establecidas a partir del tumor primario y de una metástasis ganglionar de un mismo paciente con CECC de hipofaringe y fueron cedidas por el Dr. Thomas Carey. La línea FaDu, derivada de un tumor de hipofaringe [176], y las líneas SCC-25 y SCC-9, generadas a partir de un carcinoma de lengua, fueron obtenidas de la ATCC [177, 178]. Las líneas UM-SCC-74B [169] y UM-SCC-74B200 [179], establecidas a partir de un carcinoma de laringe, fueron cedidas por el Dr. Oakley GG [179]. Además, trabajamos con la línea inmortalizada, OKF6-Tert1, establecida a partir de queratinocitos obtenidos de la mucosa oral normal [180].

Antes de realizar experimentos para identificar su fenotipo, las diferentes líneas celulares se autentificaron utilizando el *kit Cell ID* (Promega, Madison, USA). De este modo comprobamos que todas las líneas celulares mantenían la serie de marcadores polimórficos (*ESTs*) que habían sido descritos cuando se establecieron los pases originales (Métodos punto 9.4).

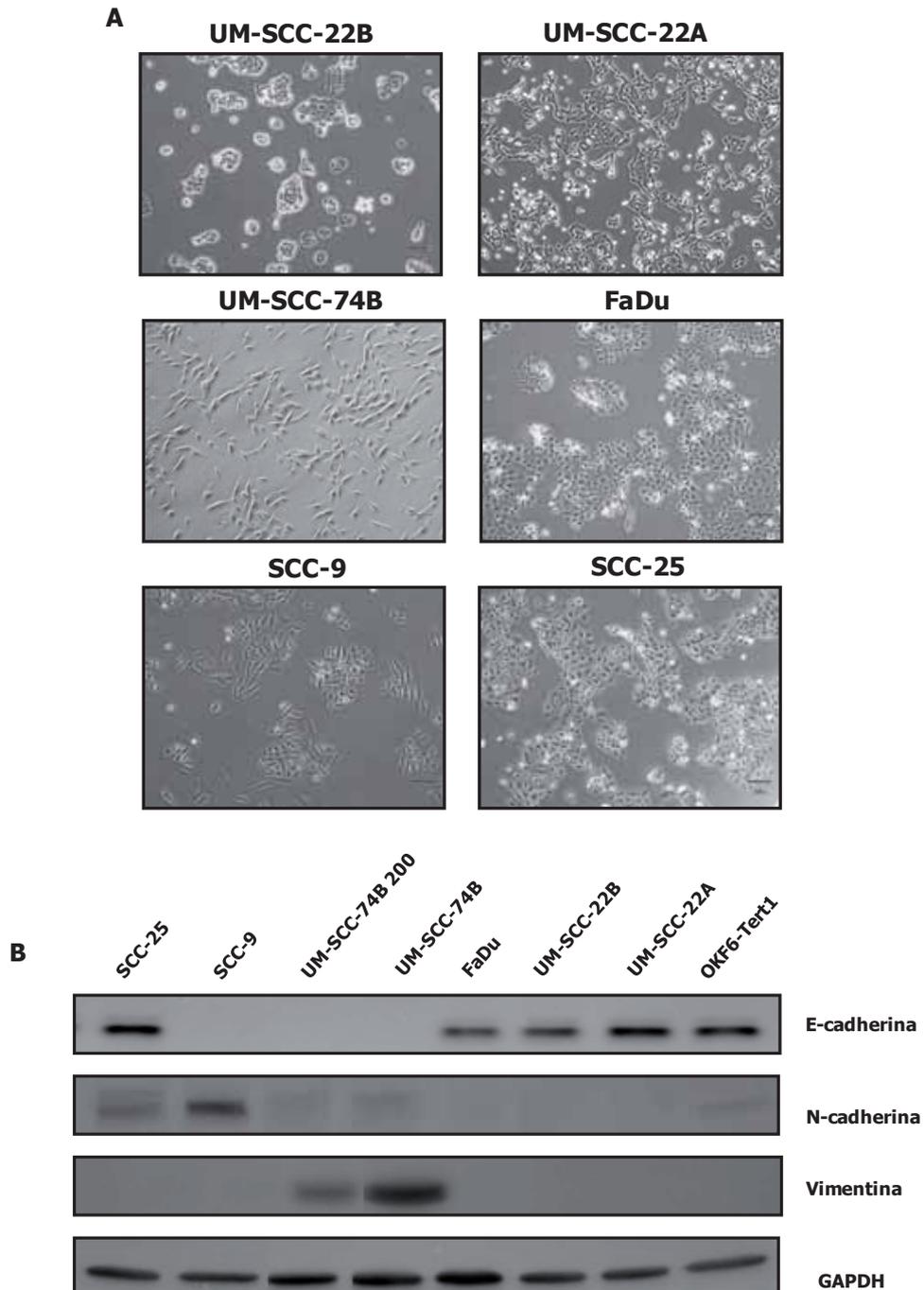
Las líneas SCC-9, UM-SCC-74B y UM-SCC-74B200 presentaban un aspecto mesenquimal, fusiforme y un crecimiento disperso, mientras que el resto de líneas celulares (SCC-25, UM-SCC-22B, UM-SCC-22A y FaDu) crecían formando agrupaciones celulares de mayor densidad y tenían una morfología epitelial (Figura 40.A).

Seguidamente analizamos, mediante *Western Blot*, los niveles de expresión de una serie de marcadores asociados con el proceso de Transición Epitelio-mesénquima (TEM) (Figura 40.B). Las líneas SCC-9, UM-SCC-74B y UM-SCC-74B-200 presentaban una pérdida de expresión de E-cadherina. UM-SCC-74B y UM-SCC-74B200 presentaban además expresión de Vimentina, mientras que SCC-9 expresaba *N-cadherina*. En cambio, el resto de líneas celulares (SCC-25, UM-SCC-22B, UM-SCC-22A y FaDu) mantenían la expresión de E-cadherina pero no expresaban Vimentina ni N-cadherina.

## Resultados

La tinción inmunocitoquímica de estos mismos marcadores confirmó los resultados obtenidos mediante *western blot*. Así, las líneas SCC9, UM-SCC-74B y UM-SCC-74B200 expresaban marcadores mesenquimales (Vimentina y N-cadherina) y perdían la expresión de E-cadherina. Por el contrario, el resto de líneas celulares mostraban expresión del marcador epitelial E-cadherina (Figura 40.C).

Estos resultados indican que las líneas SCC-9, UM-SCC-74B y UM-SCC-74B-200 expresan marcadores característicos de haber realizado el proceso TEM, mientras que el resto de líneas celulares, a pesar de haber sufrido un proceso de transformación siguen expresando el marcador epitelial E-cadherina.



## Resultados

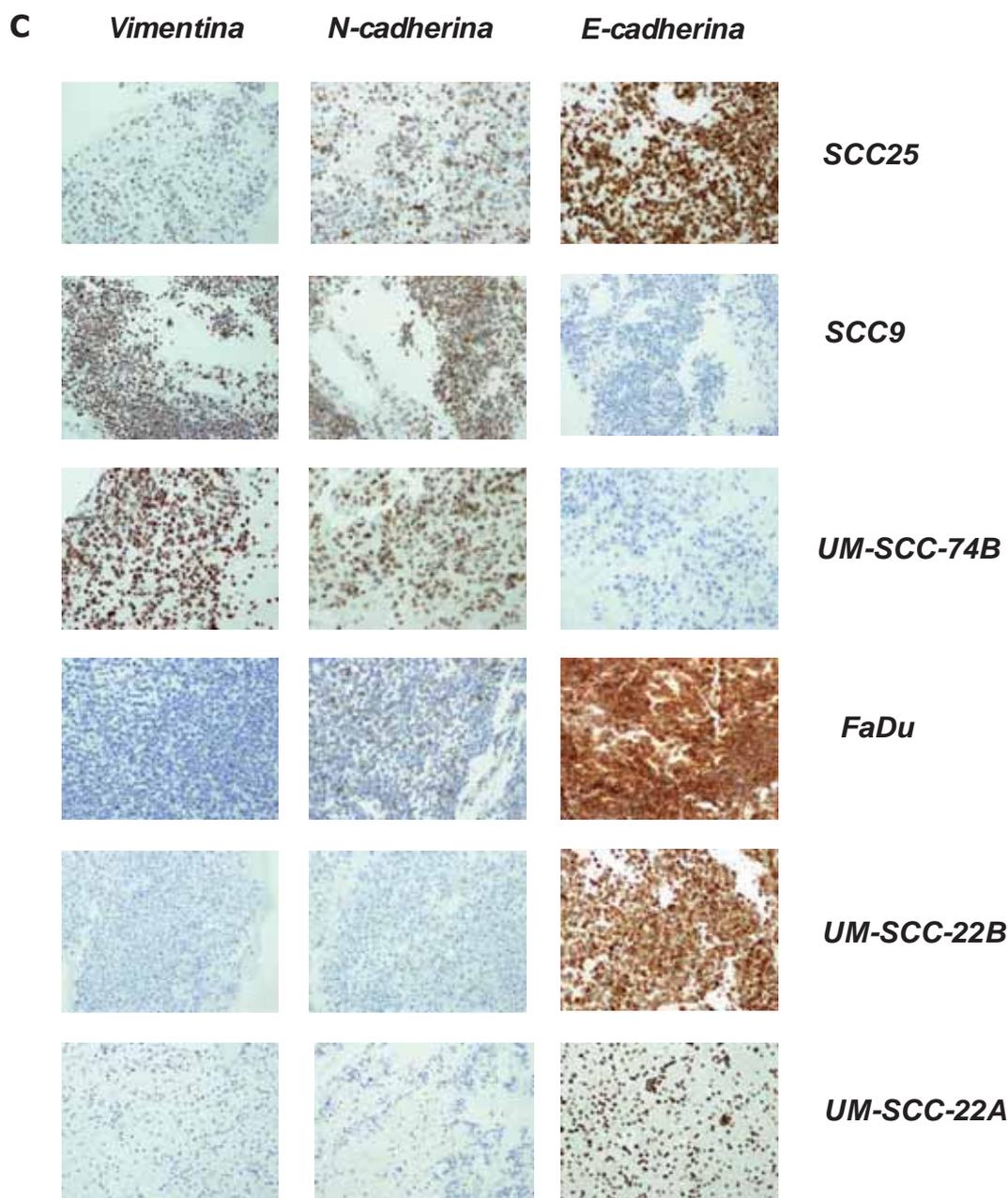


Figura 40. A) Imágenes de las líneas celulares de CECC en crecimiento exponencial, tomadas con el microscopio de luz visible (40x). B) Determinación de marcadores de TEM en las diferentes líneas de CECC mediante *Western Blot*. C) Imágenes de tinción inmunocitoquímica de las líneas celulares de CECC para las proteínas E-cadherina, N-cadherina y Vimentina.

### 4.1.2. Diferencias en el perfil de expresión génica entre líneas celulares de CECC: genotipo *EMT* vs no *EMT*.

Con el objetivo de confirmar la existencia de dos grupos de líneas celulares de CECC con características moleculares distintas, analizamos mediante microarrays de expresión tres líneas del panel celular, una de las cuales expresaba marcadores mesenquimales (SCC-9) y otras dos líneas que expresaban marcadores epiteliales (UM-SCC-22A y UM-SCC-22B). Una vez obtenidos los perfiles de expresión de las tres líneas

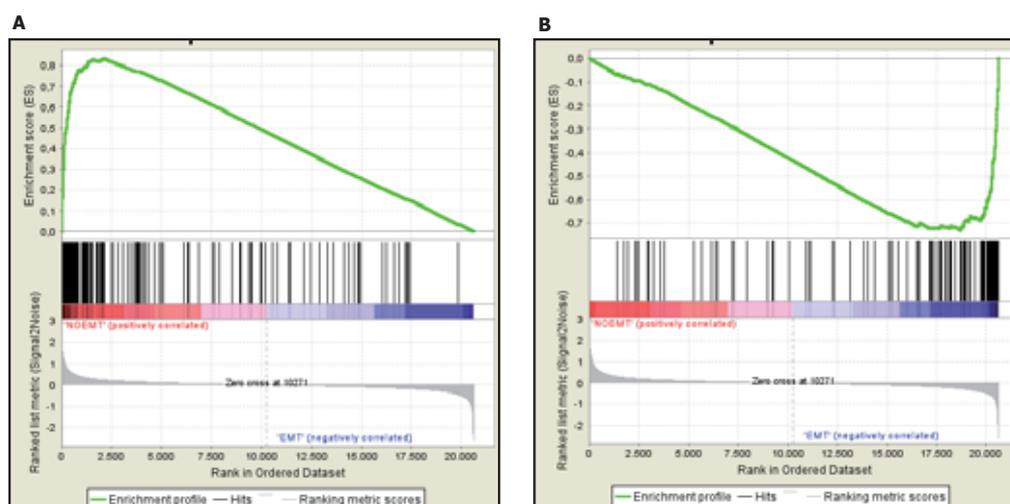
## Resultados

celulares utilizamos *GSEA* para determinar si presentaban la firma genética característica de líneas TEM, definida en el estudio de *Humtsoe et al* [181].

En el estudio de microarrays de Joseph O. Humtsoe *et al* se identificaron 353 genes diferencialmente expresados (Tabla 5 anexo) en líneas de carcinoma escamoso con fenotipo *EMT-like* respecto a líneas con fenotipo no *EMT* o epitelial. De estos genes, 208 estaban infraexpresados, mientras que los 145 restantes estaban sobreexpresados en líneas de carcinoma escamoso *EMT-like*.

Separamos la firma genética de *Humtsoe et al* en dos listados de genes según estuvieran sobreexpresados o infraexpresados en líneas con fenotipo *EMT-like*. El análisis mediante *GSEA* de nuestros datos de expresión mostró que las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B presentaban un enriquecimiento de genes infraexpresados en la firma genética *EMT-like* (Figura 41.A), mientras que la línea SCC-9 (Figura 41.B) presentaba un enriquecimiento de los genes sobreexpresados en la misma firma genética (Tabla 6 anexo). De nuevo, los resultados permitían identificar al menos dos tipos de líneas celulares de CECC.

En concreto, las líneas celulares UM-SCC-22A y UM-SCC-22B sobreexpresaban E-cadherina (*CDH1*), que es un marcador de células epiteliales mientras que la línea SCC-9 sobreexpresaba N-cadherina (*CHD2*), un gen característico de células mesenquimales. Además, las líneas con características epiteliales mostraban una sobreexpresión de los genes *RAB25* y *DUOX-1*, dos genes que identificados previamente mediante microarrays y PCR cuantitativa como marcadores de buen pronóstico en nuestra serie de pacientes con CECC.



**Figura 41. Resultados del análisis por *GSEA* para validar la firma genética que define el fenotipo TEM en líneas de CECC (Humtsoe *et al*) [181]. A) *Enrichment Plot* para la validación de genes sobreexpresados en las líneas con fenotipo epitelial. B) *Enrichment Plot* para la validación de genes infraexpresados en las líneas con fenotipo mesenquimal.**

### 4.1.3. Diferencias en el perfil de expresión génica entre líneas celulares de CECC.

Nuestras observaciones previas indicaban que las líneas SCC-9 y UM-SCC-74B presentaban un fenotipo mesenquimal, similar al subtipo 1 de tumores de mal pronóstico identificados en nuestra serie de pacientes con CECC, mientras que las líneas UM-SCC-22A, UM-SCC-22B, FaDu y SCC-25 tenían características de células epiteliales más diferenciadas, con un patrón de expresión génica similar al de los tumores del subtipo 3 de buen pronóstico. A continuación, comparamos los niveles de expresión de la línea SCC-9, que presentaba *EMT*, con los niveles de expresión de las otras dos líneas celulares con características no *EMT*. Los resultados del análisis de expresión diferencial mostraban la existencia de 1.230 genes expresados diferencialmente con un valor de probabilidad ajustada (*p.Adj.*) de 0,01.

A partir de los genes diferencialmente expresados se aplicó el análisis de ontologías utilizando el paquete informático *GOstats* para determinar los procesos biológicos y vías de señalización en los que estaban implicados los genes expresados diferencialmente al comparar las líneas celulares *EMT versus* las líneas no *EMT* (Tabla 27).

**Tabla 27. Procesos biológicos sobreexpresados (fondo gris) e infraexpresados (fondo blanco) ( $p < 0,01$ ) en la línea SCC-9 respecto a las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B.**

GO_BP_ID <sup>a</sup>	ExpCount <sup>b</sup>	Count <sup>c</sup>	Term <sup>d</sup>
GO:0007155	19	40	cell adhesion
GO:0048513	30	52	organ development
GO:0009653	26	45	anatomical structure morphogenesis
GO:0007275	58	83	multicellular organismal development
GO:0006817	2	9	phosphate transport
GO:0030511	0	2	positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway
GO:0007167	7	17	enzyme linked receptor protein signaling pathway
GO_BP_ID <sup>a</sup>	ExpCount <sup>b</sup>	Count <sup>c</sup>	Term <sup>d</sup>
GO:0048513	21	56	organ development
GO:0007275	41	81	multicellular organismal development
GO:0008544	2	13	epidermis development
GO:0030216	0	8	keratinocyte differentiation
GO:0048730	1	7	epidermis morphogenesis
GO:0031424	0	5	peptide cross-linking
GO:0007155	0	5	keratinization
GO:0043583	14	30	cell adhesion
GO:0009653	1	6	ear development
GO:0009611	19	36	anatomical structure morphogenesis

## Resultados

GO:0045683	8	20	response to wounding
GO:0045608	0	2	negative regulation of epidermis development

<sup>1</sup>GO: identificador de la base de datos *GOstats*; <sup>2</sup>Exp.Count: número de genes esperados que representan un proceso biológico; <sup>3</sup>Count: número de genes reales determinados en el análisis; y <sup>4</sup>Term: proceso biológico.

Entre las vías moleculares sobreexpresadas, cabe destacar la regulación positiva de la vía de señalización mediada por el receptor de *TGF-β*. Mientras que los procesos biológicos de diferenciación y desarrollo, se encontrarían infraexpresados.

### 4.2. Citotoxicidad inducida por tratamiento con cisplatino y determinación de los niveles de expresión de *RAB25*, *SERPINA-1*, *DUOX-1*, *RAB11A*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TGM3* y *FHL2* en líneas celulares de CECC.

El cisplatino es la base del tratamiento genotóxico que se aplica a los pacientes con CECC en estadios avanzados (III y IV).

El estudio de la sensibilidad o resistencia de las líneas celulares tras la exposición al cisplatino, y de las vías implicadas en la respuesta, podría ayudar a explicar las diferencias en la respuesta al tratamiento con cisplatino, observadas en los pacientes con CECC.

Para determinar si las líneas celulares de cabeza y cuello eran sensibles o resistentes al tratamiento con cisplatino realizamos una serie de ensayos de citotoxicidad (*XTT*). Para ello, expusimos las líneas de CECC a un rango de concentraciones crecientes de cisplatino durante 48h y calculamos la  $IC_{50}$  del cisplatino ( $\mu M$ ) para cada una de las líneas (Figura 42).

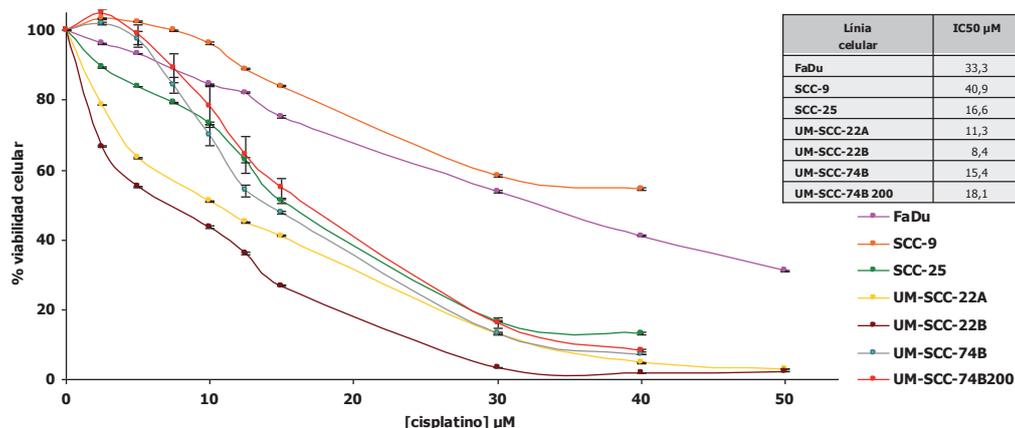
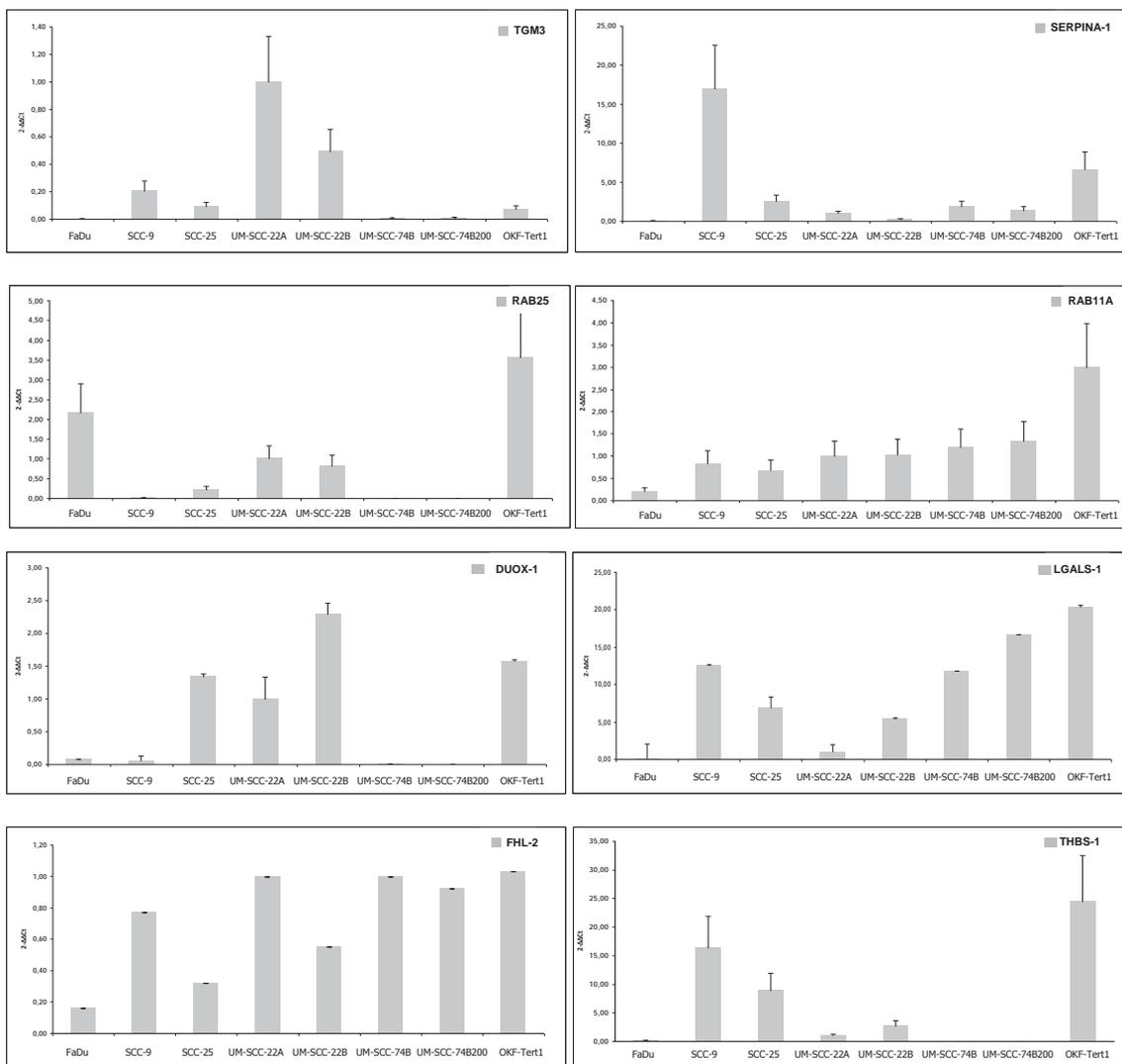


Figura 42. Curvas dosis-respuesta asociadas al tratamiento durante 48 horas con cisplatino de las diferentes líneas de CECC y tabla de los valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) de cisplatino para cada línea celular. Las barras de error representan el error estándar.

## Resultados

En la figura 42 se puede observar que las líneas SCC-9 y FaDu eran las más resistentes al efecto del cisplatino, mientras que las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B presentaban mayor sensibilidad al tratamiento con este fármaco.

A continuación, determinamos por cPCR, en todas las líneas celulares incluidas en el estudio, la expresión de los siguientes marcadores de buen o mal pronóstico, previamente identificados en pacientes con CECC: *RAB25*, *SERPINA-1*, *DUOX-1*, *RAB11A*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TGM3* y *FHL2* (Figura 43).



**Figura 43.** Histogramas de los niveles de expresión obtenidos por cPCR ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) para los genes *RAB25*, *SERPINA-1*, *DUOX-1*, *RAB11A*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TGM3* y *FHL2* en las diferentes líneas celulares. La línea UM-SCC-22A se utilizó como referencia. Las barras de error representan el error estándar.

Posteriormente se realizó un análisis estadístico para evaluar si existía una correlación entre la sensibilidad al cisplatino y los niveles de expresión de los genes determinados por cPCR. Se observó (Tabla 28) que las líneas celulares, que tenían niveles de expresión más bajos de *SERPINA-1* presentaban una respuesta citotóxica al cisplatino

## Resultados

significativamente mayor ( $p < 0,01$ ); es decir, eran más sensibles a este fármaco, que las líneas celulares que tenían niveles de expresión más altos de este gen.

**Tabla 28. Coeficientes de correlación de *Pearson* para el modelo lineal bivariante entre la  $IC_{50}$  y la expresión de *RAB25*, *SERPINA-1*, *DUOX-1*, *RAB11A*, *THBS-1*, *LGALS1*, *TGM3* y *FHL2* en las diferentes líneas celulares de CECC.**

	<i>FHL2</i>	<i>SERPINA 1</i>	<i>RAB11A</i>	<i>RAB25</i>	<i>TGM3</i>	<i>THBS1</i>	<i>DUOX-1</i>	<i>LGALS-1</i>
Coef de correlación de <i>Pearson</i>	0,1	0,978	-0,308	-0,519	-0,328	0,833	-0,569	0,502
Significancia (bilateral)	0,850	<b>0,001**</b>	0,552	0,291	0,526	<b>0,040*</b>	0,268	0,310

\* existencia de diferencias significativas con  $p < 0,05$ . \*\* existencia de diferencias significativas con  $p < 0,01$ .

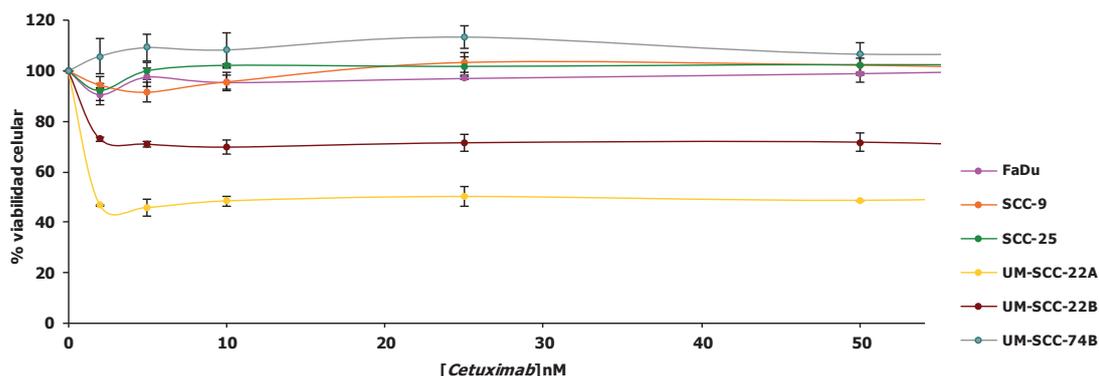
### 4.3. Estudio de citotoxicidad por tratamiento con *Cetuximab* o la combinación de *Cetuximab* con cisplatino en las líneas de CECC.

La mayoría de CECCs sobreexpresan *EGFR* [40], por lo que la inhibición de la vía de señalización de *EGFR* representa una estrategia racional en el tratamiento de esta enfermedad. El *Cetuximab* es un anticuerpo monoclonal con una importancia clínica creciente en el tratamiento de los pacientes con CECC, especialmente en combinación con RT. Sin embargo, la respuesta a este fármaco es limitada, y solo consiguen beneficiarse un porcentaje bajo de los pacientes tratados. Actualmente, no existen marcadores moleculares que hayan sido introducidos en la práctica clínica para poder determinar qué pacientes responderán y cuales mostrarán resistencia al tratamiento con *Cetuximab*. El estudio de la respuesta a *Cetuximab* en líneas celulares de CECC puede ayudar a definir estos marcadores.

En nuestro estudio *in vitro* analizamos la citotoxicidad inducida en las diferentes líneas celulares tras la exposición a *Cetuximab* durante 120h. Los resultados muestran que las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B eran sensibles al tratamiento con *Cetuximab*. El resto de líneas analizadas presentaban resistencia al fármaco (Figura 44).

En estudios adicionales se observó, de manera inesperada, que a pesar de aumentar la concentración de trabajo hasta 3000 nM, o de incrementar el tiempo de exposición al fármaco, las líneas celulares SCC-9, SCC-25, UM-SCC-74B y FaDu no experimentaban una reducción en la viabilidad celular y por tanto continuaban presentando resistencia a *Cetuximab* (resultados no mostrados).

## Resultados



**Figura 44.** Curvas dosis-respuesta obtenidas al tratar las diferentes líneas celulares durante 120h con un rango creciente de concentraciones de *Cetuximab*. Las barras de error representan el error estándar.

En las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B, sensibles a *Cetuximab*, el número de células viables disminuye considerablemente desde la concentración inicial (2nM) y se estabiliza en el siguiente punto de concentración (5nM) en ambos casos (efecto *plateau*) (Figura 44).

Recientemente se han iniciado diversos estudios clínicos, en los que se determina la efectividad de la combinación de *Cetuximab* y cisplatino para el tratamiento de los pacientes con CECC. Para analizar si esta combinación tenía un efecto aditivo o sinérgico, *in vitro*, evaluamos por *XTT* el efecto de la exposición conjunta a ambos fármacos en las líneas que presentaban sensibilidad al tratamiento con *Cetuximab*, UM-SCC-22A y UM-SCC-22B, además de la línea SCC-9, resistente y que se utilizó como control (Figura 45).

Los resultados mostraron que en las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B el tratamiento con *Cetuximab* y cisplatino tenía un efecto significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor que cuando se trataban las células únicamente con cisplatino. En cambio, para la línea SCC-9, resistente al *Cetuximab*, la combinación de ambos fármacos no suponía una disminución adicional de la viabilidad celular respecto al tratamiento con cisplatino.

## Resultados

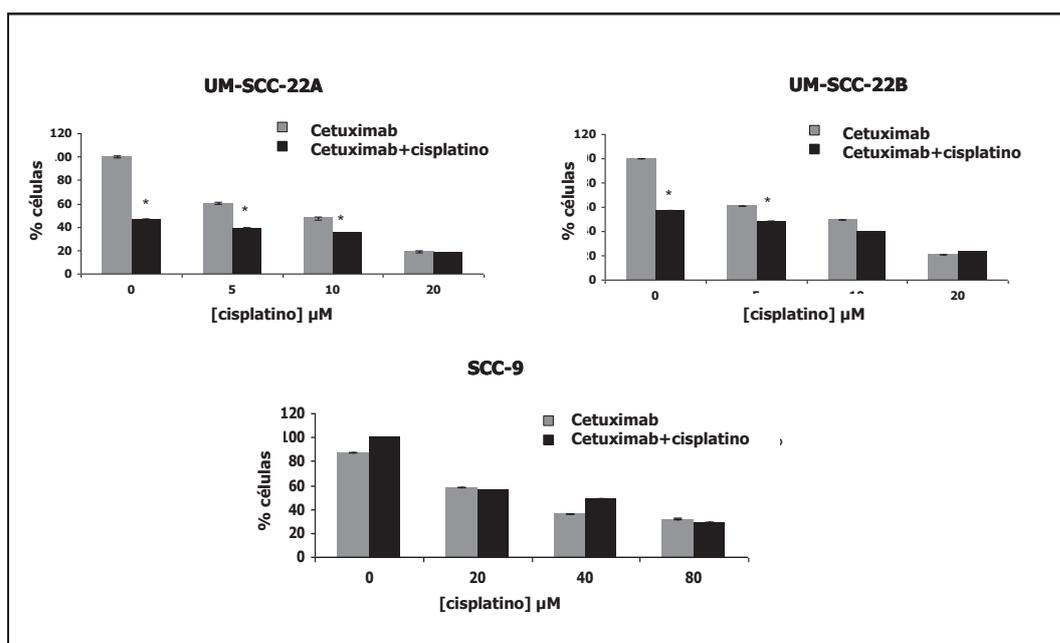


Figura 45. Efecto de la combinación del *Cetuximab* y cisplatino sobre la viabilidad de las diferentes líneas celulares de CECC. [*Cetuximab*] =10 nM, las concentraciones de cisplatino corresponden a la línea a la  $IC_{50}/2$ ,  $IC_{50}$ ,  $2IC_{50}$  de cada línea. \*  $p < 0,05$ . Las barras de error representan el error estándar.

### 4.4. Estudio funcional *in vitro* para determinar el papel de la proteína Rab25 en la respuesta de las células tumorales al tratamiento con cisplatino.

#### 4.4.1. Sobreexpresión e infraexpresión de *RAB25* en líneas de CECC.

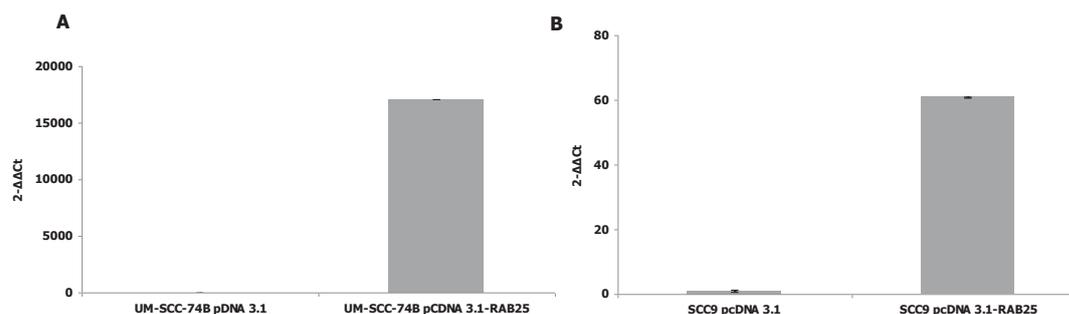
El estudio previo de microarrays llevado a cabo por nuestro grupo, en pacientes con CECC, así como los estudios de asociación de los niveles de expresión por cPCR y la validación posterior por inmunohistoquímica, en un grupo independiente de pacientes con CECC, asociaban los niveles bajos de expresión de *RAB25* en biopsias tumorales pre-tratamiento con peor pronóstico en pacientes con CECC.

Con la finalidad de estudiar si *RAB25* era un gen implicado en alguno de los fenotipos asociados al comportamiento maligno del tumor (proliferación, resistencia al tratamiento, migración o invasividad), se transfectaron las líneas UM-SCC-74B y SCC-9 con el plásmido *pcDNA3.1-HA-RAB25* con objeto de sobreexpresar esta proteína.

Las dos líneas transfectadas presentaban niveles bajos de *RAB25*, en comparación con la línea de referencia UM-SCC-22A (Figura 43).

En la Figura 46 se muestran los niveles de expresión de *RAB25* tras la transfección. Después de la selección con geneticina se obtuvieron clones estables de las dos líneas celulares que sobreexpresaban *RAB25*.

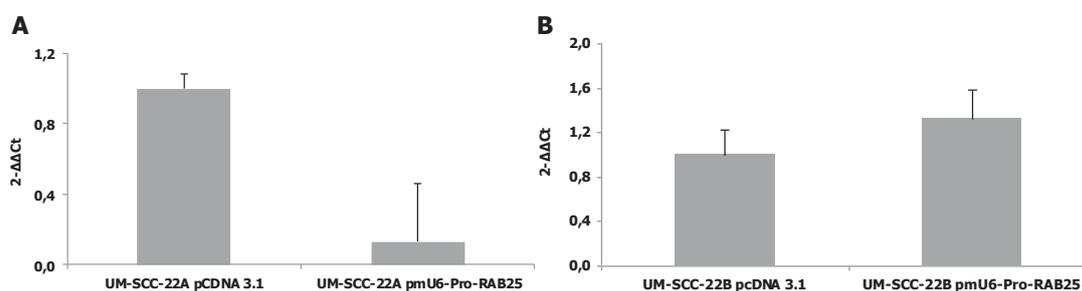
## Resultados



**Figura 46.** Determinación de los niveles de mRNA de *RAB25* por cPCR de las líneas UM-SCC-74B (A) y SCC-9 (B) transfectadas con el plásmido *pCDNA 3.1 HA-RAB25*, 72 horas después de la transfección. Las barras de error representan el error estándar.

Del mismo modo, y para completar la evaluación del efecto de *RAB25*, sobre el fenotipo tumoral, se transflectaron las células del panel de líneas que presentaban niveles más altos de *RAB25*, como UM-SCC-22A y UM-SCC-22B con el plásmido *mu6Pro-shRAB25*, portador de un *short hairpin* para *RAB25* capaz de inducir la infraexpresión del gen.

Pasadas 72 horas desde la transfección, la línea UM-SCC-22A presentaba una infraexpresión de *RAB25* de aproximadamente un 77% respecto al control. En cambio, la línea UM-SCC-22B mantenía unos niveles de expresión de *RAB25* similares a los de esta línea celular transflectada con el vector vacío (Figura 47). A pesar de los buenos resultados de la transfección de la línea UM-SCC-22A, no se obtuvieron clones estables debido a que las células que infraexpresaban *RAB25* morían tras 20 días en cultivo. La alta mortalidad de las células podría asociarse al hecho de que *RAB25* sea un gen esencial para la supervivencia de estas líneas celulares.



**Figura 47.** Determinación de los niveles de mRNA de *RAB25* por cPCR de las líneas UM-SCC-22A (A) y UM-SCC-22B (B), 72 horas después de la transfección con el plásmido *mu6Pro-shRAB25*. Las barras de error representan el error estándar.

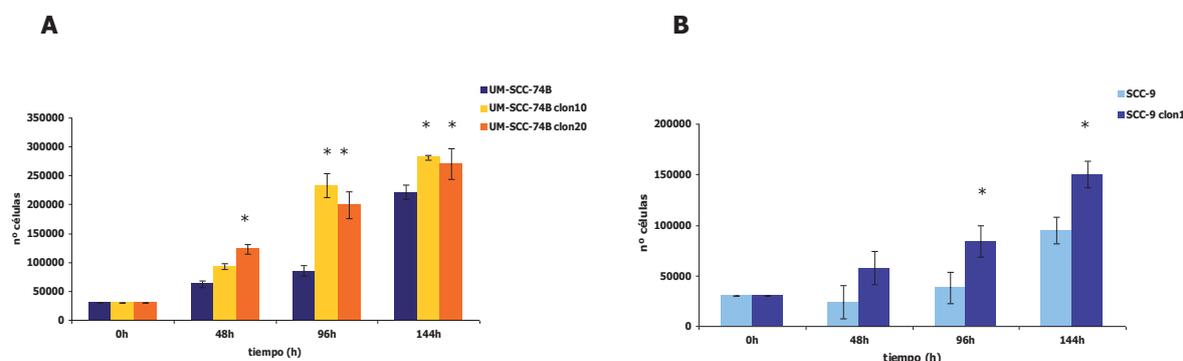
### 4.4.2. Caracterización de los clones de *RAB25*.

Una vez establecidos clones estables, analizamos si la sobreexpresión de *RAB25* tenía algún efecto sobre la proliferación celular, la sensibilidad al cisplatino y la capacidad de migración e invasión de las células tumorales.

#### 4.4.2.1. La sobreexpresión de *RAB25* aumenta la tasa de proliferación celular en las líneas de CECC.

La determinación de la tasa de proliferación, a través del conteo del número de células mediante el contador electrónico *Cell Scepter* (Millipore, Darmstadt, Alemania), tras 48h, 96h y 144h de crecimiento, mostró un aumento de la tasa de proliferación de los clones UM-SCC-74B que sobreexpresaban el gen *RAB25* (UM-SCC-74B clon 10 y UM-SCC-74B clon 20) respecto a la línea *WT* (Figura 48. A). Observamos diferencias significativas en los tres tiempos analizados ( $p < 0.05$ ). Además el análisis estadístico indicó que no había diferencias en la tasa de proliferación al comparar entre ellos los clones UM-SCC-74B clon10 y UM-SCC-74B clon20.

Del mismo modo los ensayos de proliferación para la línea SCC-9 mostraron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la proliferación celular cuando se sobreexpresaba la proteína Rab25 respecto a las células que no la expresaban, en el período de 96h a 144h (Figura 48. B).



**Figura 48. Determinación de la proliferación celular en las líneas UM-SCC-74B (A) y SCC-9 (B) y las correspondientes líneas derivadas con una sobreexpresión de *RAB25*.** \*  $p < 0,05$ , obtenida de aplicar la prueba estadística de *U-Mann Whitney* ( $n=6$ ). Las barras de error representan la desviación estándar.

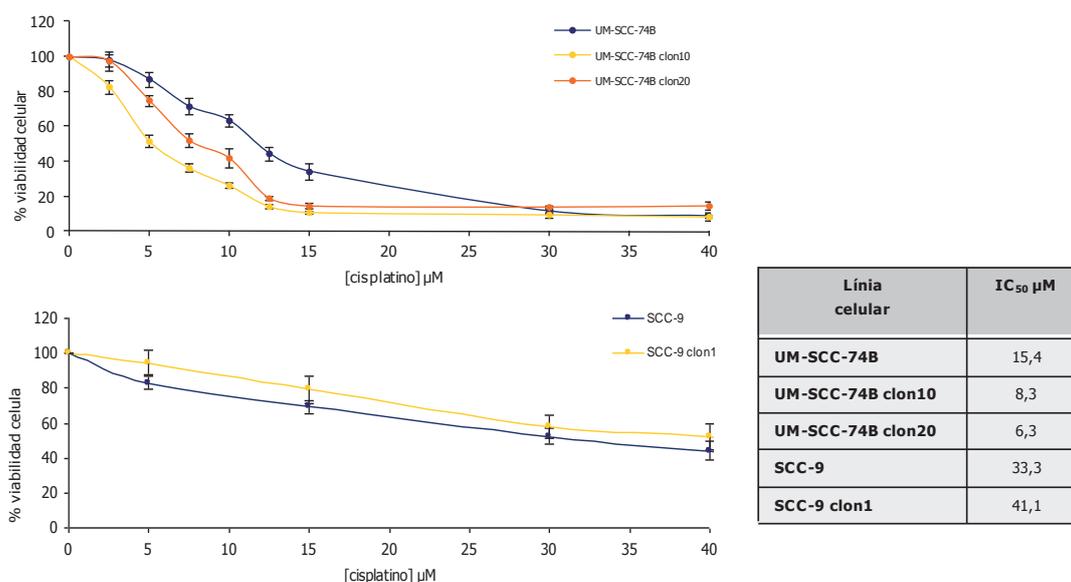
#### 4.4.2.2. La sobreexpresión de *RAB25* aumenta la sensibilidad al cisplatino de la línea UM-SCC-74B de CECC.

Para determinar si la sobreexpresión de *RAB25* tenía algún efecto sobre la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con cisplatino, se realizaron ensayos de citotoxicidad de los clones estables que sobreexpresaban *RAB25* y las correspondientes

## Resultados

líneas parentales. La sobreexpresión de *RAB25* en la línea UM-SCC-74B incrementaba de manera considerable la sensibilidad de las células al tratamiento con este fármaco (Figura 49.A). Como se puede observar en la Figura 49.B, la  $IC_{50}$  para el cisplatino se reducía a la mitad en aquellas células que sobreexpresaban *RAB25* en comparación con la línea parental ( $p=0,05$ , *Mann-Whitney*).

Sin embargo, estos resultados no se hallaron para la línea SCC-9, en la que la sobreexpresión de *RAB25* no alteraba la sensibilidad al cisplatino respecto a la línea parental.



**Figura 49. Curvas dosis-respuesta y tabla de los valores de  $IC_{50}$  ( $\mu$ M) obtenidos al exponer durante 48h a un rango creciente de concentraciones de cisplatino las líneas UM-SCC-74B y SCC-9 y sus clones que sobreexpresan *RAB25*, evaluado por ensayo de *XTT*. Las barras de error representan la desviación estándar.**

A continuación, realizamos un experimento de tinción nuclear para determinar si el incremento de la sensibilidad al cisplatino observado en los clones de la línea celular UM-SCC-74B que sobreexpresaban *RAB25* era debido a un incremento de la apoptosis. Las líneas UM-SCC-74B clon10, UM-SCC-74B clon20 y su parental UM-SCC-74B fueron expuestas a una concentración  $IC_{50}$  de cisplatino (15  $\mu$ M) durante 24h. Posteriormente realizamos una tinción nuclear con el colorante *DAPI* y observamos al microscopio de fluorescencia la presencia de núcleos celulares con condensación y fragmentación nuclear. Las observaciones indicaban una mayor presencia de núcleos apoptóticos, en aquellas células que tenían sobreexpresión de *RAB25* (Figura 50).

Por el contrario, no se observó más inducción de apoptosis en la líneas SCC-9, que sobreexpresaban *RAB25* respecto a las líneas parentales (resultados no mostrados).

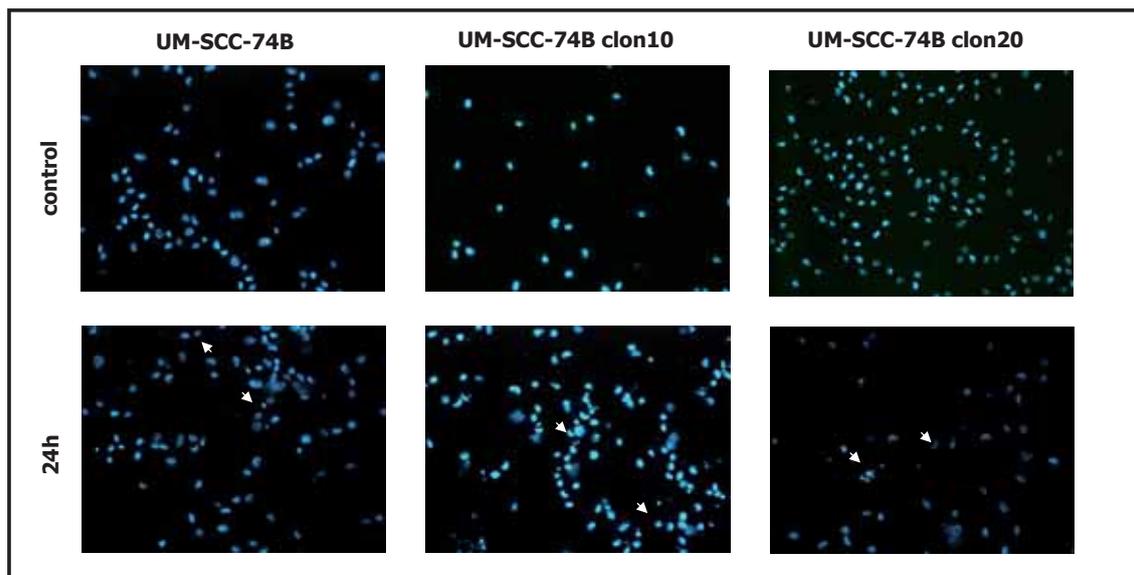


Figura 50. Imágenes tomadas al microscopio de fluorescencia (10x) del experimento de recuento apoptótico, por tinción nuclear con *DAPI* en la línea UM-SCC-74B y los clones con sobreexpresión de *RAB25* (UM-SCC-74B clon10 y UM-SCC-74B clon20) 24 horas después de la exposición al cisplatino. (Control: células tratadas con vehículo).

#### 4.4.2.3. La sobreexpresión de *RAB25* disminuye la capacidad de dispersión, migración e invasión de las células de CECC.

Los ensayos de *scattering* nos permitieron determinar la capacidad de dispersión celular de las líneas UM-SCC-74B y UM-SCC-9 y de sus clones respectivos que sobreexpresaban la proteína Rab25. Observamos, en ambos casos, que la sobreexpresión de Rab25 disminuía la capacidad de dispersión de las células en placas de colágeno IV. Es decir, la sobreexpresión de *RAB25* promovía la agrupación celular en las líneas UM-SCC-74B clon 20 y UM-SCC-9 clon 1 (Figura 51).

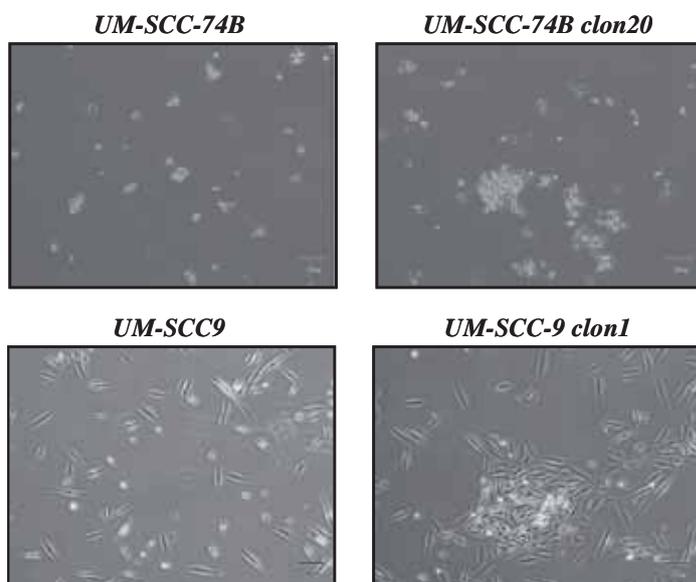


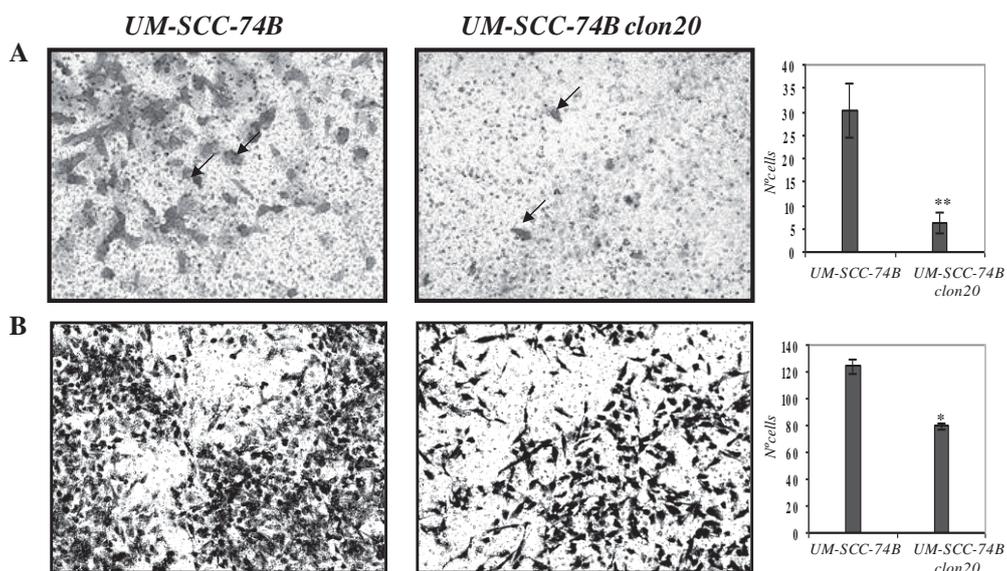
Figura 51. Experimento de *scattering* para las líneas UM-SCC-74B, SCC-9 y sus respectivos clones que sobreexpresan *RAB25*. Imágenes tomadas en un microscopio de luz visible

## Resultados

Para determinar si existían diferencias en la capacidad de migración celular entre las líneas *WT* y los clones que sobreexpresaban la proteína Rab25, se realizaron ensayos de migración en *transwells*.

La figura 52 muestra los resultados del conteo de número de células capaces de atravesar la membrana que separa ambos medios (uno que carece de *FBS* y otro que contiene un 20% de *FBS*). La existencia de factores solubles que estimulan la migración celular en el medio que contiene *FBS* permite determinar la capacidad de migración celular desde el medio pobre al medio rico en factores de crecimiento.

El conteo celular mostró la existencia de diferencias significativas ( $p=0,001$ , *Mann-Whitney*) entre las líneas UM-SCC-74B *WT* y UM-SCC-74B *clon20* en cuanto a la capacidad de migración (Figura 52.A). La línea celular que sobreexpresaba *RAB25* tenía menos capacidad de migración que la línea *WT*.



**Figura 52. Imágenes tomadas al microscopio de luz visible (20x) de las células capaces de migrar a través de la membrana (A) y las capaces de atravesar la membrana recubierta con Matrigel™ (B) en el ensayo de *transwells*. Líneas celulares UM-SCC-74B y UM-SCC-74B clon20.**

A continuación, determinamos la posible alteración de la capacidad de invasión de las células que sobreexpresaban la proteína Rab25. Para evaluar esta capacidad de invasión, también utilizamos ensayos de *transwells*, con la diferencia que supone el recubrimiento de la membrana porosa pre-tratada con Matrigel™ (BD, Franklin Lakes, USA), un extracto que contiene los factores de crecimiento y proteínas estructurales presentes en la matriz extracelular. De este modo, si las células tumorales son capaces de atravesar la película de Matrigel™ es indicativo de que presentan capacidad de

## Resultados

---

invasión, ya que podrían atravesar la MEC presente en los tejidos humanos e invadir regiones alejadas del tumor primario.

Los resultados de los ensayos de *transwells* indicaron que la línea UM-SCC-74 *WT* tenía una capacidad de invasión 1,4 veces mayor que el clon20 de esta línea celular ( $p=0,05$ , *Mann-Whitney*), el cual sobreexpresaba *RAB25*. Es decir, la sobreexpresión de *RAB25* en esta línea celular se asocia con una disminución de su capacidad de invasión (Figura 50.B).

## **DISCUSIÓN**



### V DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis, ha permitido establecer asociaciones entre el nivel de expresión génica en tejido tumoral y la evolución clínica de pacientes con CECC localmente avanzado, sometidos a tratamiento con quimiorradioterapia (QRT) concomitante o quimioterapia de inducción seguida de radioterapia o QRT.

En primer lugar, hemos analizado los niveles de expresión de una serie de genes candidatos, identificados a partir de un estudio previo de microarrays, y su posible asociación con la respuesta al tratamiento o con el pronóstico de los pacientes.

Además, se ha identificado una firma genética generada a partir de los datos de expresión de dos cohortes de pacientes analizadas por microarrays. Las cohortes de pacientes utilizadas en cada estudio de asociación y validación se han descrito en la sección de resultados (resumidas en la figura 28). Finalmente, se han realizado una serie de estudios funcionales para determinar el efecto de la sobreexpresión de Rab25 sobre la capacidad de proliferación, migración, invasión y sensibilidad al tratamiento con cisplatino en células humanas de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

A continuación se discute el conocimiento que aporta este trabajo en cuanto a la identificación de nuevos biomarcadores con posible aplicación clínica en el seguimiento y tratamiento de pacientes con CECC localmente avanzado.

#### **Identificación de biomarcadores asociados con la evolución clínica de los pacientes con CECC localmente avanzado.**

Los objetivos planteados en este proyecto se apoyan en los resultados obtenidos a partir de un estudio previo de microarrays realizado por nuestro grupo, en pacientes con CECC tratados con QRT o QTI seguida de RT/QRT/cirugía [175]. En el estudio previo, se identificaron 3 subtipos de tumores que presentaban diferencias en la evolución clínica de los pacientes. El subtipo de tumores de mal pronóstico, sobreexpresaba genes implicados en la vía secretora y transporte vesicular, genes implicados en el proceso de transición epitelio-mesénquima (fenotipo mesenquimal) y genes relacionados con la progresión y capacidad de invasión de las células tumorales. Por el contrario, estos tumores presentaban una pérdida de expresión de genes relacionados con la diferenciación de queratinocitos. En cambio, el subtipo de buen pronóstico presentaba un mayor grado de diferenciación (fenotipo epitelial) y una expresión elevada de genes localizados en la región cromosómica 1q21. También identificamos un subtipo con un pronóstico intermedio a los dos subtipos anteriores.

## Discusión

---

En el presente proyecto de tesis hemos evaluado los niveles de expresión de un conjunto de genes candidatos en una serie ampliada de pacientes. Utilizando dos estudios de asociación (Cohorte I / Cohorte I+II+III) y uno de validación (Cohorte IV), hemos determinado la relación entre los niveles de expresión de estos marcadores y la recidiva tumoral o la supervivencia de los pacientes. Todos los pacientes incluidos en el estudio presentaban CECC localmente avanzados y fueron tratados siguiendo el protocolo habitual de quimioradioterapia concomitante o quimioterapia de inducción seguida de RT/QRT o cirugía.

La selección de genes candidatos se realizó, en primer lugar, siguiendo criterios estadísticos. Seleccionamos aquellos genes que presentaban mayor sensibilidad y especificidad para predecir la recidiva tumoral y/o la supervivencia de los pacientes. Este nuevo estudio se realizó evaluando genes implicados en la vía secretora y el transporte vesicular (*TPST1*, *RAB25* y *THBS-1*), genes que participaban en la interacción de las células con proteínas de la matriz extracelular (*SERPINE-1*, *FHL2*, *LGALS1* y *THBS1*) y genes cuya expresión es característica del epitelio diferenciado (*TGM3* y *DUOX1*).

En primer lugar, determinamos los niveles de expresión del conjunto de genes candidatos, mediante PCR cuantitativa, en el mismo grupo de pacientes analizados en el estudio de microarrays (cohorte I). Los resultados mostraron la existencia de diferencias significativas en el nivel de expresión de *SERPINA-1*, *RAB25*, *DUOX1* y *TGM3* al comparar los tres subtipos de CECC previamente identificados. De este modo, confirmamos, para estos marcadores, los resultados obtenidos en el estudio de microarrays utilizando una técnica alternativa como es la PCR cuantitativa.

A continuación, establecimos un valor de corte capaz de separar los pacientes en dos grupos en función de los niveles de expresión de cada uno de estos marcadores identificados en los tres subtipos tumorales (pronóstico bueno, malo o intermedio). Estos tres subtipos tumorales previamente identificados presentaban diferencias en el perfil de expresión génica que se asociaron con un comportamiento biológico y clínico distinto. De este modo, clasificamos los pacientes utilizando un criterio biológico y no únicamente estadístico. Desde nuestro punto de vista la utilización de este criterio tiene más sentido que la práctica habitual de establecerlo a partir de exclusivamente

variables estadísticas que pueden separar o no tumores con distinto comportamiento biológico (p.e. situar el punto de corte en la mediana).

Posteriormente determinamos si existía una asociación entre estos marcadores y la evolución clínica (SLRL, SLP o SG), separando los pacientes de la cohorte I en dos grupos, a partir del valor corte establecido. Este análisis identificó a *SERPINA-1*, *RAB25* y *DUOX-1* como posibles marcadores pronóstico y/o predictivos de la respuesta a tratamiento en pacientes con CECC localmente avanzado. A diferencia de estos tres genes, *TGM3* no se asoció con la evolución clínica del paciente, a pesar de mostrar un valor de corte con capacidad de diferenciar los subtipos tumorales. Es probable que *TGM3* juegue un papel menos relevante que los otros tres marcadores en la mediación de la respuesta del tumor al tratamiento genotóxico o en la diseminación metastásica de los tumores evaluados.

Posteriormente, analizamos los niveles de expresión de *SERPINA-1*, *RAB25* y *DUOX-1* en una serie ampliada de pacientes que incluía las Cohortes I+II+III (n=110), con el objetivo de determinar su validez como marcadores pronóstico en CECC localmente avanzado. Mediante este análisis, confirmamos la existencia de una asociación significativa entre los niveles de expresión de los genes *RAB25* y *SERPINA-1* y la supervivencia libre de recidiva local (SLRL), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) de los pacientes. Para el gen *DUOX-1* no se mantuvieron las diferencias observadas en el primer estudio de asociación, por lo que se descartó de análisis posteriores.

A continuación, se discute el grado de apoyo que se ha obtenido para la posible utilización de *RAB25* y *SERPINA-1* como marcadores pronóstico en CECC localmente avanzado, y su relación con hallazgos previos de otros grupos.

### ***RAB25* es un marcador de buen pronóstico en CECC localmente avanzado.**

La literatura publicada hasta ahora indica que Rab25 y diversas proteínas implicadas en la vía secretora podrían jugar un papel importante en el proceso de transformación de las células epiteliales y en la resistencia al tratamiento antitumoral.

Rab25 es una proteína de la familia *Rab small GTPasas* que participa en el transporte y reciclaje de los receptores de superficie que se realiza por vía endosomal, regulando, de este modo, la vía de secreción de proteínas [182]. La desregulación de las proteínas

de la familia Rab se ha asociado a múltiples enfermedades incluido el cáncer [183, 184]. Alteraciones en la regulación de vía de secreción y el transporte hacia la membrana celular son habituales en diversos tipos de cáncer y conducen a cambios en la polaridad de las células del epitelio diferenciado y en la distribución de receptores de membrana. Este proceso puede favorecer la transformación de las células epiteliales y aumentar su capacidad de invasión y migración [185]. Además, *RAB25* está implicado en la regulación de la transducción de señales de las vías que regulan la proliferación, diferenciación, transporte de vesículas y formación del citoesqueleto [184].

A pesar de que estudiar el modelo de patogénesis de la enfermedad, no era uno de los objetivos principales definidos para este trabajo de tesis, al analizar los perfiles de expresión de mucosas normales y biopsias tumorales, hemos podido comprobar que la pérdida de expresión de *RAB25* es un suceso habitual en el CECC.

Estos resultados, se han confirmado analizando los datos obtenidos en otros estudios de microarrays [172-174]. Otro dato interesante, surgió del análisis de los datos de expresión del estudio realizado por *Saintigny et al (GSE26549)*, en el que no observamos diferencias en los niveles de expresión de *RAB25* al comparar lesiones premalignas con diferentes grados (hiperplasias *vs* displasias). Estos resultados, indican que *RAB25* podría jugar un papel importante en el proceso de progresión tumoral, en particular la pérdida de expresión de *RAB25* sería un suceso asociado al paso desde la etapa de carcinoma *in situ* a carcinoma invasivo.

Otros estudios descritos en la literatura muestran que los niveles de expresión de *RAB25* se encuentran también alterados en los cánceres de ovario [186], carcinoma de mama [186-188], colon [189], páncreas [190], vejiga [191] e hígado [192]. De modo, que *RAB25* también estaría implicado en el proceso de progresión de otros tipos celulares. No obstante, para poder definir la implicación de *RAB25* en el proceso de transformación de las células epiteliales normales y su posterior progresión en las distintas fases hasta carcinoma escamoso de cabeza y cuello, se deberían realizar estudios más extensos con muestras recogidas en las diferentes etapas de progresión y estudios funcionales mediante manipulación genética de células normales.

Los hallazgos previos obtenidos por nuestro grupo sugerían que *RAB25* podría ser un buen candidato como marcador de buen pronóstico en pacientes con CECC localmente avanzado. El subtipo de CECC de mal pronóstico identificado en el estudio de microarrays presentaba una infraexpresión de *RAB25*. Además, el subtipo de buen

pronóstico presentaba una sobreexpresión de genes localizados en la región cromosómica 1q21 donde se localiza el gen que codifica para la proteína Rab25.

Los resultados obtenidos en el estudio de asociación por PCR cuantitativa en una cohorte amplia de pacientes con CECC localmente avanzado (n=110) muestran que *RAB25* es un marcador de buen pronóstico, confirmando de este modo la hipótesis inicial planteada. El nivel de expresión de *RAB25*, en biopsias tumorales pre-tratamiento, se asocia con la SLRL, SLP y SG en CECC, confirmando las observaciones en el estudio de microarrays. El análisis de *Cox* multivariante de *RAB25* junto a otras variables clínicas estudiadas (tamaño tumoral y afectación ganglionar) lo identifica como un marcador de riesgo independiente.

Además, mediante un estudio retrospectivo por inmunohistoquímica, validamos el valor pronóstico de *RAB25* en un grupo de muestras independiente. Los resultados confirman que la pérdida de expresión proteica de Rab25 disminuye la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de los pacientes.

En la literatura se han descrito hallazgos en otros tipos de carcinomas que apoyan nuestros resultados. Un porcentaje elevado de los tumores de colon presentan una pérdida de expresión de *RAB25*, que a su vez, se asocia con un aumento de la agresividad de los tumores y una disminución de la supervivencia de los pacientes [189]. Del mismo modo, en tumores de páncreas, niveles elevados de *RAB25* se asocian con un aumento de la supervivencia global de los pacientes siempre y cuando los tumores no expresen el gen *CLIC3* [190].

Algunos estudios sugieren que tanto la amplificación de la región cromosómica 1q21 como la sobreexpresión de *RAB25* en tumores de mama se asocian a mal pronóstico [186]. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que la sobreexpresión de *RAB25* no es tan frecuente en tumores de mama y que depende en gran medida del subtipo de tumor analizado. De hecho, los tumores de mama de peor pronóstico, triple negativos para los receptores hormonales, de modo habitual, presentan una pérdida de la expresión de *RAB25* [187, 188].

En tumores de ovario la sobreexpresión de *RAB25* se asocia con una disminución de la supervivencia global de los pacientes [186]. No obstante, un estudio reciente realizado también en pacientes con cáncer de ovario muestra que los niveles de DNA de *RAB25* circulantes en plasma, son un factor de buen pronóstico asociado con un aumento de la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global [193].

En resumen, nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de *RAB25* se asocian con la recidiva tumoral y la supervivencia de los pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello localmente avanzado. Esta es la primera vez que *RAB25* es descrito como un marcador pronóstico en pacientes con CECC. Se trata de un marcador de buen pronóstico. Un nivel de expresión elevado de *RAB25* aumenta la posibilidad de que el paciente sobreviva y no sufra recidivas una vez finalizado el tratamiento. El hecho de que *RAB25* se asocie, no solo con la supervivencia de los pacientes, sino también con la recidiva tumoral o la supervivencia libre de progresión de la enfermedad, le da un valor pronóstico y predictivo al mismo tiempo. Además el hecho de que todos los pacientes incluidos en el estudio fueran tratados con QRT o QTI seguida de RT/QRT o cirugía indicaba una probable asociación entre el nivel de expresión de *RAB25* y la sensibilidad de las células de CECC al tratamiento genotóxico. Los estudios descritos hasta ahora por otros autores avalan el valor pronóstico de este marcador en otros tipos tumorales. A pesar de que su utilidad como marcador pronóstico podría depender en gran medida del tipo tumoral analizado así como de la coexpresión en un mismo tumor de otros biomarcadores, parece claro que en la mayoría de las neoplasias en las que ha sido estudiado, la pérdida de expresión de *RAB25* se asocia con un peor pronóstico de los pacientes.

### ***SERPINA-1* es un marcador de mal pronóstico en CECC localmente avanzado.**

La Serpina-1 (*PAI-1*) es una proteína del sistema de activación del plasminógeno (*PAS*, *Plasminogen Activating System*), y juntamente con *uPA* y de su receptor *uPAR* se encarga de la regulación del paso a plasminógeno a plasmina. La plasmina, a su vez, está implicada en la regulación de numerosos procesos patofisiológicos que requieren la remodelación de la matriz extracelular (MEC) y de la membrana basal [194].

Hay numerosos estudios que documentan la relevancia de los componentes del *PAS* en muchos aspectos de la evolución neoplásica como la proliferación, adhesión, migración, intravasación, extravasación, y crecimiento de las células tumorales en las localizaciones metastásica y en la neoangiogénesis [195, 196].

En el análisis de expresión diferencial del estudio previo de microarrays [175] encontramos que los pacientes incluidos en el grupo de mal pronóstico, presentaban sobreexpresión de *SERPINA-1* y de *uPA*, y de sus inductores principales *TGF $\beta$ -1* y *RELA* respectivamente. Estos resultados sugerían, que los genes del sistema plasminógeno, y

especialmente *SERPINA-1*, podían jugar un papel importante en el pronóstico y la respuesta al tratamiento de los pacientes con CECC.

Los resultados de los estudios de asociación por PCR cuantitativa incluidos en esta tesis, muestran que un nivel de expresión elevado de *SERPINA-1* se asocia con una menor SLRL, SLP y SG. El análisis multivariante determinó que el nivel de mRNA de *SERPINA-1* era un factor independiente de otras variables clínicas (como la afectación ganglionar o el tamaño tumoral) a la hora de predecir la supervivencia libre de recidiva local y la supervivencia libre de progresión, pero no la supervivencia global. Además, en el estudio retrospectivo, validamos el valor pronóstico de *SERPINA-1*. Observamos que una mayor expresión de la proteína Serpina-1 aumentaba la probabilidad de recidiva tumoral y ganglionar y la aparición de metástasis en los pacientes de CECC, así como también se asociaba con una menor supervivencia global de los pacientes.

Estos resultados confirman que el nivel de expresión de *SERPINA-1* es un marcador predictivo y pronóstico en pacientes con CECC localmente avanzado. Es importante destacar que Serpina-1 es un factor predictor de respuesta en pacientes de CECC tratados con QRT concomitante o QTI seguida de RT/QRT o cirugía, especialmente cuando se analiza juntamente con otras variables clínicas o moleculares como son los niveles de expresión de *RAB25*, el tamaño tumoral o la afectación ganglionar (modelo multivariante de *Cox*).

Otros estudios publicados anteriormente, apoyan nuestros resultados y la implicación de *SERPINA-1* y otros componentes del sistema plasminógeno como marcador predictivo y/o pronóstico en pacientes con CECC. Lucienne Speleman *et al* [197] describieron una asociación entre los niveles de *SERPINA-1* y la invasión perineural. Ambos factores tenían capacidad pronóstica para la supervivencia libre de enfermedad. También observaron que los tumores de menor tamaño (T1-T2) expresaban niveles más altos de *SERPINA-1*. En este estudio determinaron el valor pronóstico de *SERPINA-1*. Aquellos pacientes con niveles más elevados de este gen tenían mayor probabilidad de padecer recidivas tumorales y un menor tiempo de supervivencia global que aquellos con niveles más bajos. Además, los pacientes fumadores tenían unos niveles de *SERPINA-1* y *uPA* más elevados que aquellos que no eran fumadores.

Hundsorfer *et al* [198], encontraron que *SERPINA-1* correlacionaba con mal pronóstico en CECC. La probabilidad de recidiva tumoral aumentaba cuando los pacientes

presentaban niveles elevados de *uPA* y *SERPINA-1*. En este estudio, determinaron la capacidad predictiva de *SERPINA-1* y *uPA*, y encontraron que los pacientes intervenidos quirúrgicamente con niveles altos de *SERPINA-1* tenían más probabilidad de sufrir recidivas tumorales que aquellos con niveles bajos. Contrariamente los pacientes tratados con RT, que tenían niveles de *uPA* elevados, presentaban más riesgo de padecer recaídas.

En otros tipos tumorales también se han realizado estudios que muestran el valor de *SERPINA-1* como marcador de la evolución clínica de los pacientes. En carcinoma de mama los niveles bajos de *SERPINA-1* y de *uPA* permiten identificar a las pacientes que desarrollan tumores que no presentan afectación ganglionar y que no necesitan el tratamiento adyuvante basado en quimioterapia, requerido por las pacientes con carcinomas más agresivos [199]. En cáncer de endometrio se ha observado que los niveles citosólicos de *SERPINA-1* se asocian de manera significativa con el grado y el estadio tumoral. Además, la determinación del nivel de expresión de *SERPINA-1* puede utilizarse como marcador pronóstico y clasificar, de este modo, los pacientes en función del riesgo que tienen de padecer recidivas tumorales [200]. Hofmann *et al* encontraron que el nivel de *SERPINA-1*, en tumores renales, correlacionaba de manera significativa con la prevalencia de metástasis a distancia así como también el desarrollo de nuevas metástasis post-operatorias [201]. Por otra parte, niveles elevados de *SERPINA-1* se asociaban con una baja SG de los pacientes [202].

En carcinoma de colon también se describió una asociación entre los niveles elevados de *SERPINA-1* y el pronóstico de los pacientes [203]. Finalmente, el incremento de la actividad enzimática de *Serpina-1* en plasma y en los tumores de pacientes con carcinoma hepático, se han correlacionado con el crecimiento y la invasión tumoral y con el desarrollo de metástasis [204].

Los diferentes estudios asocian un nivel de expresión elevado de *SERPINA-1* con mal pronóstico y con aumento de la agresividad tumoral. Teniendo en cuenta el papel de inhibición que ejerce *Serpina-1* sobre el complejo *uPA-uPA<sub>r</sub>* se esperaría que *Serpina-1* previniera la degradación de la MEC y, por tanto, inhibiera la capacidad de migración e invasión de las células tumorales. Para explicar esta paradoja, algunos autores han propuesto la capacidad de migración e invasión de las células tumorales depende del balance entre la degradación de la MEC y el mantenimiento de la misma. En relación con esta propuesta, se han publicado varios estudios en los que *Serpina-1* previene el

exceso de degradación de la MEC, modula la adhesión celular y la migración [205], jugando un papel en la angiogénesis [206] y en la estimulación de la proliferación celular [207].

En conclusión, nuestros resultados y los descritos anteriormente por otros autores, apoyan el papel de *SERPINA-1* como marcador de mal pronóstico en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Hasta la fecha, nuestro estudio es el único llevado a cabo en una cohorte seleccionada de pacientes con CECC localmente avanzados tratados con quimioterapia combinada con radioterapia y/o cirugía. Estos resultados indican que además de tener valor pronóstico, los niveles de expresión de *SERPINA-1* podrían utilizarse en un futuro para discriminar qué pacientes se beneficiarían del tratamiento genotóxico y distinguirlos de los pacientes no respondedores candidatos a un tratamiento alternativo.

### **Incremento de la capacidad pronóstica y predictiva mediante la determinación conjunta de *RAB25* y *SERPINA-1*.**

Una vez determinada la capacidad pronóstica de *RAB25* y *SERPINA-1* clasificamos a los pacientes en función de los niveles de expresión conjunta de ambos genes con la finalidad de aumentar la capacidad pronóstica que tenían de manera individual. De este modo, identificamos 3 subgrupos de pacientes que presentaban diferencias en cuanto a la SLRL, SLP y SG. Un grupo de pacientes de mal pronóstico, ya que la mayoría sufrían una recaída de la enfermedad en un periodo no superior a los 2 años y un grupo de pacientes de pronóstico favorable de los cuales más del 60% permanecían vivos al cabo de 5 años después de la finalización del tratamiento. No obstante, un grupo considerable de pacientes permanecían incluidos dentro del grupo de pronóstico intermedio.

La aplicación del modelo de *Cox* indicó que la clasificación de los pacientes en función de la determinación conjunta de los niveles de *RAB25* y *SERPINA-1*, era especialmente útil para distinguir a los pacientes del grupo de mal pronóstico del resto. Los pacientes del grupo de mal pronóstico tenían un riesgo superior de muerte, de padecer recidivas locales, ganglionares y/o metástasis que el resto de pacientes (grupos de pronóstico intermedio y buen pronóstico).

El uso de marcadores moleculares adicionales a *RAB25* y *SERPINA-1* podría mejorar la clasificación del grupo de pronóstico intermedio y así determinar de manera más precisa la supervivencia de los pacientes en estadios localmente avanzados. Para

seleccionar genes candidatos a validar en futuros estudios como marcadores pronóstico, realizamos un análisis de expresión diferencial en los pacientes del grupo de pronóstico intermedio. Identificamos los genes *TYK2*, *SYNCRIP*, *TBC1D4*, *JUND*, *IRAK1BP1*, *HMGN3*, *SCYL3* y *SMARCA2* como posibles marcadores asociados con la supervivencia de los pacientes en este grupo. Todos estos genes estaban sobreexpresados en los pacientes que habían fallecido en el momento del análisis. Algunos de estos marcadores participan en vías de señalización en las que están implicados el sistema plasminógeno y la activación/inactivación de proteínas *Rab* o que se han asociado con la evolución clínica en CECC. En este sentido, *IRAK1BP1* activa la vía de *NF- $\kappa$ B* a través de la activación de *RELA*. [208]. A su vez, *RELA* es también un inductor del sistema plasminógeno, ya que activa la expresión de *uPA*, un factor de mal pronóstico en CECC [209]. Además, la activación de la vía *NF- $\kappa$ B* es un marcador de mal pronóstico en CECC [150]. *SCYL3* juega un papel importante en la regulación de la adhesión y migración celular y particularmente en CECC se ha descrito que interacciona con *CD44*. La interacción con *CD44* promueve la secreción de metaloproteinasas, proceso en el cual se encuentra involucrado *SERPINA-1* y el sistema plasminógeno, proteínas que son necesarias para la invasión tumoral. *JUND* es un componente del complejo de transcripción *AP-1*. En células de carcinoma oral se ha observado la expresión constitutiva de las proteínas que forman el complejo *AP-1*, y se ha asociado con la transformación maligna de las células escamosas epiteliales [210, 211]. *SERPINA-1*, uno de los marcadores descritos en esta tesis, presenta un dominio de unión a *API* del mismo modo que otros componentes del sistema plasminógeno, como *uPA* y *uPAR* [209]. La expresión de estos genes podría promover la activación de las mismas vías de señalización en las que participa *SERPINA-1*, lo que sugiere que la detección de alguno/s de estos genes juntamente con *SERPINA-1* podría mejorar la clasificación de los pacientes de pronóstico intermedio.

El gen *TBC1D4* promueve la inactivación de varias proteínas *Rab*, a través de su actividad GTPasa [212]. A pesar de que no se ha descrito ninguna implicación clínica de este gen en CECC, en nuestro estudio hemos encontrado que está más expresado en los pacientes que habían fallecido en el momento del análisis. La sobreexpresión de *TBC1D4* podría inactivar a *RAB25* alterando de este modo, su implicación en tumorigénesis.

En numerosas ocasiones, el efecto de un gen determinado depende del tipo celular en el cual se expresa, así como de la coexpresión de otros genes que participan en la

regulación de las mismas vías de señalización. Además, el cáncer es una enfermedad provocada por la acumulación de múltiples alteraciones genéticas que afectan a diversos procesos biológicos dentro de un mismo tipo celular. De este modo resulta difícil pensar que con un solo marcador podamos predecir el pronóstico de los pacientes [213-215].

Este hecho podría explicar por qué la detección de únicamente los niveles de *RAB25* y *SERPINA-1* no permite una clasificación de todos los pacientes de nuestro estudio, en función de si tendrán un pronóstico favorable o desfavorable. La inactivación/activación de algunos de estos genes descritos podría ser importante para añadir información pronóstica, una vez determinados los niveles de *SERPINA-1* y *RAB25*, y así clasificar de manera más precisa los pacientes del grupo de pronóstico intermedio.

A pesar de la importancia de encontrar marcador/es, que permitan diferenciar de manera más precisa el grupo de pronóstico intermedio, cabe destacar la dependencia de estos respecto a los niveles de expresión de *RAB25* y *SERPINA-1*, ya que este grupo surge de la determinación previa de los niveles de expresión de ambos genes. A través de estudios funcionales, se analizará en un futuro la interacción de estos nuevos marcadores con *SERPINA-1* y *RAB25* en células de CECC, para determinar si la supervivencia de los pacientes de pronóstico intermedio depende de las vías y procesos biológicos estudiados hasta ahora o por el contrario es independiente a posibles alteraciones del sistema plasminógeno o de la expresión de las proteínas Rab.

### **La transformación desde la mucosa normal hasta CECC localmente avanzado esta asociada con la pérdida de expresión génica.**

En los estudios de expresión diferencial entre tumores y mucosas normales identificamos 687 genes que estaban expresados de manera diferencial. Más del 75% de estos genes estaban infraexpresados en las muestras tumorales. Este hecho indica que durante el proceso de transformación de la mucosa, la pérdida de expresión génica o inactivación de genes es un suceso más habitual que la activación de determinados genes con actividad oncogénica. Estos resultados están en concordancia con dos estudios de ultrasecuenciación de CECC publicados recientemente [216, 217]. En estos estudios se observa que la mayoría de las alteraciones genéticas presentes en los CECC conducen a la inactivación del gen y no a la activación de posibles protoncogenes. Además, del mismo modo que lo observado en nuestro estudio, dichas alteraciones afectan a genes que regulan el proceso de diferenciación del epitelio. La alteración del proceso de diferenciación escamosa es una característica habitual en los

CECC. La pérdida de la capacidad de maduración de las células de la mucosa en diferentes etapas de diferenciación favorecería el proceso de transformación y la aparición de diferentes subtipos de CECC con características biológicas y moleculares distintas.

Entre los genes expresados diferencialmente al comparar muestras tumorales y mucosas normales identificamos *RAB25* y *SERPINA-1*, de los que hemos evaluado en este mismo trabajo su capacidad pronóstica y de predicción de respuesta al tratamiento de CECC.

### **Desarrollo y validación de una firma genética con valor pronóstico.**

El objetivo de desarrollar una firma genética con valor pronóstico es poder distinguir, a partir de un mínimo número de genes, subgrupos de pacientes con evoluciones clínicas distintas.

A partir de los perfiles de expresión de biopsias tumorales pre-tratamiento de pacientes con CECC localmente avanzado, tratados en nuestro centro, hemos identificado dos firmas genéticas asociadas con la supervivencia de los pacientes y/o con la recidiva del tumor primario.

La identificación de una firma genética asociada con la recidiva local se llevó a cabo analizando los perfiles de expresión de 90 biopsias tumorales. Los pacientes incluidos presentaron una mediana de seguimiento de 20 meses, tiempo en el que de manera habitual se producen la mayoría de recidivas locales. Identificamos 48 genes cuya expresión se asociaba de modo significativo con la aparición de recidivas locales. Utilizando los datos de expresión de Chung *et al*, validamos la capacidad pronóstica y predictiva de la firma genética. Los pacientes con un valor de expresión elevado de esta firma genética presentaban un riesgo superior de padecer recaídas tumorales ( $HR = 6,5$ ,  $IC_{95\%} = 1,1-37,8$  y  $p=0,03$ ). Los genes que formaban parte de la firma genética participan en procesos como la adhesión o la diferenciación celular, entre otros.

Dentro del grupo de genes asociados con la recidiva local, identificamos a *RAB25* y *SERPINA-1*. Estos resultados, concuerdan con los obtenidos en los estudios mediante PCR cuantitativa y confirman la asociación de los niveles de expresión de *RAB25* y *SERPINA-1* con la aparición de recidivas locales tras el tratamiento.

Para generar la firma genética de SG se incluyeron los pacientes que tenían un seguimiento igual o superior a 24 meses. Identificamos un grupo de 62 genes cuya expresión se asociaba con la supervivencia. La mayoría de estos genes, se encontraban sobreexpresados en los de pacientes que permanecían vivos tras el tratamiento, siendo

por tanto marcadores de buen pronóstico. Estos resultados son similares a los obtenidos al comparar los perfiles de expresión de mucosas normales respecto a tumores y a los resultados obtenidos al comparar la expresión génica de las líneas celulares con un fenotipo asociado al proceso de TEM respecto a la expresión génica de las líneas con características epiteliales. Estos resultados nos hacen pensar que esta pérdida de expresión génica podría también aumentar la supervivencia celular, la capacidad de migración y de generar metástasis de los tumores, que se traduciría finalmente en un empeoramiento de la supervivencia de los pacientes. Se han descrito resultados similares en un estudio de microrrays realizado en pacientes con CECC, en el que la pérdida de expresión génica se asocia con un aumento del riesgo de sufrir metástasis ganglionares [154].

A continuación, redefinimos y validamos la firma pronóstica utilizando los datos generados por dos estudios de microarrays independientes (Chung y Rickman) para finalmente identificar una firma genética de 16 genes de buen pronóstico. Los pacientes con unos niveles de expresión mas elevados de la firma de 16 genes presentaban un riesgo de fallecer inferior al de los pacientes con una baja expresión de la misma.

Entre los 16 genes que constituyen esta firma genética encontramos genes implicados en diferenciación del epitelio estratificado (*KRT6B*, *LGALS7* y *EVPL*), en adhesión y migración celular (*SCYL3* y *PKP3*) y otros que participan en la vía secretora (*RAB25*, *TNFAIP6* y *PLA2G3*). Estos procesos biológicos, además de participar en el proceso de transformación de las células del epitelio normal estratificado, también juegan un papel relevante en el proceso de migración y diseminación tumoral.

De entre los 16 genes incluidos en la firma genética, cabe destacar a *RAB25*. Estos resultados, juntamente con los hallados previamente en los anteriores análisis, por cPCR e inmunohistoquímica, dan solidez a la asociación del gen *RAB25* con la supervivencia global de los pacientes.

De nuevo estos resultados sugieren que *RAB25* puede ser un marcador con valor predictivo y pronóstico, por su asociación con la supervivencia global y con la recidiva local. En cambio, *SERPINA-1* sería solo un marcador predictivo, ya que se encuentra únicamente representada en la firma genética asociada con la recidiva local, y no con la de supervivencia global.

### **Implicaciones clínicas de los marcadores identificados.**

Hasta la fecha, los únicos marcadores predictivos de respuesta a tratamiento utilizados en pacientes con CECC son la respuesta a la quimioterapia de inducción (QTI) y la presencia de infección por VPH [80, 81, 111].

El grado de respuesta a la QTI identifica el protocolo terapéutico a seguir. Así una vez administrados tres ciclos de QTI los pacientes que presentan una respuesta del tumor superior al 80% continúan el tratamiento con QRT/RT, mientras que los pacientes que tienen una respuesta a la QTI inferior al 80%, son candidatos a cirugía radical. No obstante, la respuesta a la QTI, no siempre es fiable a la hora de predecir la efectividad del tratamiento posterior con RT/QRT. Por otra parte, para poder predecir la respuesta a la terapia genotóxica, es necesario administrar al paciente tres ciclos de quimioterapia previa, lo que retrasa el tratamiento efectivo en los pacientes que no responden a la QTI.

El VPH es un factor de buen pronóstico y predictivo en CECC, de modo que los pacientes VPH positivos tienen una supervivencia global más favorable y una mayor respuesta al tratamiento con quimioterapia que los pacientes VPH negativos. No obstante, únicamente los carcinomas de cavidad oral y orofaringe, presentan una incidencia elevada de infección por VPH. Además, su incidencia es muy variable en función de la región geográfica estudiada, por lo que su uso como marcador queda limitado a aquellas regiones con un número considerable de pacientes infectados.

La determinación de los niveles de expresión de *RAB25* y *SERPINA-1* en biopsias pre-tratamiento de pacientes localmente avanzados podría ayudar, en un futuro, a identificar antes de iniciar la terapia, a aquellos con mayor probabilidad de respuesta al tratamiento genotóxico y menor riesgo recidiva tumoral y consecuentemente una supervivencia más favorable. Estos pacientes podrían iniciar desde el principio un tratamiento genotóxico de quimioterapia combinada con radioterapia, disminuyendo el número de cirugías innecesarias, y aumentando de este modo, la tasa de preservación del órgano. La disponibilidad de marcadores fiables, en cuanto a su capacidad predictiva, ayudaría a distinguir los pacientes respondedores, de los pacientes no respondedores. Estos últimos serían candidatos a cirugía radical sin necesidad de recibir quimioterapia previa, reduciéndose el tiempo de espera para la cirugía y las complicaciones clínicas derivadas de la toxicidad asociada al tratamiento quimioterápico. Por otra parte, el grupo de pacientes de pronóstico desfavorable podría realizarse un seguimiento más exhaustivo que permitiera detectar la aparición de

recidivas de modo más temprano. Finalmente, la clasificación adecuada de los pacientes, antes de iniciar el tratamiento, se traduciría en un aumento de su supervivencia y la calidad de vida de los pacientes.

Cabe destacar que el nivel de expresión de estos dos marcadores es un factor de riesgo independiente para la supervivencia libre de recidiva local y la supervivencia libre de progresión. Además, *RAB25* es también un marcador pronóstico para la supervivencia global. De este modo, en nuestra serie de pacientes analizada por PCR cuantitativa, el uso combinado de ambos marcadores permitiría predecir la respuesta a la QRT o a la QTI seguida de RT/QRT o cirugía de los pacientes de un modo más eficaz que otras variables clínicas de uso habitual, como son el tamaño tumoral o la afectación ganglionar.

No obstante, es necesario llevar a cabo estudios independientes que validen o no la eficacia en predicción de respuesta al tratamiento genotóxico mediante la determinación de los niveles de expresión de *RAB25* y *SERPINA-1*. Además, el desarrollo de marcadores adicionales ayudaría a mejorar la clasificación de los pacientes en función de su probabilidad de responder a la terapia.

Por otro lado, hemos definido una firma genética, que incluye un mínimo número de genes con capacidad de predecir la recidiva tumoral de los pacientes. Uno de nuestros proyectos futuros es la obtención de los genes que predicen de una manera más precisa la recidiva tumoral, con el objetivo de reducir el número de los genes que conforman esta firma genética, además de la validación de esta firma genética en un estudio de microarrays independiente.

La firma genética asociada con la supervivencia global, añade información pronóstica a la que habíamos generado en el estudio anterior [175], ya que reduce de 50 a 16 el número de genes capaces de predecir la supervivencia. Actualmente, estamos a la espera de aumentar el número y actualizar el seguimiento de los pacientes para poderlos incluir en análisis posteriores. Nuestro propósito es utilizar esta nueva serie de pacientes como un grupo de muestras independientes para intentar validar la capacidad pronóstica de la firma genética de 16 genes asociados con la SG.

### **Caracterización de líneas celulares de CECC con patrones de expresión similares a los tumores con fenotipo mesenquimal o con fenotipo epitelial.**

En un estudio previo identificamos un subtipo de CECC de mal pronóstico que presentaba TEM y un subtipo de buen pronóstico más diferenciado que expresaba genes propios del epitelio diferenciado normal. Con el objeto de evaluar funcionalmente algunos de los biomarcadores identificados, en los estudios de pacientes, nos propusimos caracterizar previamente un panel de líneas celulares de CECC.

Este análisis demostró que las líneas UM-SCC-74B, UM-SCC-74B200 y SCC-9 presentaban un crecimiento difuso y una morfología fusiforme, asociados con la pérdida de expresión de E-Cadherina y la expresión de marcadores mesenquimales como la Vimentina o la N-Cadherina. En cambio, las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B mantenían una morfología epitelial y la expresión de E-Cadherina. Estos resultados indicaron que algunas de las líneas evaluadas presentaban características compatibles con un proceso de transición epitelio-mesénquima, de manera similar a los tumores del grupo de mal pronóstico (subtipo tumoral mesenquimal), previamente identificado en nuestro estudio.

La transición epitelio-mesénquima es el proceso a través del cual las células epiteliales pierden sus características propias, como la polaridad apico-basal, las adhesiones celulares y la expresión de marcadores epiteliales como la *E-Cadherina* [218]. Además, las células adquieren un fenotipo mesenquimal, asociado con morfología fusiforme y la expresión de marcadores como la Vimentina o la N-Cadherina. Este proceso se ha asociado, en numerosas ocasiones, con un aumento de la motilidad celular y en consecuencia de la capacidad de migración e invasión de las células tumorales [219]. En el mismo sentido, el proceso TEM es habitual en tumores de cabeza y cuello, y se ha relacionado con un aumento de la resistencia al tratamiento antitumoral y con peor pronóstico [181].

El análisis mediante microarrays de las diferencias en el perfil de expresión en las líneas SCC-9, UM-SCC-22A y UM-SCC-22B, nos permitió confirmar la presencia de un fenotipo mesenquimal en la línea SCC-9, respecto a las otras dos líneas que expresaban genes asociados con fenotipo epitelial. Al comparar la línea SCC-9, con características de haber sufrido TEM, con las otras dos líneas con características epiteliales identificamos diferencias en la expresión de genes implicados en la

diferenciación celular, desarrollo de la epidermis, respuesta a lesiones tisulares (*response to wounding*) y adhesión celular. Todos estos procesos están frecuentemente alterados durante el proceso de transición epitelio-mesénquima. Además, entre los genes expresados diferencialmente en esta línea celular encontramos diversos marcadores previamente analizados en pacientes del subtipo tumoral de mal pronóstico. La línea SCC-9 sobreexpresaba *THBS1* e infraexpresaba *RAB25* y *DUOX1*.

Estos hallazgos indican que, del mismo modo que en un estudio en pacientes hemos identificado diferentes subtipos tumorales en CECC, que se caracterizan por un comportamiento biológico distinto, también se puede identificar diferentes líneas celulares con características parecidas a las presentadas por los subtipos tumorales. En este sentido, es probable que las líneas de CECC con características TEM tengan un comportamiento biológico similar a los tumores del subtipo mesenquimal de mal pronóstico, ya que expresan un número elevado de marcadores moleculares comunes.

### **Asociación entre nivel de expresión de genes con capacidad pronóstica y la sensibilidad al cisplatino y/o *Cetuximab* en líneas de CECC.**

Los resultados del estudio de asociación entre los niveles de expresión de los marcadores con capacidad pronóstica y la sensibilidad/resistencia al cisplatino, indicaron que las líneas con niveles superiores de *SERPINA-1* eran más resistentes al tratamiento con cisplatino. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión del gen *RAB25* y la sensibilidad a este fármaco en las distintas líneas celulares estudiadas. Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en los análisis de expresión de *SERPINA-1*, en pacientes con CECC, en los que se identificó que *SERPINA-1* tenía mayor capacidad de predicción de respuesta al tratamiento que de la supervivencia de los pacientes con CECC.

En cuanto al efecto de *Cetuximab* en las líneas de CECC, observamos que las únicas líneas sensibles al tratamiento con este fármaco eran UM-SCC-22A y UM-SCC-22B. Cuando determinamos su sensibilidad al tratamiento con *Cetuximab*, observamos que el porcentaje de células viables se estabilizaba al 50% a partir de una concentración determinada, y no disminuía a pesar de aumentar la concentración del fármaco. Una explicación para este hallazgo, surge del hecho que *Cetuximab* actúa bloqueando el

sitio de unión al ligando *EGF*, lo cual produce un bloqueo de la señalización mediada por este receptor y como consecuencia deja de inducirse la proliferación. Si se prolonga la no recepción de estímulos de proliferación, puede que la célula entre en un proceso de senescencia [220], lo cual podría explicar la reducción al 50% de la viabilidad celular observada a las 120 horas.

El resto de líneas celulares presentaban resistencia a *Cetuximab*, incluso después de incrementar las dosis del fármaco a concentraciones muy superiores (3000nM) a las que habitualmente se utilizan en estudios *in vitro* [221-223]. Se han descrito varios mecanismos por los que las células de CECC presentan resistencia a *Cetuximab*, como son la desregulación en la internalización y degradación de *EGFR*; la mutación *EGFRvIII* (*EGFR variante III*), que produce una activación constitutiva del receptor; o la presencia de mutaciones en *K-RAS* [224].

En las líneas de CECC con fenotipo TEM, otra explicación posible para la resistencia a *Cetuximab*, sería que el fenotipo mesenquimal confiere resistencia al tratamiento con inhibidores de *EGFR*, como se ha demostrado en un estudio realizado en líneas celulares de CECC y de pulmón con características de haber sufrido el proceso transición epitelio-mesénquima, las cuales son resistentes a *Gefitinib* [225]. Este hallazgo explicaría la resistencia a *Cetuximab* en las líneas UM-SCC-74B y SCC-9, que tienen características mesenquimales.

Además, nuestros resultados muestran un efecto aditivo entre *Cetuximab* y el cisplatino en las líneas sensibles a *Cetuximab*. En cambio en las líneas celulares de CECC resistentes a *Cetuximab*, la combinación de fármacos no supone un incremento en la sensibilidad de las células al tratamiento.

El hecho de que el *Cetuximab* solo sea efectivo en las líneas más diferenciadas y con características epiteliales, como las UM-SCC-22A y UM-SCC-22B, sugiere que este fármaco supondría un beneficio para aquellos pacientes clasificados dentro del grupo de buen pronóstico, los cuales tienen también un fenotipo epitelial.

### **La sobreexpresión de *RAB25* aumenta la proliferación, disminuye la dispersión, migración e invasión celular y potencia la citotoxicidad por cisplatino en células de CECC.**

Los estudios asociación y validación realizados en muestras de pacientes indican que el nivel de expresión de *RAB25* puede predecir la evolución clínica de los pacientes con CECC localmente avanzado a los que se les administra QRT concomitante o QTI seguida de RT/QRT. Con objeto de determinar funcionalmente el efecto de la

expresión de *RAB25* sobre la capacidad de proliferación, migración e invasión y la respuesta al tratamiento genotóxico de las células de CECC, hemos llevado a cabo una serie de estudios *in vitro*.

En primer lugar sobreexpresamos *RAB25* en las líneas UM-SCC-74B y SCC-9. Estas líneas presentaban un fenotipo mesenquimal y unos niveles de expresión de *RAB25* significativamente menores que el resto de líneas analizadas, una característica también presente en los tumores de mal pronóstico.

La sobreexpresión de *RAB25* en las líneas UM-SCC-74B y SCC-9 resultó en un incremento de la tasa de proliferación celular. Esta observación esta en consonancia con un estudio previo realizado en líneas de carcinoma de mama y de ovario en el que la sobreexpresión de *RAB25* induce también un incremento en la tasa de proliferación [184]. De manera concomitante, la infraexpresión de *RAB25*, produce el efecto contrario, es decir disminuye la capacidad de proliferación en líneas celulares de carcinoma de mama y ovario [186, 187]. En cualquier caso, el efecto de la expresión de *RAB25* sobre las vías de proliferación aún no ha sido dilucidado a nivel mecanístico.

Los estudios de citotoxicidad inducida por cisplatino en líneas de CECC mostraron que la sobreexpresión de *RAB25* aumentaba la sensibilidad al tratamiento con este fármaco para la línea UM-SCC-74B. A pesar de que un aumento en la proliferación de las líneas tumorales llevaría a pensar de manera intuitiva en una menor respuesta al tratamiento, nuestros hallazgos son contrarios a lo esperado. Sin embargo, el aumento de la sensibilidad al cisplatino en células que expresan *RAB25*, se podría justificar en base al mecanismo de acción del fármaco, ya que la máxima actividad del cisplatino se induce en la fase S del ciclo celular, en la que se encuentran la mayor parte de las células cuando están en crecimiento exponencial.

No obstante, en la línea SCC-9, que presentaba características mesenquimales similares a los tumores de mal pronóstico y una elevada resistencia al tratamiento con cisplatino, la sobre-expresión de *RAB25* no conseguía inducir la reversión de esta resistencia a la sensibilidad al cisplatino. Este resultado podría explicarse por la presencia, en la línea SCC-9, de otras alteraciones genéticas que jugasen un papel predominante en la respuesta al cisplatino. En este sentido es relevante indicar que la línea SCC-9 presentaba niveles de expresión de *SERPINA-1* significativamente más elevados que el resto de líneas de CECC analizadas. De este modo el efecto de la

sobreexpresión de *RAB25* en esta línea celular, no sería capaz de revertir la resistencia a cisplatino, que se ha asociado a los niveles elevados de expresión de *SERPINA-1*, que se ha observado también en las líneas de CECC estudiadas.

Finalmente la sobreexpresión de *RAB25* disminuía la capacidad de dispersión, migración y de invasión de la línea UM-SCC-74B. Se ha descrito que la proteína Rab25 esta implicada en procesos de migración e invasión a través de la unión al complejo de integrinas  $\alpha 5$  y  $\beta 1$  [226], así como en el reciclaje de ambas integrinas [227]. Por otra parte, niveles elevados de Rab25 se han asociado con un incremento del reciclaje de estas proteínas, y de la capacidad de migración y de invasión en diferentes tipos celulares [226-228]. La alteración de la presencia de determinados receptores en la membrana celular, como es *ITGB1*, podría explicar por qué la sobreexpresión de *RAB25* disminuye la capacidad de migración e invasión de las células de CECC. Además, la alteración de la vía secretora, en la que participa *RAB25*, es un proceso habitual en las neoplasias de origen epitelial que provoca la pérdida de polaridad celular. Este proceso favorecería la proliferación desordenada de las células del epitelio y aumentaría su capacidad de migración a través de las proteínas de la matriz extracelular. Además, en nuestro estudio, la disminución de la capacidad migratoria e invasiva de los clones de la línea UM-SCC-74B que sobreexpresan el gen *RAB25*, se podría explicar por un aumento de la proliferación. Chong-feng *et al* proponen que el proceso de migración e invasión se produce cuando las células se encuentran en un estado quiescente, en el que la tasa de proliferación es baja [229]. Es decir, la expresión de *RAB25* en la línea UM-SCC-74B produce un aumento de la proliferación, lo que podría disminuir su capacidad de migración e invasión.

De modo general nuestros hallazgos indican que la expresión de *RAB25* aumenta la capacidad de proliferación, disminuyendo en cambio la capacidad de migración e invasión, a la vez que potencia la toxicidad inducida por cisplatino en las células de CECC. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los estudios en muestras de pacientes, en los que el nivel elevado de expresión de *RAB25* es un factor de buen pronóstico. En pacientes con CECC, la pérdida de expresión de *RAB25* podría aumentar la capacidad de migración e invasión, y la resistencia al tratamiento genotóxico de las células tumorales, que se traduciría, tal y como hemos observado, en una disminución de la SLRL, SLP y SG. No obstante, los resultados indican que algunas de estas características podrían depender del subtipo celular en el cual se exprese la

## Discusión

---

proteína así como de la coexpresión de otros genes implicados en las vías de señalización que regulan la agresividad tumoral y la respuesta a genotóxicos.

Para esclarecer la implicación de *RAB25* en la proliferación, invasión, migración y resistencia o sensibilidad al tratamiento antitumoral es necesario que en un futuro evaluemos desde el punto de vista molecular estas vías y que amplíemos su estudio funcional con mayor número de líneas celulares.



# **CONCLUSIÓN**



### VI CONCLUSIÓN

1. El estudio de la asociación entre el nivel de expresión de los distintos biomarcadores analizados, en biopsias pre-tratamiento, y la evolución clínica de los pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) localmente avanzado, ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1.1. El nivel de expresión de RAB25 es un factor de buen pronóstico que es independiente de las variables clínicas establecidas y que está asociado con la supervivencia libre de recidiva local, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.

1.2. El nivel de expresión de SERPINA-1 es un factor de mal pronóstico que se asocia con la supervivencia libre de recidiva local, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.

1.3. El análisis conjunto de RAB25 y SERPINA-1 permite identificar un subtipo de pacientes que no se beneficia del protocolo terapéutico actual.

1.4. Se ha identificado una firma de expresión de 16 genes que se asocia con la supervivencia global, y se ha validado en dos series independientes de pacientes.

2. Se han identificado líneas de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, establecidas a partir de tumores humanos, con características mesenquimales y líneas con fenotipo epitelial, que presentan patrones de expresión similares a los subtipos tumorales establecidos previamente en pacientes.

## Conclusión

---

3. La sobreexpresión exógena de *RAB25* aumenta la proliferación, disminuye la capacidad de migración e invasión y potencia la citotoxicidad inducida por cisplatino en líneas de carcinoma escamoso de cabeza y cuello humano.

# **BIBLIOGRAFÍA**



**VII BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografía

---

1. THOMAS, G.R., H. NADIMINTI, AND J. REGALADO, *MOLECULAR PREDICTORS OF CLINICAL OUTCOME IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. INT J EXP PATHOL, 2005. **86**(6): P. 347-63.
2. RIES LAG, M.D., KRAPCHO M ET AL, *SEER CANCER STATISTICS REVIEW*. BETHESDA, 2006.
3. MCMAHON, S. AND A.Y. CHEN, *HEAD AND NECK CANCER*. CANCER METASTASIS REV, 2003. **22**(1): P. 21-4.
4. ARGIRIS, A., ET AL., *HEAD AND NECK CANCER*. LANCET, 2008. **371**(9625): P. 1695-709.
5. HUNTER, K.D., E.K. PARKINSON, AND P.R. HARRISON, *PROFILING EARLY HEAD AND NECK CANCER*. NAT REV CANCER, 2005. **5**(2): P. 127-35.
6. HASHIBE, M., ET AL., *EVIDENCE FOR AN IMPORTANT ROLE OF ALCOHOL- AND ALDEHYDE-METABOLIZING GENES IN CANCERS OF THE UPPER AERODIGESTIVE TRACT*. CANCER EPIDEMIOL BIOMARKERS PREV, 2006. **15**(4): P. 696-703.
7. SUAREZ, C., ET AL., *TUMOURS OF FAMILIAL ORIGIN IN THE HEAD AND NECK*. ORAL ONCOL, 2006. **42**(10): P. 965-78.
8. TRIZNA, Z. AND S.P. SCHANTZ, *HEREDITARY AND ENVIRONMENTAL FACTORS ASSOCIATED WITH RISK AND PROGRESSION OF HEAD AND NECK CANCER*. OTOLARYNGOL CLIN NORTH AM, 1992. **25**(5): P. 1089-103.
9. HOBBS, C.G., ET AL., *HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND HEAD AND NECK CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS*. CLIN OTOLARYNGOL, 2006. **31**(4): P. 259-66.
10. D'SOUZA, G., ET AL., *CASE-CONTROL STUDY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND OROPHARYNGEAL CANCER*. N ENGL J MED, 2007. **356**(19): P. 1944-56.
11. BRUCE BROCKSTEIN, M.D.A.G.M., M.D., *HEAD AND NECK CANCER*. 2003: KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS.
12. PATEL, S.G. AND J.P. SHAH, *TNM STAGING OF CANCERS OF THE HEAD AND NECK: STRIVING FOR UNIFORMITY AMONG DIVERSITY*. CA CANCER J CLIN, 2005. **55**(4): P. 242-58; QUIZ 261-2, 264.
13. MOISA, II, *NEUROENDOCRINE TUMORS OF THE LARYNX*. HEAD NECK, 1991. **13**(6): P. 498-508.
14. LAURIE, S.A. AND L. LICITRA, *SYSTEMIC THERAPY IN THE PALLIATIVE MANAGEMENT OF ADVANCED SALIVARY GLAND CANCERS*. J CLIN ONCOL, 2006. **24**(17): P. 2673-8.
15. SPANO, J.P., ET AL., *NASOPHARYNGEAL CARCINOMAS: AN UPDATE*. EUR J CANCER, 2003. **39**(15): P. 2121-35.
16. BARNES, L., ET AL., *PATHOLOGY AND GENETICS OF HEAD AND NECK TUMOURS*. 2005: IARC PRESS.
17. WALDRON, C.A. AND W.G. SHAFER, *LEUKOPLAKIA REVISITED. A CLINICOPATHOLOGIC STUDY 3256 ORAL LEUKOPLAKIAS*. CANCER, 1975. **36**(4): P. 1386-92.
18. SILVERMAN, S., JR., M. GORSKY, AND F. LOZADA, *ORAL LEUKOPLAKIA AND MALIGNANT TRANSFORMATION. A FOLLOW-UP STUDY OF 257 PATIENTS*. CANCER, 1984. **53**(3): P. 563-8.
19. EINHORN, J. AND J. WERSALL, *INCIDENCE OF ORAL CARCINOMA IN PATIENTS WITH LEUKOPLAKIA OF THE ORAL MUCOSA*. CANCER, 1967. **20**(12): P. 2189-93.
20. MICHAEL M. PAPARELLA, D.A.S., *OTOLARYNGOLOGY*. 1991: W.B. SAUNDERS CO.
21. CALIFANO, J., ET AL., *GENETIC PROGRESSION MODEL FOR HEAD AND NECK CANCER: IMPLICATIONS FOR FIELD CANCERIZATION*. CANCER RES, 1996. **56**(11): P. 2488-92.
22. HA, P.K., ET AL., *A TRANSCRIPTIONAL PROGRESSION MODEL FOR HEAD AND NECK CANCER*. CLIN CANCER RES, 2003. **9**(8): P. 3058-64.
23. SLAUGHTER, D.P., H.W. SOUTHWICK, AND W. SMEJKAL, *FIELD CANCERIZATION IN ORAL STRATIFIED SQUAMOUS EPITHELIUM; CLINICAL IMPLICATIONS OF MULTICENTRIC ORIGIN*. CANCER, 1953. **6**(5): P. 963-8.
24. LEEMANS, C.R., B.J. BRAAKHUIS, AND R.H. BRAKENHOFF, *THE MOLECULAR BIOLOGY OF HEAD AND NECK CANCER*. NAT REV CANCER. **11**(1): P. 9-22.
25. HANAHAN, D. AND R.A. WEINBERG, *THE HALLMARKS OF CANCER*. CELL, 2000. **100**(1): P. 57-70.
26. KASTAN, M.B. AND J. BARTEK, *CELL-CYCLE CHECKPOINTS AND CANCER*. NATURE, 2004. **432**(7015): P. 316-23.
27. SOMERS, K.D., ET AL., *FREQUENT P53 MUTATIONS IN HEAD AND NECK CANCER*. CANCER RES, 1992. **52**(21): P. 5997-6000.
28. KOCH, W.M., ET AL., *P53 MUTATION AND LOCOREGIONAL TREATMENT FAILURE IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. J NATL CANCER INST, 1996. **88**(21): P. 1580-6.
29. CHANG, F., S. SYRJANEN, AND K. SYRJANEN, *IMPLICATIONS OF THE P53 TUMOR-SUPPRESSOR GENE IN CLINICAL ONCOLOGY*. J CLIN ONCOL, 1995. **13**(4): P. 1009-22.
30. MAO, L., 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): P. 682-5.

## Bibliografía

---

31. VAN DER RIET, P., ET AL., *FREQUENT LOSS OF CHROMOSOME 9P21-22 EARLY IN HEAD AND NECK CANCER PROGRESSION*. *CANCER RES*, 1994. **54**(5): P. 1156-8.
32. REED, A.L., ET AL., *HIGH FREQUENCY OF P16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) INACTIVATION IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. *CANCER RES*, 1996. **56**(16): P. 3630-3.
33. OZANNE, B., ET AL., *OVER-EXPRESSION OF THE EGF RECEPTOR IS A HALLMARK OF SQUAMOUS CELL CARCINOMAS*. *J PATHOL*, 1986. **149**(1): P. 9-14.
34. GRANDIS, J.R. AND D.J. TWEARDY, *ELEVATED LEVELS OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR ALPHA AND EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR MESSENGER RNA ARE EARLY MARKERS OF CARCINOGENESIS IN HEAD AND NECK CANCER*. *CANCER RES*, 1993. **53**(15): P. 3579-84.
35. HAMA, T., ET AL., *PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR PHOSPHORYLATION AND MUTATION IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. *ONCOLOGIST*, 2009. **14**(9): P. 900-8.
36. MORANDELL, S., ET AL., *PHOSPHOPROTEOMICS STRATEGIES FOR THE FUNCTIONAL ANALYSIS OF SIGNAL TRANSDUCTION*. *PROTEOMICS*, 2006. **6**(14): P. 4047-56.
37. SOK, J.C., ET AL., *MUTANT EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFRVIII) CONTRIBUTES TO HEAD AND NECK CANCER GROWTH AND RESISTANCE TO EGFR TARGETING*. *CLIN CANCER RES*, 2006. **12**(17): P. 5064-73.
38. ISHITOYA, J., ET AL., *GENE AMPLIFICATION AND OVEREXPRESSION OF EGF RECEPTOR IN SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF THE HEAD AND NECK*. *BR J CANCER*, 1989. **59**(4): P. 559-62.
39. HERBST, R.S., *REVIEW OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR BIOLOGY*. *INT J RADIAT ONCOL BIOL PHYS*, 2004. **59**(2 SUPPL): P. 21-6.
40. KALYANKRISHNA, S. AND J.R. GRANDIS, *EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR BIOLOGY IN HEAD AND NECK CANCER*. *J CLIN ONCOL*, 2006. **24**(17): P. 2666-72.
41. SEIWERT, T.Y., ET AL., *THE MET RECEPTOR TYROSINE KINASE IS A POTENTIAL NOVEL THERAPEUTIC TARGET FOR HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. *CANCER RES*, 2009. **69**(7): P. 3021-31.
42. WANG, D., ET AL., *MUTATION AND DOWNREGULATION OF THE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA TYPE II RECEPTOR GENE IN PRIMARY SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF THE HEAD AND NECK*. *CARCINOGENESIS*, 1997. **18**(11): P. 2285-90.
43. COHEN, J., ET AL., *ATTENUATED TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA SIGNALING PROMOTES NUCLEAR FACTOR-KAPPA B ACTIVATION IN HEAD AND NECK CANCER*. *CANCER RES*, 2009. **69**(8): P. 3415-24.
44. MURUGAN, A.K., ET AL., *ONCOGENIC MUTATIONS OF THE PIK3CA GENE IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS*. *INT J ONCOL*, 2008. **32**(1): P. 101-11.
45. OKAMI, K., ET AL., *ANALYSIS OF PTEN/MMAC1 ALTERATIONS IN AERODIGESTIVE TRACT TUMORS*. *CANCER RES*, 1998. **58**(3): P. 509-11.
46. KERBEL, R.S., *TUMOR ANGIOGENESIS*. *N ENGL J MED*, 2008. **358**(19): P. 2039-49.
47. HARDISSON, D., *MOLECULAR PATHOGENESIS OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. *EUR ARCH OTORHINOLARYNGOL*, 2003. **260**(9): P. 502-8.
48. PANTEL, K. AND R.H. BRAKENHOFF, *DISSECTING THE METASTATIC CASCADE*. *NAT REV CANCER*, 2004. **4**(6): P. 448-56.
49. SUN, P.C., ET AL., *TRANSCRIPT MAP OF THE 8P23 PUTATIVE TUMOR SUPPRESSOR REGION*. *GENOMICS*, 2001. **75**(1-3): P. 17-25.
50. THIERY, J.P., *EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITIONS IN TUMOUR PROGRESSION*. *NAT REV CANCER*, 2002. **2**(6): P. 442-54.
51. IKUSHIMA, H. AND K. MIYAZONO, *TGFBETA SIGNALLING: A COMPLEX WEB IN CANCER PROGRESSION*. *NAT REV CANCER*. **10**(6): P. 415-24.
52. LU, S.L., ET AL., *OVEREXPRESSION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA1 IN HEAD AND NECK EPITHELIA RESULTS IN INFLAMMATION, ANGIOGENESIS, AND EPITHELIAL HYPERPROLIFERATION*. *CANCER RES*, 2004. **64**(13): P. 4405-10.
53. STADLER, M.E., ET AL., *MOLECULAR BIOLOGY OF HEAD AND NECK CANCER: RISKS AND PATHWAYS*. *HEMATOL ONCOL CLIN NORTH AM*, 2008. **22**(6): P. 1099-124, VII.
54. SLEBOS, R.J., 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): P. 701-9.
55. MUNGER, K. AND P.M. HOWLEY, *HUMAN PAPILLOMAVIRUS IMMORTALIZATION AND TRANSFORMATION FUNCTIONS*. *VIRUS RES*, 2002. **89**(2): P. 213-28.
56. SZENTIRMAY, Z., ET AL., *HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN HEAD AND NECK CANCER: MOLECULAR BIOLOGY AND CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATIONS*. *CANCER METASTASIS REV*, 2005. **24**(1): P. 19-34.
57. PFISTER, D.G., 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): P. 3693-704.

## Bibliografía

---

58. JONES, A.S., ET AL., *THE TREATMENT OF EARLY LARYNGEAL CANCERS (T1-T2 N0): SURGERY OR IRRADIATION?* HEAD NECK, 2004. **26**(2): P. 127-35.
59. BESE, N.S., J. HENDRY, AND B. JEREMIC, *EFFECTS OF PROLONGATION OF OVERALL TREATMENT TIME DUE TO UNPLANNED INTERRUPTIONS DURING RADIOTHERAPY OF DIFFERENT TUMOR SITES AND PRACTICAL METHODS FOR COMPENSATION.* INT J RADIAT ONCOL BIOL PHYS, 2007. **68**(3): P. 654-61.
60. AMBROSCH, P., *THE ROLE OF LASER MICROSURGERY IN THE TREATMENT OF LARYNGEAL CANCER.* CURR OPIN OTOLARYNGOL HEAD NECK SURG, 2007. **15**(2): P. 82-8.
61. LEFEBVRE, J.L., *LARYNGEAL PRESERVATION IN HEAD AND NECK CANCER: MULTIDISCIPLINARY APPROACH.* LANCET ONCOL, 2006. **7**(9): P. 747-55.
62. SIMENTAL, A.A., JR., J.T. JOHNSON, AND E.N. MYERS, *CERVICAL METASTASIS FROM SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE MAXILLARY ALVEOLUS AND HARD PALATE.* LARYNGOSCOPE, 2006. **116**(9): P. 1682-4.
63. FERRIS, R.L., ET AL., *MOLECULAR STAGING OF CERVICAL LYMPH NODES IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK.* CANCER RES, 2005. **65**(6): P. 2147-56.
64. DUVVURI, U., ET AL., *ELECTIVE NECK DISSECTION AND SURVIVAL IN PATIENTS WITH SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY AND OROPHARYNX.* LARYNGOSCOPE, 2004. **114**(12): P. 2228-34.
65. MYERS, E.N., R.L. WAGNER, AND J.T. JOHNSON, *MICROLARYNGOSCOPIC SURGERY FOR T1 GLOTTIC LESIONS: A COST-EFFECTIVE OPTION.* ANN OTOL RHINOL LARYNGOL, 1994. **103**(1): P. 28-30.
66. MENDENHALL, W.M., ET AL., *DEFINITIVE RADIOTHERAPY FOR NASOPHARYNGEAL CARCINOMA.* AM J CLIN ONCOL, 2006. **29**(6): P. 622-7.
67. NAKAMURA, K., ET AL., *MULTI-INSTITUTIONAL ANALYSIS OF EARLY SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HYPOPHARYNX TREATED WITH RADICAL RADIOTHERAPY.* INT J RADIAT ONCOL BIOL PHYS, 2006. **65**(4): P. 1045-50.
68. FORASTIERE, A., ET AL., *HEAD AND NECK CANCER.* N ENGL J MED, 2001. **345**(26): P. 1890-900.
69. POSNER, M.R., ET AL., *INDUCTION CHEMOTHERAPY IN LOCALLY ADVANCED SQUAMOUS CELL CANCER OF THE HEAD AND NECK: EVOLUTION OF THE SEQUENTIAL TREATMENT APPROACH.* SEMIN ONCOL, 2004. **31**(6): P. 778-85.
70. COHEN, E.E., M.W. LINGEN, AND E.E. VOKES, *THE EXPANDING ROLE OF SYSTEMIC THERAPY IN HEAD AND NECK CANCER.* J CLIN ONCOL, 2004. **22**(9): P. 1743-52.
71. POSNER, M.R., *PARADIGM SHIFT IN THE TREATMENT OF HEAD AND NECK CANCER: THE ROLE OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY.* ONCOLOGIST, 2005. **10 SUPPL 3**: P. 11-9.
72. VETERANS, *INDUCTION CHEMOTHERAPY PLUS RADIATION COMPARED WITH SURGERY PLUS RADIATION IN PATIENTS WITH ADVANCED LARYNGEAL CANCER.* N ENGL J MED, 1991. **324**(24): P. 1685-90.
73. LEFEBVRE, J.L., ET AL., *LARYNX PRESERVATION IN PYRIFORM SINUS CANCER: PRELIMINARY RESULTS OF A EUROPEAN ORGANIZATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER PHASE III TRIAL. EORTC HEAD AND NECK CANCER COOPERATIVE GROUP.* J NATL CANCER INST, 1996. **88**(13): P. 890-9.
74. FORASTIERE, A.A., ET AL., *CONCURRENT CHEMOTHERAPY AND RADIOTHERAPY FOR ORGAN PRESERVATION IN ADVANCED LARYNGEAL CANCER.* N ENGL J MED, 2003. **349**(22): P. 2091-8.
75. DENIS, F., ET AL., *FINAL RESULTS OF THE 94-01 FRENCH HEAD AND NECK ONCOLOGY AND RADIOTHERAPY GROUP RANDOMIZED TRIAL COMPARING RADIOTHERAPY ALONE WITH CONCOMITANT RADIOCHEMOTHERAPY IN ADVANCED-STAGE OROPHARYNX CARCINOMA.* J CLIN ONCOL, 2004. **22**(1): P. 69-76.
76. PACCAGNELLA, A., ET AL., *PHASE III TRIAL OF INITIAL CHEMOTHERAPY IN STAGE III OR IV HEAD AND NECK CANCERS: A STUDY BY THE GRUPPO DI STUDIO SUI TUMORI DELLA TESTA E DEL COLLO.* J NATL CANCER INST, 1994. **86**(4): P. 265-72.
77. ZORAT, P.L., ET AL., *RANDOMIZED PHASE III TRIAL OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN HEAD AND NECK CANCER: 10-YEAR FOLLOW-UP.* J NATL CANCER INST, 2004. **96**(22): P. 1714-7.
78. AL-SARRAF, M., ET AL., *CHEMORADIOTHERAPY VERSUS RADIOTHERAPY IN PATIENTS WITH ADVANCED NASOPHARYNGEAL CANCER: PHASE III RANDOMIZED INTERGROUP STUDY 0099.* J CLIN ONCOL, 1998. **16**(4): P. 1310-7.
79. DOMENGE, C., ET AL., *RANDOMIZED TRIAL OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN OROPHARYNGEAL CARCINOMA. FRENCH GROUPE D'ETUDE DES TUMEURS DE LA TETE ET DU COU (GETTEC).* BR J CANCER, 2000. **83**(12): P. 1594-8.
80. ENSLEY, J.F., ET AL., *CORRELATION BETWEEN RESPONSE TO CISPLATINUM-COMBINATION CHEMOTHERAPY AND SUBSEQUENT RADIOTHERAPY IN PREVIOUSLY UNTREATED PATIENTS WITH ADVANCED SQUAMOUS CELL CANCERS OF THE HEAD AND NECK.* CANCER, 1984. **54**(5): P. 811-4.

## Bibliografía

---

81. ALTUNDAG, O., ET AL., *INDUCTION CHEMOTHERAPY WITH CISPLATIN AND 5-FLUOROURACIL FOLLOWED BY CHEMORADIOTHERAPY OR RADIOOTHERAPY 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): P. 15-21.
82. BARNADAS, A., ET AL., *PHASE I/II DOCETAXEL PLUS CONCURRENT HYPERFRACTIONATED RADIOOTHERAPY IN LOCALLY ADVANCED UNRESECTABLE HEAD AND NECK CANCER (TAX.ES1.102 STUDY)*. CLIN TRANSL ONCOL, 2011. **13**(4): P. 254-60.
83. BONNER, J.A., ET AL., *RADIOOTHERAPY PLUS CETUXIMAB FOR LOCOREGIONALLY ADVANCED HEAD AND NECK CANCER: 5-YEAR SURVIVAL DATA FROM A PHASE 3 RANDOMISED TRIAL, AND RELATION BETWEEN CETUXIMAB-INDUCED RASH AND SURVIVAL*. LANCET ONCOL. **11**(1): P. 21-8.
84. BURTNES, B., ET AL., *PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF CISPLATIN PLUS PLACEBO COMPARED WITH CISPLATIN PLUS CETUXIMAB IN METASTATIC/RECURRENT HEAD AND NECK CANCER: AN EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP STUDY*. J CLIN ONCOL, 2005. **23**(34): P. 8646-54.
85. COHEN, E.E., ET AL., *PHASE II TRIAL OF GEFITINIB 250 MG DAILY IN PATIENTS WITH RECURRENT AND/OR METASTATIC SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK*. CLIN CANCER RES, 2005. **11**(23): P. 8418-24.
86. COHEN, E.E., ET AL., *PHASE II TRIAL OF ZD1839 IN RECURRENT OR METASTATIC SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK*. J CLIN ONCOL, 2003. **21**(10): P. 1980-7.
87. SOULIERES, D., ET AL., *MULTICENTER PHASE II STUDY OF ERLOTINIB, AN ORAL EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR TYROSINE KINASE INHIBITOR, IN PATIENTS WITH RECURRENT OR METASTATIC SQUAMOUS CELL CANCER OF THE HEAD AND NECK*. J CLIN ONCOL, 2004. **22**(1): P. 77-85.
88. KIRBY, A.M., ET AL., *GEFITINIB (ZD1839, IRESSA) AS PALLIATIVE TREATMENT IN RECURRENT OR METASTATIC HEAD AND NECK CANCER*. BR J CANCER, 2006. **94**(5): P. 631-6.
89. STEWART, J.S., ET AL., *PHASE III STUDY OF GEFITINIB COMPARED WITH INTRAVENOUS METHOTREXATE FOR RECURRENT SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK [CORRECTED]*. J CLIN ONCOL, 2009. **27**(11): P. 1864-71.
90. COHEN, E.E., *ROLE OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR PATHWAY-TARGETED THERAPY IN PATIENTS WITH RECURRENT AND/OR METASTATIC SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK*. J CLIN ONCOL, 2006. **24**(17): P. 2659-65.
91. SCHMIDT-ULLRICH, R.K., *MOLECULAR TARGETS IN RADIATION ONCOLOGY*. ONCOGENE, 2003. **22**(37): P. 5730-3.
92. HARRISON, L.B., ET AL., *IMPACT OF TUMOR HYPOXIA AND ANEMIA ON RADIATION THERAPY OUTCOMES*. ONCOLOGIST, 2002. **7**(6): P. 492-508.
93. LONGLEY, D.B., D.P. HARKIN, AND P.G. JOHNSTON, *5-FLUOROURACIL: MECHANISMS OF ACTION AND CLINICAL STRATEGIES*. NAT REV CANCER, 2003. **3**(5): P. 330-8.
94. YOSHIOKA, A., 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): P. 8235-41.
95. EASTMAN, A., *THE FORMATION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DNA ADDUCTS PRODUCED BY ANTICANCER PLATINUM COMPLEXES*. PHARMACOL THER, 1987. **34**(2): P. 155-66.
96. PINTO, A.L. AND S.J. LIPPARD, *BINDING OF THE ANTITUMOR DRUG CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) (CISPLATIN) TO DNA*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 1985. **780**(3): P. 167-80.
97. MCHUGH, P.J., W.R. SONES, AND J.A. HARTLEY, *REPAIR OF INTERMEDIATE STRUCTURES PRODUCED AT DNA INTERSTRAND CROSS-LINKS IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. MOL CELL BIOL, 2000. **20**(10): P. 3425-33.
98. SCHRIJVERS, D. AND J.B. VERMORKEN, *TAXANES IN HEAD AND NECK CANCER*. FUTURE ONCOL, 2005. **1**(6): P. 829-39.
99. LYSENG-WILLIAMSON, K.A. AND C. FENTON, *DOCETAXEL: A REVIEW OF ITS USE IN METASTATIC BREAST CANCER*. DRUGS, 2005. **65**(17): P. 2513-31.
100. SCHRIJVERS, D. AND J.B. VERMORKEN, *TAXANES IN THE TREATMENT OF HEAD AND NECK CANCER*. CURR OPIN ONCOL, 2005. **17**(3): P. 218-24.
101. LURJE, G. AND H.J. LENZ, *EGFR SIGNALING AND DRUG DISCOVERY*. ONCOLOGY, 2009. **77**(6): P. 400-10.
102. LI, S., ET AL., *STRUCTURAL BASIS FOR INHIBITION OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR BY CETUXIMAB*. CANCER CELL, 2005. **7**(4): P. 301-11.
103. KAWAGUCHI, Y., ET AL., *CETUXIMAB INDUCE ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXICITY AGAINST EGFR-EXPRESSING ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. INT J CANCER, 2007. **120**(4): P. 781-7.

## Bibliografía

---

104. KARAMOUZIS, M.V., J.R. GRANDIS, AND A. ARGIRIS, *THERAPIES DIRECTED AGAINST EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR IN AERODIGESTIVE CARCINOMAS*. JAMA, 2007. **298**(1): P. 70-82.
105. MASHBERG, A. AND L.J. FELDMAN, *CLINICAL CRITERIA FOR IDENTIFYING EARLY ORAL AND OROPHARYNGEAL CARCINOMA: ERYTHROPLASIA REVISITED*. AM J SURG, 1988. **156**(4): P. 273-5.
106. PAPARELLA MM, S.D., GLUCKMAN JL, MEYERHOFF WL, *OTOLARYNGOLOGY*. VOL. 1. 1991, PHILADELPHIA: W.B. SAUNDERS COMPANY.
107. LAYLAND, M.K., D.G. SESSIONS, AND J. LENOX, *THE INFLUENCE OF LYMPH NODE METASTASIS IN THE TREATMENT OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY, OROPHARYNX, LARYNX, AND HYPOPHARYNX: NO VERSUS N+*. LARYNGOSCOPE, 2005. **115**(4): P. 629-39.
108. HASINA, R. AND M.W. LINGEN, *HEAD AND NECK CANCER: THE PURSUIT OF MOLECULAR DIAGNOSTIC MARKERS*. SEMIN ONCOL, 2004. **31**(6): P. 718-25.
109. KREIMER, A.R., ET AL., *HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS WORLDWIDE: A SYSTEMATIC REVIEW*. CANCER EPIDEMIOL BIOMARKERS PREV, 2005. **14**(2): P. 467-75.
110. WEINBERGER, P.M., ET AL., *MOLECULAR CLASSIFICATION IDENTIFIES A SUBSET OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS-ASSOCIATED OROPHARYNGEAL CANCERS WITH FAVORABLE PROGNOSIS*. J CLIN ONCOL, 2006. **24**(5): P. 736-47.
111. KUMAR, B., 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): P. 3128-37.
112. HE, Y., 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): P. 1080-7.
113. ANG, K.K., ET AL., *IMPACT OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR EXPRESSION ON SURVIVAL AND PATTERN OF RELAPSE IN PATIENTS WITH ADVANCED HEAD AND NECK CARCINOMA*. CANCER RES, 2002. **62**(24): P. 7350-6.
114. KIM, J.W., ET AL., *GENETIC AND EPIGENETIC INACTIVATION OF LPL GENE IN HUMAN PROSTATE CANCER*. INT J CANCER, 2009. **124**(3): P. 734-8.
115. BOLSTAD, B.M., ET AL., *A COMPARISON OF NORMALIZATION METHODS FOR HIGH DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAY DATA BASED ON VARIANCE AND BIAS*. BIOINFORMATICS, 2003. **19**(2): P. 185-93.
116. LOTHAIRE, P., ET AL., *MOLECULAR MARKERS OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA: PROMISING SIGNS IN NEED OF PROSPECTIVE EVALUATION*. HEAD NECK, 2006. **28**(3): P. 256-69.
117. CHUNG, C.H., 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): P. 4170-6.
118. CHUNG, C.H., ET AL., *MOLECULAR CLASSIFICATION OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS USING PATTERNS OF GENE EXPRESSION*. CANCER CELL, 2004. **5**(5): P. 489-500.
119. BENTZEN, S.M., 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): P. 5560-7.
120. AUBERT, B., ET AL., *OBSERVATION OF A NEW DS MESON DECAYING TO DK AT A MASS OF 2.86 GEV/C2*. PHYS REV LETT, 2006. **97**(22): P. 222001.
121. EKSTRAND, A.J., ET AL., *GENES FOR EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR, TRANSFORMING GROWTH FACTOR ALPHA, AND EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND THEIR EXPRESSION IN HUMAN GLIOMAS IN VIVO*. CANCER RES, 1991. **51**(8): P. 2164-72.
122. WABER, P., ET AL., *GENETIC ALTERATIONS OF CHROMOSOME BAND 9P21-22 IN HEAD AND NECK CANCER ARE NOT RESTRICTED TO P16INK4A*. ONCOGENE, 1997. **15**(14): P. 1699-704.
123. COON, S.W., ET AL., *PROGNOSTIC IMPLICATIONS OF LOSS OF HETEROZYGOSITY AT 8P21 AND 9P21 IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. INT J CANCER, 2004. **111**(2): P. 206-12.
124. GONZALEZ, M.V., ET AL., *DELETION AND METHYLATION OF THE TUMOUR SUPPRESSOR GENE P16/CDKN2 IN PRIMARY HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. J CLIN PATHOL, 1997. **50**(6): P. 509-12.
125. GEISLER, S.A., ET AL., *P16 AND P53 PROTEIN EXPRESSION AS PROGNOSTIC INDICATORS OF SURVIVAL AND DISEASE RECURRENCE FROM HEAD AND NECK CANCER*. CLIN CANCER RES, 2002. **8**(11): P. 3445-53.
126. MIRACCA, E.C., L.P. KOWALSKI, AND M.A. NAGAI, *HIGH PREVALENCE OF P16 GENETIC ALTERATIONS IN HEAD AND NECK TUMOURS*. BR J CANCER, 1999. **81**(4): P. 677-83.

## Bibliografía

---

127. RAWNSLEY, J.D., ET AL., *DELETION ANALYSIS OF THE P16/CDKN2 GENE IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA USING QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD*. ARCH OTOLARYNGOL HEAD NECK SURG, 1997. **123**(8): P. 863-7.
128. NAMAZIE, A., ET AL., *CYCLIN D1 AMPLIFICATION AND P16(MTS1/CDK4I) DELETION CORRELATE WITH POOR PROGNOSIS IN HEAD AND NECK TUMORS*. LARYNGOSCOPE, 2002. **112**(3): P. 472-81.
129. BAZAN, V., ET AL., *PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF P16INK4A ALTERATIONS AND 9P21 LOSS OF HETEROZYGOSITY IN LOCALLY ADVANCED LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. J CELL PHYSIOL, 2002. **192**(3): P. 286-93.
130. DANAHEY, D.G., ET AL., *P16 MUTATION FREQUENCY AND CLINICAL CORRELATION IN HEAD AND NECK CANCER*. ACTA OTOLARYNGOL, 1999. **119**(2): P. 285-8.
131. YUEN, P.W., ET AL., *CLINICOPATHOLOGICAL SIGNIFICANCE OF P16 GENE EXPRESSION IN THE SURGICAL TREATMENT OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS*. J CLIN PATHOL, 2002. **55**(1): P. 58-60.
132. LEWIS, J.S., JR., ET AL., *P16 POSITIVE OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA: AN ENTITY WITH A FAVORABLE PROGNOSIS REGARDLESS OF TUMOR HPV STATUS*. AM J SURG PATHOL. **34**(8): P. 1088-96.
133. HAFKAMP, H.C., ET AL., *MARKED DIFFERENCES IN SURVIVAL RATE BETWEEN SMOKERS AND NONSMOKERS WITH HPV 16-ASSOCIATED TONSILLAR CARCINOMAS*. INT J CANCER, 2008. **122**(12): P. 2656-64.
134. CRUZ, I.B., ET AL., *P53 EXPRESSION ABOVE THE BASAL CELL LAYER IN ORAL MUCOSA IS AN EARLY EVENT OF MALIGNANT TRANSFORMATION AND HAS PREDICTIVE VALUE FOR DEVELOPING ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. J PATHOL, 1998. **184**(4): P. 360-8.
135. BALL, V.A., ET AL., *P53 IMMUNOSTAINING OF SURGICAL MARGINS AS A PREDICTOR OF LOCAL RECURRENCE IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY AND OROPHARYNX*. EAR NOSE THROAT J, 1997. **76**(11): P. 818-23.
136. JIN, X., L. ZHOU, AND A. ZHAO, *MUTANTS OF P53 GENE PRESENCE IN LARYNGEAL CARCINOMA AND ADJACENT HISTOPATHOLOGICALLY NORMAL TISSUE*. ORL J OTORHINOLARYNGOL RELAT SPEC, 2000. **62**(3): P. 140-2.
137. ERBER, R., ET AL., *TP53 DNA CONTACT MUTATIONS ARE SELECTIVELY ASSOCIATED WITH ALLELIC LOSS AND HAVE A STRONG CLINICAL IMPACT IN HEAD AND NECK CANCER*. ONCOGENE, 1998. **16**(13): P. 1671-9.
138. MA, L., ET AL., *CLINICAL IMPLICATION OF SCREENING P53 GENE MUTATIONS IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS*. J CANCER RES CLIN ONCOL, 1998. **124**(7): P. 389-96.
139. MINETA, H., ET AL., *P53 MUTATION, BUT NOT P53 OVEREXPRESSION, CORRELATES WITH SURVIVAL IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. BR J CANCER, 1998. **78**(8): P. 1084-90.
140. KHADEMI, B., ET AL., *THE EXPRESSION OF P53, C-ERBB-1 AND C-ERBB-2 MOLECULES AND THEIR CORRELATION WITH PROGNOSTIC MARKERS IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK TUMORS*. CANCER LETT, 2002. **184**(2): P. 223-30.
141. VIELBA, R., ET AL., *P53 AND CYCLIN D1 AS PROGNOSTIC FACTORS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE LARYNX*. LARYNGOSCOPE, 2003. **113**(1): P. 167-72.
142. NARAYANA, A., ET AL., *IS P53 AN INDEPENDENT PROGNOSTIC FACTOR IN PATIENTS WITH LARYNGEAL CARCINOMA?* CANCER, 1998. **82**(2): P. 286-91.
143. NYLANDER, K., E. DABELSTEEN, AND P.A. HALL, *THE P53 MOLECULE AND ITS PROGNOSTIC ROLE IN SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF THE HEAD AND NECK*. J ORAL PATHOL MED, 2000. **29**(9): P. 413-25.
144. FRIEDMAN, M., ET AL., *PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF BCL-2 AND P53 EXPRESSION IN ADVANCED LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. HEAD NECK, 2001. **23**(4): P. 280-5.
145. GAPANY, M., ET AL., *RELATIONSHIP BETWEEN IMMUNOHISTOCHEMICALLY DETECTABLE P53 PROTEIN AND PROGNOSTIC FACTORS IN HEAD AND NECK TUMORS*. CANCER DETECT PREV, 1993. **17**(3): P. 379-86.
146. PUKKILA, M.J., ET AL., *NUCLEAR AND CYTOPLASMIC P53 EXPRESSION IN PHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA: PROGNOSTIC IMPLICATIONS*. HEAD NECK, 2002. **24**(8): P. 784-91.
147. SMARDOVA, J., ET AL., *ANALYSIS OF TUMOR SUPPRESSOR P53 STATUS IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. ONCOL REP, 2004. **11**(4): P. 923-9.
148. CHENG, Y.L., ET AL., *PROGNOSTIC PREDICTION OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF P53 AND P16 IN RESECTED NON-SMALL CELL LUNG CANCER*. EUR J CARDIOTHORAC SURG, 2003. **23**(2): P. 221-8.
149. ZIOBER, A.F., ET AL., *IDENTIFICATION OF A GENE SIGNATURE FOR RAPID SCREENING OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. CLIN CANCER RES, 2006. **12**(20 PT 1): P. 5960-71.
150. CHUNG, C.H., ET AL., *GENE EXPRESSION PROFILES IDENTIFY EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION AND ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR-KAPPA B SIGNALING AS*

## Bibliografía

---

- CHARACTERISTICS OF A HIGH-RISK HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA. *CANCER RES*, 2006. **66**(16): P. 8210-8.
151. CROMER, A., ET AL., *IDENTIFICATION OF GENES ASSOCIATED WITH TUMORIGENESIS AND METASTATIC POTENTIAL OF HYPOPHARYNGEAL CANCER BY MICROARRAY ANALYSIS*. *ONCOGENE*, 2004. **23**(14): P. 2484-98.
152. GINOS, M.A., 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): P. 55-63.
153. GOTTSCHLICH, S., ET AL., *GENE EXPRESSION PROFILING OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA USING CDNA MICROARRAYS*. *INT J ONCOL*, 2006. **29**(3): P. 605-13.
154. ROEPMAN, 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): P. 182-6.
155. JAIS, J.P., ET AL., *THE EXPRESSION OF 16 GENES RELATED TO THE CELL OF ORIGIN AND IMMUNE RESPONSE PREDICTS SURVIVAL IN ELDERLY PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA TREATED WITH CHOP AND RITUXIMAB*. *LEUKEMIA*, 2008. **22**(10): P. 1917-24.
156. SAINTIGNY, P., ET AL., *GENE EXPRESSION PROFILING PREDICTS THE DEVELOPMENT OF ORAL CANCER*. *CANCER PREV RES (PHILA)*, 2011. **4**(2): P. 218-29.
157. AKERVALL, J., 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): P. 8204-13.
158. DE JONG, M.C., ET AL., *CD44 EXPRESSION PREDICTS LOCAL RECURRENCE AFTER RADIOTHERAPY IN LARYNX CANCER*. *CLIN CANCER RES*. **16**(21): P. 5329-38.
159. PAVON, M.A., ET AL., *GENE EXPRESSION SIGNATURES AND MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH CLINICAL OUTCOME IN LOCALLY ADVANCED HEAD AND NECK CARCINOMA. CARCINOGENESIS*.
160. PAVON, M.A., ET AL., *KU70 PREDICTS RESPONSE AND PRIMARY TUMOR RECURRENCE AFTER THERAPY IN LOCALLY ADVANCED HEAD AND NECK CANCER*. *INT J CANCER*, 2008. **123**(5): P. 1068-79.
161. SCHMITTGEN, T.D. AND K.J. LIVAK, *ANALYZING REAL-TIME PCR DATA BY THE COMPARATIVE C(T) METHOD*. *NAT PROTOC*, 2008. **3**(6): P. 1101-8.
162. DE KOK, J.B., ET AL., *NORMALIZATION OF GENE EXPRESSION MEASUREMENTS IN TUMOR TISSUES: COMPARISON OF 13 ENDOGENOUS CONTROL GENES*. *LAB INVEST*, 2005. **85**(1): P. 154-9.
163. IRIZARRY, R.A., ET AL., *EXPLORATION, NORMALIZATION, AND SUMMARIES OF HIGH DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAY PROBE LEVEL DATA*. *BIostatistics*, 2003. **4**(2): P. 249-64.
164. EMERSON, J.D. AND G.A. COLDITZ, *USE OF STATISTICAL ANALYSIS IN THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*. *N ENGL J MED*, 1983. **309**(12): P. 709-13.
165. FALCON, S. AND R. GENTLEMAN, *USING GOSTATS TO TEST GENE LISTS FOR GO TERM ASSOCIATION*. *BIOINFORMATICS*, 2007. **23**(2): P. 257-8.
166. MERLOS-SUAREZ, A., ET AL., *THE INTESTINAL STEM CELL SIGNATURE IDENTIFIES COLORECTAL CANCER STEM CELLS AND PREDICTS DISEASE RELAPSE*. *CELL STEM CELL*. **8**(5): P. 511-24.
167. SUBRAMANIAN, A., ET AL., *GENE SET ENRICHMENT ANALYSIS: A KNOWLEDGE-BASED APPROACH FOR INTERPRETING GENOME-WIDE EXPRESSION PROFILES*. *PROC NATL ACAD SCI U S A*, 2005. **102**(43): P. 15545-50.
168. BRENNER, J.C., ET AL., *GENOTYPING OF 73 UM-SCC HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINES*. *HEAD NECK*. **32**(4): P. 417-26.
169. ZHAO, M., ET AL., *ASSEMBLY AND INITIAL CHARACTERIZATION OF A PANEL OF 85 GENOMICALLY VALIDATED CELL LINES FROM DIVERSE HEAD AND NECK TUMOR SITES*. *CLIN CANCER RES*.
170. RICKMAN, D.S., ET AL., *PREDICTION OF FUTURE METASTASIS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HEAD AND NECK SQUAMOUS-CELL CARCINOMA BASED ON TRANSCRIPTOME AND GENOME ANALYSIS BY MICROARRAYS*. *ONCOGENE*, 2008. **27**(51): P. 6607-22.
171. PENG, C.H., ET AL., *A NOVEL MOLECULAR SIGNATURE IDENTIFIED BY SYSTEMS GENETICS APPROACH PREDICTS PROGNOSIS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. *PLOS ONE*. **6**(8): P. E23452.
172. AMBATIPUDI, S., ET AL., *GENOME-WIDE EXPRESSION AND COPY NUMBER ANALYSIS IDENTIFIES DRIVER GENES IN GINGIVOBUCCAL CANCERS*. *GENES CHROMOSOMES CANCER*. **51**(2): P. 161-73.
173. THURLOW, J.K., ET AL., *SPECTRAL CLUSTERING OF MICROARRAY DATA ELUCIDATES THE ROLES OF MICROENVIRONMENT REMODELING AND IMMUNE RESPONSES IN SURVIVAL OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. *J CLIN ONCOL*. **28**(17): P. 2881-8.

## Bibliografía

---

174. PAVON, M.A., ET AL., *GENE EXPRESSION SIGNATURES AND MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH CLINICAL OUTCOME IN LOCALLY ADVANCED HEAD AND NECK CARCINOMA*. CARCINOGENESIS, 2012.
175. RANGAN, S.R., *A NEW HUMAN CELL LINE (FADU) FROM A HYPOPHARYNGEAL CARCINOMA*. CANCER, 1972. **29**(1): P. 117-21.
176. TEICHER, B.A., ET AL., *CHARACTERIZATION OF A HUMAN SQUAMOUS CARCINOMA CELL LINE RESISTANT TO CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II)*. CANCER RES, 1987. **47**(2): P. 388-93.
177. RHEINWALD, J.G. AND M.A. BECKETT, *TUMORIGENIC KERATINOCYTE LINES REQUIRING ANCHORAGE AND FIBROBLAST SUPPORT CULTURES FROM HUMAN SQUAMOUS CELL CARCINOMAS*. CANCER RES, 1981. **41**(5): P. 1657-63.
178. MANTHEY, K.C., ET AL., *HYPERPHOSPHORYLATION OF REPLICATION PROTEIN A IN CISPLATIN-RESISTANT AND -SENSITIVE HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINES*. HEAD NECK. **32**(5): P. 636-45.
179. DICKSON, M.A., ET AL., *HUMAN KERATINOCYTES THAT EXPRESS HTERT AND ALSO BYPASS A P16(INK4A)-ENFORCED MECHANISM THAT LIMITS LIFE SPAN BECOME IMMORTAL YET RETAIN NORMAL GROWTH AND DIFFERENTIATION CHARACTERISTICS*. MOL CELL BIOL, 2000. **20**(4): P. 1436-47.
180. HUMTSOE, J.O., ET AL., *TRANSCRIPTIONAL PROFILING IDENTIFIES UPREGULATED GENES FOLLOWING INDUCTION OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN SQUAMOUS CARCINOMA CELLS*. EXP CELL RES. **318**(4): P. 379-90.
181. GROSSHANS, B.L., D. ORTIZ, AND P. NOVICK, *RABS AND THEIR EFFECTORS: ACHIEVING SPECIFICITY IN MEMBRANE TRAFFIC*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2006. **103**(32): P. 11821-7.
182. STENMARK, H., *RAB GTPASES AS COORDINATORS OF VESICLE TRAFFIC*. NAT REV MOL CELL BIOL, 2009. **10**(8): P. 513-25.
183. AGARWAL, R., ET AL., *THE EMERGING ROLE OF THE RAB25 SMALL GTPASE IN CANCER*. TRAFFIC, 2009. **10**(11): P. 1561-8.
184. ETIENNE-MANNEVILLE, S., *POLARITY PROTEINS IN MIGRATION AND INVASION*. ONCOGENE, 2008. **27**(55): P. 6970-80.
185. CHENG, K.W., ET AL., *THE RAB25 SMALL GTPASE DETERMINES AGGRESSIVENESS OF OVARIAN AND BREAST CANCERS*. NAT MED, 2004. **10**(11): P. 1251-6.
186. CHENG, J.M., ET AL., *LOSS OF RAB25 EXPRESSION IN BREAST CANCER*. INT J CANCER, 2006. **118**(12): P. 2957-64.
187. CHENG, J.M., ET AL., *TUMOR SUPPRESSOR FUNCTION OF RAB25 IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER*. INT J CANCER. **126**(12): P. 2799-812.
188. GOLDENRING, J.R. AND K.T. NAM, *RAB25 AS A TUMOUR SUPPRESSOR IN COLON CARCINOGENESIS*. BR J CANCER. **104**(1): P. 33-6.
189. DOZYNKIEWICZ, M.A., ET AL., *RAB25 AND CLIC3 COLLABORATE TO PROMOTE INTEGRIN RECYCLING FROM LATE ENDOSOMES/LYSOSOMES AND DRIVE CANCER PROGRESSION*. DEV CELL. **22**(1): P. 131-45.
190. MOR, O., ET AL., *MOLECULAR ANALYSIS OF TRANSITIONAL CELL CARCINOMA USING CDNA MICROARRAY*. ONCOGENE, 2003. **22**(48): P. 7702-10.
191. HE, H., ET AL., *IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NINE NOVEL HUMAN SMALL GTPASES SHOWING VARIABLE EXPRESSIONS IN LIVER CANCER TISSUES*. GENE EXPR, 2002. **10**(5-6): P. 231-42.
192. NO, J.H., ET AL., *CELL-FREE DNA LEVEL AS A PROGNOSTIC BIOMARKER FOR EPITHELIAL OVARIAN CANCER*. ANTICANCER RES. **32**(8): P. 3467-71.
193. ULISSE, S., ET AL., *INHIBITION OF THE AURORA KINASES SUPPRESSES IN VITRO NT2-D1 CELL GROWTH AND TUMORIGENICITY*. J ENDOCRINOL. **204**(2): P. 135-42.
194. DUFFY, M.J., *THE UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR SYSTEM: ROLE IN MALIGNANCY*. CURR PHARM DES, 2004. **10**(1): P. 39-49.
195. CHOONG, P.F. AND A.P. NADESAPILLAI, *UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR SYSTEM: A MULTIFUNCTIONAL ROLE IN TUMOR PROGRESSION AND METASTASIS*. CLIN ORTHOP RELAT RES, 2003(415 SUPPL): P. S46-58.
196. SPELEMAN, L., ET AL., *PROGNOSTIC VALUE OF PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. HEAD NECK, 2007. **29**(4): P. 341-50.
197. HUNSDORFER, B., ET AL., *[THE PROGNOSTIC IMPORTANCE OF URINASE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATORS (UPA) AND PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITORS (PAI-1) IN THE PRIMARY RESECTION OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA]*. MUND KIEFER GESICHTSCHIR, 2004. **8**(3): P. 173-9.
198. HARBECK, N., ET AL., *TUMOR-ASSOCIATED PROTEOLYTIC FACTORS UPA AND PAI-1: CRITICAL APPRAISAL OF THEIR CLINICAL RELEVANCE IN BREAST CANCER AND THEIR INTEGRATION INTO DECISION-SUPPORT ALGORITHMS*. CRIT REV CLIN LAB SCI, 2007. **44**(2): P. 179-201.

## Bibliografía

---

199. STEINER, E., ET AL., *ROLE OF UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR (UPA) AND PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR TYPE 1 (PAI-1) FOR PROGNOSIS IN ENDOMETRIAL CANCER*. GYNECOL ONCOL, 2008. **108**(3): P. 569-76.
200. HOFMANN, R., ET AL., *CLINICAL RELEVANCE OF UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR, ITS RECEPTOR, AND ITS INHIBITOR IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA*. CANCER, 1996. **78**(3): P. 487-92.
201. OHBA, K., ET AL., *EXPRESSION OF UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR, UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR RECEPTOR AND PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITORS IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA: CORRELATION WITH TUMOR ASSOCIATED MACROPHAGE AND PROGNOSIS*. J UROL, 2005. **174**(2): P. 461-5.
202. SAKAKIBARA, T., ET AL., *PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 AS A POTENTIAL MARKER FOR THE MALIGNANCY OF COLORECTAL CANCER*. BR J CANCER, 2005. **93**(7): P. 799-803.
203. ZHENG, Q., ET AL., *INVASION AND METASTASIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN RELATION TO UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR, ITS RECEPTOR AND INHIBITOR*. J CANCER RES CLIN ONCOL, 2000. **126**(11): P. 641-6.
204. LOSKUTOFF, D.J., ET AL., *REGULATION OF CELL ADHESION BY PAI-1*. APMIS, 1999. **107**(1): P. 54-61.
205. BAJOU, K., ET AL., *ABSENCE OF HOST PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR 1 PREVENTS CANCER INVASION AND VASCULARIZATION*. NAT MED, 1998. **4**(8): P. 923-8.
206. WEBB, D.J., K.S. THOMAS, AND S.L. GONIAS, *PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR 1 FUNCTIONS AS A UROKINASE RESPONSE MODIFIER AT THE LEVEL OF CELL SIGNALING AND THEREBY PROMOTES MCF-7 CELL GROWTH*. J CELL BIOL, 2001. **152**(4): P. 741-52.
207. EOM, S.Y., ET AL., *COSMECEUTICAL PROPERTIES OF POLYSACCHARIDES FROM THE ROOT BARK OF ULMUS DAVIDIANA VAR. JAPONICA*. J COSMET SCI, 2006. **57**(5): P. 355-67.
208. ULISSE, S., ET AL., *THE UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR SYSTEM: A TARGET FOR ANTI-CANCER THERAPY*. CURR CANCER DRUG TARGETS, 2009. **9**(1): P. 32-71.
209. MIINEA, C.P., ET AL., *AS160, THE AKT SUBSTRATE REGULATING GLUT4 TRANSLOCATION, HAS A FUNCTIONAL RAB GTPASE-ACTIVATING PROTEIN DOMAIN*. BIOCHEM J, 2005. **391**(PT 1): P. 87-93.
210. MIKOLAJCZYK, S.D., ET AL., *ARE MULTIPLE MARKERS THE FUTURE OF PROSTATE CANCER DIAGNOSTICS?* CLIN BIOCHEM, 2004. **37**(7): P. 519-28.
211. FERTE, C., F. ANDRE, AND J.C. SORIA, *MOLECULAR CIRCUITS OF SOLID TUMORS: PROGNOSTIC AND PREDICTIVE TOOLS FOR BEDSIDE USE*. NAT REV CLIN ONCOL. **7**(7): P. 367-80.
212. LUDWIG, J.A. AND J.N. WEINSTEIN, *BIOMARKERS IN CANCER STAGING, PROGNOSIS AND TREATMENT SELECTION*. NAT REV CANCER, 2005. **5**(11): P. 845-56.
213. AGRAWAL, N., ET AL., *EXOME SEQUENCING OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA REVEALS INACTIVATING MUTATIONS IN NOTCH1*. SCIENCE. **333**(6046): P. 1154-7.
214. STRANSKY, N., ET AL., *THE MUTATIONAL LANDSCAPE OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA*. SCIENCE. **333**(6046): P. 1157-60.
215. MORENO-BUENO, G., ET AL., *THE MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR FEATURES OF THE EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION*. NAT PROTOC, 2009. **4**(11): P. 1591-613.
216. FRIEDL, P. AND K. WOLF, *TUMOUR-CELL INVASION AND MIGRATION: DIVERSITY AND ESCAPE MECHANISMS*. NAT REV CANCER, 2003. **3**(5): P. 362-74.
217. CHEN, J.H., ET AL., *LOSS OF PROLIFERATIVE CAPACITY AND INDUCTION OF SENESCENCE IN OXIDATIVELY STRESSED HUMAN FIBROBLASTS*. J BIOL CHEM, 2004. **279**(47): P. 49439-46.
218. MANDIC, R., ET AL., *TREATMENT OF HNSCC CELL LINES WITH THE EGFR-SPECIFIC INHIBITOR CETUXIMAB (ERBITUX) RESULTS IN PARADOX PHOSPHORYLATION OF TYROSINE 1173 IN THE RECEPTOR*. FEBS LETT, 2006. **580**(20): P. 4793-800.
219. ZHANG, N., ET AL., *CONCURRENT CETUXIMAB, CISPLATIN, AND RADIATION FOR SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK IN VITRO*. RADIOOTHER ONCOL, 2009. **92**(3): P. 388-92.
220. DOODY, J.F., ET AL., *INHIBITORY ACTIVITY OF CETUXIMAB ON EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR MUTATIONS IN NON SMALL CELL LUNG CANCERS*. MOL CANCER THER, 2007. **6**(10): P. 2642-51.
221. COOPER, J.B. AND E.E. COHEN, *MECHANISMS OF RESISTANCE TO EGFR INHIBITORS IN HEAD AND NECK CANCER*. HEAD NECK, 2009. **31**(8): P. 1086-94.
222. FREDERICK, B.A., ET AL., *EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION PREDICTS GEFITINIB RESISTANCE IN CELL LINES OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA*. MOL CANCER THER, 2007. **6**(6): P. 1683-91.
223. CASWELL, P.T., ET AL., *RAB25 ASSOCIATES WITH ALPHA5BETA1 INTEGRIN TO PROMOTE INVASIVE MIGRATION IN 3D MICROENVIRONMENTS*. DEV CELL, 2007. **13**(4): P. 496-510.

## Bibliografía

---

224. WHITE, D.P., P.T. CASWELL, AND J.C. NORMAN, *ALPHA V BETA3 AND ALPHA5BETA1 INTEGRIN RECYCLING PATHWAYS DICTATE DOWNSTREAM RHO KINASE SIGNALING TO REGULATE PERSISTENT CELL MIGRATION*. J CELL BIOL, 2007. **177**(3): P. 515-25.
225. CASWELL, P.T., ET AL., *RAB-COUPILING PROTEIN COORDINATES RECYCLING OF ALPHA5BETA1 INTEGRIN AND EGFR1 TO PROMOTE CELL MIGRATION IN 3D MICROENVIRONMENTS*. J CELL BIOL, 2008. **183**(1): P. 143-55.
226. GAO, C.F., ET AL., *PROLIFERATION AND INVASION: PLASTICITY IN TUMOR CELLS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2005. **102**(30): P. 10528-33.



## VIII ANEXO

Tabla 29. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio Chung et al [150].

Variable	Número de casos (%)
<b>Sexo</b>	
Hombre	27 (93%)
Mujer	2 (6,8%)
<b>Localización tumoral</b>	
Cavidad oral	13 (45%)
Laringe	5 (17%)
Orofaringe	11 (38%)
<b>Tamaño tumoral</b>	
T1	4 (14%)
T2	11 (21%)
T3	8 (27%)
T4	6 (21%)
<b>Afectación ganglionar</b>	
N <sup>+</sup>	7 (24%)
N <sup>-</sup>	22 (76%)
<b>Estadio Tumoral (TNM)</b>	
II	3 (10%)
III	5 (17%)
IV	21 (72%)
<b>Tratamiento<sup>1</sup></b>	
Cirugía	4 (14%)
QTI+QRT+Cirugía	1 (3,4%)
Cirugía seguida de	
RT	13 (45%)
QRT	10 (34,5%)

Tabla 30. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio Rickman et al [171].

Variable	Número de casos (%)
<b>Sexo</b>	
Hombre	76 (94%)
Mujer	5 (6%)
<b>Localización tumoral</b>	
Cavidad oral	10 (12%)
Hipofaringe	36 (44%)
Orofaringe	35 (43%)
<b>Tamaño tumoral</b>	
T1	3 (3,7%)
T2	38 (47%)
T3	30 (37%)
T4	10 (12%)
<b>Afectación ganglionar</b>	
N <sup>+</sup>	17 (21%)
N <sup>-</sup>	64 (79%)
<b>Estadio Tumoral (TNM)</b>	
II	7 (8%)
III	23 (28%)
IV	51 (63%)
<b>Tratamiento</b>	
Cirugía seguida de	
RT	73 (90%)
QRT	8 (10%)

## Anexo

**Tabla 31. Genes asociados con la supervivencia global de los pacientes. *p* valor < 0,05**

<u>Probe</u>	<u>Symbol</u>	<u>logFC</u>	<u>t-statistic</u>	<u>p-value</u>
<u>206177 s at</u>	ARG1	<b>1.21616</b>	<b>2.54487</b>	<b>0.0136311</b>
<u>206400 at</u>	LGALS7	<b>1.13386</b>	<b>2.50842</b>	<b>0.0149626</b>
<u>220724 at</u>	FLJ21511	<b>1.09794</b>	<b>2.22648</b>	<b>0.0299035</b>
<u>203939 at</u>	NT5E	<b>0.96623</b>	<b>2.42213</b>	<b>0.0185948</b>
<u>206026 s at</u>	TNFAIP6	<b>0.899087</b>	<b>2.16244</b>	<b>0.0347453</b>
<u>204379 s at</u>	FGFR3	<b>0.893426</b>	<b>2.90665</b>	<b>0.00517595</b>
<u>219973 at</u>	ARSJ	<b>0.888135</b>	<b>2.26413</b>	<b>0.0273432</b>
<u>206432 at</u>	HAS2	<b>0.848492</b>	<b>2.4382</b>	<b>0.0178634</b>
<u>209885 at</u>	RHOD	<b>0.844074</b>	<b>2.4659</b>	<b>0.0166635</b>
<u>202743 at</u>	PIK3R3	<b>0.809656</b>	<b>2.57485</b>	<b>0.0126177</b>
<u>220346 at</u>	MTHFD2L	<b>0.785966</b>	<b>2.34145</b>	<b>0.0226867</b>
<u>218186 at</u>	RAB25	<b>0.781587</b>	<b>2.56847</b>	<b>0.0128275</b>
<u>201975 at</u>	CLIP1	<b>0.747579</b>	<b>2.40725</b>	<b>0.0192954</b>
<u>205349 at</u>	GNA15	<b>0.736667</b>	<b>2.91671</b>	<b>0.00503303</b>
<u>205402 x at</u>	PRSS2	<b>0.733876</b>	<b>2.16572</b>	<b>0.0344816</b>
<u>206482 at</u>	PTK6	<b>0.724775</b>	<b>2.07367</b>	<b>0.0425863</b>
<u>201482 at</u>	QSOX1	<b>0.706085</b>	<b>2.22723</b>	<b>0.0298502</b>
<u>210128 s at</u>	LTB4R	<b>0.695939</b>	<b>2.39368</b>	<b>0.0199552</b>
<u>204141 at</u>	TUBB2A	<b>0.689352</b>	<b>2.02898</b>	<b>0.0470854</b>
<u>219763 at</u>	DENND1A	<b>0.678003</b>	<b>2.16145</b>	<b>0.0348254</b>
<u>220780 at</u>	PLA2G3	<b>0.674008</b>	<b>2.29078</b>	<b>0.0256505</b>
<u>205310 at</u>	FBXO46	<b>0.667712</b>	<b>2.15147</b>	<b>0.0356404</b>
<u>216470 x at</u>	TRY6	<b>0.657288</b>	<b>2.03362</b>	<b>0.0466005</b>
<u>219316 s at</u>	FLVCR2	<b>0.655463</b>	<b>2.1495</b>	<b>0.0358029</b>
<u>214838 at</u>	SFT2D2	<b>0.653466</b>	<b>2.21376</b>	<b>0.0308149</b>
<u>219092 s at</u>	IPPK	<b>0.650847</b>	<b>2.14189</b>	<b>0.0364381</b>
<u>214382 at</u>	UNC93A	<b>0.650423</b>	<b>2.11976</b>	<b>0.0383416</b>
<u>213618 at</u>	CENTD1	<b>0.64123</b>	<b>2.33524</b>	<b>0.0230331</b>
<u>207114 at</u>	LY6G6C	<b>0.641111</b>	<b>2.24544</b>	<b>0.0285892</b>
<u>204976 s at</u>	AMMECR1	<b>0.640675</b>	<b>2.08606</b>	<b>0.0414073</b>
<u>220240 s at</u>	TMCO3	<b>0.637434</b>	<b>2.0675</b>	<b>0.0431846</b>
<u>206604 at</u>	OVOL1	<b>0.634947</b>	<b>2.28322</b>	<b>0.0261214</b>
<u>212882 at</u>	KLHL18	<b>0.614365</b>	<b>2.16371</b>	<b>0.0346429</b>
<u>204503 at</u>	EVPL	<b>0.59668</b>	<b>2.12403</b>	<b>0.037968</b>
<u>209126 x at</u>	KRT6B	<b>0.58078</b>	<b>2.55736</b>	<b>0.0132002</b>
<u>202637 s at</u>	ICAM1	<b>0.574074</b>	<b>2.07481</b>	<b>0.042477</b>
<u>208093 s at</u>	NDEL1	<b>0.571601</b>	<b>2.15798</b>	<b>0.0351067</b>
<u>205323 s at</u>	MTF1	<b>0.559934</b>	<b>2.25664</b>	<b>0.027837</b>
<u>216388 s at</u>	LTB4R	<b>0.557659</b>	<b>2.42712</b>	<b>0.0183648</b>
<u>204254 s at</u>	VDR	<b>0.554643</b>	<b>2.01703</b>	<b>0.0483563</b>
<u>209873 s at</u>	PKP3	<b>0.548598</b>	<b>2.10773</b>	<b>0.0394124</b>
<u>216397 s at</u>	BOP1	<b>0.539074</b>	<b>2.58606</b>	<b>0.0122566</b>
<u>203046 s at</u>	TIMELESS	<b>0.529749</b>	<b>2.19861</b>	<b>0.0319321</b>
<u>218752 at</u>	ZMAT5	<b>0.529696</b>	<b>2.08954</b>	<b>0.0410816</b>
<u>205607 s at</u>	SCYL3	<b>0.529087</b>	<b>2.15093</b>	<b>0.0356849</b>
<u>209212 s at</u>	KLF5	<b>0.517791</b>	<b>2.18324</b>	<b>0.0331026</b>
<u>220412 x at</u>	KCNK7	<b>0.504299</b>	<b>2.01368</b>	<b>0.0487174</b>
<u>206491 s at</u>	NAPA	<b>0.500675</b>	<b>3.02177</b>	<b>0.00374374</b>
<u>212716 s at</u>	EIF3K	<b>0.496865</b>	<b>2.53427</b>	<b>0.014007</b>

## Anexo

<b>215032 at</b>	RREB1	<b>0.495886</b>	<b>2.42624</b>	<b>0.018405</b>
<b>208751 at</b>	NAPA	<b>0.480741</b>	<b>2.84028</b>	<b>0.00621783</b>
<b>205536 at</b>	VAV2	<b>0.474378</b>	<b>2.47501</b>	<b>0.016285</b>
<b>203122 at</b>	TTC15	<b>0.473876</b>	<b>2.55235</b>	<b>0.0133716</b>
<b>203390 s at</b>	KIF3C	<b>0.466905</b>	<b>2.10633</b>	<b>0.0395393</b>
<b>205322 s at</b>	MTF1	<b>0.46078</b>	<b>2.13597</b>	<b>0.0369394</b>
<b>210405 x at</b>	TNFRSF10B	<b>0.457063</b>	<b>2.00471</b>	<b>0.0496971</b>
<b>209502 s at</b>	BAIAP2	<b>0.452566</b>	<b>2.43702</b>	<b>0.0179163</b>
<b>216985 s at</b>	STX3	<b>0.446733</b>	<b>2.04762</b>	<b>0.045162</b>
<b>200668 s at</b>	UBE2D3	<b>0.428161</b>	<b>2.09855</b>	<b>0.0402476</b>
<b>201872 s at</b>	ABCE1	<b>0.420939</b>	<b>2.07853</b>	<b>0.0421202</b>
<b>200744 s at</b>	GNB1	<b>0.377566</b>	<b>2.36107</b>	<b>0.0216237</b>
<b>218818 at</b>	FHL3	<b>0.374762</b>	<b>2.52965</b>	<b>0.0141735</b>
<b>215495 s at</b>	SAMD4A	<b>0.366508</b>	<b>2.034</b>	<b>0.0465606</b>
<b>214266 s at</b>	PDLIM7	<b>0.361839</b>	<b>2.17704</b>	<b>0.033585</b>
<b>209878 s at</b>	RELA	<b>0.354577</b>	<b>2.48222</b>	<b>0.0159911</b>
<b>211078 s at</b>	STK3	<b>0.284352</b>	<b>2.06933</b>	<b>0.0430065</b>

Tabla 32. Genes asociados con la recidiva local de los pacientes. *p* valor < 0,05

<u>Probe</u>	<u>Symbol</u>	<u>logFC</u>	<u>t-statistic</u>	<u>p-value</u>
<b>202628 s at</b>	SERPINE1	<b>0.84742</b>	<b>2.24141</b>	<b>0.0273806</b>
<b>201147 s at</b>	TIMP3	<b>0.805829</b>	<b>2.29682</b>	<b>0.0238756</b>
<b>201506 at</b>	TGFB1	<b>0.796791</b>	<b>2.6595</b>	<b>0.00921679</b>
<b>202627 s at</b>	SERPINE1	<b>0.782821</b>	<b>2.21287</b>	<b>0.029356</b>
<b>201149 s at</b>	TIMP3	<b>0.702393</b>	<b>2.16261</b>	<b>0.033139</b>
<b>202998 s at</b>	LOXL2	<b>0.658797</b>	<b>2.71674</b>	<b>0.00786333</b>
<b>216080 s at</b>	FADS3	<b>0.511885</b>	<b>2.63624</b>	<b>0.00982483</b>
<b>201389 at</b>	ITGA5	<b>0.500976</b>	<b>2.65252</b>	<b>0.00939551</b>
<b>201105 at</b>	LGALS1	<b>0.489799</b>	<b>2.09966</b>	<b>0.0384692</b>
<b>221423 s at</b>	YIPF5	<b>0.404385</b>	<b>1.98642</b>	<b>0.0499324</b>
<b>201106 at</b>	GPX4	<b>-0.278516</b>	<b>-2.03768</b>	<b>0.0444258</b>
<b>212400 at</b>	FAM102A	<b>-0.37012</b>	<b>-2.02256</b>	<b>0.0459931</b>
<b>210249 s at</b>	NCOA1	<b>-0.375187</b>	<b>-2.07081</b>	<b>0.0411498</b>
<b>204484 at</b>	PIK3C2B	<b>-0.39246</b>	<b>-2.02829</b>	<b>0.0453929</b>
<b>216210 x at</b>	TRIOBP	<b>-0.404318</b>	<b>-2.04102</b>	<b>0.0440852</b>
<b>218648 at</b>	CRTC3	<b>-0.405107</b>	<b>-2.31886</b>	<b>0.0225954</b>
<b>218741 at</b>	CENPM	<b>-0.406444</b>	<b>-2.23305</b>	<b>0.0279464</b>
<b>219946 x at</b>	MYH14	<b>-0.406751</b>	<b>-2.24354</b>	<b>0.0272379</b>
<b>211401 s at</b>	FGFR2	<b>-0.434372</b>	<b>-2.10321</b>	<b>0.0381497</b>
<b>202032 s at</b>	MAN2A2	<b>-0.448449</b>	<b>-2.55668</b>	<b>0.0121886</b>
<b>218657 at</b>	RAPGEFL1	<b>-0.464639</b>	<b>-2.0946</b>	<b>0.0389281</b>
<b>212066 s at</b>	USP34	<b>-0.467701</b>	<b>-2.14232</b>	<b>0.0347821</b>
<b>205607 s at</b>	SCYL3	<b>-0.474171</b>	<b>-2.05914</b>	<b>0.0422793</b>
<b>212916 at</b>	PHF8	<b>-0.486765</b>	<b>-2.61651</b>	<b>0.0103688</b>
<b>212351 at</b>	EIF2B5	<b>-0.493917</b>	<b>-2.13316</b>	<b>0.035547</b>
<b>207540 s at</b>	SYK	<b>-0.494425</b>	<b>-2.23843</b>	<b>0.0275809</b>
<b>214373 at</b>	LOC728210	<b>-0.539572</b>	<b>-2.06694</b>	<b>0.0415217</b>
<b>201675 at</b>	AKAP1	<b>-0.541845</b>	<b>-2.25449</b>	<b>0.0265148</b>
<b>207267 s at</b>	DSCR6	<b>-0.560455</b>	<b>-2.30549</b>	<b>0.0233645</b>
<b>217983 s at</b>	RNASET2	<b>-0.569666</b>	<b>-2.52855</b>	<b>0.0131398</b>
<b>218696 at</b>	EIF2AK3	<b>-0.588102</b>	<b>-2.07335</b>	<b>0.0409073</b>
<b>220035 at</b>	NUP210	<b>-0.602019</b>	<b>-2.51934</b>	<b>0.0134653</b>

## Anexo

<b>218546 at</b>	C1orf115	<b>-0.615374</b>	<b>-2.59919</b>	<b>0.0108686</b>
<b>204503 at</b>	EVPL	<b>-0.635441</b>	<b>-2.45988</b>	<b>0.0157474</b>
<b>210613 s at</b>	SYNGR1	<b>-0.643543</b>	<b>-2.20247</b>	<b>0.0301057</b>
<b>202454 s at</b>	ERBB3	<b>-0.651484</b>	<b>-2.12737</b>	<b>0.0360375</b>
<b>218035 s at</b>	FLJ20273	<b>-0.661096</b>	<b>-2.10768</b>	<b>0.0377513</b>
<b>218186 at</b>	RAB25	<b>-0.663917</b>	<b>-2.22512</b>	<b>0.0284933</b>
<b>210827 s at</b>	ELF3	<b>-0.672674</b>	<b>-2.38379</b>	<b>0.0191691</b>
<b>209106 at</b>	NCOA1	<b>-0.716591</b>	<b>-2.36504</b>	<b>0.0201077</b>
<b>212841 s at</b>	PPFIBP2	<b>-0.72643</b>	<b>-2.60202</b>	<b>0.0107852</b>
<b>201428 at</b>	CLDN4	<b>-0.751725</b>	<b>-2.48261</b>	<b>0.014837</b>
<b>209205 s at</b>	LMO4	<b>-0.852794</b>	<b>-2.34423</b>	<b>0.0211967</b>
<b>219681 s at</b>	RAB11FIP1	<b>-0.871537</b>	<b>-2.53679</b>	<b>0.0128545</b>
<b>209204 at</b>	LMO4	<b>-0.890882</b>	<b>-2.09258</b>	<b>0.0391129</b>
<b>204753 s at</b>	HLF	<b>-0.899947</b>	<b>-2.26923</b>	<b>0.0255679</b>
<b>205590 at</b>	RASGRP1	<b>-1.0408</b>	<b>-2.86462</b>	<b>0.00516198</b>
<b>204734 at</b>	KRT15	<b>-1.21751</b>	<b>-2.76774</b>	<b>0.00681262</b>
<b>219554 at</b>	RHCG	<b>-1.33032</b>	<b>-2.53604</b>	<b>0.01288</b>
<b>201650 at</b>	KRT19	<b>-1.73202</b>	<b>-2.57517</b>	<b>0.0115975</b>
<b>207935 s at</b>	KRT13	<b>-1.82882</b>	<b>-2.43664</b>	<b>0.0167298</b>

Tabla 33. Listado de genes diferencialmente expresados entre las mucosas normales y los tumores de CECC incluidos en el estudio.  $p < 0,01$

Probe	Symbol	logFC	t-statistic	p-value
<b>204475 at</b>	MMP1	<b>7.34115</b>	<b>14.4447</b>	<b>2.8394e-26</b>
<b>205828 at</b>	MMP3	<b>5.14222</b>	<b>7.76671</b>	<b>6.98662e-12</b>
<b>204580 at</b>	MMP12	<b>4.83492</b>	<b>9.98812</b>	<b>9.93257e-17</b>
<b>205680 at</b>	MMP10	<b>4.32555</b>	<b>7.09375</b>	<b>1.86146e-10</b>
<b>209875 s at</b>	SPP1	<b>3.95565</b>	<b>5.84662</b>	<b>6.25206e-08</b>
<b>209942 x at</b>	MAGEA3	<b>3.61556</b>	<b>3.89541</b>	<b>0.000176714</b>
<b>214612 x at</b>	MAGEA6	<b>3.47183</b>	<b>3.80545</b>	<b>0.000243317</b>
<b>210511 s at</b>	INHBA	<b>3.41439</b>	<b>6.38394</b>	<b>5.37127e-09</b>
<b>211756 at</b>	PTHLH	<b>3.37313</b>	<b>5.51749</b>	<b>2.68218e-07</b>
<b>218804 at</b>	TMEM16A	<b>3.36199</b>	<b>4.93784</b>	<b>3.14597e-06</b>
<b>214974 x at</b>	CXCL5	<b>3.31966</b>	<b>4.68352</b>	<b>8.84522e-06</b>
<b>202267 at</b>	LAMC2	<b>3.25471</b>	<b>7.19097</b>	<b>1.16432e-10</b>
<b>205157 s at</b>	KRT17	<b>3.20645</b>	<b>9.46729</b>	<b>1.38726e-15</b>
<b>202311 s at</b>	COL1A1	<b>3.17241</b>	<b>6.61946</b>	<b>1.78421e-09</b>
<b>211122 s at</b>	CXCL11	<b>2.9089</b>	<b>3.93184</b>	<b>0.000155034</b>
<b>202859 x at</b>	IL8	<b>2.89706</b>	<b>4.9891</b>	<b>2.54513e-06</b>
<b>205483 s at</b>	ISG15	<b>2.89459</b>	<b>6.8841</b>	<b>5.08702e-10</b>
<b>206300 s at</b>	PTHLH	<b>2.87418</b>	<b>4.59148</b>	<b>1.27606e-05</b>
<b>206858 s at</b>	HOXC6	<b>2.86744</b>	<b>6.59597</b>	<b>1.99282e-09</b>
<b>204533 at</b>	CXCL10	<b>2.72813</b>	<b>4.5232</b>	<b>1.6702e-05</b>
<b>208025 s at</b>	HMGA2	<b>2.7052</b>	<b>4.49574</b>	<b>1.85989e-05</b>
<b>219087 at</b>	ASPN	<b>2.70411</b>	<b>5.38452</b>	<b>4.77573e-07</b>
<b>37892 at</b>	COL11A1	<b>2.65844</b>	<b>3.67158</b>	<b>0.000388144</b>
<b>206513 at</b>	AIM2	<b>2.65483</b>	<b>5.31095</b>	<b>6.55204e-07</b>
<b>202310 s at</b>	COL1A1	<b>2.62217</b>	<b>5.74312</b>	<b>9.92488e-08</b>
<b>203915 at</b>	CXCL9	<b>2.62193</b>	<b>4.50837</b>	<b>1.7702e-05</b>
<b>212236 x at</b>	KRT17	<b>2.5845</b>	<b>9.11263</b>	<b>8.33233e-15</b>
<b>220322 at</b>	IL1F9	<b>2.57785</b>	<b>3.92804</b>	<b>0.000157171</b>
<b>210163 at</b>	CXCL11	<b>2.54858</b>	<b>3.88024</b>	<b>0.00018657</b>
<b>221730 at</b>	COL5A2	<b>2.46944</b>	<b>5.51881</b>	<b>2.66674e-07</b>

## Anexo

<b><u>213790 at</u></b>	ADAM12	<b>2.4655</b>	<b>6.05562</b>	<b>2.43233e-08</b>
<b><u>213797 at</u></b>	RSAD2	<b>2.45537</b>	<b>4.58023</b>	<b>1.33415e-05</b>
<b><u>205959 at</u></b>	MMP13	<b>2.44329</b>	<b>3.76757</b>	<b>0.000278004</b>
<b><u>203789 s at</u></b>	SEMA3C	<b>2.43973</b>	<b>4.82411</b>	<b>5.01355e-06</b>
<b><u>221729 at</u></b>	COL5A2	<b>2.41307</b>	<b>5.49259</b>	<b>2.98969e-07</b>
<b><u>205943 at</u></b>	TDO2	<b>2.41008</b>	<b>4.28086</b>	<b>4.25856e-05</b>
<b><u>202998 s at</u></b>	LOXL2	<b>2.39062</b>	<b>7.74049</b>	<b>7.95042e-12</b>
<b><u>201641 at</u></b>	BST2	<b>2.34078</b>	<b>6.12967</b>	<b>1.73496e-08</b>
<b><u>204415 at</u></b>	IFI6	<b>2.31481</b>	<b>3.89599</b>	<b>0.000176348</b>
<b><u>202404 s at</u></b>	COL1A2	<b>2.30564</b>	<b>5.59406</b>	<b>1.91807e-07</b>
<b><u>206569 at</u></b>	IL24	<b>2.29525</b>	<b>4.06126</b>	<b>9.67841e-05</b>
<b><u>203153 at</u></b>	IFIT1	<b>2.286</b>	<b>4.87098</b>	<b>4.14058e-06</b>
<b><u>202628 s at</u></b>	SERPINE1	<b>2.25653</b>	<b>4.56373</b>	<b>1.42396e-05</b>
<b><u>211980 at</u></b>	COL4A1	<b>2.25069</b>	<b>7.55189</b>	<b>2.0086e-11</b>
<b><u>203184 at</u></b>	FBN2	<b>2.22523</b>	<b>3.72066</b>	<b>0.00032748</b>
<b><u>212489 at</u></b>	COL5A1	<b>2.21782</b>	<b>5.17</b>	<b>1.19346e-06</b>
<b><u>209800 at</u></b>	KRT16	<b>2.19475</b>	<b>4.08466</b>	<b>8.87918e-05</b>
<b><u>203936 s at</u></b>	MMP9	<b>2.17581</b>	<b>5.29515</b>	<b>7.01052e-07</b>
<b><u>211964 at</u></b>	COL4A2	<b>2.16415</b>	<b>6.69824</b>	<b>1.23015e-09</b>
<b><u>210135 s at</u></b>	SHOX2	<b>2.1542</b>	<b>5.67911</b>	<b>1.31834e-07</b>
<b><u>212364 at</u></b>	MYO1B	<b>2.1424</b>	<b>6.40101</b>	<b>4.96132e-09</b>
<b><u>202627 s at</u></b>	SERPINE1	<b>2.14206</b>	<b>4.57435</b>	<b>1.3655e-05</b>
<b><u>215446 s at</u></b>	LOX	<b>2.05813</b>	<b>4.32022</b>	<b>3.66572e-05</b>
<b><u>210355 at</u></b>	PTHLH	<b>2.05733</b>	<b>3.89836</b>	<b>0.000174855</b>
<b><u>203413 at</u></b>	NELL2	<b>2.05385</b>	<b>3.70846</b>	<b>0.000341659</b>
<b><u>201438 at</u></b>	COL6A3	<b>2.05346</b>	<b>5.06576</b>	<b>1.84963e-06</b>
<b><u>211161 s at</u></b>	COL3A1	<b>2.04247</b>	<b>5.51186</b>	<b>2.74883e-07</b>
<b><u>212488 at</u></b>	COL5A1	<b>2.02733</b>	<b>4.84571</b>	<b>4.59105e-06</b>
<b><u>211981 at</u></b>	COL4A1	<b>2.0244</b>	<b>7.64696</b>	<b>1.25974e-11</b>
<b><u>206214 at</u></b>	PLA2G7	<b>2.02028</b>	<b>5.14504</b>	<b>1.32604e-06</b>
<b><u>202234 s at</u></b>	SLC16A1	<b>2.00482</b>	<b>4.32864</b>	<b>3.54964e-05</b>
<b><u>204030 s at</u></b>	SCHIP1	<b>1.97918</b>	<b>6.65093</b>	<b>1.53823e-09</b>
<b><u>205941 s at</u></b>	COL10A1	<b>1.97387</b>	<b>3.91161</b>	<b>0.000166737</b>
<b><u>200790 at</u></b>	ODC1	<b>1.94598</b>	<b>5.15871</b>	<b>1.25174e-06</b>
<b><u>205479 s at</u></b>	PLAU	<b>1.9429</b>	<b>5.59748</b>	<b>1.88943e-07</b>
<b><u>207517 at</u></b>	LAMC2	<b>1.93603</b>	<b>4.63763</b>	<b>1.06241e-05</b>
<b><u>209900 s at</u></b>	SLC16A1	<b>1.92317</b>	<b>5.12698</b>	<b>1.43084e-06</b>
<b><u>218404 at</u></b>	SNX10	<b>1.91963</b>	<b>5.00601</b>	<b>2.37255e-06</b>
<b><u>207173 x at</u></b>	CDH11	<b>1.91843</b>	<b>4.45057</b>	<b>2.21815e-05</b>
<b><u>203921 at</u></b>	CHST2	<b>1.88729</b>	<b>3.90909</b>	<b>0.000168251</b>
<b><u>219773 at</u></b>	NOX4	<b>1.87561</b>	<b>4.84848</b>	<b>4.53939e-06</b>
<b><u>219863 at</u></b>	HERC5	<b>1.86474</b>	<b>4.45138</b>	<b>2.21115e-05</b>
<b><u>203417 at</u></b>	MFAP2	<b>1.86401</b>	<b>5.93124</b>	<b>4.27326e-08</b>
<b><u>211668 s at</u></b>	PLAU	<b>1.85368</b>	<b>5.17335</b>	<b>1.17668e-06</b>
<b><u>204779 s at</u></b>	HOXB7	<b>1.82756</b>	<b>3.83126</b>	<b>0.000222095</b>
<b><u>219926 at</u></b>	POPDC3	<b>1.81434</b>	<b>3.78654</b>	<b>0.00026008</b>
<b><u>214453 s at</u></b>	IFI44	<b>1.78822</b>	<b>4.31475</b>	<b>3.74304e-05</b>
<b><u>201744 s at</u></b>	LUM	<b>1.77406</b>	<b>5.59624</b>	<b>1.89975e-07</b>
<b><u>219631 at</u></b>	LRP12	<b>1.77065</b>	<b>4.78158</b>	<b>5.95877e-06</b>
<b><u>218888 s at</u></b>	NETO2	<b>1.76</b>	<b>4.34452</b>	<b>3.3402e-05</b>
<b><u>201310 s at</u></b>	C5orf13	<b>1.74746</b>	<b>4.78313</b>	<b>5.92157e-06</b>
<b><u>202729 s at</u></b>	LTBP1	<b>1.73325</b>	<b>4.48336</b>	<b>1.95207e-05</b>
<b><u>214642 x at</u></b>	MAGEA5	<b>1.72475</b>	<b>3.73485</b>	<b>0.000311692</b>

## Anexo

<b><u>202236 s at</u></b>	SLC16A1	<b>1.72451</b>	<b>4.56693</b>	<b>1.40609e-05</b>
<b><u>203726 s at</u></b>	LAMA3	<b>1.72404</b>	<b>4.26585</b>	<b>4.50818e-05</b>
<b><u>204844 at</u></b>	ENPEP	<b>1.71626</b>	<b>5.06316</b>	<b>1.86982e-06</b>
<b><u>205660 at</u></b>	OASL	<b>1.69249</b>	<b>3.68899</b>	<b>0.000365501</b>
<b><u>210845 s at</u></b>	PLAUR	<b>1.68888</b>	<b>4.17955</b>	<b>6.24011e-05</b>
<b><u>216973 s at</u></b>	HOXB7	<b>1.68811</b>	<b>4.06298</b>	<b>9.61741e-05</b>
<b><u>202411 at</u></b>	IFI27	<b>1.67368</b>	<b>5.16478</b>	<b>1.22011e-06</b>
<b><u>204136 at</u></b>	COL7A1	<b>1.66734</b>	<b>6.53587</b>	<b>2.64262e-09</b>
<b><u>215076 s at</u></b>	COL3A1	<b>1.66276</b>	<b>5.36996</b>	<b>5.08496e-07</b>
<b><u>205569 at</u></b>	LAMP3	<b>1.66064</b>	<b>4.06229</b>	<b>9.64179e-05</b>
<b><u>201852 x at</u></b>	COL3A1	<b>1.65814</b>	<b>4.17972</b>	<b>6.23603e-05</b>
<b><u>201313 at</u></b>	ENO2	<b>1.63731</b>	<b>4.86336</b>	<b>4.27171e-06</b>
<b><u>218986 s at</u></b>	FLJ20035	<b>1.63475</b>	<b>4.07201</b>	<b>9.30315e-05</b>
<b><u>204527 at</u></b>	MYO5A	<b>1.63261</b>	<b>5.58293</b>	<b>2.01418e-07</b>
<b><u>207714 s at</u></b>	SERPINH1	<b>1.6177</b>	<b>5.71657</b>	<b>1.11672e-07</b>
<b><u>218585 s at</u></b>	DTL	<b>1.61627</b>	<b>5.30876</b>	<b>6.61391e-07</b>
<b><u>204948 s at</u></b>	FST	<b>1.61535</b>	<b>3.82555</b>	<b>0.000226632</b>
<b><u>204023 at</u></b>	RFC4	<b>1.60827</b>	<b>5.54308</b>	<b>2.39841e-07</b>
<b><u>201635 s at</u></b>	FXR1	<b>1.60822</b>	<b>7.97158</b>	<b>2.53663e-12</b>
<b><u>222344 at</u></b>	C5orf13	<b>1.60604</b>	<b>3.87775</b>	<b>0.000188237</b>
<b><u>212365 at</u></b>	MYO1B	<b>1.59081</b>	<b>4.58872</b>	<b>1.29005e-05</b>
<b><u>202952 s at</u></b>	ADAM12	<b>1.54874</b>	<b>3.68474</b>	<b>0.000370908</b>
<b><u>201309 x at</u></b>	C5orf13	<b>1.52689</b>	<b>5.33463</b>	<b>5.91934e-07</b>
<b><u>215177 s at</u></b>	ITGA6	<b>1.52622</b>	<b>3.6953</b>	<b>0.000357604</b>
<b><u>219787 s at</u></b>	ECT2	<b>1.5212</b>	<b>4.22282</b>	<b>5.30422e-05</b>
<b><u>212012 at</u></b>	PXDN	<b>1.51308</b>	<b>3.69318</b>	<b>0.000360239</b>
<b><u>200665 s at</u></b>	SPARC	<b>1.50906</b>	<b>4.6062</b>	<b>1.20375e-05</b>
<b><u>209351 at</u></b>	KRT14	<b>1.50804</b>	<b>3.83214</b>	<b>0.000221404</b>
<b><u>219493 at</u></b>	SHCBP1	<b>1.50798</b>	<b>5.41867</b>	<b>4.12066e-07</b>
<b><u>201853 s at</u></b>	CDC25B	<b>1.50111</b>	<b>5.67074</b>	<b>1.36806e-07</b>
<b><u>203438 at</u></b>	STC2	<b>1.49583</b>	<b>4.32238</b>	<b>3.63558e-05</b>
<b><u>206364 at</u></b>	KIF14	<b>1.45904</b>	<b>5.15304</b>	<b>1.28208e-06</b>
<b><u>201656 at</u></b>	ITGA6	<b>1.44838</b>	<b>4.34432</b>	<b>3.34283e-05</b>
<b><u>204033 at</u></b>	TRIP13	<b>1.44558</b>	<b>4.83994</b>	<b>4.70048e-06</b>
<b><u>202643 s at</u></b>	TNFAIP3	<b>1.44331</b>	<b>4.74423</b>	<b>6.92992e-06</b>
<b><u>213680 at</u></b>	KRT6C	<b>1.44298</b>	<b>3.76305</b>	<b>0.000282436</b>
<b><u>211343 s at</u></b>	COL13A1	<b>1.44223</b>	<b>4.4024</b>	<b>2.67335e-05</b>
<b><u>210933 s at</u></b>	FSCN1	<b>1.43206</b>	<b>6.93834</b>	<b>3.92558e-10</b>
<b><u>212473 s at</u></b>	MICAL2	<b>1.41541</b>	<b>3.84077</b>	<b>0.000214731</b>
<b><u>209270 at</u></b>	LAMB3	<b>1.41055</b>	<b>4.10532</b>	<b>8.2261e-05</b>
<b><u>220668 s at</u></b>	DNMT3B	<b>1.39745</b>	<b>4.02509</b>	<b>0.000110513</b>
<b><u>208962 s at</u></b>	FADS1	<b>1.3915</b>	<b>4.12052</b>	<b>7.77559e-05</b>
<b><u>202983 at</u></b>	HLTF	<b>1.38431</b>	<b>3.78093</b>	<b>0.000265265</b>
<b><u>201291 s at</u></b>	TOP2A	<b>1.3797</b>	<b>4.60716</b>	<b>1.19916e-05</b>
<b><u>208965 s at</u></b>	PYHIN1	<b>1.3782</b>	<b>6.80005</b>	<b>7.59153e-10</b>
<b><u>213905 x at</u></b>	BGN	<b>1.37146</b>	<b>3.70706</b>	<b>0.000343321</b>
<b><u>201564 s at</u></b>	FSCN1	<b>1.3632</b>	<b>4.80126</b>	<b>5.50181e-06</b>
<b><u>218618 s at</u></b>	FNDC3B	<b>1.36166</b>	<b>4.73877</b>	<b>7.08433e-06</b>
<b><u>213869 x at</u></b>	THY1	<b>1.35779</b>	<b>4.69066</b>	<b>8.59577e-06</b>
<b><u>201559 s at</u></b>	CLIC4	<b>1.35314</b>	<b>4.24749</b>	<b>4.83257e-05</b>
<b><u>201250 s at</u></b>	SLC2A1	<b>1.34462</b>	<b>3.81221</b>	<b>0.000237584</b>
<b><u>202107 s at</u></b>	MCM2	<b>1.32734</b>	<b>4.39968</b>	<b>2.70158e-05</b>
<b><u>219507 at</u></b>	RSRC1	<b>1.32654</b>	<b>4.13023</b>	<b>7.5002e-05</b>

## Anexo

<b><u>201976 s at</u></b>	MYO10	<b>1.31333</b>	<b>4.79542</b>	<b>5.63366e-06</b>
<b><u>201105 at</u></b>	LGALS1	<b>1.3048</b>	<b>4.49386</b>	<b>1.87363e-05</b>
<b><u>41037 at</u></b>	TEAD4	<b>1.2948</b>	<b>5.22556</b>	<b>9.43149e-07</b>
<b><u>208850 s at</u></b>	THY1	<b>1.28752</b>	<b>4.19985</b>	<b>5.7828e-05</b>
<b><u>221898 at</u></b>	PDPN	<b>1.2721</b>	<b>4.31019</b>	<b>3.80876e-05</b>
<b><u>201818 at</u></b>	AYTL2	<b>1.27104</b>	<b>4.26162</b>	<b>4.58101e-05</b>
<b><u>211966 at</u></b>	COL4A2	<b>1.26234</b>	<b>4.2952</b>	<b>4.03259e-05</b>
<b><u>214604 at</u></b>	HOXD11	<b>1.24414</b>	<b>4.02475</b>	<b>0.000110649</b>
<b><u>204078 at</u></b>	SC65	<b>1.24376</b>	<b>4.08468</b>	<b>8.87844e-05</b>
<b><u>221881 s at</u></b>	CLIC4	<b>1.243</b>	<b>5.48756</b>	<b>3.05593e-07</b>
<b><u>208079 s at</u></b>	AURKA	<b>1.23276</b>	<b>4.6186</b>	<b>1.14593e-05</b>
<b><u>208851 s at</u></b>	THY1	<b>1.22103</b>	<b>4.7456</b>	<b>6.89187e-06</b>
<b><u>202580 x at</u></b>	FOXM1	<b>1.21983</b>	<b>3.98287</b>	<b>0.000128898</b>
<b><u>209642 at</u></b>	BUB1	<b>1.20978</b>	<b>3.76336</b>	<b>0.00028213</b>
<b><u>220254 at</u></b>	LRP12	<b>1.19622</b>	<b>3.77522</b>	<b>0.00027064</b>
<b><u>204822 at</u></b>	TTK	<b>1.19584</b>	<b>4.33627</b>	<b>3.4475e-05</b>
<b><u>204318 s at</u></b>	GTSE1	<b>1.1815</b>	<b>3.75095</b>	<b>0.000294651</b>
<b><u>212840 at</u></b>	UBXD7	<b>1.18127</b>	<b>5.2148</b>	<b>9.87237e-07</b>
<b><u>209652 s at</u></b>	PGF	<b>1.17824</b>	<b>3.84864</b>	<b>0.000208812</b>
<b><u>202644 s at</u></b>	TNFAIP3	<b>1.16917</b>	<b>3.68189</b>	<b>0.000374579</b>
<b><u>205443 at</u></b>	SNAPC1	<b>1.15961</b>	<b>4.91529</b>	<b>3.45219e-06</b>
<b><u>200600 at</u></b>	MSN	<b>1.15501</b>	<b>3.81624</b>	<b>0.000234225</b>
<b><u>200827 at</u></b>	PLOD1	<b>1.1464</b>	<b>5.58411</b>	<b>2.00371e-07</b>
<b><u>204603 at</u></b>	EXO1	<b>1.13693</b>	<b>4.50397</b>	<b>1.80093e-05</b>
<b><u>209013 x at</u></b>	TRIO	<b>1.13661</b>	<b>5.29532</b>	<b>7.00525e-07</b>
<b><u>201462 at</u></b>	SCRN1	<b>1.13477</b>	<b>3.74575</b>	<b>0.000300059</b>
<b><u>210001 s at</u></b>	SOCS1	<b>1.13438</b>	<b>4.23619</b>	<b>5.04342e-05</b>
<b><u>209087 x at</u></b>	MCAM	<b>1.13421</b>	<b>4.63505</b>	<b>1.07338e-05</b>
<b><u>209695 at</u></b>	PTP4A3	<b>1.09704</b>	<b>4.53744</b>	<b>1.57933e-05</b>
<b><u>206316 s at</u></b>	KNTC1	<b>1.09496</b>	<b>3.84274</b>	<b>0.000213233</b>
<b><u>218355 at</u></b>	KIF4A	<b>1.09022</b>	<b>3.83043</b>	<b>0.000222748</b>
<b><u>212285 s at</u></b>	AGRN	<b>1.08942</b>	<b>4.85795</b>	<b>4.36711e-06</b>
<b><u>201474 s at</u></b>	ITGA3	<b>1.08869</b>	<b>3.70293</b>	<b>0.000348272</b>
<b><u>213139 at</u></b>	SNAI2	<b>1.06521</b>	<b>3.85781</b>	<b>0.000202106</b>
<b><u>214752 x at</u></b>	FLNA	<b>1.0578</b>	<b>5.47145</b>	<b>3.27769e-07</b>
<b><u>200615 s at</u></b>	AP2B1	<b>1.04424</b>	<b>3.90655</b>	<b>0.000169793</b>
<b><u>210052 s at</u></b>	TPX2	<b>1.0415</b>	<b>4.85591</b>	<b>4.40364e-06</b>
<b><u>202954 at</u></b>	UBE2C	<b>1.03871</b>	<b>4.23778</b>	<b>5.01326e-05</b>
<b><u>202185 at</u></b>	PLOD3	<b>1.0324</b>	<b>3.88773</b>	<b>0.00018164</b>
<b><u>212621 at</u></b>	KIAA0286	<b>1.02117</b>	<b>3.7069</b>	<b>0.000343507</b>
<b><u>213746 s at</u></b>	FLNA	<b>1.02008</b>	<b>4.78368</b>	<b>5.90849e-06</b>
<b><u>221737 at</u></b>	GNA12	<b>1.00466</b>	<b>4.71529</b>	<b>7.78663e-06</b>
<b><u>200859 x at</u></b>	FLNA	<b>0.98475</b>	<b>4.83645</b>	<b>4.76781e-06</b>
<b><u>202600 s at</u></b>	NRIP1	<b>0.961348</b>	<b>3.94786</b>	<b>0.000146329</b>
<b><u>213097 s at</u></b>	ZRF1	<b>0.952349</b>	<b>3.81987</b>	<b>0.000231232</b>
<b><u>208637 x at</u></b>	ACTN1	<b>0.943953</b>	<b>3.6932</b>	<b>0.000360211</b>
<b><u>212220 at</u></b>	PSME4	<b>0.921614</b>	<b>4.11032</b>	<b>8.07534e-05</b>
<b><u>221705 s at</u></b>	SIKE	<b>0.838141</b>	<b>4.37059</b>	<b>3.02209e-05</b>
<b><u>203085 s at</u></b>	TGFB1	<b>0.832165</b>	<b>3.74009</b>	<b>0.000306051</b>
<b><u>217419 x at</u></b>	AGRN	<b>0.793984</b>	<b>4.05141</b>	<b>0.000100351</b>
<b><u>212279 at</u></b>	TMEM97	<b>0.779898</b>	<b>3.68053</b>	<b>0.000376336</b>
<b><u>201710 at</u></b>	MYBL2	<b>0.770429</b>	<b>3.73792</b>	<b>0.000308375</b>
<b><u>220750 s at</u></b>	LEPRE1	<b>0.75284</b>	<b>3.6884</b>	<b>0.000366241</b>

## Anexo

<b><u>213730</u></b> x at	TCF3	<b>0.744392</b>	<b>5.02107</b>	<b>2.22855e-06</b>
<b><u>214730</u></b> s at	GLG1	<b>0.710102</b>	<b>4.02777</b>	<b>0.000109433</b>
<b><u>208876</u></b> s at	PAK2	<b>0.686057</b>	<b>4.33323</b>	<b>3.48786e-05</b>
<b><u>207604</u></b> s at	SLC4A7	<b>0.656782</b>	<b>3.92121</b>	<b>0.000161086</b>
<b><u>212794</u></b> s at	KIAA1033	<b>0.647875</b>	<b>3.92259</b>	<b>0.000160283</b>
<b><u>211934</u></b> x at	GANAB	<b>0.581512</b>	<b>4.45842</b>	<b>2.15137e-05</b>
<b><u>212477</u></b> at	CENTB2	<b>0.417661</b>	<b>3.92024</b>	<b>0.000161644</b>
<b><u>208062</u></b> s at	NRG2	<b>-0.237804</b>	<b>-3.80441</b>	<b>0.000244215</b>
<b><u>216866</u></b> s at	COL14A1	<b>-0.247406</b>	<b>-3.73701</b>	<b>0.000309354</b>
<b><u>215702</u></b> s at	CFTR	<b>-0.300429</b>	<b>-4.2809</b>	<b>4.25791e-05</b>
<b><u>215774</u></b> s at	SUCLG2	<b>-0.305924</b>	<b>-3.87637</b>	<b>0.000189166</b>
<b><u>217676</u></b> at		<b>-0.310541</b>	<b>-3.83075</b>	<b>0.000222495</b>
<b><u>206159</u></b> at	GDF10	<b>-0.319867</b>	<b>-4.11084</b>	<b>8.05983e-05</b>
<b><u>207864</u></b> at	SCN7A	<b>-0.324402</b>	<b>-4.45687</b>	<b>2.16443e-05</b>
<b><u>200939</u></b> s at	RERE	<b>-0.335608</b>	<b>-4.48799</b>	<b>1.91709e-05</b>
<b><u>34478</u></b> at	RAB11B	<b>-0.347252</b>	<b>-3.98432</b>	<b>0.000128218</b>
<b><u>214767</u></b> s at	HSPB6	<b>-0.348018</b>	<b>-3.84931</b>	<b>0.000208309</b>
<b><u>208468</u></b> at	SOX21	<b>-0.34905</b>	<b>-4.44239</b>	<b>2.28973e-05</b>
<b><u>218835</u></b> at	SFTPA2B	<b>-0.351481</b>	<b>-3.76767</b>	<b>0.000277901</b>
<b><u>216803</u></b> at	PDLIM5	<b>-0.359663</b>	<b>-4.31552</b>	<b>3.7321e-05</b>
<b><u>207402</u></b> at	ZNF132	<b>-0.384454</b>	<b>-3.7238</b>	<b>0.000323922</b>
<b><u>222352</u></b> at	FBXO31	<b>-0.389877</b>	<b>-3.77542</b>	<b>0.00027045</b>
<b><u>217675</u></b> at	ZBTB7C	<b>-0.390899</b>	<b>-3.97523</b>	<b>0.000132521</b>
<b><u>214371</u></b> at	TSSK2	<b>-0.392686</b>	<b>-3.72064</b>	<b>0.000327499</b>
<b><u>215516</u></b> at	LAMB4	<b>-0.398529</b>	<b>-3.76797</b>	<b>0.000277612</b>
<b><u>212047</u></b> s at	RNF167	<b>-0.39906</b>	<b>-3.74671</b>	<b>0.000299051</b>
<b><u>208244</u></b> at	BMP3	<b>-0.401144</b>	<b>-3.851</b>	<b>0.000207064</b>
<b><u>213493</u></b> at	SNED1	<b>-0.41288</b>	<b>-3.83011</b>	<b>0.000223005</b>
<b><u>202921</u></b> s at	ANK2	<b>-0.423361</b>	<b>-3.84156</b>	<b>0.000214124</b>
<b><u>208383</u></b> s at	PCK1	<b>-0.425822</b>	<b>-4.80835</b>	<b>5.34562e-06</b>
<b><u>221310</u></b> at	FGF14	<b>-0.430613</b>	<b>-5.37993</b>	<b>4.87115e-07</b>
<b><u>206800</u></b> at	MTHFR	<b>-0.439745</b>	<b>-4.20473</b>	<b>5.67776e-05</b>
<b><u>204907</u></b> s at	BCL3	<b>-0.440133</b>	<b>-3.93242</b>	<b>0.00015471</b>
<b><u>209521</u></b> s at	AMOT	<b>-0.44668</b>	<b>-5.03054</b>	<b>2.14248e-06</b>
<b><u>216339</u></b> s at	TNXA	<b>-0.44761</b>	<b>-4.01444</b>	<b>0.000114899</b>
<b><u>208512</u></b> s at	MLLT4	<b>-0.449173</b>	<b>-4.25745</b>	<b>4.65391e-05</b>
<b><u>215099</u></b> s at	RXRB	<b>-0.457201</b>	<b>-3.92527</b>	<b>0.000158744</b>
<b><u>216179</u></b> x at	RNF24	<b>-0.461124</b>	<b>-3.96562</b>	<b>0.000137223</b>
<b><u>205638</u></b> at	BAI3	<b>-0.492308</b>	<b>-5.40904</b>	<b>4.29598e-07</b>
<b><u>209428</u></b> s at	ZFPL1	<b>-0.495281</b>	<b>-3.74616</b>	<b>0.000299633</b>
<b><u>211082</u></b> x at	MARK2	<b>-0.501307</b>	<b>-3.73688</b>	<b>0.000309494</b>
<b><u>206243</u></b> at	TIMP4	<b>-0.511614</b>	<b>-4.04162</b>	<b>0.000104024</b>
<b><u>215904</u></b> at	MLLT4	<b>-0.517089</b>	<b>-4.22137</b>	<b>5.33328e-05</b>
<b><u>211431</u></b> s at	TYRO3	<b>-0.522268</b>	<b>-5.80551</b>	<b>7.51493e-08</b>
<b><u>220810</u></b> at	CLCA3	<b>-0.543299</b>	<b>-3.89711</b>	<b>0.000175637</b>
<b><u>36994</u></b> at	ATP6VOC	<b>-0.543626</b>	<b>-4.01701</b>	<b>0.000113827</b>
<b><u>222070</u></b> at	DND1	<b>-0.547191</b>	<b>-3.91436</b>	<b>0.000165098</b>
<b><u>200656</u></b> s at	P4HB	<b>-0.550041</b>	<b>-3.79806</b>	<b>0.000249745</b>
<b><u>212797</u></b> at	SORT1	<b>-0.556558</b>	<b>-5.63346</b>	<b>1.61274e-07</b>
<b><u>207326</u></b> at	BTC	<b>-0.565914</b>	<b>-5.00015</b>	<b>2.431e-06</b>
<b><u>215928</u></b> at	ABLIM2	<b>-0.566221</b>	<b>-4.06217</b>	<b>9.64629e-05</b>
<b><u>217613</u></b> at	TMEM144	<b>-0.571307</b>	<b>-4.66319</b>	<b>9.59438e-06</b>
<b><u>213490</u></b> s at	MAP2K2	<b>-0.572543</b>	<b>-4.32907</b>	<b>3.54373e-05</b>

## Anexo

<u>218832 x at</u>	ARRB1	-0.573524	-3.85417	0.000204744
<u>215106 at</u>	TTC22	-0.574934	-4.48777	1.91873e-05
<u>208540 x at</u>	LOC729659	-0.58191	-3.79666	0.000250981
<u>201903 at</u>	UQCRC1	-0.592186	-3.70491	0.000345892
<u>214640 at</u>	UNC93A	-0.611604	-4.38923	2.81278e-05
<u>205236 x at</u>	SOD3	-0.614556	-4.11285	8.00003e-05
<u>200861 at</u>	CNOT1	-0.614934	-4.92604	3.30275e-06
<u>215059 at</u>	C4orf31	-0.618182	-4.6745	9.17022e-06
<u>213925 at</u>	C1orf95	-0.6281	-4.46724	2.0788e-05
<u>209182 s at</u>	C10orf10	-0.631134	-3.74327	0.000302669
<u>206077 at</u>	KEL	-0.632748	-5.72969	1.05353e-07
<u>201383 s at</u>	NBR1	-0.63712	-3.9143	0.000165134
<u>206050 s at</u>	RNH1	-0.640153	-4.03874	0.000105128
<u>203236 s at</u>	LGALS9	-0.649408	-4.50635	1.78425e-05
<u>207511 s at</u>	C2orf24	-0.651849	-3.69783	0.000354482
<u>211387 x at</u>	RNGTT	-0.659867	-3.89021	0.000180036
<u>204188 s at</u>	RARG	-0.663708	-4.67174	9.27214e-06
<u>204189 at</u>	RARG	-0.673636	-4.30553	3.87698e-05
<u>202198 s at</u>	MTMR3	-0.687375	-5.7963	7.83054e-08
<u>214732 at</u>	SP1	-0.696486	-4.68046	8.95415e-06
<u>206457 s at</u>	DIO1	-0.700388	-5.41026	4.27342e-07
<u>220363 s at</u>	ELMO2	-0.704934	-4.89051	3.82202e-06
<u>220128 s at</u>	NPAL2	-0.705455	-4.21888	5.38347e-05
<u>208717 at</u>	OXA1L	-0.705986	-3.75411	0.000291418
<u>207913 at</u>	CYP2F1	-0.707344	-5.67429	1.34672e-07
<u>200954 at</u>	ATP6VOC	-0.716895	-3.91031	0.000167516
<u>207175 at</u>	ADIPOQ	-0.717988	-7.14953	1.4224e-10
<u>205752 s at</u>	GSTM5	-0.721593	-4.05772	9.80536e-05
<u>222159 at</u>	PLXNA2	-0.725771	-4.5178	1.70596e-05
<u>217729 s at</u>	AES	-0.730051	-4.24951	4.7959e-05
<u>209988 s at</u>	ASCL1	-0.732135	-3.76258	0.000282902
<u>211666 x at</u>	RPL3	-0.733075	-4.20337	5.70685e-05
<u>211740 at</u>	ICA1	-0.733667	-4.1626	6.64824e-05
<u>212494 at</u>	TENC1	-0.745669	-3.86614	0.000196197
<u>210213 s at</u>	EIF6	-0.747569	-3.69567	0.000357145
<u>219140 s at</u>	RBP4	-0.751645	-4.09369	8.58801e-05
<u>221418 s at</u>	MED16	-0.757099	-4.24035	4.96486e-05
<u>221686 s at</u>	RECQL5	-0.770644	-5.13894	1.36054e-06
<u>202592 at</u>	BLOC1S1	-0.772278	-5.07148	1.80591e-06
<u>205293 x at</u>	BAIAP2	-0.781747	-4.18317	6.15597e-05
<u>217807 s at</u>	GLTSCR2	-0.782891	-3.72987	0.000317146
<u>204723 at</u>	SCN3B	-0.783085	-3.83315	0.00022061
<u>200646 s at</u>	NUCB1	-0.7876	-4.63871	1.05782e-05
<u>214939 x at</u>	MLLT4	-0.788233	-6.26002	9.53358e-09
<u>65517 at</u>	AP1M2	-0.790429	-3.79743	0.000250303
<u>220119 at</u>	EPB41L4A	-0.796302	-4.22865	5.18891e-05
<u>206253 at</u>	DLG2	-0.796854	-6.04781	2.5203e-08
<u>222249 at</u>	PLGLB1	-0.800031	-5.5041	2.8434e-07
<u>202545 at</u>	PRKCD	-0.800572	-4.33117	3.51544e-05
<u>200787 s at</u>	PEA15	-0.805495	-5.13241	1.39847e-06
<u>210549 s at</u>	CCL23	-0.806159	-4.19351	5.92204e-05
<u>205460 at</u>	NPAS2	-0.806731	-4.5069	1.78039e-05
<u>221188 s at</u>	CIDEB	-0.809571	-5.04337	2.03088e-06

## Anexo

<b><u>200752 s at</u></b>	CAPN1	<b>-0.811226</b>	<b>-4.50887</b>	<b>1.76673e-05</b>
<b><u>214397 at</u></b>	MBD2	<b>-0.81383</b>	<b>-4.23445</b>	<b>5.07659e-05</b>
<b><u>209107 x at</u></b>	NCOA1	<b>-0.81665</b>	<b>-4.15764</b>	<b>6.77237e-05</b>
<b><u>219268 at</u></b>	ETNK2	<b>-0.816874</b>	<b>-3.91253</b>	<b>0.000166186</b>
<b><u>209072 at</u></b>	MBP	<b>-0.817099</b>	<b>-4.06892</b>	<b>9.40936e-05</b>
<b><u>205102 at</u></b>	TMPRSS2	<b>-0.817549</b>	<b>-3.72556</b>	<b>0.000321946</b>
<b><u>207255 at</u></b>	LEPR	<b>-0.82093</b>	<b>-4.97079</b>	<b>2.74567e-06</b>
<b><u>221725 at</u></b>		<b>-0.823187</b>	<b>-3.89511</b>	<b>0.000176906</b>
<b><u>215749 s at</u></b>	GORASP1	<b>-0.824423</b>	<b>-3.79279</b>	<b>0.000254421</b>
<b><u>220276 at</u></b>	FLJ22655	<b>-0.824678</b>	<b>-6.37088</b>	<b>5.70708e-09</b>
<b><u>212323 s at</u></b>	VPS13D	<b>-0.827099</b>	<b>-4.78503</b>	<b>5.87608e-06</b>
<b><u>206623 at</u></b>	PDE6A	<b>-0.831093</b>	<b>-5.19251</b>	<b>1.08508e-06</b>
<b><u>206826 at</u></b>	PMP2	<b>-0.831205</b>	<b>-4.99295</b>	<b>2.50472e-06</b>
<b><u>207636 at</u></b>	SERPINI2	<b>-0.831267</b>	<b>-4.54664</b>	<b>1.52317e-05</b>
<b><u>64440 at</u></b>	IL17RC	<b>-0.836476</b>	<b>-3.99561</b>	<b>0.000123063</b>
<b><u>213052 at</u></b>	PRKAR2A	<b>-0.837702</b>	<b>-4.41091</b>	<b>2.58682e-05</b>
<b><u>205883 at</u></b>	ZBTB16	<b>-0.842022</b>	<b>-4.94361</b>	<b>3.07198e-06</b>
<b><u>208434 at</u></b>	MDS1	<b>-0.846302</b>	<b>-4.04266</b>	<b>0.000103626</b>
<b><u>210471 s at</u></b>	KCNAB1	<b>-0.851522</b>	<b>-3.69624</b>	<b>0.000356438</b>
<b><u>220120 s at</u></b>	EPB41L4A	<b>-0.852533</b>	<b>-3.89836</b>	<b>0.000174857</b>
<b><u>221643 s at</u></b>	RERE	<b>-0.854433</b>	<b>-3.7565</b>	<b>0.000288995</b>
<b><u>216881 x at</u></b>	PRB4	<b>-0.85525</b>	<b>-4.61865</b>	<b>1.1457e-05</b>
<b><u>218261 at</u></b>	AP1M2	<b>-0.855659</b>	<b>-4.15472</b>	<b>6.84664e-05</b>
<b><u>220578 at</u></b>	ADAMTSL4	<b>-0.865506</b>	<b>-4.80431</b>	<b>5.43401e-06</b>
<b><u>36936 at</u></b>	TSTA3	<b>-0.868366</b>	<b>-3.83705</b>	<b>0.000217581</b>
<b><u>206088 at</u></b>	LRRC37A	<b>-0.869898</b>	<b>-4.72026</b>	<b>7.63265e-06</b>
<b><u>207752 x at</u></b>	PRB1	<b>-0.870797</b>	<b>-3.70319</b>	<b>0.000347955</b>
<b><u>205232 s at</u></b>	PAFAH2	<b>-0.873504</b>	<b>-4.48095</b>	<b>1.97051e-05</b>
<b><u>214156 at</u></b>	MYRIP	<b>-0.87761</b>	<b>-4.07493</b>	<b>9.20336e-05</b>
<b><u>219416 at</u></b>	SCARA3	<b>-0.879489</b>	<b>-3.72047</b>	<b>0.000327691</b>
<b><u>208622 s at</u></b>	VIL2	<b>-0.880807</b>	<b>-4.08563</b>	<b>8.84745e-05</b>
<b><u>202320 at</u></b>	GTF3C1	<b>-0.886364</b>	<b>-3.69618</b>	<b>0.000356513</b>
<b><u>205155 s at</u></b>	SPTBN2	<b>-0.88856</b>	<b>-4.76339</b>	<b>6.41416e-06</b>
<b><u>202039 at</u></b>	TIAF1	<b>-0.890899</b>	<b>-4.47485</b>	<b>2.01797e-05</b>
<b><u>203766 s at</u></b>	LMOD1	<b>-0.891256</b>	<b>-3.92586</b>	<b>0.00015841</b>
<b><u>216308 x at</u></b>	GRHPR	<b>-0.894229</b>	<b>-3.68868</b>	<b>0.000365891</b>
<b><u>214490 at</u></b>	ARSF	<b>-0.895649</b>	<b>-3.74964</b>	<b>0.000296004</b>
<b><u>201644 at</u></b>	TSTA3	<b>-0.89617</b>	<b>-3.86707</b>	<b>0.000195545</b>
<b><u>221934 s at</u></b>	DALRD3	<b>-0.898447</b>	<b>-4.20243</b>	<b>5.727e-05</b>
<b><u>206879 s at</u></b>	NRG2	<b>-0.898529</b>	<b>-4.60386</b>	<b>1.21495e-05</b>
<b><u>210249 s at</u></b>	NCOA1	<b>-0.90335</b>	<b>-3.95694</b>	<b>0.000141601</b>
<b><u>200710 at</u></b>	ACADVL	<b>-0.904944</b>	<b>-4.04213</b>	<b>0.000103829</b>
<b><u>216570 x at</u></b>	LOC646417	<b>-0.905455</b>	<b>-5.24946</b>	<b>8.51969e-07</b>
<b><u>211272 s at</u></b>	DGKA	<b>-0.906772</b>	<b>-4.50685</b>	<b>1.78072e-05</b>
<b><u>220309 at</u></b>	TTC22	<b>-0.910153</b>	<b>-3.73676</b>	<b>0.00030962</b>
<b><u>206992 s at</u></b>	ATP5S	<b>-0.913687</b>	<b>-4.47518</b>	<b>2.01542e-05</b>
<b><u>221926 s at</u></b>	IL17RC	<b>-0.913861</b>	<b>-5.3778</b>	<b>4.91605e-07</b>
<b><u>214533 at</u></b>	CMA1	<b>-0.917794</b>	<b>-4.02955</b>	<b>0.000108726</b>
<b><u>204309 at</u></b>	CYP11A1	<b>-0.921032</b>	<b>-3.71878</b>	<b>0.000329623</b>
<b><u>218523 at</u></b>	LHPP	<b>-0.92905</b>	<b>-4.25527</b>	<b>4.69245e-05</b>
<b><u>220246 at</u></b>	CAMK1D	<b>-0.929111</b>	<b>-4.31144</b>	<b>3.79062e-05</b>
<b><u>215649 s at</u></b>	MVK	<b>-0.930123</b>	<b>-5.96318</b>	<b>3.69931e-08</b>
<b><u>212324 s at</u></b>	VPS13D	<b>-0.938069</b>	<b>-4.54867</b>	<b>1.51105e-05</b>

## Anexo

<b><u>202546 at</u></b>	VAMP8	<b>-0.938897</b>	<b>-3.70831</b>	<b>0.000341839</b>
<b><u>202807 s at</u></b>	TOM1	<b>-0.939397</b>	<b>-4.31944</b>	<b>3.67665e-05</b>
<b><u>201044 x at</u></b>	DUSP1	<b>-0.939602</b>	<b>-3.70874</b>	<b>0.000341327</b>
<b><u>210301 at</u></b>	XDH	<b>-0.93999</b>	<b>-3.72824</b>	<b>0.000318957</b>
<b><u>209964 s at</u></b>	ATXN7	<b>-0.940317</b>	<b>-5.41215</b>	<b>4.23855e-07</b>
<b><u>215303 at</u></b>		<b>-0.942227</b>	<b>-6.6215</b>	<b>1.76718e-09</b>
<b><u>210101 x at</u></b>	SH3GLB1	<b>-0.943851</b>	<b>-4.0135</b>	<b>0.000115292</b>
<b><u>205093 at</u></b>	PLEKHA6	<b>-0.950255</b>	<b>-4.79848</b>	<b>5.56422e-06</b>
<b><u>215464 s at</u></b>	TAX1BP3	<b>-0.953391</b>	<b>-3.81831</b>	<b>0.000232511</b>
<b><u>204287 at</u></b>	SYNGR1	<b>-0.953606</b>	<b>-4.04249</b>	<b>0.000103692</b>
<b><u>220518 at</u></b>	ABI3BP	<b>-0.957773</b>	<b>-6.38586</b>	<b>5.32345e-09</b>
<b><u>200823 x at</u></b>	RPL29	<b>-0.962094</b>	<b>-4.87312</b>	<b>4.10432e-06</b>
<b><u>214671 s at</u></b>	ABR	<b>-0.964351</b>	<b>-3.75205</b>	<b>0.000293528</b>
<b><u>209502 s at</u></b>	BAIAP2	<b>-0.967385</b>	<b>-3.92406</b>	<b>0.000159439</b>
<b><u>210756 s at</u></b>	NOTCH2	<b>-0.969949</b>	<b>-4.55949</b>	<b>1.44795e-05</b>
<b><u>201835 s at</u></b>	PRKAB1	<b>-0.971359</b>	<b>-5.74647</b>	<b>9.77784e-08</b>
<b><u>209456 s at</u></b>	FBXW11	<b>-0.974678</b>	<b>-4.05715</b>	<b>9.8259e-05</b>
<b><u>219153 s at</u></b>	THSD4	<b>-0.975444</b>	<b>-5.40188</b>	<b>4.43088e-07</b>
<b><u>219946 x at</u></b>	MYH14	<b>-0.975689</b>	<b>-4.13908</b>	<b>7.25731e-05</b>
<b><u>212400 at</u></b>	FAM102A	<b>-0.981277</b>	<b>-3.8931</b>	<b>0.000178178</b>
<b><u>209470 s at</u></b>	GPM6A	<b>-0.982503</b>	<b>-6.32268</b>	<b>7.13659e-09</b>
<b><u>203167 at</u></b>	TIMP2	<b>-0.987099</b>	<b>-3.70391</b>	<b>0.000347098</b>
<b><u>205459 s at</u></b>	NPAS2	<b>-0.989275</b>	<b>-4.13785</b>	<b>7.29065e-05</b>
<b><u>212728 at</u></b>	DLG3	<b>-0.993401</b>	<b>-3.72271</b>	<b>0.000325149</b>
<b><u>206349 at</u></b>	LGI1	<b>-1.00364</b>	<b>-7.33526</b>	<b>5.78294e-11</b>
<b><u>201360 at</u></b>	CST3	<b>-1.00623</b>	<b>-4.56421</b>	<b>1.42129e-05</b>
<b><u>212226 s at</u></b>	PPAP2B	<b>-1.01313</b>	<b>-3.68047</b>	<b>0.000376417</b>
<b><u>57739 at</u></b>	DND1	<b>-1.0148</b>	<b>-4.01739</b>	<b>0.000113668</b>
<b><u>218813 s at</u></b>	SH3GLB2	<b>-1.0223</b>	<b>-4.53254</b>	<b>1.61006e-05</b>
<b><u>218357 s at</u></b>	TIMM8B	<b>-1.0226</b>	<b>-3.87714</b>	<b>0.000188646</b>
<b><u>216210 x at</u></b>	TRIOBP	<b>-1.02414</b>	<b>-3.90112</b>	<b>0.000173136</b>
<b><u>202681 at</u></b>	USP4	<b>-1.02837</b>	<b>-3.76011</b>	<b>0.000285358</b>
<b><u>221588 x at</u></b>	ALDH6A1	<b>-1.03203</b>	<b>-3.68626</b>	<b>0.000368962</b>
<b><u>211681 s at</u></b>	PDLIM5	<b>-1.03317</b>	<b>-3.83045</b>	<b>0.000222733</b>
<b><u>221204 s at</u></b>	CRTAC1	<b>-1.03364</b>	<b>-5.53368</b>	<b>2.49904e-07</b>
<b><u>206832 s at</u></b>	SEMA3F	<b>-1.03699</b>	<b>-5.40139</b>	<b>4.44031e-07</b>
<b><u>222372 at</u></b>	MAGI1	<b>-1.03952</b>	<b>-3.81733</b>	<b>0.000233323</b>
<b><u>205622 at</u></b>	SMPD2	<b>-1.04085</b>	<b>-3.90151</b>	<b>0.000172893</b>
<b><u>212969 x at</u></b>	EML3	<b>-1.0454</b>	<b>-5.2973</b>	<b>6.94623e-07</b>
<b><u>212046 x at</u></b>	MAPK3	<b>-1.05348</b>	<b>-4.16748</b>	<b>6.52808e-05</b>
<b><u>202787 s at</u></b>	MAPKAPK3	<b>-1.05569</b>	<b>-4.49772</b>	<b>1.84553e-05</b>
<b><u>212085 at</u></b>	SLC25A6	<b>-1.05788</b>	<b>-4.48428</b>	<b>1.9451e-05</b>
<b><u>221476 s at</u></b>	RPL15	<b>-1.05792</b>	<b>-3.73957</b>	<b>0.000306601</b>
<b><u>208336 s at</u></b>	GPSN2	<b>-1.05798</b>	<b>-4.9282</b>	<b>3.27346e-06</b>
<b><u>211752 s at</u></b>	NDUFS7	<b>-1.05874</b>	<b>-3.94618</b>	<b>0.000147221</b>
<b><u>203442 x at</u></b>	EML3	<b>-1.05877</b>	<b>-5.85916</b>	<b>5.91018e-08</b>
<b><u>201900 s at</u></b>	AKR1A1	<b>-1.05902</b>	<b>-4.1616</b>	<b>6.67322e-05</b>
<b><u>210155 at</u></b>	MYOC	<b>-1.06215</b>	<b>-11.9075</b>	<b>6.3697e-21</b>
<b><u>204608 at</u></b>	ASL	<b>-1.06444</b>	<b>-3.8555</b>	<b>0.000203774</b>
<b><u>204484 at</u></b>	PIK3C2B	<b>-1.06489</b>	<b>-4.21191</b>	<b>5.52648e-05</b>
<b><u>215684 s at</u></b>	ASCC2	<b>-1.06579</b>	<b>-4.34478</b>	<b>3.33686e-05</b>
<b><u>210409 at</u></b>	C6orf124	<b>-1.06713</b>	<b>-4.58995</b>	<b>1.2838e-05</b>
<b><u>205384 at</u></b>	FXYP1	<b>-1.06818</b>	<b>-4.5679</b>	<b>1.4007e-05</b>

## Anexo

<b><u>205864 at</u></b>	SLC7A4	<b>-1.06956</b>	<b>-4.36003</b>	<b>3.14724e-05</b>
<b><u>217914 at</u></b>	TPCN1	<b>-1.07482</b>	<b>-5.71959</b>	<b>1.10184e-07</b>
<b><u>215203 at</u></b>	GOLGA4	<b>-1.07939</b>	<b>-6.01227</b>	<b>2.96188e-08</b>
<b><u>219747 at</u></b>	C4orf31	<b>-1.08602</b>	<b>-3.73959</b>	<b>0.000306581</b>
<b><u>200001 at</u></b>	CAPNS1	<b>-1.08761</b>	<b>-5.87746</b>	<b>5.44411e-08</b>
<b><u>213185 at</u></b>	KIAA0556	<b>-1.09421</b>	<b>-4.29089</b>	<b>4.09921e-05</b>
<b><u>204242 s at</u></b>	ACOX3	<b>-1.09439</b>	<b>-4.32107</b>	<b>3.65375e-05</b>
<b><u>217746 s at</u></b>	PDCD6IP	<b>-1.10052</b>	<b>-3.88048</b>	<b>0.000186409</b>
<b><u>205979 at</u></b>	SCGB2A1	<b>-1.10324</b>	<b>-3.76372</b>	<b>0.000281774</b>
<b><u>222236 s at</u></b>	DDEF1	<b>-1.10353</b>	<b>-3.71932</b>	<b>0.000329006</b>
<b><u>219415 at</u></b>	TTYH1	<b>-1.10463</b>	<b>-3.73142</b>	<b>0.000315439</b>
<b><u>202788 at</u></b>	MAPKAPK3	<b>-1.10545</b>	<b>-4.64018</b>	<b>1.05166e-05</b>
<b><u>222291 at</u></b>	DKFZP564J102	<b>-1.10634</b>	<b>-4.36871</b>	<b>3.04397e-05</b>
<b><u>203467 at</u></b>	PMM1	<b>-1.1094</b>	<b>-3.99496</b>	<b>0.000123354</b>
<b><u>217846 at</u></b>	QARS	<b>-1.11059</b>	<b>-5.8255</b>	<b>6.87255e-08</b>
<b><u>218010 x at</u></b>	C20orf149	<b>-1.1109</b>	<b>-7.44071</b>	<b>3.45954e-11</b>
<b><u>204067 at</u></b>	SUOX	<b>-1.11152</b>	<b>-4.12687</b>	<b>7.59454e-05</b>
<b><u>216661 x at</u></b>	CYP2C9	<b>-1.11577</b>	<b>-3.84085</b>	<b>0.00021467</b>
<b><u>221704 s at</u></b>	VPS37B	<b>-1.11739</b>	<b>-4.3898</b>	<b>2.80654e-05</b>
<b><u>200764 s at</u></b>	CTNNA1	<b>-1.1202</b>	<b>-4.9195</b>	<b>3.39292e-06</b>
<b><u>206947 at</u></b>	B3GALT5	<b>-1.12257</b>	<b>-7.04368</b>	<b>2.36858e-10</b>
<b><u>208960 s at</u></b>	KLF6	<b>-1.12671</b>	<b>-4.08908</b>	<b>8.7354e-05</b>
<b><u>208949 s at</u></b>	LGALS3	<b>-1.12689</b>	<b>-3.762</b>	<b>0.000283475</b>
<b><u>209872 s at</u></b>	PKP3	<b>-1.13032</b>	<b>-4.6435</b>	<b>1.03785e-05</b>
<b><u>213710 s at</u></b>		<b>-1.1308</b>	<b>-4.28241</b>	<b>4.2335e-05</b>
<b><u>218489 s at</u></b>	ALAD	<b>-1.13646</b>	<b>-4.26854</b>	<b>4.46245e-05</b>
<b><u>204134 at</u></b>	PDE2A	<b>-1.13828</b>	<b>-4.65866</b>	<b>9.76959e-06</b>
<b><u>201892 s at</u></b>	IMPDH2	<b>-1.14065</b>	<b>-3.82594</b>	<b>0.000226322</b>
<b><u>207704 s at</u></b>	GAS7	<b>-1.14721</b>	<b>-5.72836</b>	<b>1.05974e-07</b>
<b><u>204856 at</u></b>	B3GNT3	<b>-1.14819</b>	<b>-4.0723</b>	<b>9.29299e-05</b>
<b><u>200765 x at</u></b>	CTNNA1	<b>-1.14842</b>	<b>-4.15923</b>	<b>6.73241e-05</b>
<b><u>220073 s at</u></b>	PLEKHG6	<b>-1.16618</b>	<b>-4.09516</b>	<b>8.54128e-05</b>
<b><u>217504 at</u></b>	ABCA6	<b>-1.1663</b>	<b>-3.71183</b>	<b>0.000337681</b>
<b><u>220962 s at</u></b>	PADI1	<b>-1.16743</b>	<b>-9.15855</b>	<b>6.60783e-15</b>
<b><u>221084 at</u></b>	HTR3B	<b>-1.16761</b>	<b>-6.17478</b>	<b>1.41109e-08</b>
<b><u>213462 at</u></b>	NPAS2	<b>-1.17061</b>	<b>-3.69002</b>	<b>0.000364201</b>
<b><u>204941 s at</u></b>	ALDH3B2	<b>-1.17087</b>	<b>-4.22358</b>	<b>5.28889e-05</b>
<b><u>221041 s at</u></b>	SLC17A5	<b>-1.17103</b>	<b>-3.77856</b>	<b>0.000267481</b>
<b><u>201851 at</u></b>	SH3GL1	<b>-1.17257</b>	<b>-3.84109</b>	<b>0.000214486</b>
<b><u>205145 s at</u></b>	MYL5	<b>-1.18098</b>	<b>-3.67414</b>	<b>0.000384738</b>
<b><u>206539 s at</u></b>	CYP4F12	<b>-1.18193</b>	<b>-5.35055</b>	<b>5.52801e-07</b>
<b><u>220911 s at</u></b>	KIAA1305	<b>-1.1846</b>	<b>-4.35682</b>	<b>3.18633e-05</b>
<b><u>217973 at</u></b>	DCXR	<b>-1.18626</b>	<b>-5.04241</b>	<b>2.03902e-06</b>
<b><u>208483 x at</u></b>	KRT33A	<b>-1.18739</b>	<b>-4.38778</b>	<b>2.82854e-05</b>
<b><u>215138 s at</u></b>	KIAA1026	<b>-1.1916</b>	<b>-4.94911</b>	<b>3.0031e-06</b>
<b><u>218231 at</u></b>	NAGK	<b>-1.19375</b>	<b>-3.85093</b>	<b>0.000207115</b>
<b><u>210276 s at</u></b>	TRIOBP	<b>-1.19534</b>	<b>-4.84027</b>	<b>4.69416e-06</b>
<b><u>210872 x at</u></b>	GAS7	<b>-1.19801</b>	<b>-4.20821</b>	<b>5.60398e-05</b>
<b><u>208626 s at</u></b>	VAT1	<b>-1.20103</b>	<b>-4.96912</b>	<b>2.76469e-06</b>
<b><u>204459 at</u></b>	CSTF2	<b>-1.20569</b>	<b>-4.29689</b>	<b>4.00677e-05</b>
<b><u>210298 x at</u></b>	FHL1	<b>-1.20908</b>	<b>-4.66903</b>	<b>9.37313e-06</b>
<b><u>219278 at</u></b>	MAP3K6	<b>-1.21126</b>	<b>-3.9465</b>	<b>0.000147047</b>
<b><u>201768 s at</u></b>	CLINT1	<b>-1.2119</b>	<b>-4.09565</b>	<b>8.52601e-05</b>

## Anexo

<b><u>208505 s at</u></b>	FUT2	<b>-1.21381</b>	<b>-4.56833</b>	<b>1.39834e-05</b>
<b><u>211432 s at</u></b>	TYRO3	<b>-1.21512</b>	<b>-5.37639</b>	<b>4.94607e-07</b>
<b><u>218657 at</u></b>	RAPGEFL1	<b>-1.21618</b>	<b>-4.30058</b>	<b>3.95081e-05</b>
<b><u>217751 at</u></b>	GSTK1	<b>-1.21836</b>	<b>-4.39273</b>	<b>2.77498e-05</b>
<b><u>215107 s at</u></b>	TTC22	<b>-1.22516</b>	<b>-5.65993</b>	<b>1.43497e-07</b>
<b><u>218000 s at</u></b>	PHLDA1	<b>-1.22696</b>	<b>-4.32962</b>	<b>3.53627e-05</b>
<b><u>219599 at</u></b>		<b>-1.22755</b>	<b>-5.23857</b>	<b>8.9239e-07</b>
<b><u>210829 s at</u></b>	SSBP2	<b>-1.22943</b>	<b>-4.07079</b>	<b>9.34478e-05</b>
<b><u>216836 s at</u></b>	ERBB2	<b>-1.23342</b>	<b>-3.96074</b>	<b>0.000139666</b>
<b><u>205987 at</u></b>	CD1C	<b>-1.23416</b>	<b>-3.87205</b>	<b>0.000192104</b>
<b><u>204829 s at</u></b>	FOLR2	<b>-1.23429</b>	<b>-4.60851</b>	<b>1.19274e-05</b>
<b><u>214168 s at</u></b>	TJP1	<b>-1.23923</b>	<b>-4.05518</b>	<b>9.89725e-05</b>
<b><u>214919 s at</u></b>	ANKHD1	<b>-1.23933</b>	<b>-4.68035</b>	<b>8.95796e-06</b>
<b><u>202734 at</u></b>	TRIP10	<b>-1.24184</b>	<b>-6.73687</b>	<b>1.02459e-09</b>
<b><u>202096 s at</u></b>	TSPO	<b>-1.24501</b>	<b>-4.33609</b>	<b>3.44983e-05</b>
<b><u>209469 at</u></b>	GPM6A	<b>-1.25472</b>	<b>-7.25003</b>	<b>8.7472e-11</b>
<b><u>218756 s at</u></b>	MGC4172	<b>-1.25796</b>	<b>-4.84147</b>	<b>4.67108e-06</b>
<b><u>215821 x at</u></b>	PSG1	<b>-1.26202</b>	<b>-3.89426</b>	<b>0.000177444</b>
<b><u>218024 at</u></b>	BRP44L	<b>-1.26689</b>	<b>-3.68442</b>	<b>0.000371318</b>
<b><u>214924 s at</u></b>	TRAK1	<b>-1.27118</b>	<b>-4.54658</b>	<b>1.52353e-05</b>
<b><u>201539 s at</u></b>	FHL1	<b>-1.27384</b>	<b>-3.99717</b>	<b>0.000122367</b>
<b><u>222333 at</u></b>	ALS2CL	<b>-1.27429</b>	<b>-4.2646</b>	<b>4.52961e-05</b>
<b><u>214505 s at</u></b>	FHL1	<b>-1.27607</b>	<b>-4.78304</b>	<b>5.92372e-06</b>
<b><u>204290 s at</u></b>	ALDH6A1	<b>-1.2764</b>	<b>-4.59169</b>	<b>1.275e-05</b>
<b><u>219680 at</u></b>	NLRX1	<b>-1.27969</b>	<b>-4.37386</b>	<b>2.98428e-05</b>
<b><u>210419 at</u></b>	BARX2	<b>-1.28057</b>	<b>-3.9592</b>	<b>0.000140447</b>
<b><u>215626 at</u></b>	DOCK9	<b>-1.28184</b>	<b>-4.6702</b>	<b>9.3292e-06</b>
<b><u>202826 at</u></b>	SPIINT1	<b>-1.28533</b>	<b>-5.19258</b>	<b>1.08477e-06</b>
<b><u>207519 at</u></b>	SLC6A4	<b>-1.29022</b>	<b>-4.78113</b>	<b>5.96964e-06</b>
<b><u>218485 s at</u></b>	SLC35C1	<b>-1.29159</b>	<b>-5.33733</b>	<b>5.85121e-07</b>
<b><u>208908 s at</u></b>	CAST	<b>-1.29209</b>	<b>-4.36657</b>	<b>3.06917e-05</b>
<b><u>202504 at</u></b>	TRIM29	<b>-1.29289</b>	<b>-4.87498</b>	<b>4.07329e-06</b>
<b><u>203123 s at</u></b>	SLC11A2	<b>-1.29448</b>	<b>-3.82885</b>	<b>0.000224001</b>
<b><u>213488 at</u></b>	SNED1	<b>-1.29585</b>	<b>-6.42732</b>	<b>4.38929e-09</b>
<b><u>206277 at</u></b>	P2RY2	<b>-1.29615</b>	<b>-3.9858</b>	<b>0.000127533</b>
<b><u>214076 at</u></b>	GFOD2	<b>-1.29628</b>	<b>-5.07564</b>	<b>1.77472e-06</b>
<b><u>219749 at</u></b>	SH2D4A	<b>-1.30376</b>	<b>-3.70535</b>	<b>0.000345369</b>
<b><u>221295 at</u></b>	CIDEA	<b>-1.30416</b>	<b>-6.40795</b>	<b>4.80353e-09</b>
<b><u>213078 x at</u></b>	AGPAT7	<b>-1.30897</b>	<b>-4.24673</b>	<b>4.84654e-05</b>
<b><u>210610 at</u></b>	CEACAM1	<b>-1.31143</b>	<b>-4.63843</b>	<b>1.059e-05</b>
<b><u>219929 s at</u></b>	ZFYVE21	<b>-1.31498</b>	<b>-3.74513</b>	<b>0.000300707</b>
<b><u>203641 s at</u></b>	COBLL1	<b>-1.31616</b>	<b>-4.11777</b>	<b>7.85545e-05</b>
<b><u>203759 at</u></b>	ST3GAL4	<b>-1.3168</b>	<b>-5.09245</b>	<b>1.6541e-06</b>
<b><u>204975 at</u></b>	EMP2	<b>-1.32473</b>	<b>-3.73719</b>	<b>0.000309161</b>
<b><u>209355 s at</u></b>	PPAP2B	<b>-1.33563</b>	<b>-4.89088</b>	<b>3.81627e-06</b>
<b><u>214621 at</u></b>	GYS2	<b>-1.3364</b>	<b>-3.89417</b>	<b>0.000177502</b>
<b><u>203296 s at</u></b>	ATP1A2	<b>-1.34026</b>	<b>-5.94592</b>	<b>3.99942e-08</b>
<b><u>212586 at</u></b>	CAST	<b>-1.34862</b>	<b>-3.67276</b>	<b>0.00038657</b>
<b><u>211002 s at</u></b>	TRIM29	<b>-1.35615</b>	<b>-5.49271</b>	<b>2.98813e-07</b>
<b><u>221856 s at</u></b>	FAM63A	<b>-1.35652</b>	<b>-4.34485</b>	<b>3.336e-05</b>
<b><u>206200 s at</u></b>	ANXA11	<b>-1.36118</b>	<b>-4.62152</b>	<b>1.1327e-05</b>
<b><u>208399 s at</u></b>	EDN3	<b>-1.36162</b>	<b>-6.45963</b>	<b>3.77535e-09</b>
<b><u>204223 at</u></b>	PRELP	<b>-1.36314</b>	<b>-6.1291</b>	<b>1.73951e-08</b>

## Anexo

<u>222126 at</u>	HRBL	-1.37305	-3.8415	0.000214174
<u>205653 at</u>	CTSG	-1.37425	-3.8872	0.000181984
<u>220753 s at</u>	CRYL1	-1.37733	-4.02845	0.000109165
<u>40472 at</u>	AGPAT7	-1.37817	-6.34384	6.47005e-09
<u>210480 s at</u>	MYO6	-1.38282	-4.43591	2.34806e-05
<u>210544 s at</u>	ALDH3A2	-1.38628	-4.37811	2.93588e-05
<u>219871 at</u>	FLJ13197	-1.391	-4.14485	7.10326e-05
<u>208510 s at</u>	PPARG	-1.39676	-4.14718	7.0419e-05
<u>210791 s at</u>	RICS	-1.40223	-4.1306	7.48987e-05
<u>207160 at</u>	IL12A	-1.41016	-4.85846	4.35808e-06
<u>220858 at</u>	SORBS2	-1.41698	-6.42098	4.52097e-09
<u>205317 s at</u>	SLC15A2	-1.41829	-4.43829	2.32653e-05
<u>205152 at</u>	SLC6A1	-1.4263	-5.94578	4.00196e-08
<u>221868 at</u>	PAIP2B	-1.42751	-4.58588	1.30463e-05
<u>201534 s at</u>	UBL3	-1.43676	-3.97404	0.000133098
<u>206104 at</u>	ISL1	-1.43716	-3.68788	0.000366898
<u>212272 at</u>	LPIN1	-1.4375	-5.78335	8.29664e-08
<u>201283 s at</u>	TRAK1	-1.44047	-6.2459	1.01752e-08
<u>219503 s at</u>	TMEM40	-1.44363	-3.82231	0.000229243
<u>214106 s at</u>	GMDS	-1.44493	-4.27839	4.29868e-05
<u>218262 at</u>	RMND5B	-1.45593	-4.97687	2.67736e-06
<u>221656 s at</u>	ARHGEF10L	-1.45789	-4.08373	8.90964e-05
<u>203675 at</u>	NUCB2	-1.45831	-4.5502	1.50196e-05
<u>220794 at</u>	GREM2	-1.46258	-10.135	4.72335e-17
<u>205759 s at</u>	SULT2B1	-1.46715	-3.93299	0.000154393
<u>210613 s at</u>	SYNGR1	-1.47239	-3.83103	0.000222272
<u>206509 at</u>	PIP	-1.47997	-3.6719	0.000387713
<u>206682 at</u>	CLEC10A	-1.48277	-3.98494	0.000127934
<u>203815 at</u>	GSTT1	-1.48311	-3.7379	0.000308398
<u>205977 s at</u>	EPHA1	-1.48312	-4.13346	7.41059e-05
<u>202481 at</u>	DHRS3	-1.48362	-3.90907	0.000168263
<u>214040 s at</u>	GSN	-1.48408	-4.00084	0.000120741
<u>219752 at</u>	RASAL1	-1.48449	-4.11143	8.04227e-05
<u>207063 at</u>	CYorf14	-1.48549	-3.73604	0.000310402
<u>202850 at</u>	ABCD3	-1.48778	-3.88725	0.000181953
<u>220266 s at</u>	KLF4	-1.48933	-3.70095	0.000350676
<u>213478 at</u>	KIAA1026	-1.48972	-5.04617	2.00727e-06
<u>215784 at</u>	CD1E	-1.49147	-4.58327	1.31819e-05
<u>206498 at</u>	OCA2	-1.49243	-7.07207	2.06633e-10
<u>212713 at</u>	MFAP4	-1.49305	-4.7051	8.11187e-06
<u>213900 at</u>	C9orf61	-1.49469	-5.94252	4.0613e-08
<u>220428 at</u>	CD207	-1.49755	-5.18655	1.1128e-06
<u>214889 at</u>	DKFZP564J102	-1.50035	-4.90873	3.54658e-06
<u>201412 at</u>	LRP10	-1.50109	-4.15945	6.72687e-05
<u>218677 at</u>	S100A14	-1.50651	-3.84119	0.000214407
<u>218792 s at</u>	BSPRY	-1.51304	-3.68748	0.000367413
<u>213071 at</u>	DPT	-1.51783	-4.67964	8.98364e-06
<u>205259 at</u>	NR3C2	-1.51791	-3.88177	0.000185549
<u>202192 s at</u>	GAS7	-1.52416	-4.50326	1.80597e-05
<u>205637 s at</u>	SH3GL3	-1.52615	-3.81738	0.000233276
<u>202528 at</u>	GALE	-1.53513	-5.21942	9.68086e-07
<u>209357 at</u>	CITED2	-1.53953	-4.41292	2.56686e-05
<u>209980 s at</u>	SHMT1	-1.54529	-4.69402	8.4808e-06

## Anexo

<b>214890 s at</b>	DKFZP564J102	<b>-1.54767</b>	<b>-4.78033</b>	<b>5.98923e-06</b>
<b>216615 s at</b>	HTR3A	<b>-1.55231</b>	<b>-5.57368</b>	<b>2.09759e-07</b>
<b>210299 s at</b>	FHL1	<b>-1.55288</b>	<b>-3.67714</b>	<b>0.00038077</b>
<b>205248 at</b>	DOPEY2	<b>-1.5546</b>	<b>-3.85682</b>	<b>0.000202821</b>
<b>219436 s at</b>	EMCN	<b>-1.56145</b>	<b>-4.16061</b>	<b>6.69783e-05</b>
<b>204168 at</b>	MGST2	<b>-1.56223</b>	<b>-4.37048</b>	<b>3.02341e-05</b>
<b>213509 x at</b>	CES2	<b>-1.5741</b>	<b>-4.53049</b>	<b>1.62304e-05</b>
<b>211067 s at</b>	GAS7	<b>-1.57415</b>	<b>-4.52161</b>	<b>1.68065e-05</b>
<b>202712 s at</b>	CKMT1B	<b>-1.57746</b>	<b>-4.33492</b>	<b>3.46532e-05</b>
<b>203499 at</b>	EPHA2	<b>-1.57802</b>	<b>-3.77237</b>	<b>0.00027336</b>
<b>218342 s at</b>	ERMP1	<b>-1.57943</b>	<b>-4.20193</b>	<b>5.73769e-05</b>
<b>202786 at</b>	STK39	<b>-1.58613</b>	<b>-3.90904</b>	<b>0.000168286</b>
<b>205730 s at</b>	ABLIM3	<b>-1.58765</b>	<b>-4.77705</b>	<b>6.06911e-06</b>
<b>219824 at</b>	SLC13A4	<b>-1.59751</b>	<b>-4.24678</b>	<b>4.84567e-05</b>
<b>202583 s at</b>	RANBP9	<b>-1.60185</b>	<b>-4.38199</b>	<b>2.89231e-05</b>
<b>218876 at</b>	TPPP3	<b>-1.60216</b>	<b>-3.84456</b>	<b>0.000211854</b>
<b>210827 s at</b>	ELF3	<b>-1.60508</b>	<b>-4.30856</b>	<b>3.83246e-05</b>
<b>208978 at</b>	CRIP2	<b>-1.60536</b>	<b>-5.52742</b>	<b>2.56831e-07</b>
<b>219296 at</b>	ZDHC13	<b>-1.60553</b>	<b>-3.78359</b>	<b>0.000262792</b>
<b>215800 at</b>	DUOX1	<b>-1.61519</b>	<b>-4.22329</b>	<b>5.29472e-05</b>
<b>218739 at</b>	ABHD5	<b>-1.61655</b>	<b>-4.24155</b>	<b>4.94224e-05</b>
<b>201535 at</b>	UBL3	<b>-1.61726</b>	<b>-4.29269</b>	<b>4.07127e-05</b>
<b>213397 x at</b>	ANG	<b>-1.62708</b>	<b>-3.74163</b>	<b>0.000304404</b>
<b>222348 at</b>	MAST4	<b>-1.62735</b>	<b>-3.73147</b>	<b>0.000315381</b>
<b>211663 x at</b>	PTGDS	<b>-1.62874</b>	<b>-4.79226</b>	<b>5.70641e-06</b>
<b>211776 s at</b>	EPB41L3	<b>-1.62934</b>	<b>-3.80556</b>	<b>0.000243223</b>
<b>211354 s at</b>	LEPR	<b>-1.63454</b>	<b>-5.329</b>	<b>6.06414e-07</b>
<b>212443 at</b>	NBEAL2	<b>-1.64442</b>	<b>-6.36069</b>	<b>5.98375e-09</b>
<b>204519 s at</b>	PLLP	<b>-1.65325</b>	<b>-5.01729</b>	<b>2.26393e-06</b>
<b>205923 at</b>	RELN	<b>-1.65349</b>	<b>-4.87275</b>	<b>4.11059e-06</b>
<b>204034 at</b>	ETHE1	<b>-1.65606</b>	<b>-4.54327</b>	<b>1.54352e-05</b>
<b>205166 at</b>	CAPN5	<b>-1.66572</b>	<b>-7.58824</b>	<b>1.68073e-11</b>
<b>207980 s at</b>	CITED2	<b>-1.66802</b>	<b>-4.70905</b>	<b>7.98413e-06</b>
<b>218928 s at</b>	SLC37A1	<b>-1.66855</b>	<b>-4.96106</b>	<b>2.85844e-06</b>
<b>221884 at</b>	EVI1	<b>-1.67216</b>	<b>-3.88829</b>	<b>0.000181276</b>
<b>203908 at</b>	SLC4A4	<b>-1.67713</b>	<b>-5.42986</b>	<b>3.92598e-07</b>
<b>206658 at</b>	UPK3B	<b>-1.68011</b>	<b>-4.7785</b>	<b>6.03375e-06</b>
<b>214451 at</b>	TFAP2B	<b>-1.6802</b>	<b>-6.12061</b>	<b>1.80837e-08</b>
<b>202893 at</b>	UNC13B	<b>-1.6879</b>	<b>-4.56953</b>	<b>1.39176e-05</b>
<b>206998 x at</b>	PRB3	<b>-1.68792</b>	<b>-3.97326</b>	<b>0.000133474</b>
<b>214382 at</b>	UNC93A	<b>-1.68885</b>	<b>-3.84708</b>	<b>0.000209972</b>
<b>207057 at</b>	SLC16A7	<b>-1.68944</b>	<b>-4.05827</b>	<b>9.78555e-05</b>
<b>219932 at</b>	SLC27A6	<b>-1.68952</b>	<b>-4.12852</b>	<b>7.54796e-05</b>
<b>202995 s at</b>	FBLN1	<b>-1.69361</b>	<b>-3.77939</b>	<b>0.000266703</b>
<b>221304 at</b>	UGT1A8	<b>-1.69437</b>	<b>-6.03432</b>	<b>2.67966e-08</b>
<b>217508 s at</b>	C18orf25	<b>-1.69598</b>	<b>-3.78398</b>	<b>0.000262436</b>
<b>209667 at</b>	CES2	<b>-1.6996</b>	<b>-4.42465</b>	<b>2.45288e-05</b>
<b>221669 s at</b>	ACAD8	<b>-1.70038</b>	<b>-3.79033</b>	<b>0.000256634</b>
<b>202454 s at</b>	ERBB3	<b>-1.70115</b>	<b>-4.2496</b>	<b>4.79417e-05</b>
<b>212659 s at</b>	IL1RN	<b>-1.70931</b>	<b>-3.79274</b>	<b>0.00025447</b>
<b>214765 s at</b>	ASAH1	<b>-1.71014</b>	<b>-4.56147</b>	<b>1.43672e-05</b>
<b>209668 x at</b>	CES2	<b>-1.71055</b>	<b>-4.50258</b>	<b>1.81078e-05</b>
<b>205158 at</b>	RNASE4	<b>-1.71098</b>	<b>-3.83241</b>	<b>0.000221192</b>

## Anexo

<b><u>218711 s at</u></b>	SDPR	<b>-1.71291</b>	<b>-6.13161</b>	<b>1.71962e-08</b>
<b><u>218312 s at</u></b>	ZSCAN18	<b>-1.71315</b>	<b>-3.88258</b>	<b>0.000185013</b>
<b><u>216025 x at</u></b>	CYP2C9	<b>-1.71483</b>	<b>-3.87639</b>	<b>0.000189152</b>
<b><u>214433 s at</u></b>	SELENBP1	<b>-1.71802</b>	<b>-4.94603</b>	<b>3.04148e-06</b>
<b><u>219681 s at</u></b>	RAB11FIP1	<b>-1.72603</b>	<b>-3.75578</b>	<b>0.00028972</b>
<b><u>212865 s at</u></b>	COL14A1	<b>-1.72605</b>	<b>-4.09837</b>	<b>8.44061e-05</b>
<b><u>205081 at</u></b>	CRIP1	<b>-1.73605</b>	<b>-4.00795</b>	<b>0.000117654</b>
<b><u>220289 s at</u></b>	AIM1L	<b>-1.73631</b>	<b>-4.13817</b>	<b>7.28212e-05</b>
<b><u>202191 s at</u></b>	GAS7	<b>-1.73792</b>	<b>-4.3066</b>	<b>3.86125e-05</b>
<b><u>222362 at</u></b>	HRBL	<b>-1.74473</b>	<b>-5.66183</b>	<b>1.42296e-07</b>
<b><u>208609 s at</u></b>	TNXB	<b>-1.7463</b>	<b>-8.53987</b>	<b>1.48929e-13</b>
<b><u>214401 at</u></b>	PAX1	<b>-1.75038</b>	<b>-4.17654</b>	<b>6.31072e-05</b>
<b><u>214421 x at</u></b>	CYP2C9	<b>-1.75172</b>	<b>-4.06942</b>	<b>9.39211e-05</b>
<b><u>218935 at</u></b>	EHD3	<b>-1.75584</b>	<b>-5.50227</b>	<b>2.86626e-07</b>
<b><u>207059 at</u></b>	PAX9	<b>-1.76308</b>	<b>-4.96006</b>	<b>2.87019e-06</b>
<b><u>204069 at</u></b>	MEIS1	<b>-1.76911</b>	<b>-4.15992</b>	<b>6.71498e-05</b>
<b><u>210262 at</u></b>	CRISP2	<b>-1.77419</b>	<b>-6.59621</b>	<b>1.99053e-09</b>
<b><u>203585 at</u></b>	ZNF185	<b>-1.79348</b>	<b>-4.18208</b>	<b>6.18123e-05</b>
<b><u>216125 s at</u></b>	RANBP9	<b>-1.79753</b>	<b>-5.41075</b>	<b>4.26425e-07</b>
<b><u>210652 s at</u></b>	C1orf34	<b>-1.80017</b>	<b>-3.79617</b>	<b>0.000251417</b>
<b><u>220907 at</u></b>	GPR110	<b>-1.80563</b>	<b>-4.4452</b>	<b>2.26489e-05</b>
<b><u>204667 at</u></b>	FOXA1	<b>-1.80783</b>	<b>-4.60134</b>	<b>1.22715e-05</b>
<b><u>218035 s at</u></b>	FLJ20273	<b>-1.81265</b>	<b>-4.33905</b>	<b>3.41089e-05</b>
<b><u>204875 s at</u></b>	GMDS	<b>-1.81423</b>	<b>-5.58309</b>	<b>2.01268e-07</b>
<b><u>211355 x at</u></b>	LEPR	<b>-1.81857</b>	<b>-5.61033</b>	<b>1.78565e-07</b>
<b><u>209487 at</u></b>	RBPMS	<b>-1.81939</b>	<b>-3.69123</b>	<b>0.000362675</b>
<b><u>220017 x at</u></b>	CYP2C9	<b>-1.82442</b>	<b>-4.17638</b>	<b>6.3144e-05</b>
<b><u>205097 at</u></b>	SLC26A2	<b>-1.82465</b>	<b>-4.4952</b>	<b>1.86386e-05</b>
<b><u>210608 s at</u></b>	FUT2	<b>-1.8251</b>	<b>-5.92728</b>	<b>4.3504e-08</b>
<b><u>212807 s at</u></b>	SORT1	<b>-1.82637</b>	<b>-4.40696</b>	<b>2.62666e-05</b>
<b><u>209488 s at</u></b>	RBPMS	<b>-1.82687</b>	<b>-5.84713</b>	<b>6.23783e-08</b>
<b><u>205316 at</u></b>	SLC15A2	<b>-1.82708</b>	<b>-3.78166</b>	<b>0.000264582</b>
<b><u>212268 at</u></b>	SERPINB1	<b>-1.82793</b>	<b>-3.7882</b>	<b>0.000258571</b>
<b><u>219100 at</u></b>	OBFC1	<b>-1.83175</b>	<b>-5.03963</b>	<b>2.06282e-06</b>
<b><u>209373 at</u></b>	MALL	<b>-1.85903</b>	<b>-4.57707</b>	<b>1.3509e-05</b>
<b><u>211695 x at</u></b>	MUC1	<b>-1.86232</b>	<b>-5.11979</b>	<b>1.47476e-06</b>
<b><u>209493 at</u></b>	PDZD2	<b>-1.86416</b>	<b>-3.77294</b>	<b>0.00027281</b>
<b><u>205184 at</u></b>	GNG4	<b>-1.86607</b>	<b>-5.28362</b>	<b>7.36473e-07</b>
<b><u>201118 at</u></b>	PGD	<b>-1.87762</b>	<b>-4.72761</b>	<b>7.41014e-06</b>
<b><u>204249 s at</u></b>	LMO2	<b>-1.87812</b>	<b>-4.03928</b>	<b>0.00010492</b>
<b><u>209925 at</u></b>	OCLN	<b>-1.88353</b>	<b>-4.41663</b>	<b>2.53025e-05</b>
<b><u>219856 at</u></b>	C1orf116	<b>-1.89249</b>	<b>-5.50186</b>	<b>2.87134e-07</b>
<b><u>212187 x at</u></b>	PTGDS	<b>-1.89848</b>	<b>-4.84377</b>	<b>4.62742e-06</b>
<b><u>204378 at</u></b>	BCAS1	<b>-1.9002</b>	<b>-4.31351</b>	<b>3.76074e-05</b>
<b><u>214734 at</u></b>	EXPH5	<b>-1.90124</b>	<b>-5.90735</b>	<b>4.75926e-08</b>
<b><u>218180 s at</u></b>	EPS8L2	<b>-1.90394</b>	<b>-4.56976</b>	<b>1.39046e-05</b>
<b><u>206030 at</u></b>	ASPA	<b>-1.90764</b>	<b>-6.00558</b>	<b>3.05314e-08</b>
<b><u>218960 at</u></b>	TMPRSS4	<b>-1.91196</b>	<b>-5.07672</b>	<b>1.76677e-06</b>
<b><u>207761 s at</u></b>	METTL7A	<b>-1.94184</b>	<b>-3.77052</b>	<b>0.000275141</b>
<b><u>220016 at</u></b>	AHNAK	<b>-1.94185</b>	<b>-4.47989</b>	<b>1.97873e-05</b>
<b><u>219235 s at</u></b>	PHACTR4	<b>-1.94362</b>	<b>-4.19519</b>	<b>5.88469e-05</b>
<b><u>205464 at</u></b>	SCNN1B	<b>-1.94751</b>	<b>-5.78302</b>	<b>8.30871e-08</b>
<b><u>211356 x at</u></b>	LEPR	<b>-1.94897</b>	<b>-5.58273</b>	<b>2.01594e-07</b>

## Anexo

<b><u>219127 at</u></b>	ATAD4	<b>-1.95008</b>	<b>-5.61963</b>	<b>1.71403e-07</b>
<b><u>219597 s at</u></b>	DUOX1	<b>-1.95721</b>	<b>-5.07863</b>	<b>1.75271e-06</b>
<b><u>220037 s at</u></b>	LYVE1	<b>-1.95837</b>	<b>-8.78879</b>	<b>4.26394e-14</b>
<b><u>213412 at</u></b>	TJP3	<b>-1.96551</b>	<b>-6.43122</b>	<b>4.31022e-09</b>
<b><u>220108 at</u></b>	GNA14	<b>-1.97124</b>	<b>-6.0714</b>	<b>2.26371e-08</b>
<b><u>203779 s at</u></b>	MPZL2	<b>-1.97337</b>	<b>-4.48074</b>	<b>1.97217e-05</b>
<b><u>204606 at</u></b>	CCL21	<b>-1.97447</b>	<b>-4.26722</b>	<b>4.48484e-05</b>
<b><u>205499 at</u></b>	SRPX2	<b>-1.97605</b>	<b>-5.02176</b>	<b>2.22223e-06</b>
<b><u>204955 at</u></b>	SRPX	<b>-1.98074</b>	<b>-4.45756</b>	<b>2.15865e-05</b>
<b><u>216244 at</u></b>	IL1RN	<b>-1.98174</b>	<b>-4.45319</b>	<b>2.19563e-05</b>
<b><u>211748 x at</u></b>	PTGDS	<b>-1.98221</b>	<b>-4.99824</b>	<b>2.45035e-06</b>
<b><u>207655 s at</u></b>	BLNK	<b>-1.98337</b>	<b>-4.20662</b>	<b>5.63744e-05</b>
<b><u>204503 at</u></b>	EVPL	<b>-1.98886</b>	<b>-5.87473</b>	<b>5.51124e-08</b>
<b><u>206453 s at</u></b>	NDRG2	<b>-1.99541</b>	<b>-5.42664</b>	<b>3.98107e-07</b>
<b><u>219165 at</u></b>	PDLIM2	<b>-2.00626</b>	<b>-5.41734</b>	<b>4.14451e-07</b>
<b><u>218966 at</u></b>	MYO5C	<b>-2.01184</b>	<b>-4.74257</b>	<b>6.97665e-06</b>
<b><u>206898 at</u></b>	CDH19	<b>-2.02845</b>	<b>-5.22797</b>	<b>9.33523e-07</b>
<b><u>213236 at</u></b>	SASH1	<b>-2.03036</b>	<b>-6.45679</b>	<b>3.82563e-09</b>
<b><u>221523 s at</u></b>	RRAGD	<b>-2.03728</b>	<b>-4.05183</b>	<b>0.000100196</b>
<b><u>210130 s at</u></b>	TM7SF2	<b>-2.03888</b>	<b>-6.08568</b>	<b>2.12097e-08</b>
<b><u>209772 s at</u></b>	CD24	<b>-2.0426</b>	<b>-5.13559</b>	<b>1.37989e-06</b>
<b><u>210198 s at</u></b>	PLP1	<b>-2.0517</b>	<b>-8.1561</b>	<b>1.01402e-12</b>
<b><u>218186 at</u></b>	RAB25	<b>-2.05401</b>	<b>-5.36108</b>	<b>5.28317e-07</b>
<b><u>216243 s at</u></b>	IL1RN	<b>-2.05955</b>	<b>-3.91969</b>	<b>0.000161964</b>
<b><u>205470 s at</u></b>	KLK11	<b>-2.0605</b>	<b>-3.91068</b>	<b>0.000167297</b>
<b><u>41644 at</u></b>	SASH1	<b>-2.07286</b>	<b>-5.70788</b>	<b>1.16057e-07</b>
<b><u>213050 at</u></b>	COBL	<b>-2.0763</b>	<b>-4.42474</b>	<b>2.45203e-05</b>
<b><u>213693 s at</u></b>	MUC1	<b>-2.08442</b>	<b>-4.42298</b>	<b>2.46874e-05</b>
<b><u>209587 at</u></b>	PITX1	<b>-2.08826</b>	<b>-5.42192</b>	<b>4.06321e-07</b>
<b><u>204754 at</u></b>	HLF	<b>-2.09512</b>	<b>-4.38572</b>	<b>2.85109e-05</b>
<b><u>205399 at</u></b>	DCLK1	<b>-2.1081</b>	<b>-4.63828</b>	<b>1.05965e-05</b>
<b><u>205489 at</u></b>	CRYM	<b>-2.1093</b>	<b>-4.69522</b>	<b>8.44012e-06</b>
<b><u>209074 s at</u></b>	FAM107A	<b>-2.11343</b>	<b>-6.76518</b>	<b>8.95865e-10</b>
<b><u>206932 at</u></b>	CH25H	<b>-2.11462</b>	<b>-3.94576</b>	<b>0.000147442</b>
<b><u>206295 at</u></b>	IL18	<b>-2.12249</b>	<b>-4.56207</b>	<b>1.43333e-05</b>
<b><u>203961 at</u></b>	NEBL	<b>-2.12849</b>	<b>-4.45454</b>	<b>2.18409e-05</b>
<b><u>203407 at</u></b>	PPL	<b>-2.13124</b>	<b>-5.19949</b>	<b>1.05349e-06</b>
<b><u>203747 at</u></b>	AQP3	<b>-2.13217</b>	<b>-4.00886</b>	<b>0.000117261</b>
<b><u>220013 at</u></b>	ABHD9	<b>-2.13556</b>	<b>-3.86219</b>	<b>0.00019898</b>
<b><u>219450 at</u></b>	C4orf19	<b>-2.14009</b>	<b>-5.12515</b>	<b>1.44186e-06</b>
<b><u>208335 s at</u></b>	DARC	<b>-2.147</b>	<b>-5.00515</b>	<b>2.38108e-06</b>
<b><u>204237 at</u></b>	GULP1	<b>-2.15438</b>	<b>-3.71904</b>	<b>0.000329328</b>
<b><u>213611 at</u></b>	AQP5	<b>-2.15714</b>	<b>-9.33962</b>	<b>2.64619e-15</b>
<b><u>205042 at</u></b>	GNE	<b>-2.16012</b>	<b>-3.90911</b>	<b>0.000168242</b>
<b><u>205073 at</u></b>	CYP2J2	<b>-2.16768</b>	<b>-4.6785</b>	<b>9.02456e-06</b>
<b><u>213929 at</u></b>		<b>-2.17873</b>	<b>-4.38161</b>	<b>2.89655e-05</b>
<b><u>211026 s at</u></b>	MGLL	<b>-2.1789</b>	<b>-4.61198</b>	<b>1.17647e-05</b>
<b><u>218730 s at</u></b>	OGN	<b>-2.18906</b>	<b>-5.93819</b>	<b>4.14141e-08</b>
<b><u>202920 at</u></b>	ANK2	<b>-2.19192</b>	<b>-5.17435</b>	<b>1.17173e-06</b>
<b><u>206094 x at</u></b>	UGT1A6	<b>-2.19413</b>	<b>-3.74088</b>	<b>0.000305202</b>
<b><u>207038 at</u></b>	SLC16A6	<b>-2.19624</b>	<b>-4.57734</b>	<b>1.34947e-05</b>
<b><u>202992 at</u></b>	C7	<b>-2.19977</b>	<b>-6.96131</b>	<b>3.51677e-10</b>
<b><u>209976 s at</u></b>	CYP2E1	<b>-2.20559</b>	<b>-5.42032</b>	<b>4.09138e-07</b>

## Anexo

<u>210609 s at</u>	TP53I3	-2.20689	-5.26917	7.83332e-07
<u>203962 s at</u>	NEBL	-2.2123	-4.77433	6.13645e-06
<u>209368 at</u>	EPHX2	-2.21719	-6.60169	1.93992e-09
<u>216258 s at</u>	SERPINB13	-2.21734	-4.16715	6.53616e-05
<u>202790 at</u>	CLDN7	-2.22964	-4.59905	1.23838e-05
<u>201325 s at</u>	EMP1	-2.26446	-4.6269	1.10875e-05
<u>211889 x at</u>	CEACAM1	-2.26803	-5.43232	3.88434e-07
<u>209109 s at</u>	TSPAN6	-2.2699	-5.32572	6.15019e-07
<u>203453 at</u>	SCNN1A	-2.28737	-4.00308	0.000119757
<u>213174 at</u>	TTC9	-2.28785	-6.17978	1.37911e-08
<u>1431 at</u>	CYP2E1	-2.28847	-5.07441	1.78393e-06
<u>205466 s at</u>	HS3ST1	-2.28924	-4.26538	4.51623e-05
<u>209108 at</u>	TSPAN6	-2.2948	-6.1648	1.47721e-08
<u>203305 at</u>	F13A1	-2.29582	-4.97374	2.71235e-06
<u>208502 s at</u>	PITX1	-2.30076	-5.3805	4.85925e-07
<u>209679 s at</u>	LOC57228	-2.30481	-5.59982	1.87013e-07
<u>206093 x at</u>	TNXB	-2.30907	-9.2086	5.13168e-15
<u>39249 at</u>	AQP3	-2.31849	-4.54658	1.52352e-05
<u>203431 s at</u>	RICS	-2.3277	-4.52057	1.68749e-05
<u>204393 s at</u>	ACPP	-2.32815	-4.65782	9.80245e-06
<u>221667 s at</u>	HSPB8	-2.34424	-4.31911	3.6812e-05
<u>219476 at</u>	C1orf116	-2.34527	-5.23148	9.19705e-07
<u>211559 s at</u>	CCNG2	-2.34581	-5.84903	6.18498e-08
<u>214088 s at</u>	FUT3	-2.3461	-4.7198	7.64671e-06
<u>211362 s at</u>	SERPINB13	-2.34894	-4.26161	4.58114e-05
<u>204235 s at</u>	GULP1	-2.35211	-4.60751	1.19748e-05
<u>209365 s at</u>	ECM1	-2.35221	-5.16735	1.2069e-06
<u>219727 at</u>	DUOX2	-2.35333	-3.7147	0.000334333
<u>209692 at</u>	EYA2	-2.36098	-4.3403	3.39471e-05
<u>221404 at</u>	IL1F6	-2.36177	-4.87474	4.0772e-06
<u>208596 s at</u>	UGT1A3	-2.36573	-3.74338	0.000302551
<u>219722 s at</u>	GDPD3	-2.37547	-4.73375	7.22895e-06
<u>211465 x at</u>	FUT6	-2.38693	-7.82934	5.12865e-12
<u>206482 at</u>	PTK6	-2.39301	-5.34275	5.71641e-07
<u>215913 s at</u>	GULP1	-2.39814	-5.83518	6.58096e-08
<u>215103 at</u>	CYP2C18	-2.40213	-4.09097	8.67472e-05
<u>204674 at</u>	LRMP	-2.40237	-5.1421	1.34259e-06
<u>207367 at</u>	ATP12A	-2.41418	-6.74051	1.00708e-09
<u>204867 at</u>	GCHFR	-2.42955	-5.45479	3.52366e-07
<u>218963 s at</u>	KRT23	-2.43381	-4.03872	0.000105133
<u>219059 s at</u>	LYVE1	-2.43561	-8.61293	1.03217e-13
<u>211883 x at</u>	CEACAM1	-2.43602	-6.03743	2.64207e-08
<u>214063 s at</u>	TF	-2.43871	-4.69159	8.56354e-06
<u>212510 at</u>	GPD1L	-2.46656	-6.10069	1.98067e-08
<u>222043 at</u>	CLU	-2.46855	-4.871	4.1401e-06
<u>205612 at</u>	MMRN1	-2.47518	-6.06905	2.28805e-08
<u>204614 at</u>	SERPINB2	-2.47756	-3.85547	0.000203799
<u>209975 at</u>	CYP2E1	-2.48229	-4.83929	4.71281e-06
<u>221655 x at</u>	EPS8L1	-2.48564	-6.51403	2.92738e-09
<u>208791 at</u>	CLU	-2.48931	-5.06493	1.85602e-06
<u>211885 x at</u>	FUT6	-2.4914	-7.52723	2.26645e-11
<u>216333 x at</u>	TNXB	-2.50489	-8.6545	8.37693e-14
<u>217551 at</u>	LOC441453	-2.511	-5.68762	1.26961e-07

## Anexo

<b><u>210398</u></b> x at	FUT6	<b>-2.51459</b>	<b>-8.61367</b>	<b>1.02833e-13</b>
<b><u>214070</u></b> s at	ATP10B	<b>-2.51547</b>	<b>-4.58943</b>	<b>1.28644e-05</b>
<b><u>208792</u></b> s at	CLU	<b>-2.53729</b>	<b>-4.82732</b>	<b>4.94852e-06</b>
<b><u>213451</u></b> x at	TNXB	<b>-2.5401</b>	<b>-8.47416</b>	<b>2.07025e-13</b>
<b><u>203649</u></b> s at	PLA2G2A	<b>-2.54084</b>	<b>-5.12175</b>	<b>1.46261e-06</b>
<b><u>35974</u></b> at	LRMP	<b>-2.54235</b>	<b>-4.74672</b>	<b>6.86066e-06</b>
<b><u>220149</u></b> at	C2orf54	<b>-2.55141</b>	<b>-6.25713</b>	<b>9.66166e-09</b>
<b><u>217315</u></b> s at	KLK13	<b>-2.56617</b>	<b>-5.91578</b>	<b>4.58177e-08</b>
<b><u>205513</u></b> at	TCN1	<b>-2.5752</b>	<b>-3.90211</b>	<b>0.000172518</b>
<b><u>211882</u></b> x at	FUT6	<b>-2.57802</b>	<b>-8.3229</b>	<b>4.41259e-13</b>
<b><u>35148</u></b> at	TJP3	<b>-2.5847</b>	<b>-6.87736</b>	<b>5.25331e-10</b>
<b><u>214858</u></b> at	GPC1	<b>-2.59472</b>	<b>-9.64528</b>	<b>5.63528e-16</b>
<b><u>210399</u></b> x at	FUT6	<b>-2.59629</b>	<b>-6.73692</b>	<b>1.02435e-09</b>
<b><u>205392</u></b> s at	CCL14	<b>-2.59665</b>	<b>-7.1569</b>	<b>1.37268e-10</b>
<b><u>208126</u></b> s at	CYP2C18	<b>-2.60507</b>	<b>-4.59179</b>	<b>1.27448e-05</b>
<b><u>205328</u></b> at	CLDN10	<b>-2.6059</b>	<b>-3.94973</b>	<b>0.000145344</b>
<b><u>213895</u></b> at	EMP1	<b>-2.61406</b>	<b>-5.80311</b>	<b>7.59598e-08</b>
<b><u>218779</u></b> x at	EPS8L1	<b>-2.63524</b>	<b>-6.01267</b>	<b>2.95653e-08</b>
<b><u>203757</u></b> s at	CEACAM6	<b>-2.63637</b>	<b>-3.83923</b>	<b>0.000215902</b>
<b><u>221665</u></b> s at	EPS8L1	<b>-2.67213</b>	<b>-6.24418</b>	<b>1.02559e-08</b>
<b><u>206262</u></b> at	ADH1C	<b>-2.67632</b>	<b>-5.15474</b>	<b>1.27291e-06</b>
<b><u>91826</u></b> at	EPS8L1	<b>-2.67634</b>	<b>-5.12807</b>	<b>1.42429e-06</b>
<b><u>207847</u></b> s at	MUC1	<b>-2.68162</b>	<b>-5.59789</b>	<b>1.88602e-07</b>
<b><u>218885</u></b> s at	GALNT12	<b>-2.69419</b>	<b>-5.11103</b>	<b>1.53004e-06</b>
<b><u>219230</u></b> at	TMEM100	<b>-2.71825</b>	<b>-7.26344</b>	<b>8.19677e-11</b>
<b><u>214279</u></b> s at	NDRG2	<b>-2.7195</b>	<b>-8.03824</b>	<b>1.82223e-12</b>
<b><u>216010</u></b> x at	FUT3	<b>-2.72537</b>	<b>-8.96079</b>	<b>1.79273e-14</b>
<b><u>209612</u></b> s at	ADH1B	<b>-2.72945</b>	<b>-9.21054</b>	<b>5.08164e-15</b>
<b><u>204351</u></b> at	S100P	<b>-2.73432</b>	<b>-4.16666</b>	<b>6.54821e-05</b>
<b><u>220197</u></b> at	ATP6V0A4	<b>-2.74084</b>	<b>-5.57291</b>	<b>2.10462e-07</b>
<b><u>205969</u></b> at	AADAC	<b>-2.75579</b>	<b>-5.8824</b>	<b>5.32436e-08</b>
<b><u>204288</u></b> s at	SORBS2	<b>-2.78213</b>	<b>-8.00277</b>	<b>2.17305e-12</b>
<b><u>214235</u></b> at	CYP3A5P2	<b>-2.78906</b>	<b>-6.02508</b>	<b>2.79458e-08</b>
<b><u>219554</u></b> at	RHCG	<b>-2.80537</b>	<b>-4.05559</b>	<b>9.88231e-05</b>
<b><u>214624</u></b> at	UPK1A	<b>-2.81614</b>	<b>-6.00317</b>	<b>3.08669e-08</b>
<b><u>206605</u></b> at	P11	<b>-2.82147</b>	<b>-4.30208</b>	<b>3.92833e-05</b>
<b><u>206576</u></b> s at	CEACAM1	<b>-2.82493</b>	<b>-5.76008</b>	<b>9.20345e-08</b>
<b><u>201525</u></b> at	APOD	<b>-2.83851</b>	<b>-6.92385</b>	<b>4.2073e-10</b>
<b><u>211848</u></b> s at	CEACAM7	<b>-2.86096</b>	<b>-6.82804</b>	<b>6.64518e-10</b>
<b><u>203400</u></b> s at	TF	<b>-2.86209</b>	<b>-4.71631</b>	<b>7.7546e-06</b>
<b><u>213172</u></b> at	TTC9	<b>-2.90112</b>	<b>-4.71948</b>	<b>7.65649e-06</b>
<b><u>209613</u></b> s at	ADH1B	<b>-2.90453</b>	<b>-8.54825</b>	<b>1.42793e-13</b>
<b><u>211726</u></b> s at	FMO2	<b>-2.91278</b>	<b>-4.88477</b>	<b>3.91303e-06</b>
<b><u>206004</u></b> at	TGM3	<b>-2.92285</b>	<b>-3.70188</b>	<b>0.000349544</b>
<b><u>205783</u></b> at	KLK13	<b>-2.9494</b>	<b>-4.14566</b>	<b>7.08181e-05</b>
<b><u>211689</u></b> s at	TMPRSS2	<b>-2.97554</b>	<b>-5.54953</b>	<b>2.33164e-07</b>
<b><u>221305</u></b> s at	UGT1A8	<b>-2.9786</b>	<b>-5.83702</b>	<b>6.52689e-08</b>
<b><u>209498</u></b> at	CEACAM1	<b>-2.98025</b>	<b>-4.65576</b>	<b>9.88304e-06</b>
<b><u>212224</u></b> at	ALDH1A1	<b>-3.00943</b>	<b>-4.32429</b>	<b>3.60916e-05</b>
<b><u>205382</u></b> s at	CFD	<b>-3.07417</b>	<b>-7.45922</b>	<b>3.16062e-11</b>
<b><u>219529</u></b> at	CLIC3	<b>-3.08046</b>	<b>-5.19126</b>	<b>1.09086e-06</b>
<b><u>210085</u></b> s at	ANXA9	<b>-3.13759</b>	<b>-7.3723</b>	<b>4.82907e-11</b>
<b><u>205185</u></b> at	SPINK5	<b>-3.14672</b>	<b>-4.41546</b>	<b>2.5417e-05</b>

## Anexo

<u>211734 s at</u>	FCER1A	-3.16959	-5.57493	2.08606e-07
<u>206884 s at</u>	SCEL	-3.18485	-3.90334	0.000171763
<u>205623 at</u>	ALDH3A1	-3.18499	-4.88321	3.93829e-06
<u>201884 at</u>	CEACAM5	-3.22418	-4.1647	6.59633e-05
<u>205200 at</u>	CLEC3B	-3.22482	-7.4948	2.65615e-11
<u>210505 at</u>	ADH7	-3.22661	-4.30126	3.94065e-05
<u>204284 at</u>	PPP1R3C	-3.23866	-4.60994	1.18602e-05
<u>205725 at</u>	SCGB1A1	-3.27338	-8.94547	1.93667e-14
<u>211549 s at</u>	HPGD	-3.28876	-5.31248	6.50916e-07
<u>205765 at</u>	CYP3A5	-3.33337	-6.22902	1.09975e-08
<u>211712 s at</u>	ANXA9	-3.35992	-6.05832	2.40258e-08
<u>206198 s at</u>	CEACAM7	-3.36259	-7.22568	9.84248e-11
<u>209894 at</u>	LEPR	-3.36799	-5.72389	1.08101e-07
<u>209687 at</u>	CXCL12	-3.38507	-5.20024	1.05011e-06
<u>203914 x at</u>	HPGD	-3.4147	-5.28361	7.36485e-07
<u>209763 at</u>	CHRD1	-3.43233	-7.1692	1.29351e-10
<u>214234 s at</u>	CYP3A5P2	-3.45776	-7.07363	2.05088e-10
<u>206199 at</u>	CEACAM7	-3.45803	-4.34601	3.32114e-05
<u>219508 at</u>	GCNT3	-3.47639	-6.0143	2.9347e-08
<u>214536 at</u>	SLURP1	-3.50375	-4.55822	1.45527e-05
<u>211548 s at</u>	HPGD	-3.6193	-4.94869	3.00825e-06
<u>207935 s at</u>	KRT13	-3.62481	-3.70854	0.000341565
<u>204895 x at</u>	MUC4	-3.65834	-7.10651	1.7505e-10
<u>219014 at</u>	PLAC8	-3.73393	-5.10416	1.57478e-06
<u>204719 at</u>	ABCA8	-3.74998	-6.8387	6.31613e-10
<u>203913 s at</u>	HPGD	-3.78993	-5.16533	1.21725e-06
<u>203924 at</u>	GSTA2	-3.81492	-5.63323	1.61437e-07
<u>217109 at</u>	MUC4	-3.91198	-4.94603	3.04143e-06
<u>220267 at</u>	KRT24	-4.02073	-4.48115	1.96897e-05
<u>217110 s at</u>	MUC4	-4.06086	-6.24392	1.02683e-08
<u>205044 at</u>	GABRP	-4.2709	-5.69477	1.23003e-07
<u>205319 at</u>	PSCA	-4.27557	-8.05891	1.64436e-12
<u>210096 at</u>	CYP4B1	-4.56037	-7.14075	1.484e-10
<u>204777 s at</u>	MAL	-4.7101	-5.02198	2.22016e-06
<u>220090 at</u>	CRNN	-4.76029	-4.38959	2.80889e-05
<u>213240 s at</u>	KRT4	-4.82575	-4.8837	3.93024e-06
<u>220026 at</u>	CLCA4	-5.07268	-5.50809	2.79438e-07
<u>207802 at</u>	CRISP3	-5.08688	-6.12785	1.7495e-08

Tabla 34. Subgrupo de genes de la firma genética del estudio de Humtsoe *et al* [181] sobreexpresados en la línea SCC-9.

Probe	Symbol	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES
<u>CCDC50</u>	CCDC50	18702	-0.261	-0.7263
<u>TBC1D9</u>	TBC1D9	18731	-0.263	-0.7221
<u>ASTN2</u>	ASTN2	18743	-0.264	-0.7172
<u>BBS7</u>	BBS7	18816	-0.270	-0.7150
<u>BCL2A1</u>	BCL2A1	18829	-0.271	-0.7100
<u>GALK1</u>	GALK1	18867	-0.275	-0.7060
<u>THBS4</u>	THBS4	18873	-0.275	-0.7005
<u>FVT1</u>	FVT1	18904	-0.278	-0.6962
<u>NRP1</u>	NRP1	18937	-0.281	-0.6919
<u>ITGB5</u>	ITGB5	18986	-0.288	-0.6882
<u>IER3IP1</u>	IER3IP1	19116	-0.306	-0.6881
<u>LOC440157</u>	LOC440157	19134	-0.308	-0.6825

## Anexo

<u>SLC35B4</u>	SLC35B4	19172	-0.312	-0.6778
<u>RPS27L</u>	RPS27L	19181	-0.313	-0.6716
<u>OSTM1</u>	OSTM1	19434	-0.351	-0.6766
<u>PPAPDC1A</u>	PPAPDC1A	19715	-0.412	-0.6816
<u>CAMK4</u>	CAMK4	19769	-0.426	-0.6753
<u>PLAUR</u>	PLAUR	19832	-0.442	-0.6691
<u>CREM</u>	CREM	19886	-0.462	-0.6620
<u>FOXR2</u>	FOXR2	19920	-0.472	-0.6537
<u>PRICKLE2</u>	PRICKLE2	19933	-0.477	-0.6444
<u>ABHD14A</u>	ABHD14A	19944	-0.480	-0.6348
<u>PXK</u>	PXK	20020	-0.505	-0.6279
<u>DACT1</u>	DACT1	20023	-0.507	-0.6174
<u>GK</u>	GK	20027	-0.510	-0.6069
<u>EVI2B</u>	EVI2B	20084	-0.538	-0.5984
<u>TBL1X</u>	TBL1X	20149	-0.565	-0.5897
<u>PREX1</u>	PREX1	20164	-0.570	-0.5784
<u>GFPT2</u>	GFPT2	20167	-0.572	-0.5666
<u>CDC42EP3</u>	CDC42EP3	20211	-0.596	-0.5562
<u>TMEM158</u>	TMEM158	20263	-0.626	-0.5456
<u>FBN1</u>	FBN1	20265	-0.629	-0.5325
<u>FKBP7</u>	FKBP7	20269	-0.631	-0.5195
<u>CRTAP</u>	CRTAP	20282	-0.638	-0.5067
<u>HECW2</u>	HECW2	20320	-0.660	-0.4947
<u>NEGR1</u>	NEGR1	20323	-0.666	-0.4809
<u>MCAM</u>	MCAM	20325	-0.666	-0.4670
<u>FLJ39632</u>	FLJ39632	20331	-0.677	-0.4531
<u>LACTB</u>	LACTB	20334	-0.679	-0.4390
<u>STC1</u>	STC1	20389	-0.744	-0.4261
<u>RECK</u>	RECK	20430	-0.801	-0.4113
<u>PLEKHO1</u>	PLEKHO1	20438	-0.813	-0.3946
<u>HS3ST3A1</u>	HS3ST3A1	20445	-0.825	-0.3777
<u>CDH13</u>	CDH13	20462	-0.857	-0.3605
<u>CXCL3</u>	CXCL3	20470	-0.881	-0.3424
<u>ANKRD28</u>	ANKRD28	20478	-0.910	-0.3238
<u>KLF9</u>	KLF9	20483	-0.937	-0.3044
<u>CHN1</u>	CHN1	20499	-1.000	-0.2842
<u>DOCK10</u>	DOCK10	20520	-1.078	-0.2626
<u>ZNF404</u>	ZNF404	20525	-1.106	-0.2397
<u>RHOBTB1</u>	RHOBTB1	20539	-1.155	-0.2162
<u>CDH2</u>	CDH2	20549	-1.220	-0.1911
<u>MAP1B</u>	MAP1B	20555	-1.269	-0.1648
<u>LOX</u>	LOX	20579	-1.591	-0.1327
<u>NNMT</u>	NNMT	20598	-2.099	-0.0897
<u>SCG5</u>	SCG5	20599	-2.130	-0.0452
<u>EVI2A</u>	EVI2A	20600	-2.172	0.0002