



FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA  
Departamento de Estomatoloxía

**VALIDACIÓN Y ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE  
LOS GENES *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*,  
*ATP6V1C1* Y *ATP6V0E* EN EL CARCINOMA ORAL DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS MEDIANTE PCR  
CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL**

TESIS DOCTORAL

EVA MARÍA OTERO REY

Santiago de Compostela, enero de 2006





FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA

VALIDACIÓN Y ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS  
GENES *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*, *ATP6V1C1* Y  
*ATP6V0E* EN EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN  
TIEMPO REAL

Autora: EVA MARÍA OTERO REY

Santiago de Compostela, 20 de Enero de 2006.



D. ABEL GARCÍA GARCÍA, Profesor Titular de Cirugía Oral y Maxilofacial de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela; D. FRANCISCO BARROS ANGUEIRA, Doctor en Biología y Jefe de Laboratorio de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica del Sergas; y D. JOSÉ MANUEL SOMOZA MARTÍN, Doctor en Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**CERTIFICAN:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada “VALIDACIÓN Y ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS GENES *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*, *ATP6V1C1* Y *ATP6V0E* EN EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL”, ha sido elaborada por Dña. EVA MARÍA OTERO REY bajo nuestra dirección, y hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, se expide la presente certificación en Santiago de Compostela, a 20 de Enero de 2006.

Prof. Dr. D. Abel García García

Dr. D. Francisco Barros Angueira

Dr. D. José Manuel Somoza Martín



El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el contexto del proyecto de investigación:

EXPRESIÓN GENÉTICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS EPITELIALES DE LESIONES PREMALIGNAS Y CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LA CAVIDAD ORAL

Financiación: Xunta de Galicia (PGIDT01PXI20804PR)

Director del proyecto e investigador principal: Prof Abel García García (Universidad de Santiago de Compostela)



## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Profesor Abel García García, por ser el promotor de esta investigación y por la amistad, confianza y cariño que me ha demostrado a lo largo de estos años.

Al Dr. Francisco Barros Angueira, por su inestimable ayuda y aportación a esta Tesis Doctoral y por su dedicación a la investigación.

Al Dr. José Manuel Somoza Martín, por su apoyo en este y otros trabajos realizados, así como por su paciencia y ayuda constante.

Al Profesor José Manuel Gándara Rey, por su gran aportación docente a mi formación y por su continua dedicación a la enseñanza.

Al Profesor Andrés Blanco Carrión, una de las mejores personas que conozco y con la que tengo la suerte de trabajar día a día.

A Manuel Peñamaría Mallón, compañero y amigo, que ha estado siempre dispuesto a prestar su ayuda de forma desinteresada.

A todos mis compañeros del Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e

Implantología y del Máster de Odontología Práctica Diaria de la Universidad de Santiago de Compostela.

A Sonia, por saber escuchar y aconsejarme en cada momento.

A Oky, por tener la suerte de tener a mi lado una persona que me entiende y me apoya día a día.

*A mis padres,  
por guiar mis pasos con su ejemplo*



# ÍNDICE



JUSTIFICACIÓN	15
I. INTRODUCCIÓN	21
1.- Carcinoma oral de células escamosas	23
1.1. Concepto	23
1.2. Epidemiología	24
1.3. Etiopatogenia	25
1.4. Clínica	27
1.5. Diagnóstico	28
1.5.1. Diagnóstico histológico y ultraestructural	28
1.5.2. Inmunohistoquímica	31
1.5.3. Técnicas de biología molecular	32
1.6. Estadiaje	33
1.7. Pronóstico	35
1.8. Tratamiento	37

---

2.- Bases moleculares del cáncer	41
2.1. La maquinaria de proliferación celular	41
2.1.1. Ciclo celular	42
2.1.2. Regulación del ciclo celular	44
2.2. Oncogenes, genes supresores tumorales	46
2.3. Adaptaciones celulares, lesión y muerte celular	51
2.4. La maquinaria de muerte celular	59
2.4.1. Apoptosis	60
2.4.2. Genes reguladores de la apoptosis	61
2.5. Diferencias entre las células normales y las células cancerosas	62
2.6. Carcinogénesis	64
2.7. Angiogénesis	66
2.8. Técnicas de biología molecular	68
3.- Bases moleculares del carcinoma oral de células escamosas	75
3.1. Carcinoma oral de células escamosas y <i>microarrays</i> de ADN	76
3.2. Genes sobreexpresados en el carcinoma oral de células escamosas según un estudio con el <i>array Atlas Glass Human 3.8 I</i> <i>Microarray</i>	78

---

4.- Validación de los resultados obtenidos con <i>microarrays</i> de ADN	107
4.1. PCR cuantitativa en tiempo real	108
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	113
III. MATERIAL Y MÉTODO	117
1.- Selección de pacientes	119
1.1. Edad y sexo	119
1.2. Consumo de tabaco	119
1.3. Localización del tumor	120
1.4. Estadio del tumor	120
2.- Selección de los genes a estudio	121
3.- Metodología de trabajo	122
3.1. Obtención de las muestras	122
3.2. Procesado de las muestras	123
3.3. Cuantificación por PCR en tiempo real	124
4.- Normalización de datos	127
5.- Análisis del nivel de expresión	129
6.- Estudio estadístico	129

---

IV. RESULTADOS	131
1.- Estudio de los genes	133
1.1.- <i>ADRBK2 (adrenergic, beta, receptor kinase 2)</i>	133
1.2.- <i>ADRB1 (adrenergic, beta-1-, receptor)</i>	135
1.3.- <i>ADRA2B (adrenergic, alpha-2B-, receptor)</i>	137
1.4.- <i>AXIN 2</i>	139
1.5.- <i>ATP6V1C1(ATPase, H+ transporting, lysosomal 42KDa, V1 subunit C, isoform 1)</i>	141
1.6.- <i>ATP6V0E (ATPase, H+ transporting, lysosomal 9KDa, V0 subunit e)</i>	143
2.- Normalización de datos	145
2.1.- <i>ADRBK2 (adrenergic, beta, receptor kinase 2)</i>	145
2.2.- <i>ADRB1 (adrenergic, beta-1-, receptor)</i>	146
2.3.- <i>ADRA2B (adrenergic, alpha-2B-, receptor)</i>	147
2.4.- <i>AXIN 2</i>	148
2.5.- <i>ATP6V1C1(ATPase, H+ transporting, lysosomal 42KDa, V1 subunit C, isoform 1)</i>	149
2.6.- <i>ATP6V0E (ATPase, H+ transporting, lysosomal 9KDa, V0 subunit e)</i>	150

3.- Análisis del nivel de expresión	151
V. DISCUSIÓN	155
VI. CONCLUSIONES	177
VII. BIBLIOGRAFÍA	181
VIII. ANEXOS	209



## **JUSTIFICACIÓN**



Cada año más de 300.000 nuevos casos de carcinoma oral de células escamosas (COCE) son diagnosticados en todo el mundo (1). De éstos, aproximadamente 50.000 casos ocurren en Estados Unidos y Europa (2). En España, la incidencia del cáncer oral es de 12 a 15 casos/100.000 habitantes/año en varones y de 2 a 4 casos/100.000 habitantes/año en mujeres, y representa entre el 2 y el 3% de todas las muertes por cáncer en nuestro país (3).

Estudios epidemiológicos recientes (4) han demostrado un aumento de la mortalidad anual por cáncer oral, de un 25% para los hombres y de un 9% para las mujeres, durante el período de 1975-1994, lo que hace que el cáncer oral deba ser considerado un problema de salud pública en España (5).

Desafortunadamente, los rasgos clínico-patológicos de la enfermedad son la única medida disponible para predecir su pronóstico, guiar el tratamiento y aconsejar a los pacientes. El tratamiento convencional, ya sea con cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, está asociado con una elevada morbilidad afectando el habla, la deglución y, en general, la calidad de vida del paciente. Pese a los avances en estas intervenciones, la recurrencia de la enfermedad se observa en más del 50% de los pacientes con altas tasas de mortalidad asociada (6). Esto viene acompañado del hecho de que mientras nuestra habilidad para controlar localmente la enfermedad ha progresado, la tasa total de supervivencia a los 5 años no ha mejorado significativamente en las pasadas tres décadas.

El COCE, como enfermedad neoplásica de etiología multifactorial, es una de las enfermedades más heterogéneas. Aunque existen diversos factores de

riesgo, los más importantes son el tabaco y el alcohol, potenciando su acción cuando se consumen conjuntamente. Sin embargo, pese a los esfuerzos para identificar biomarcadores, ningún marcador específico puede ser usado con confianza en la detección precoz o como indicador de pronosis. El estadiaje de la enfermedad se basa en la actualidad únicamente en los hallazgos clínicos de localización, con atención a complicaciones locales, regionales y a distancia. Aunque el estadiaje tiene un fuerte valor predictivo con respecto a la probabilidad de supervivencia, los problemas asociados a su aplicación ponen en evidencia la necesidad de un refinamiento del sistema y de la identificación de factores pronósticos adicionales.

Son las limitaciones de las características clínicas en pacientes con cáncer oral las que han llevado a la búsqueda de biomarcadores de pronóstico por parte de diversos grupos de investigación. Inicialmente los esfuerzos se centraron en marcadores individuales, como *p53*, queratinas o *p16*, pero su utilidad es limitada dada su penetrancia incompleta y expresión variable (7). Es por ello que los esfuerzos recientes se han centrado en el análisis de los cambios de expresión génica global con la esperanza de identificar cambios asociados con la carcinogénesis en estos tumores, y de identificar firmas genéticas específicas que permitan predecir las consecuencias de la enfermedad (8).

El proyecto Genoma Humano ha sido el catalizador para el desarrollo de tecnologías de alta productividad que han permitido mapear y secuenciar genomas complejos. En los últimos años tales tecnologías se han extendido hasta permitir la medida de la expresión relativa de miles de genes simultáneamente en un único experimento. La plataforma con mayor responsabilidad en esta nueva frontera de la investigación genómica es la de *microarrays* de ADN, también conocida como chip de ADN o chip génico. Actualmente existe una gran variedad de tipos de *microarrays* de ADN en el mercado, pero todos se basan en el principio de tomar una librería representativa de fragmentos de ADN de un

genoma complejo e imprimir dichos productos a intervalos regularmente espaciados sobre una superficie sólida. La lista de productos que pueden imprimirse varía desde segmentos específicos de cromosomas y librerías de ADN complementario (ADNc) hasta librerías de promotores. En el caso de los *microarrays* de ADNc, la mayoría de las metodologías se basan en el diferente marcaje fluorescente de dos grupos de ARN mensajeros (uno del tumor y otro del mismo tejido sano) mediante transcripción reversa para generar ADNc marcado. Estas moléculas de ADNc se hibridan a ADNc inmovilizados sobre la superficie del *microarray*, permitiendo el análisis en paralelo de cientos o miles de genes impresos sobre un único *microarray*. Se logra así una herramienta poderosa para observar cambios en la expresión génica a lo largo de genomas completos. Es conocido que distintas plataformas y metodologías de *arrays* pueden proporcionar resultados diferentes, incluso contradictorios. Estos extremos se exacerban por el uso de tamaños muestrales pequeños, consecuencia natural del alto coste de las técnicas. Pese a todo, la evidencia sugiere que el empleo de plataformas de *microarrays* con una metodología similar proporciona datos seguros y reproducibles de la expresión génica diferencial (9). Es por ello que se ha impuesto la necesidad de confirmar los resultados por una metodología más robusta a la hora de medir diferencias de expresión, entre las que destaca la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) (10).

Nosotros realizamos un estudio previo en nuestra unidad acerca del análisis de la expresión génica diferencial del COCE en relación al tejido oral normal mediante *microarrays* de ADN (11). Decidimos centrarnos en los genes que muestran un aumento de actividad o sobreexpresión en el tejido tumoral y dentro de éstos, seleccionamos 6 de ellos que cumplen una serie de parámetros estadísticos y que pueden ser interesantes dada su función biológica. Los genes seleccionados son: *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*, *ATP6V1C1* y *ATP6V0E*.



# **I.- INTRODUCCIÓN**



## **1.- CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

### **1.1. CONCEPTO**

El COCE, tumor maligno de origen epitelial, es la neoplasia más frecuente de la cavidad oral. Representa entre un 90 y un 95% de todas las lesiones malignas de la boca (12), por lo que en el presente trabajo será considerado como sinónimo de cáncer oral.

Al contrario que en otras áreas del cuerpo, los límites de la cavidad oral no siempre son fáciles de definir. Como consecuencia, la definición exacta del cáncer oral respecto a su localización, ha demostrado ser una tarea extremadamente difícil tanto para los clínicos como para los investigadores.

En la mayoría de los trabajos, los tumores de labio y glándulas salivales son excluidos dentro del término cáncer oral, debido a su distinta estructura histológica y a la exposición del labio al sol. En otros trabajos, el cáncer de orofaringe es estudiado conjuntamente con los cánceres de localización intraoral (13).

Aunque clásicamente se consideraba que el cáncer oral comprendía todas las neoplasias malignas que afecten los labios, la lengua y los tejidos intraorales, incluida la orofaringe (13), en la última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Moore y cols. (14) sugieren que las lesiones asentadas en la porción móvil de la lengua, suelo

de boca, mucosa yugal, mucosa del reborde alveolar superior e inferior y paladar, deben ser agrupadas bajo la denominación de cáncer oral, y que el cáncer de labio, orofaringe y de glándulas salivales deben ser analizados por separado. Así lo seguiremos en nuestro trabajo.

## **1.2. EPIDEMIOLOGÍA**

La OMS predice un aumento continuo de esta enfermedad en todo el mundo (15, 16). El cáncer oral es el undécimo cáncer más común, y representa aproximadamente el 4% de todos los cánceres y un 2% de las muertes por cáncer en el mundo (1, 17).

Estudios epidemiológicos han mostrado que la incidencia del cáncer oral varía significativamente entre zonas geográficas distintas, y entre países desarrollados y en vías de desarrollo. Así, en Estados Unidos representa el 2-4% de todos los tumores malignos del organismo, y en la zona del sur y sudeste de Asia, donde existe la costumbre de masticar tabaco (nuez de betel) o dejarla depositada en el suelo de la boca, esta prevalencia aumenta hasta un 30 e incluso un 40% (18).

En España, la incidencia del cáncer oral es de 12 a 15 casos/100.000 habitantes/año en varones y de 2 a 4 casos/100.000 habitantes/año en mujeres, y representa entre el 2 y el 3% de todas las muertes por cáncer en nuestro país (3).

Es más frecuente en varones que en mujeres, siendo la relación varón/mujer variable en las distintas series mundiales entre 1-4:1. Sin embargo, esta proporción está modificándose en los últimos años, existiendo una tendencia hacia el equilibrio intersexual justificado por el mayor consumo de tabaco y alcohol por parte de las mujeres (19). Además, esta relación entre ambos sexos varía según las distintas localizaciones en la cavidad oral. Así, el carcinoma de encía o

reborde alveolar es más frecuente en las mujeres (20).

La edad media de presentación es alrededor de los 60 años (21), siendo más del 90% de los pacientes con cáncer oral mayores de 45 años.

A pesar de los considerables avances en las técnicas quirúrgicas junto con otras modalidades de tratamiento coadyuvante añadidas, el pronóstico global de los pacientes que sufren esta enfermedad no ha mejorado en las últimas dos décadas (22). El tratamiento generalmente da lugar a un deterioro del habla, la masticación y la deglución, así como deformidad estética y trastornos psicológicos.

### **1.3. ETIOPATOGENIA**

Su etiología es multifactorial, siendo los factores de riesgo más prevalentes el consumo de tabaco y alcohol. Ambos factores actúan sinérgicamente, aunque cada uno de ellos posee potenciales carcinogénicos independientes (23). Se ha demostrado que el alcohol es un factor de riesgo que potencia la carcinogénesis relacionada con el consumo de tabaco (24, 25). La asociación de tabaco y alcohol está íntimamente relacionada no sólo con el desarrollo del cáncer oral, sino también con el curso de la enfermedad, estando ligada a un peor pronóstico (26). El hábito de fumar sigue siendo el principal factor de riesgo del cáncer oral, los fumadores presentan un riesgo relativo 7 veces más alto en relación a los no fumadores. Hay evidencias que sugieren que con el cese del hábito tabáquico después de un período de 10 años, este riesgo elevado se reduce a niveles cercanos a los de personas que nunca han fumado (27).

La radiación ultravioleta de la luz solar también constituye un factor etiológico en el desarrollo del carcinoma de células escamosas de labio, fundamentalmente de labio inferior (28). La luz ultravioleta favorece la formación de un enlace covalente entre dos bases de pirimidina en el ADN, formándose

dímeros de pirimidina.

Otros factores ambientales y la exposición a diversos virus como el virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) (29), el papilomavirus humano (PVH) y el virus de Epstein-Barr pueden producir o promover el cáncer de la cavidad oral y de la nasofaringe. El virus de Epstein-Barr está asociado al linfopitelioma de nasofaringe (carcinoma indiferenciado de nasofaringe), encontrándose títulos de IgA elevados frente a dicho virus en pacientes que padecen esta enfermedad. En cuanto al PVH, se ha detectado su ADN en las células del carcinoma oral (13), del de amígdalas y de laringe. Los tipos más frecuentemente relacionados con estos tumores son PVH-16 y PVH-18. Estos virus poseen entre sus genes oncogenes y un gen que codifica una proteína (E6) que bloquea la actividad reguladora del gen *p53* (30, 31, 32, 33, 34, 35).

La aparición de tumores de la cavidad oral en pacientes jóvenes y en pacientes no fumadores sugiere el papel de una predisposición genética. En estos casos se han detectado mutaciones en genes supresores tumorales como *p53*, gen en el que con mayor frecuencia aparecen mutaciones asociadas con el cáncer (34, 35, 36, 37).

A pesar de que conocemos la implicación de todos los factores etiológicos mencionados, el desarrollo del COCE es un proceso multifactorial con gran variabilidad entre unos individuos y otros. Hoy sabemos que el desarrollo del cáncer en el hombre está determinado por una compleja sucesión de eventos que normalmente tienen lugar a lo largo de muchos años. Parece claro que los factores genéticos y moleculares son decisivos en la carcinogénesis; por ello, se espera que un mejor conocimiento de los determinantes moleculares de la carcinogénesis oral mejore el diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad.

El conocimiento de la historia natural del COCE es fundamental para comprender su evolución, diagnóstico, tratamiento y pronóstico. Se trata de una

neoplasia maligna que deriva del epitelio poliestratificado plano que tapiza la cavidad oral. Inicialmente se localiza en el propio epitelio (carcinoma *in situ*). Con el tiempo, sobrepasa la membrana basal invadiendo el tejido conjuntivo y destruyendo estructuras vecinas como músculos, hueso, glándulas salivales, etc. Este proceso de crecimiento y de invasión se desarrolla generalmente durante varios meses desde un tumor localizado de pocos milímetros, hasta una masa de importantes dimensiones que destruye estructuras vecinas (13).

Durante este período de crecimiento localizado, el tumor produce metástasis en los ganglios linfáticos cervicales, generalmente en los más próximos al tumor, extendiéndose progresivamente a otras estructuras cervicales vecinas. Cuanto mayor es el tumor primario y más larga su evolución, mayor es la posibilidad de que presente afectación de los ganglios linfáticos cervicales. Sin embargo, esto no quiere decir que tumores pequeños y de corta evolución no produzcan metástasis ganglionares, ni que tumores de larga evolución se hayan limitado a un crecimiento local sin la producción de este tipo de metástasis. En ocasiones, la presencia de una metástasis en un ganglio cervical puede ser el primer síntoma de un COCE, aunque esto suele ser más frecuente en tumores de hipofaringe o nasofaringe (13).

Pueden producir metástasis a distancia, a cualquier órgano de la economía, pero ésta no es la causa más frecuente del fallecimiento de los pacientes; sino que suele ser la afectación local por el tumor primario y la afectación regional a nivel del cuello (13).

#### **1.4. CLÍNICA**

Clínicamente el COCE se presenta en estadios precoces con un aspecto variado, asemejándose a una leucoplasia, eritroplasia o eritroleucoplasia. Con la

evolución de la lesión, ésta tiende a ulcerarse, presentando un carácter infiltrativo, dando lugar a una lesión mal delimitada, endurecida y de superficie granulosa. En algunas ocasiones la lesión puede presentar un carácter exofítico o mixto (38).

Haya-Fernández y cols. (39) encuentran que el 19,6% de los pacientes con COCE presentan una leucoplasia asociada a la lesión primaria en el momento del diagnóstico. La presencia de leucoplasia asociada al tumor primario se correlaciona con tumores en estadios más tempranos.

Las manifestaciones clínicas del COCE son muy diversas dependiendo del tamaño y de su localización. Entre ellas nos encontramos la presencia de una úlcera (generalmente de mucho tiempo de evolución), dolor, disfagia, hemorragia, disfonía, movilidad y pérdida dentaria, parestesia y trismus, entre otras (13).

## **1.5. DIAGNÓSTICO**

En cuanto al diagnóstico, hay que tener en cuenta dos aspectos: la estirpe tumoral (que sea un COCE), y la extensión del tumor (según la clasificación TNM, que comentaremos más adelante).

### **1.5.1. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURAL**

Para determinar la estirpe tumoral es preciso realizar un estudio histológico del mismo, mediante el estudio de una biopsia representativa del tejido neoplásico. Aunque el COCE es, en la mayoría de los casos, bastante característico desde el punto de vista clínico, la existencia de otros muchos procesos similares clínicamente hace necesario en todos los casos que el diagnóstico se confirme por medio del análisis anatomopatológico. Para ello, se realiza una toma de biopsia de forma convencional siendo necesario incluir tejido tumoral, margen de la lesión y

tejido sano. Habitualmente se emplea una tinción de hematoxilina y eosina. El estudio con microscopía de luz sigue siendo la base fundamental del diagnóstico histopatológico de la mayoría de las lesiones orales, incluido el COCE.

Las atipias celulares, las alteraciones epiteliales en su estructuración de estratos, mitosis anormales en cuanto a número, forma y localización y las modificaciones de la queratinización, son características comunes en el diagnóstico histopatológico del carcinoma. Se determinará también el grado de invasión del tumor según haya atravesado o no la membrana basal (carcinoma *in situ* o carcinoma invasivo), así como la diferenciación tumoral.

Existen diferentes variantes en cuanto al grado de diferenciación, dependiendo del parecido que presente el tumor con la arquitectura normal del epitelio. Los carcinomas que producen cantidades importantes de queratina y muestran algún signo de maduración desde la capa basal a la capa córnea, se denominan bien diferenciados. Los que no producen queratina, pero sí es posible reconocer cierto grado de estratificación, a pesar de su desviación de la estructura normal, se denominan moderadamente diferenciados. Cuando no producen queratina, y su aspecto apenas muestra semejanza con una estructura epitelial normal, además de observarse anomalías celulares frecuentes, se denominan poco diferenciados (13).

Sin embargo, el diagnóstico del tumor no ofrece toda la información necesaria para su seguimiento y tratamiento. Durante muchos años se viene observando que tumores idénticos desde el punto de vista histológico tienen una evolución clínica muy diferente, por ejemplo, en cuanto a su capacidad de producir metástasis. Además, en muchos casos de tumores pobremente diferenciados es imposible por medio de microscopía óptica conseguir un diagnóstico exacto. Por todo ello, es necesario estudiar estos tumores con mayor profundidad, por medio de técnicas más avanzadas que permiten obtener información más detallada de su

comportamiento.

La principal limitación de la microscopía óptica es su escasa capacidad de magnificación. Aunque permite visualizar la morfología de las células y sus estructuras principales (núcleo, nucleolo, citoplasma...), no permite la identificación de estructuras más reducidas (desmosomas, membranas, microvellosidades ...). En estos casos recurriremos a la microscopía electrónica, cuyo poder de magnificación es mucho mayor.

Las muestras para microscopía electrónica se fijan en glutaraldehído y posteriormente se incluyen en resinas sintéticas, para poder realizar cortes ultrafinos (10 veces más delgados que los de microscopía de luz). La tinción se realiza con sales de metales pesados como citrato de plomo, tetróxido de osmio o acetato de uranilo, que permiten un contraste adecuado del tejido bajo el haz de electrones. Los cortes se montan sobre grillas de cobre, se tiñen y se observan al microscopio electrónico. Para documentar los hallazgos es necesario obtener fotografías en blanco y negro de las preparaciones.

En la microscopía electrónica de transmisión, la preparación es atravesada por un haz de electrones, proporcionando la imagen sobre una pantalla. El microscopio electrónico de transmisión es capaz de generar un haz de electrones a alta tensión (80kV) y concentrarlo sobre la preparación mediante un sistema de campos electromagnéticos equivalentes a las lentes en el microscopio de luz. La microscopía electrónica de transmisión es especialmente útil en oncología, desde el punto de vista investigador, fundamentalmente en el diagnóstico de neoplasias malignas, ya que permite identificar la estirpe o diferenciación celular de una neoplasia. Con la microscopía electrónica de transmisión es posible distinguir elementos de diferenciación celular no apreciables con microscopía de luz. Por ejemplo, la observación de desmosomas en un tejido tumoral nos orienta al diagnóstico de carcinoma; las microvellosidades bien desarrolladas sugieren que

podemos estar ante un adenocarcinoma; la aparición de melanosomas indican un posible melanoma; el hallazgo de gránulos densos rodeados por membranas, nos orientan hacia un carcinoma neuroendocrino; etc.

La microscopía electrónica de barrido permite el estudio de superficies celulares. La imagen se obtiene rastreando la superficie de la muestra con un haz electrónico ultrafino. Las señales generadas se recolectan, amplifican y captan en un tubo de rayos catódicos. Se utiliza de forma rutinaria en el estudio de múltiples enfermedades, como por ejemplo en las enfermedades del tallo piloso.

#### 1.5.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

A pesar de la gran utilidad de estas técnicas, el estudio de un tumor no puede centrarse exclusivamente en el análisis morfológico de las células y sus componentes. Existen otros muchos factores importantes para su diagnóstico y tratamiento. Por un lado, es fundamental para el diagnóstico de muchas neoplasias indiferenciadas, conocer su estirpe celular por medio de la identificación de proteínas y antígenos de superficie. Éste es el objetivo primordial de las técnicas inmunohistoquímicas. Por otro lado, el comportamiento clínico del tumor está dictado fundamentalmente por el genotipo de sus células, las alteraciones moleculares existentes en su genoma, la presencia de oncogenes, mutaciones genéticas, alteración de genes supresores tumorales, expresión génica anormal, etc. Todas estas alteraciones están tomando mayor relevancia día a día, como consecuencia de la evolución de las técnicas de biología molecular.

La inmunohistoquímica engloba un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar la presencia de una gran variedad de antígenos en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la

capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción se hace visible mediante el marcado de los anticuerpos con sustancias que absorben o emiten luz.

Se ha visto que la inmunohistoquímica tiene utilidad diagnóstica en la identificación de marcadores pronósticos de diversas neoplasias (marcadores tumorales). Por ejemplo, es posible la identificación de los productos de oncogenes y de genes supresores tumorales con anticuerpos monoclonales, como *c-erbB-2*, *bcl-2*, *p21*, *Rb1* y *p53*. También es posible la identificación de marcadores de diferenciación como *HMB-45* para melanocitos (melanoma), *AE1* para carcinomas, vimentina para sarcomas y *CD45* para leucocitos (linfomas) (40, 41). Aunque el diagnóstico histológico del COCE casi siempre se realiza mediante la microscopía óptica convencional, la aplicación de la inmunohistoquímica mediante marcadores para citoqueratinas puede ser útil en distinguir tumores pobremente diferenciados o indiferenciados de otras lesiones malignas (38). Existen diferentes opiniones en la literatura en relación a la utilización de la inmunohistoquímica para la identificación de marcadores tumorales en el COCE con el objetivo de predecir su comportamiento y evolución clínica, por lo que hay una acuciante necesidad de investigación de nuevos indicadores pronósticos, a fin de valorar la agresividad biológica de las lesiones propias de cada paciente.

### 1.5.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Existen numerosas técnicas para estudiar directamente el ADN tumoral, tanto en el propio tejido, como mediante la manipulación previa del mismo. Entre las más difundidas encontramos la hibridación *in situ*, la técnica *Southern Blot* (que puede ser considerada como una de las precursoras de los *microarrays*), *Northern Blot*, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), y las técnicas de secuenciación automática. Más adelante comentaremos algunas de estas técnicas.

## **1.6. ESTADIAJE**

El estadio del cáncer oral depende del tamaño de la lesión primaria y de la diseminación regional o a distancia de la enfermedad. El estadio es importante, ya que tiene influencia sobre el plan de tratamiento y el pronóstico del cáncer oral. Dentro de las clasificaciones más utilizadas se encuentra la TNM, propuesta por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (42) (Tablas 1 y 2).

**TAMAÑO DEL TUMOR PRIMARIO (T)**

TX	Tumor primario no puede ser valorado
T0	No existe evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Lesión menor de 2 cm en su máximo diámetro
T2	Lesión mayor de 2 cm y menor de 4 cm en su máximo diámetro
T3	Lesión mayor de 4 cm en su máximo diámetro
T4	Lesión mayor de 4 cm que invade estructuras adyacentes (ej. seno maxilar, huesos maxilares, músculos pterigoideos, base de lengua o piel)

**GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)**

NX	Adenopatía cervical no puede ser valorada
N0	No hay adenopatías cervicales clínicamente positivas
N1	Un solo ganglio homolateral clínicamente positivo con 3 cm o menos de diámetro
N2	Un solo ganglio homolateral clínicamente positivo mayor de 3 cm y menor de 6 cm de diámetro; o múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos menores de 6 cm de diámetro; o ganglios bilaterales o contralaterales clínicamente positivos, ninguno mayor de 6 cm de diámetro
N2a	Un solo ganglio homolateral clínicamente positivo mayor de 3 cm y menor de 6 cm de diámetro
N2b	Múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos menores de 6 cm de diámetro
N2c	Ganglios bilaterales o contralaterales clínicamente positivos, ninguno con más de 6 cm de diámetro
N3	Un ganglio clínicamente positivo con más de 6 cm de diámetro

**METÁSTASIS A DISTANCIA (M)**

MX	Metástasis a distancia no puede ser valorada
M0	No existe metástasis a distancia
M1	Existe metástasis a distancia

**Tabla 1.** Clasificación TNM. Extensión del tumor primario (T); Ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N); Ausencia o presencia de metástasis a distancia (M)

ESTADIOS	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
<b>Estadio I</b>	T1	N0	M0
<b>Estadio II</b>	T2	N0	M0
<b>Estadio III</b>	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
<b>Estadio IVA</b>	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	Cualquier T	N2	M0
<b>Estadio IVB</b>	Cualquier T	N3	M0
<b>Estadio IVC</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

**Tabla 2.** Estadaje clínico. Extensión del tumor primario (T); Ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N); Ausencia o presencia de metástasis a distancia (M)

## 1.7. PRONÓSTICO

Pese a los avances significativos en las técnicas quirúrgicas, la radioterapia y la quimioterapia, las tasas de mortalidad no han sufrido mejoras durante estas últimas décadas.

El pronóstico depende de diversos factores como son: la clínica, la localización, el grado histológico, la presencia o no de metástasis y la clasificación TNM.

Aproximadamente 7.800 personas en Estados Unidos (5.100 varones, 2.700 mujeres) y 900 en el Reino Unido mueren por cáncer oral y sus complicaciones cada año (43).

En España, se ha descrito un aumento de la mortalidad del cáncer oral durante el período de 1975 a 1994 (4).

Las tasas de curación del cáncer oral dependen de su estadio. La tasa de supervivencia a los 5 años es del 80% en estadios iniciales, 40% en neoplasias con afectación regional, y menos del 20% para pacientes con metástasis a distancia (44). La detección precoz aumenta significativamente la posibilidad de curación del paciente.

En el momento del diagnóstico del cáncer oral, el 36% de los pacientes presentan enfermedad localizada, un 43% presentan enfermedad con afectación regional, un 9% presentan metástasis a distancia, y para el 12% restante el estadio de la enfermedad no se puede identificar (45). Estos resultados deben considerarse malos si se tiene en cuenta que los carcinomas de células escamosas se forman en el epitelio superficial de la cavidad oral, por lo que producen cambios visibles precoces.

La detección precoz en estadios asintomáticos garantiza no sólo un aumento en las tasas de supervivencia, sino también una mejor calidad de vida, como consecuencia de tratamientos menos agresivos y mutilantes (23, 46).

## 1.8. TRATAMIENTO

Actualmente, la cirugía y la radioterapia son las dos modalidades de tratamiento con potencial curativo, y suelen ser empleadas individualmente o en combinación (47). El tratamiento del cáncer oral depende principalmente de la localización y del estadio de la lesión y del estado de salud general del paciente (48).

Las lesiones en estadios precoces (I y II) son potencialmente curables con cirugía o radioterapia, consiguiéndose una supervivencia del 80-90% a los 5 años (13). Si las lesiones están en estadios avanzados (III y IV) son generalmente tratadas con cirugía seguida de radioterapia y quimioterapia (aunque el papel de la quimioterapia en el cáncer oral todavía no está claramente definido), alcanzando una supervivencia a los 5 años del 34-54% (13).

Los resultados de la terapia estándar, incluso cuando se emplean la cirugía radical y varias formas de radio y quimioterapia, han permanecido en niveles decepcionantes pese al avance de los tratamientos multidisciplinarios. Una de las razones es que la piedra angular de las decisiones terapéuticas, el sistema de clasificación TNM, complementada con el estadio del grado de diferenciación histológica, ha demostrado que no siempre es un indicador pronóstico satisfactorio (49, 50). Por lo tanto, hay una gran necesidad de investigar nuevos indicadores pronósticos, volcados principalmente en la valoración de la agresividad biológica de las lesiones propias de cada paciente.

La cirugía implica la resección completa de la lesión con un margen de tejido normal adyacente y, cuando está indicado, algunos o todos los ganglios linfáticos cervicales homolaterales y en algunas ocasiones, los contralaterales (51).

La radioterapia posee la ventaja de preservación de los órganos, y

actualmente es la modalidad de tratamiento primaria de algunos casos de carcinomas de lengua, amígdala palatina, paladar blando y faringe. Sin embargo, el tratamiento no está libre de reacciones adversas y es frecuente la aparición de mucositis, xerostomía, candidiasis y, en algunos casos, osteorradionecrosis (52).

La decisión de emplear o no la radioterapia postoperatoria debe considerar tanto la lesión primaria como la extensión regional de la enfermedad. Cuando los factores relacionados con el tumor primario (lesiones primarias extensas, márgenes quirúrgicos positivos, invasión de los espacios perineural, linfático y vascular) indican el uso de la radioterapia, el cuello debe ser incluido en el campo de tratamiento (47).

Cuando la radioterapia se combina con la cirugía parece haber una preferencia por la radioterapia postoperatoria, puesto que ésta induce una fibrosis tisular (lo que haría la cirugía más difícil). Además, los tejidos irradiados poseen una capacidad de cicatrización más lenta (53).

El uso de la quimioterapia, en general a través de la combinación de diversas drogas citotóxicas, no ha tenido particular éxito en el tratamiento del COCE y se considera más una modalidad de tratamiento paliativo que un tratamiento curativo primario. Los principales agentes utilizados han sido el metrotexato, la bleomicina, el cisplatino y el 5-fluoracilo. La quimioterapia puede dar como resultado una disminución temporal del tamaño de la masa tumoral, pero no ha demostrado un aumento significativo en las tasas de supervivencia a los 5 años, control del tumor primario y reducción del potencial metastático (54). Sin embargo, ensayos clínicos más recientes utilizando la combinación de la quimio y radioterapia en el tratamiento de pacientes con lesiones en estadios avanzados han demostrado resultados preliminares alentadores (55), y deben tener su papel en el futuro. Por ahora, su indicación en el tratamiento del COCE se limita a tumores en estadios avanzados, que debido a su extensión sean considerados

como inoperables, o a las recidivas y metástasis tumorales (56).

Los buenos resultados alcanzados por la cirugía combinada con la radio y quimioterapia en los tumores en estadios precoces no pueden ser siempre alcanzados cuando son aplicados a la enfermedad en estadios avanzados. Es por este motivo por el que surge la necesidad de investigar nuevas modalidades de tratamiento en base a las características particulares de cada paciente.



## **2.- BASES MOLECULARES DEL CÁNCER**

Actualmente no cabe duda de que el cáncer es una enfermedad genética de las células somáticas (57). En las células tumorales se produce una alteración de los mecanismos de salvaguardia encargados de que el número celular se ajuste a las necesidades del organismo completo, y las células proliferan sin control. Para comprender cómo una célula normal se transforma en cancerosa, debemos comprender primero los mecanismos básicos que gobiernan el control del número celular en las células normales.

### **2.1.- LA MAQUINARIA DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

Existen determinados aspectos del control de la proliferación celular que son comunes a todos los organismos. Universalmente, el proceso de división celular consta de numerosos pasos que deben ocurrir de forma secuencial para que se produzcan células descendientes viables. Además, el ciclo de división celular ha evolucionado de tal manera que existen varios puntos de control para evitar que el ciclo avance, a menos que hayan ocurrido con éxito los pasos precedentes. Por ejemplo, sería letal que la mitosis ocurriera antes de que la replicación se haya completado, por ello, se han desarrollado mecanismos que impiden esos “desastres celulares”.

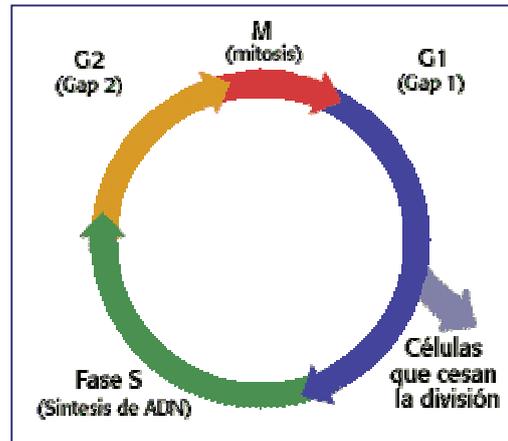
El conocimiento del ciclo de división celular en condiciones normales es esencial para comprender las alteraciones que ocurren durante el proceso de la

carcinogénesis oral. El descontrol del ciclo celular es una marca fundamental de la progresión del cáncer (58). Muchas de las alteraciones moleculares que causan el comportamiento anormal de las células neoplásicas se basan en alteraciones del ciclo celular (59).

### 2.1.1. CICLO CELULAR

El ciclo celular es el período de tiempo y el conjunto de modificaciones que sufre una célula desde su formación, por división de otra preexistente, hasta que se divide originando dos células hijas, idénticas entre sí y a ella misma (60). Así, el período entre dos divisiones mitóticas define el ciclo de la célula somática. El tiempo que transcurre desde el final de una mitosis hasta el comienzo de la siguiente se llama interfase. El período de la división real, correspondiente a la mitosis visible, se denomina fase M (61). Por tanto, el ciclo celular comprende interfase y mitosis.

Para dividirse, una célula somática debe doblar su masa y repartir sus componentes de forma igualitaria entre las dos células hijas. Doblar el tamaño es un proceso continuo a lo largo de un ciclo celular que resulta de la transcripción y traducción de los genes que codifican las proteínas que constituyen el fenotipo particular de la célula. Por el contrario, la reproducción del genoma se lleva a cabo exclusivamente en el período específico de la síntesis de ADN que recibe el nombre de fase de síntesis o fase S (61). Este período S va precedido y seguido por dos fases que reciben respectivamente los nombres de fase  $G_1$  y  $G_2$  (se refieren a los dos “gaps” o espacios del ciclo celular en los que no existe síntesis de ADN). Por consiguiente, la interfase comprende los períodos  $G_1$ , S y  $G_2$ . La mitosis, en conjunto, recibe el nombre de fase M. Así, un ciclo celular típico posee cuatro fases sucesivas:  $G_1$ , S,  $G_2$ , M (60) (Figura 1).



**Figura 1.** Fases del ciclo celular

La cantidad de ADN no es igual durante todo el ciclo: después de la fase M las células recién formadas comienzan la interfase (ingresan en el período  $G_1$ ) y la actividad biosintética, que se reduce durante la mitosis, aumenta notablemente. Durante este período la célula posee el ADN recibido de su progenitora. La fase S comienza cuando se inicia la síntesis del ADN nuclear y termina cuando éste se ha duplicado. Por tanto, después de la fase S, los cromosomas tendrán una doble constitución, estando formados por dos cromátidas hermanas. Esta situación se mantendrá durante toda la fase  $G_2$  y hasta que la célula dé origen a otras dos por división (60).

Las diferentes células de un organismo pluricelular tienen ciclos de distinta duración. En los organismos unicelulares la duración de los ciclos se ve limitada principalmente por la disponibilidad de nutrientes. En los seres pluricelulares cada tipo celular debe existir sólo en determinado número, por lo que las distintas células poseen ciclos de diferente duración, incluso en células del mismo tejido.

La fase de duración más variable es la  $G_1$ : en un organismo hay células que están en fase  $G_1$  unos días, otras años, e incluso las hay que no se dividen.

Además, cuando una célula se detiene dentro de su ciclo celular lo hace siempre en  $G_1$ . Según se ha podido demostrar, esta situación se debe a la existencia, dentro de la fase  $G_1$ , del denominado punto de restricción o punto R, una vez superado el cual, las células se ven obligadas a realizar las fases S,  $G_2$  y M (60).

La progresión del ciclo celular requiere la actuación coordinada de una compleja red de proteínas reguladoras que funcionan como interruptores bioquímicos que controlan sus principales fases e integran señales intracelulares y del medio extracelular, mitogénicas o antiproliferativas, para adecuar la división celular a las necesidades celulares o tisulares (60).

La transición de una fase del ciclo celular a la siguiente es controlada en “puntos de control o restricción” antes de que el ciclo pueda progresar. Cuando existe un daño del ADN, los genes que controlan estos puntos de control detienen el ciclo celular para facilitar la reparación del ADN. La detención en la fase  $G_1$  previene la replicación del ADN dañado y la detención en la fase  $G_2$  permite la segmentación de los cromosomas dañados (60).

### 2.1.2. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

Los principales reguladores del ciclo son heterodímeros constituidos por una proteína, denominada genéricamente ciclina y una proteína-kinasa perteneciente a las llamadas kinasas dependientes de ciclinas o CDKs (kinasas ciclina-dependientes). Estos complejos, a su vez, se hayan regulados por otras kinasas y fosfatasas. La kinasa se compone de una subunidad catalítica y de una pareja reguladora que es la ciclina. Actualmente se conocen dos grandes grupos de ciclinas: las ciclinas mitóticas, que regulan el tránsito de  $G_2$  a M, y las ciclinas de  $G_1$ , que son requeridas para superar el punto de restricción y pasar de  $G_1$  a S (60).

El que una célula sobrepase o no el punto R determinará el que la misma

entre en división o no. Por ello, las células pueden detenerse en su ciclo celular y quedar en un estado de "reposo" sin superar el punto R y, por tanto, sin dividirse. Entonces se considera que la célula se encuentra en la llamada fase  $G_0$  del ciclo celular (60). Cierta tipo de células se pueden estimular para que abandonen  $G_0$  y entren de nuevo en un ciclo celular. Abandonar o reentrar en el ciclo celular puede ocurrir antes del punto de restricción o punto R.

Diversos parámetros influyen la habilidad de una célula para tomar la decisión básica de dividirse, incluyendo la respuesta a los estímulos externos (como el aporte de nutrientes) y un estudio de si la masa celular es suficiente para soportar un ciclo de división. Por regla general, una célula se divide con una masa que no es absoluta pero está determinada por un control que en sí mismo responde a una tasa de crecimiento (61).

El principio y el final de la fase S son puntos importantes en el ciclo celular. Una célula debe saber cuándo está lista para iniciar la replicación y, por tanto, debe contar con algún método de reconocimiento de una replicación completa satisfactoria. Esto podría determinarse mediante un examen del estado del ADN. Los inhibidores de la replicación del ADN pueden bloquear el ciclo celular. No se conoce cómo bloquean la activación de la kinasa de la fase M. En general, se acepta que el ciclo celular queda regulado en función de los distintos momentos en que se activan los complejos ciclina-CDK y por la localización de cada uno de estos complejos dentro de la célula (60).

El control de la división celular es esencial en los seres pluricelulares para mantener la forma y la función del organismo.

Existen mecanismos para regular las divisiones celulares que funcionan como un sistema de retroalimentación. Un ejemplo típico son los hepatocitos: estas células comienzan a dividirse sólo si es necesario un incremento en el número de células, como ocurre cuando se extirpa una parte del hígado. Existe

una sustancia elaborada por las propias células que, a altas concentraciones, mantiene inhibidas las divisiones celulares y sólo si su concentración desciende los hepatocitos comienzan a dividirse (60).

Son conocidos otros sistemas de control mitótico que parecen estar directamente relacionados con la posición ocupada por las células en el tejido. Así, en el epitelio estratificado de la epidermis las células de la capa basal se dividen para ir renovando dicho epitelio, mientras que en los estratos superiores no existen divisiones. Cuando una célula del estrato basal se desplaza a los estratos superiores deja de dividirse. Esto parece indicar que la existencia o no de divisiones depende de la situación ocupada por la célula (60).

Todos estos controles están mediados por hormonas y factores de crecimiento que pueden ser proteínas o moléculas de menor tamaño que actúan por vía sanguínea como mediadores químicos locales.

En las células cancerosas el control normal de la división está alterado; así, las células cancerosas no presentan el fenómeno de la inhibición por contacto, requieren para sobrevivir y dividirse en un cultivo menos factores de crecimiento que las normales y, una vez iniciado dicho cultivo, poseen un crecimiento indefinido, al contrario de lo que ocurre con los cultivos de células normales que, pasado un número determinado de divisiones, toda la población celular deja de dividirse y el cultivo envejece y muere (60).

## **2.2. ONCOGENES, GENES SUPRESORES TUMORALES**

### **- ONCOGENES**

Se ha descrito la existencia de genes relacionados con la aparición de tumores cancerígenos a los que se ha llamado oncogenes. Éstos son genes cuyos

productos se asocian con la transformación neoplásica, puesto que producen proteínas que promueven el crecimiento celular y tumoral. La mutación de los genes normales a partir de los cuales se originan (proto-oncogenes) produce cambios en la función y expresión de los mismos, que conlleva la aparición de células cancerígenas. Todos los proto-oncogenes localizados hasta el momento pertenecen a uno de los siguientes grupos: factores de crecimiento, receptores para factores de crecimiento, transductores de señales o proteínas ligadoras de ADN, habiéndose relacionado todos ellos con el control del ciclo celular (60). Muchos trabajos apuntan a que el oncogén sería el responsable no sólo del fenotipo del tumor, sino también de la capacidad invasiva y grado de malignidad del mismo (62).

Diversos oncogenes han sido asociados con la carcinogénesis oral. Se cree que la expresión aberrante de los oncogenes receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR/c-erb 1*) y *CCND1*/ciclina D1 contribuyen al desarrollo del cáncer oral (63).

Las funciones de los proto-oncogenes están estrechamente ligadas a fenómenos esenciales del correcto comportamiento celular (64). En algunas circunstancias los proto-oncogenes sufren alteraciones que modifican su función normal y les dotan de capacidad transformante. Estos genes transformantes son genéricamente denominados oncogenes y pueden residir desde el inicio en el cromosoma celular (c-onc) o integrarse en el genoma de la célula procedentes del exterior, vehiculizados por un virus (v-onc) (18).

Los proto-oncogenes se descubrieron inicialmente como “pasajeros” en el interior del genoma de retrovirus transformantes agudos, que causan la inducción rápida de tumores en animales y que también pueden transformar *in vitro* células animales (65).

Hoy día se conoce la secuencia de bases que confecciona un gen

responsable de la producción de proteínas de crecimiento celular, el cual puede alterarse en cualquier momento provocando su activación en la edad adulta. Este hecho daría lugar a la síntesis de una proteína que actuaría no ya favoreciendo el crecimiento embriogénico y la maduración celular, sino la multiplicación del clon celular fuera de control. A los oncogenes se les denomina con tres letras: *ras*, *SRC*, *rel*, *myb*, *myc*, *erb*, *mos*, *fms*, *fps*, *yes*, *ros*, *abl*, *fes*... (62). Se conocen al menos 40 oncogenes diferentes integrados en el cromosoma humano que, tras su activación, dan lugar al inicio y/o progresión del tumor, aunque sin duda deben existir numerosos mecanismos de seguridad que prevengan la fácil activación de un oncogén (18).

Los oncogenes codifican muchas de las proteínas transmisoras de señales por las cuales las células responden a señales de crecimiento externas. Las células normales, con oncogenes normales, no dan inicio al proceso de replicación del ADN y división celular sin el estímulo de señales externas. Sin embargo, cuando existen mutaciones en los oncogenes, las oncoproteínas mutadas pueden enviar un estímulo de crecimiento desde el citoplasma hacia el núcleo mismo en ausencia de señalización externa. De esta manera, la proliferación autógena de las células que poseen oncogenes mutados da como resultado la aparición de tumores.

#### - GENES SUPRESORES TUMORALES

Son múltiples los mecanismos por los que un gen activado de forma anormal puede contribuir al desarrollo de un tumor. Sin embargo, en el genoma humano existen genes que se comportan como transformantes exclusivamente cuando no son activos. Estos genes reciben el nombre de antioncogenes o genes de supresión tumoral y sólo ejercen un efecto oncogénico cuando los dos alelos cromosómicos (uno en cada cromosoma de la misma pareja) se alteran o delecionan; es decir, se comportan como genes recesivos desde el punto de vista

de su expresión, así, la alteración exclusiva de un solo alelo no tiene consecuencia alguna (18).

Los productos de los genes supresores del cáncer actúan frenando la proliferación celular. La función fisiológica del gen consiste en regular el crecimiento celular y no en evitar la formación de tumores (65).

El gen del retinoblastoma (**Rb**) constituye uno de los ejemplos mejor conocidos de oncogenes recesivos (18). Actúa como un freno al progreso de la célula desde la fase G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular. Cuando la célula recibe el estímulo de los factores de crecimiento, la proteína Rb se inactiva, por lo que el freno desaparece y la célula atraviesa el punto de control G<sub>1</sub>-S (65). Si falta la proteína Rb o si una mutación altera su capacidad, el freno molecular del ciclo celular desaparecerá y la célula avanzará hacia la fase S. La pérdida del control normal del ciclo celular es esencial para la transformación maligna (65).

Aunque no hay una relación clara entre la mutación de *Rb* y un peor pronóstico, Pavelic y cols. (66) han sugerido que su subexpresión se correlaciona con una peor supervivencia.

En la inmensa mayoría de los cánceres humanos existe una mutación de al menos uno de los cuatro reguladores clave del ciclo celular (*p16*, *ciclina D*, *CDK4*, *Rb*) (65).

El gen **p53**, el otro gen supresor del cáncer, actúa impidiendo la propagación de células genéticamente dañadas. El *p53* es imprescindible cuando se requiere la aplicación de “frenos de emergencia”, como cuando la radiación, la luz ultravioleta o las sustancias químicas mutágenas dañan el ADN (67).

Las mutaciones en *p53* aparecen asociadas a muchos tipos de tumores; se estima que un 50% de los tumores humanos carecen de un gen *p53* funcional. La proteína *p53* es un regulador transcripcional que se activa en respuesta a la

presencia de daños en el ADN y que desempeña un papel doble. Por un lado, impide la progresión del ciclo celular hasta que hayan sido reparados los daños en el ADN. Por otro lado, en determinadas circunstancias induce la muerte celular por apoptosis (muerte celular programada) (68). En ausencia de un gen *p53* funcional, la ruta apoptótica en la que participa *p53* no se activa, y el ciclo celular progresa aunque no hayan sido reparados los daños. La falta de este punto de control provoca un aumento generalizado en la frecuencia de mutaciones, reorganizaciones cromosómicas y aneuploidías; de este modo, se incrementa la probabilidad de que ocurran otras mutaciones activadoras de la proliferación celular o inhibidoras de la apoptosis (57).

El gen *p53* bloquea también la angiogénesis (69). Ésta se relaciona con el grado y estado del tumor y con el pronóstico del cáncer. Se demostró que tejidos normales y adenomas poseen una angiogénesis baja, mientras que en el cáncer la angiogénesis aumenta en relación al estado y grado del tumor (70).

Esta pausa permite que la célula tenga tiempo para reparar la lesión del ADN. Además, *p53* ayuda a este proceso de manera directa, induciendo la transcripción de una proteína (GADD45) que interviene en la reparación del ADN. Si la reparación del ADN es satisfactoria, *p53* activará un gen (*mdm2*) cuyo producto se une e inhibe a la propia *p53*, levantando así el bloqueo del ciclo celular. Si no se logra reparar la lesión del ADN, la proteína *p53* normal activará los genes promotores de la apoptosis (71).

Existen mecanismos que pueden inactivar las funciones del gen *p53*, lo que conduce a la proliferación celular incontrolada (72). Las proteínas transformadoras de virus de ADN, como la proteína E6 de los virus del papilomavirus humano (73), el virus de Epstein-Barr y el virus del Herpes simple tipo 6 y 8, pueden unirse y degradar a *p53* (67).

Las mutaciones de *p53* causantes de tumores se han observado

principalmente en células somáticas. Las mutaciones de la línea germinal de *p53* son responsables de un trastorno canceroso hereditario conocido como síndrome de Li-Fraumeni (LFS: *Li-Fraumeni syndrome*) (74). Este raro síndrome se transmite de forma autosómica dominante e implica carcinomas de mama y colon, sarcomas de tejidos blandos, osteosarcomas, tumores cerebrales, leucemias y carcinomas adrenocorticales (75). Estos tumores suelen manifestarse a edad precoz en los miembros de familias con LFS y en los individuos afectados se observan, por lo general, múltiples tumores primarios. La demostración de constantes mutaciones de *p53* en el ADN constitucional de los pacientes con LFS confirmó el papel etiológico de este gen.

Como en el gen del retinoblastoma, la herencia de un gen *p53* mutado aumenta en gran medida la susceptibilidad del individuo a una posterior transformación celular y desarrollo tumoral.

El gen *p73* en condiciones adecuadas, de igual manera que el gen *p53*, puede detener el ciclo celular y provocar la apoptosis (65).

### **2.3. ADAPTACIONES CELULARES, LESIÓN Y MUERTE CELULAR**

Diversas adaptaciones celulares están inducidas por el estímulo directo de las células por factores producidos por las mismas células respondedoras o por otras circundantes. Otras se deben a la activación de diversos receptores celulares de superficie y de las vías de señalización subsiguientes. Las adaptaciones pueden asociarse con la inducción de una nueva síntesis proteica por las células diana y la inducción de proliferación celular. Éstas pueden implicar también un cambio celular desde la producción de un tipo de proteínas a otro o la hiperproducción marcada de una proteína (76).

La lesión celular es el resultado de un estrés celular tan intenso que las

células ya no son capaces de adaptarse o de una exposición celular a agentes inherentemente lesivos. La lesión puede progresar a través de un estadio progresivo y culminar con la muerte celular. Estas alteraciones pueden dividirse en los siguientes estadios (76):

-Lesión celular reversible: inicialmente la lesión se manifiesta como cambios funcionales y morfológicos reversibles si se elimina el estímulo dañino. La lesión reversible se caracteriza por la reducción de la fosforilación oxidativa, la deplección del trifosfato de adenosina (ATP), y la hinchazón celular producida por cambios en las concentraciones iónicas y el aflujo de agua.

-Lesión irreversible y muerte celular: con el daño continuado, la lesión se hace irreversible, en cuyo momento la célula no puede recuperarse. En los tejidos isquémicos como el miocardio ciertos cambios estructurales (ej. densidades amorfas mitocondriales indicativas de daño mitocondrial grave) y los cambios funcionales (ej. pérdida de permeabilidad de membrana) son indicativos de células que han sufrido una lesión irreversible.

Las células irreversiblemente lesionadas sufren cambios morfológicos que se reconocen como muerte celular. Existen dos tipos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis, que difieren en su morfología, mecanismos y papeles en la enfermedad y la fisiología. Cuando el daño a las membranas es intenso, las enzimas lisosomales penetran en el citoplasma y digieren la célula, y los contenidos celulares se derraman, dando lugar a necrosis. Algunos estímulos nocivos, especialmente los que dañan al ADN, inducen otro tipo de muerte, la apoptosis, que se caracteriza por disolución nuclear sin pérdida completa de la integridad de membrana. Mientras que la necrosis siempre es un proceso patológico, la apoptosis sirve a muchas funciones normales y no se asocia necesariamente a lesión celular (76).

Hay una serie de principios que tienen que ver con la mayoría de las formas

de lesión celular (76):

A.-La respuesta celular a los estímulos lesivos depende del tipo de lesión, su duración e intensidad. Así, las dosis pequeñas de una toxina química o breves períodos de isquemia pueden inducir una lesión reversible, mientras que las dosis grandes de la misma toxina o una isquemia más prolongada podrían dar lugar a la muerte celular instantánea o una lesión lenta irreversible dando lugar, con el tiempo, a la muerte celular.

B.-Las consecuencias de la lesión celular dependen del tipo, estado y adaptabilidad de la célula lesionada. El estado nutricional y hormonal de la célula y sus necesidades metabólicas son importantes en la respuesta a la lesión. La exposición de dos individuos a concentraciones idénticas de una toxina puede no producir efecto en uno y muerte celular en el otro. Esto puede deberse a variaciones genéticas. Con el mapa del genoma humano completo, existe un gran interés en la identificación de polimorfismos genéticos que afecten a la respuesta celular ante agentes lesivos.

C.-La lesión celular es el resultado de anomalías funcionales y bioquímicas en uno o más de los varios componentes celulares esenciales. Las dianas más importantes de los estímulos lesivos son la respiración aeróbica que implica la fosforilación oxidativa mitocondrial y la producción de ATP, la integridad de las membranas celulares (de la cual dependen la homeostasis iónica y osmótica de la célula y sus organelas), la síntesis proteica, el citoesqueleto y la integridad del aparato genético de la célula.

Existen diversos mecanismos de lesión celular, algunos de los cuales describimos a continuación:

#### 1.-Deplección de ATP

La deplección de ATP y la síntesis disminuida de ATP se asocian

frecuentemente con lesión hipóxica y química (tóxica). Se requiere fosfato de alta energía en forma de ATP para muchos procesos sintéticos y degradativos en la célula. Éstos incluyen el transporte de membrana, la síntesis de proteínas, la lipogénesis y las reacciones de desacetilación-reacetilación necesarias para el ciclo fosfolipídico. El ATP se produce de dos maneras, la vía más importante en las células del mamífero es la fosforilación oxidativa del difosfato de adenosina (ADP), en una reacción que da lugar a la reducción del oxígeno mediante el sistema de transferencia de electrones en las mitocondrias. La segunda es la vía glucolítica, que puede producir ATP en ausencia de oxígeno utilizando glucosa derivada de los líquidos corporales o de la hidrólisis de glucógeno. Así, los tejidos con mayor capacidad glucolítica están en ventaja cuando disminuyan los niveles de ATP por la inhibición del metabolismo oxidativo por la lesión (76).

La deplección del ATP a menos del 5 al 10% de los niveles normales tiene efectos amplios sobre muchos sistemas celulares críticos (76):

\* La actividad de la bomba de sodio de la membrana plasmática dependiente de energía (ATPasa- $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$  sensible a ouabaína) está reducida. La insuficiencia de este sistema de transporte activo, debido a la concentración disminuida de ATP y aumento de la actividad ATPasa, da lugar a la acumulación intracelular de sodio y a que el potasio salga de la célula. La ganancia neta de solutos se acompaña por ganancia isosmótica de agua, produciendo tumefacción celular y dilatación del retículo endoplasmático.

\* El metabolismo energético celular está alterado. Si el suministro de oxígeno a las células se reduce, como ocurre en la isquemia, la fosforilación oxidativa cesa y las células dependen de la glucólisis para la producción de energía. Este cambio al metabolismo anaeróbico está controlado por metabolitos de la vía de energía que actúan sobre enzimas glucolíticas. La disminución en ATP celular y el aumento asociado en monofostato de adenosina estimulan las

actividades de fosfofructocinasa y fosforilasa. Esto da lugar a una tasa aumentada de glucólisis anaeróbica diseñada para mantener la fuente de energía celular mediante la generación de ATP por el metabolismo de la glucosa derivada del glucógeno. Como consecuencia, los almacenes de glucógeno se agotan rápidamente. La glucólisis tiene como resultado el acúmulo de ácido láctico y fosfatos inorgánicos de la hidrólisis de los ésteres de fosfato. Esto reduce el pH intracelular dando lugar a la disminución de la actividad de muchas enzimas celulares.

\* El fallo de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da lugar a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , con efectos lesivos sobre numerosos componentes celulares, que describiremos más adelante.

\* Con la deplección prolongada o empeorada de ATP ocurre una alteración estructural del aparato sintético de proteínas, manifestada como un desprendimiento de ribosomas del retículo endoplasmático rugoso y una disociación de polisomas a monosomas, con una reducción consecuente en la síntesis proteica. Al final, hay un daño irreversible en las mitocondrias y las membranas lisosomales, y la célula sufre necrosis.

\* En las células privadas de oxígeno o glucosa, las proteínas pueden plegarse erróneamente, y estas proteínas mal plegadas desencadenan una reacción celular denominada respuesta de la proteína desplegada que puede dar lugar a lesión celular e incluso muerte.

## 2.-Daño Mitocondrial

Las mitocondrias son dianas virtualmente importantes de todos los tipos de estímulos lesivos, incluyendo hipoxia y toxinas. Frecuentemente, el daño celular se acompaña de cambios morfológicos en las mitocondrias. Las mitocondrias pueden lesionarse por aumentos del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, por estrés oxidativo, por

degradación de fosfolípidos a través de las vías de fosfolipasa A<sub>2</sub> y esfingomielinina, y por productos de la degradación de los lípidos derivados de aquí, tales como ácidos grasos libres y ceramida. A menudo, el daño mitocondrial da lugar a la formación de un canal de alta conductibilidad, lo que se ha llamado transición a la permeabilidad mitocondrial, en la membrana interna de la mitocondria. Aunque es reversible en los primeros estadios, este poro no selectivo se hace permanente si persiste el estímulo desencadenante, impidiendo el mantenimiento de la fuerza protónica mitocondrial, o potencial. Dado que el mantenimiento del potencial de membrana es crítico para la fosforilación oxidativa mitocondrial, se desprende que la transición a la permeabilidad mitocondrial irreversible es un golpe mortal para la célula. El daño mitocondrial también puede asociarse con salida del citocromo c al citosol. Dado que el citocromo c es un componente integral de la cadena de transporte de electrones y puede desencadenar las vías de la muerte apoptótica en el citosol, este acontecimiento patológico es probablemente un determinante clave de la muerte celular (76).

### 3.-Aflujo de calcio intracelular y pérdida de la homeostasis del calcio

Los iones de calcio son mediadores importantes de la lesión celular. El calcio citosólico libre se mantiene a concentraciones extremadamente bajas (menor de 0,1  $\mu\text{mol}$ ) en comparación con los niveles extracelulares de 1,3  $\text{mmol}$ , y la mayoría del calcio intracelular está secuestrado en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático. Tales gradientes están modulados por ATPasas-Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, dependientes de energía, asociadas a la membrana. La isquemia y ciertas toxinas producen un aumento precoz en la concentración citosólica de calcio, debido al flujo neto de Ca<sup>2+</sup> a través de la membrana plasmática y la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular derivan de aumentos inespecíficos en la permeabilidad de membrana. A su vez, el aumento de Ca<sup>2+</sup> activa varias enzimas, con efectos celulares potencialmente deletéreos. Las enzimas que se sabe se activan por el calcio incluyen ATPasas (que por lo tanto aceleran la deplección del ATP),

fosfolipasas (que producen lesión en la membrana), proteasas (que rompen las proteínas de membrana y citoesqueléticas), y endonucleasas (que son responsables de la fragmentación del ADN y la cromatina). Los niveles aumentados de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular también dan lugar a un aumento de la permeabilidad mitocondrial e inducción de apoptosis. Aunque la lesión celular a menudo origina un aumento de calcio intracelular y, a su vez, esto media varios efectos como la muerte celular, la pérdida de la homeostasia de calcio no siempre es un episodio proximal en la lesión celular irreversible (76).

#### 4.-Defectos en la permeabilidad de membrana

La pérdida precoz de la permeabilidad selectiva de membrana, que conduce finalmente a un daño manifiesto de la misma, es una característica constante en la mayoría de las formas de lesión celular. El daño de la membrana puede afectar a las mitocondrias, la membrana plasmática y otras membranas celulares. En las células isquémicas, los defectos de membrana pueden ser el resultado de una serie de acontecimientos que implican la deplección del ATP y la activación de las fosfolipasas moduladas por calcio. Sin embargo, la membrana plasmática puede dañarse también directamente por ciertas toxinas bacterianas, proteínas víricas, componentes líticos del complemento, y una variedad de agentes físicos y químicos. Varios mecanismos bioquímicos pueden contribuir al daño de la membrana (76):

\* Disfunción mitocondrial. La función mitocondrial defectuosa da lugar a una síntesis disminuida de fosfolípidos, que afecta a todas las membranas celulares incluyendo las mismas mitocondrias. A la vez, el aumento en el calcio citosólico, asociado con deplección del ATP, da lugar a una captación aumentada de  $\text{Ca}^{2+}$  por las mitocondrias, avivando las fosfolipasas y dando lugar a una descomposición de los fosfolípidos. El resultado neto es la deplección de fosfolípidos de las mitocondrias y otras membranas celulares, y la acumulación de

ácidos grasos libres. En la mitocondria, estos cambios producen defectos de permeabilidad, tales como los de transición de la permeabilidad de la mitocondria dando lugar a una lesión celular progresiva.

\* Pérdida de fosfolípidos de membrana. La lesión celular grave se asocia con una disminución en el contenido de fosfolípidos de membrana mediante un mecanismo de degradación debido, probablemente, a la activación de fosfolipasas endógenas por los niveles aumentados de calcio citosólico. La pérdida fosfolipídica también puede ocurrir secundariamente a una disminución de la reacetilación dependiente de ATP o a una disminución de la síntesis *de novo* de fosfolípidos.

\* Anormalidades citoesqueléticas. Los filamentos citoesqueléticos sirven como anclajes que conectan la membrana plasmática con el interior de la célula. La activación de proteasas por el aumento del calcio citosólico puede producir daño en los elementos del citoesqueleto. En presencia de tumefacción celular, este cambio da lugar al despegamiento de la membrana celular del citoesqueleto haciendo que ésta sea susceptible a la distensión y ruptura.

\* Especies de oxígeno reactivo. Los radicales libres de oxígeno parcialmente reducido causan lesión en las membranas celulares y en otros constituyentes celulares.

\* Productos de descomposición de los lípidos. Incluyen los ácidos grasos libres no esterificados, la acilcarnitina y los lisofosfolípidos, productos catabólicos que se sabe se acumulan en las células lesionadas como resultado de la degradación fosfolipídica. Tienen un efecto detergente sobre las membranas. Asimismo, pueden bien insertarse en la bicapa lipídica de la membrana o bien intercambiarse con los fosfolípidos de membrana, causando potencialmente cambios en la permeabilidad y alteraciones electrofisiológicas.

El daño en la membrana plasmática da lugar a pérdida del equilibrio osmótico y aflujo de líquidos e iones, así como a una pérdida de proteínas, enzimas, coenzimas y ácidos ribonucleicos. Las células también pueden perder metabolitos, que son vitales en la reconstitución del ATP, vaciando así aún más la carga neta de fosfatos intracelulares de alta energía. La lesión de las membranas lisosomales da lugar a la liberación de sus enzimas en el citoplasma y activación de las mismas. Los lisosomas contienen RNasas, DNasas, proteasas, fosfatasas, flucosidasas y catepsinas. La activación de esas enzimas da lugar a digestión enzimática de los componentes celulares, provocando la pérdida de la ribonucleoproteína, desoxirribonucleoproteína y glucógeno, y las células mueren por necrosis (76).

#### **2.4. LA MAQUINARIA DE MUERTE CELULAR**

Algunos aspectos del control celular aparecen sólo en los organismos multicelulares. Para desarrollarse y mantenerse normalmente, los organismos multicelulares deben mantener un equilibrio adecuado del número de cada tipo celular en cada uno de sus diversos tejidos. Casi todos estos tipos celulares son somáticos, es decir, no contribuyen a la línea germinal. Desde un punto de vista de la propagación de las especies, la pérdida de células somáticas no supone ningún problema para el organismo, siempre que las células restantes de ese tipo proliferen para compensar la pérdida. Por otro lado, dado que las células defectuosas pueden ser extremadamente perjudiciales, se han desarrollado mecanismos para eliminar este tipo de células. El proceso se denomina muerte celular programada o apoptosis. Una cascada de enzimas conocidas como caspasas producen la muerte celular mediante la destrucción de numerosos sistemas estructurales y funcionales de la célula. Una vez que las células están muertas, los restos celulares son eliminados por los macrófagos (57).

#### 2.4.1. APOPTOSIS

El denominador común de diversos procesos neoplásicos es el crecimiento anárquico y autónomo de sus células. Este aumento se debe tanto a una proliferación celular intensa como a una muerte celular insuficiente (77, 78). Consecuentemente, mutaciones y otras alteraciones moleculares que impiden la apoptosis pueden jugar un importante papel en la patogenia y en la progresión de distintas neoplasias. La apoptosis es una forma de muerte celular programada genéticamente que se distingue por la activación de una familia de proteasas cisterna-aspartato (caspasas) que rompen varias proteínas originando cambios morfológicos y bioquímicos característicos de esta forma de muerte celular. Las aberraciones en este proceso, que conllevan una reducción de la muerte celular, podrían participar en la carcinogénesis favoreciendo la aparición de mutaciones transformantes (79).

En los organismos multicelulares, se han desarrollado sistemas de eliminación de las células dañadas (células potencialmente perjudiciales) mediante un mecanismo de autodestrucción denominado muerte celular programada o apoptosis (57). La apoptosis es el punto final de una cascada de acontecimientos moleculares que conducen a la activación de las enzimas proteolíticas responsables de la muerte celular (65). Aunque este mecanismo de autodestrucción se activa en respuesta a una diversidad de circunstancias, el proceso de apoptosis sigue los mismos pasos independientemente de cuál haya sido la circunstancia determinante. Primero se produce la fragmentación del ADN cromosómico, la desorganización estructural de los orgánulos y la pérdida de la morfología normal de las células (las células apoptóticas se vuelven esféricas). Luego, las células se descomponen en fragmentos celulares pequeños denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por los macrófagos (57).

Los “motores” de la autodestrucción son unas proteasas denominadas

caspasas, que actúan dirigiendo otras proteínas. Las caspasas son proteínas con un elevado contenido de cisteínas que cuando se activan cortan en determinados residuos de aspartato de las proteínas diana. En las células normales, las caspasas se encuentran en un estado enzimáticamente inactivo denominado zimógeno. En términos generales, un zimógeno es una forma precursora inactiva de una enzima cuya longitud excede el tamaño final de la enzima activa. Para convertir la forma zimógeno en caspasa activa, es necesario que se elimine una parte del polipéptido mediante ruptura enzimática o proteólisis (57).

Actualmente, se considera que existen dos tipos de caspasas: iniciadoras y ejecutoras. Se desconocen, sin embargo, los detalles relativos a cómo estos dos tipos de caspasas se organizan para producir la cascada proteolítica. Una posibilidad es que las caspasas iniciadoras sean activadas por proteólisis en respuesta a señales activadoras procedentes de otras clases de proteínas. Una vez activadas, las caspasas iniciadoras actuarían sobre las caspasas ejecutoras, que a su vez actuarían sobre otras proteínas, y así sucesivamente (57).

#### 2.4.2. GENES REGULADORES DE LA APOPTOSIS

Los genes que evitan o inducen la muerte celular programada son también variables importantes de la ecuación del cáncer; ya que el balance entre la proliferación, diferenciación y muerte celular determina el número de células en una población, así como el tamaño y el estado de un tumor.

Uno de los genes reguladores de la apoptosis es el *bcl-2*, que protege a los linfocitos de la apoptosis; es decir, evita la muerte celular programada. Por el hecho de que alarga la supervivencia celular, la expresión excesiva de *bcl-2* permite que sobrevengan otras mutaciones que afectan a los proto-oncogenes y a los genes supresores del cáncer (65).

No está completamente aclarada la base bioquímica de la acción de *bcl-2*,

aunque diversos estudios sugieren que *bcl-2* inhibe la apoptosis regulando una vía metabólica antioxidante (80).

Otros genes reguladores de la apoptosis serían: *bax*, *bad* y *bcl-xS*, que favorecen la muerte celular programada (65).

## **2.5. DIFERENCIAS ENTRE LAS CÉLULAS NORMALES Y LAS CÉLULAS CANCEROSAS**

Un tumor maligno, o cáncer, es de naturaleza clonal. Un cáncer está compuesto por un agregado de células todas ellas derivadas de una célula fundadora aberrante que, a pesar de estar rodeado por células normales, ha dejado de estar integrado en ese medio ambiente.

Las células cancerosas suelen distinguirse de las células normales que las rodean por la manifestación de una serie de cambios fenotípicos específicos, como una tasa rápida de división, la invasión de nuevos territorios celulares (las células cancerosas tienden a viajar al azar a través de los tejidos, penetrar en el torrente sanguíneo y ser transportadas por todo el cuerpo, donde constituyen nidos para numerosos crecimientos cancerosos nuevos), una tasa metabólica elevada, y una morfología anormal. Por ejemplo, cuando las células epiteliales normales se colocan en un medio de cultivo, sólo crecen si están adheridas a la superficie de la placa de Petri. Además, las células epiteliales normales se dividen hasta que constituyen una monocapa continua. Entonces, de alguna manera, reconocen que han formado una capa epitelial sencilla y dejan de dividirse. Por el contrario, las células malignas derivadas de tejido epitelial continúan proliferando y se apilan unas sobre otras. Claramente, los factores que regulan la diferenciación celular normal deben estar alterados (57).

Ciertos cánceres también producen factores angiogénicos que determinan

la neoformación de muchos vasos sanguíneos en su interior, aportando de este modo los nutrientes necesarios para el desarrollo del cáncer (81), puesto que los tumores sólidos no pueden crecer entre 1 y 2 mm en diámetro sin inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos que les facilite el aporte de nutrientes necesarios.

La conversión al estado maligno puede ocurrir en muchos tipos celulares diferentes. Parece que existe un mecanismo general común que consiste en la acumulación de múltiples mutaciones en una sola célula que provocan su proliferación descontrolada. Algunas de estas mutaciones pueden transmitirse de padres a hijos a través de la línea germinal, otras surgen de nuevo en el linaje celular somático de una célula determinada (57).

Sólo una minúscula fracción de las células que mutan en el cuerpo originan un cáncer. Existen varias razones para ello (81):

1ª) La mayoría de las células que han sufrido una mutación tienen una capacidad de supervivencia menor que las células normales y, por tanto, sencillamente mueren.

2ª) Sólo unas pocas de las células mutadas que sobreviven se convierten en cancerosas, porque incluso la mayoría de estas células mutadas siguen teniendo controles de retroacción normales que evitan su crecimiento excesivo.

3ª) Las células potencialmente cancerosas suelen ser destruidas por el sistema inmunitario del cuerpo antes de que crezcan en un cáncer: la mayoría de las células mutadas producen en su interior proteínas anormales debido a la presencia de genes alterados; dichas proteínas estimulan al sistema inmunitario del cuerpo, apareciendo anticuerpos o linfocitos sensibilizados contra las células cancerosas y las destruyen. Así, las personas cuyos sistemas inmunitarios están suprimidos, como las que reciben fármacos inmunosupresores tras un trasplante

renal o cardíaco, tienen cinco veces mayor probabilidad de desarrollar cáncer.

4<sup>a</sup>) Para provocar un cáncer suelen ser necesarios al mismo tiempo varios oncogenes activados diferentes. Uno de estos genes, por ejemplo, podría estimular la reproducción rápida de una línea celular, pero no se produciría un cáncer debido a la ausencia de un gen mutante simultáneo imprescindible para formar los vasos sanguíneos necesarios.

## 2.6. CARCINOGENESIS

El desarrollo del cáncer en el hombre está determinado por una compleja sucesión de eventos que normalmente tienen lugar a lo largo de muchos años (82). Durante este proceso el genoma de células neoplásicas incipientes adquiere alelos mutantes de proto-oncogenes, genes supresores de tumores y otros genes que controlan directa o indirectamente la proliferación celular. En el genoma de diversos tipos de neoplasias se han encontrado diferentes combinaciones de estos alelos mutantes, así como en el mismo tipo de neoplasia en distintos pacientes.

Los experimentos de transfección de ADN revelan que ningún oncogén solo (ej. *myc*, *ras*) puede inducir la transformación completa de células *in vitro* pero que *ras* y *myc* juntos pueden transformar fibroblastos. Esta cooperación es necesaria porque cada oncogén está especializado en inducir parte del fenotipo necesario para la transformación completa. Así, en este ejemplo, el oncogén *ras* induce a las células a secretar factores de crecimiento y les permite crecer sin anclaje a un sustrato normal, mientras que el oncogén *myc* vuelve a las células más sensibles a factores de crecimiento e inmortaliza células. *Myc* y *bcl-2* también cooperan en la transformación neoplásica (65).

Prácticamente todos los tumores de las células somáticas se deben a una serie de mutaciones específicas que se acumulan dentro de la célula. Se ha visto

que estas mutaciones pueden clasificarse en unas cuantas categorías principales: las que aumentan la capacidad proliferativa de las células, las que disminuyen la susceptibilidad de una célula a la apoptosis, o las que producen un incremento en la tasa general de mutación de la célula, aumentando así la probabilidad de que ocurran mutaciones que afecten a la proliferación o a la apoptosis (57).

El número de genes implicados en los distintos pasos de la transformación neoplásica aumenta a medida que se investiga sobre el tema. Recientes estudios sobre la transformación experimental de células humanas indican que la alteración de un limitado número de vías reguladoras celulares es suficiente para que una amplia variedad de células normales adquieran un fenotipo tumoral. Estos resultados sugieren una serie de principios genéticos y celulares que pueden gobernar muchos de los distintos tipos de cáncer humano (83).

Actualmente se acepta que la mayoría de los tumores sólidos resultan de un proceso de múltiples pasos de acumulación de alteraciones genéticas que implican la activación de varios oncogenes y la pérdida de dos o más genes supresores de cáncer (84, 85). Estas dos alteraciones representan un paso crucial en la progresión desde una célula normal hasta un tumor maligno. Un ejemplo de la adquisición creciente de un fenotipo maligno sería el estudio del carcinoma de colon. Se cree que estas lesiones evolucionan a través de una serie de etapas identificables morfológicamente: hiperplasia epitelial de colon, formación de adenomas que crecen progresivamente y que terminan por sufrir la transformación maligna. El modelo molecular de la evolución de este tipo de cáncer comenzaría por la inactivación del gen supresor del tumor *APC*, seguida de la activación de *ras* y terminando por la pérdida de los genes *ddc* y *p53* (aunque se considera menos importante el orden de mutación que su acumulación total, pudiendo en algunos casos invertirse el orden de mutaciones anteriormente descritos) (65).

Sabemos que muchas mutaciones subyacen a la carcinogénesis, pero no

sabemos si las numerosas mutaciones de las células cancerosas surgen independientemente o si son el resultado de la lesión genética de uno o más “genes mutadores” clave. Existe un gen en el cromosoma 2p15-16 que de alguna forma regula o influye sobre las mutaciones en cientos o posiblemente miles de otros *loci*. Este gen se descubrió en el cáncer de colon hereditario no vinculado a poliposis y se ha denominado gen del cáncer de colon familiar (*fcc: familiar colon carcinoma*). Se ha visto que aproximadamente el 13% de los cánceres de colon esporádicos muestran también mutaciones de *fcc* y que el producto del gen *fcc* está involucrado en la reparación del ADN. Cuando se está copiando un filamento de ADN, la proteína de *fcc* parece actuar como un “corrector ortográfico”. Si existe un error que determina un emparejamiento erróneo de bases (ej. el emparejamiento de G con T, en vez del normal de A con T), el producto del gen *fcc* dirige a la maquinaria de reparación del ADN para que lo corrija. Sin este corrector ortográfico se acumulan lentamente errores en varios genes, incluyendo los que regulan el crecimiento celular (65).

## **2.7. ANGIOGÉNESIS**

El término angiogénesis significa crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

Todos los tejidos del cuerpo tienen que tener un suministro constante de sangre, la cual proporciona oxígeno y nutrientes esenciales para sobrevivir. Cada vez que se dañan los vasos sanguíneos, desde la concepción hasta la muerte, proteínas y moléculas especiales llamadas factores de crecimiento se dirigen al sitio dañado para promover el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos.

Irónicamente, la angiogénesis, que es esencial para la vida misma, se ha convertido en un blanco fundamental en la lucha contra el cáncer. Los tumores necesitan también un suministro de sangre confiable para sobrevivir, y los mismos

factores angiogénicos que ayudan a mantener a los tejidos vitales también ayudan a mantener a los tejidos cancerosos.

La angiogénesis se produce principalmente en respuesta a factores angiogénicos liberados por los tejidos isquémicos, tejidos que crecen rápidamente o tejidos con tasas metabólicas excesivas. El proceso consta de múltiples pasos que parecen estar regulados tanto por factores estimulantes como por factores inhibidores. Los factores angiogénicos mejor caracterizados son el factor de crecimiento de células endoteliales, el factor de crecimiento fibroblástico y la angiogenina. Para que un tumor crezca, tiene que liberar más factores estimulantes que factores inhibidores en el tejido circundante.

El hecho de que los tumores también produzcan inhibidores angiogénicos resulta ser muy importante para explicar la metástasis, que es la propagación del cáncer a otras partes del cuerpo y la principal razón de las muertes relacionadas con esta enfermedad. Frecuentemente, metástasis pequeñas, microscópicas, en áreas del cuerpo alejadas del tumor primario, permanecen inactivas durante años y empiezan a crecer sólo después que el tumor primario es extirpado. Esto sucede porque el tumor primario ha estado liberando inhibidores angiogénicos en el torrente sanguíneo y cuando estos inhibidores desaparecen los tumores microscópicos empiezan a crecer. Los investigadores esperan que evitando la angiogénesis ellos puedan evitar que estas metástasis microscópicas crezcan. Además, si un tumor no se ha propagado a otras áreas y ha sido tratado efectivamente con agentes antiangiogénicos es menos probable que ocurra la metástasis, debido a que hay menos vasos sanguíneos disponibles para que las células cancerosas se diseminen desde el tumor.

El crecimiento tumoral está asociado con una actividad celular elevada donde el aumento del soporte sanguíneo es crucial para la continuación de su desarrollo. Los pasos críticos para la neovascularización incluyen la degradación

de la matriz extracelular, la proliferación de células endoteliales, y la migración y remodelación de la matriz extracelular. Se ha asociado la angiogénesis con la aparición de metástasis y una disminución de la supervivencia de pacientes con varios tipos de tumores, incluyendo el COCE.

Los factores asociados con la angiogénesis en los COCE han sido utilizados como dianas terapéuticas en nuevas modalidades de tratamiento del cáncer oral. Los tumores sólidos no pueden crecer entre 1 y 2 mm en diámetro sin inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos que les facilite el aporte de nutrientes necesarios. El bloqueo del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos priva al tumor de nutrientes y oxígeno, y por lo tanto, inhibiría el crecimiento del tumor y su diseminación a otras zonas del organismo. Actualmente existen distintas estrategias anti-angiogénesis siendo investigadas en ensayos clínicos: 1) bloqueo de la habilidad de las células endoteliales en romper la matriz extracelular adyacente, utilizando inhibidores de las metaloproteinasas (MMPs); 2) inhibición directa del crecimiento de las células endoteliales; 3) bloqueo de los factores que estimulan la angiogénesis, por ejemplo el bloqueo de la señal del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF); y 4) bloqueo de las integrinas, moléculas de la superficie de las células epiteliales que garantizan la supervivencia de las células endoteliales y promueven la angiogénesis (86).

## **2.8. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

Como nos hemos referido anteriormente, el estudio molecular del cáncer oral implica investigar el material genético de las propias células del tejido tumoral, y observar si existen alteraciones o no con respecto al tejido normal. Existen numerosas técnicas de biología molecular para estudiar directamente el ADN tumoral, tanto en el propio tejido, como mediante la manipulación previa del mismo. Entre las más difundidas encontramos la hibridación *in situ*, la técnica de

*Southern Blot* (que puede ser considerada como una de las precursoras de los *microarrays*), *Northern Blot*, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), las técnicas de secuenciación automática y los *microarrays* de ADN.

La **hibridación *in situ*** consiste en la unión específica o hibridación de fragmentos marcados de ADN monocatenario o de ARN, con sus secuencias complementarias. Para ello, se utilizan sondas complementarias de un fragmento conocido de ADN, que se marcan con un isótopo radiactivo o bien con una sustancia colorante (41). La importancia de que la técnica se realice *in situ*, es decir, que se visualice la reacción en las células del tejido original, radica en que de esta forma es posible detectar la localización exacta en el tejido de un determinado gen o qué tipos celulares lo expresan. La hibridación *in situ* se utiliza primordialmente en la detección de bajo número de copias de virus, tanto virus no carcinógenos (CMV) como carcinógenos (PVH, HBV, VEB) (87, 88, 89).

La técnica de ***Southern blot*** permite el análisis de ADN genómico o fragmentos definidos de ADN después de la digestión con enzimas o endonucleasas de restricción. Cada enzima de restricción reconoce secuencias específicas diferentes, por lo que distintas moléculas de ADN pueden ser digeridas por diferentes enzimas de restricción, en base a su secuencia de nucleótidos (41). Previamente a su hibridación, el ADN se aísla del resto de los componentes celulares y, una vez digerido con las enzimas de restricción adecuadas, se separan mediante electroforesis los distintos fragmentos originados, en base a sus diferentes tamaños. Los fragmentos separados, que presentan en el gel un patrón de distribución que es característico de cada ácido nucleico, pueden ser transferidos desde el gel a soportes sólidos (membranas de nitrocelulosa o *nylon*), conservando el mismo patrón de distribución que presentaban. Posteriormente, las membranas con el ADN se exponen a una sonda marcada, que hibridará con aquellas secuencias que presenten homología con ella, haciendo posible su visualización en función del tipo de marcaje de la sonda. La transferencia del ADN

contenido en un gel a membranas de nitrocelulosa o de *nylon* puede realizarse por capilaridad, aplicando la membrana sobre el gel y sobre ella papel absorbente, que arrastre en un tampón adecuado los fragmentos nucleotídicos. Esta técnica se utiliza en el diagnóstico y detección de portadores de enfermedades monogénicas, cuando se conoce la mutación responsable de la enfermedad. Requiere que se conozca cuál es la mutación responsable de la enfermedad y que el gen haya sido clonado, para poder disponer de una sonda específica, o que exista una sonda de algún marcador ligado a la enfermedad (90, 91).

Empleando el mismo procedimiento, pero empleando ARN en lugar de ADN, se realiza la técnica de ***Northern blot***. Con esta técnica podemos conocer si un determinado gen se expresa o no en el tejido u órgano estudiado, ya que permite la detección del ARNm correspondiente (92, 93).

Un avance significativo en las técnicas de biología molecular se produce con el descubrimiento de la técnica denominada “reacción en cadena de la polimerasa” o **PCR** (*polymerase chain reaction*) desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Es un método enzimático que permite obtener múltiples copias a partir de un segmento predeterminado de ADN. Las muestras pueden obtenerse de material de autopsias, biopsias y muestras citológicas. Es una técnica extremadamente sensible, ya que es suficiente con disponer de una única célula. Esta técnica requiere una enzima especial, la *Taq-polimerasa*, que añade el primer nucleótido al cebador o *primer* y posteriormente los nucleótidos necesarios, replicando el fragmento que queremos multiplicar. Una vez amplificado el ADN, éste puede identificarse mediante electroforesis en gel de agarosa o mediante *Southern blot*. Es una técnica con múltiples aplicaciones, ya que se utiliza como paso previo a cualquier otra técnica que requiera utilizar cantidades importantes de ADN. Se utiliza por ejemplo, para la detección de expresión de oncogenes y genes supresores tumorales en neoplasias, clonalidad de linfomas, identificación de agentes infecciosos como virus, bacterias y micobacterias y en el estudio de

mutaciones (94, 95, 96).

Durante la segunda mitad del siglo XX, los biólogos moleculares se han concentrado básicamente en la realización de estudios sobre un gen concreto o una proteína concreta. Sin embargo, a medida que entramos en la “era genómica”, este tipo de investigaciones ha ido evolucionando desde el estudio de sistemas de una sola variable hasta el estudio de interacciones mucho más complejas y con multitud de variables a la vez. Así, en lugar de estudiar la expresión de genes individuales, las nuevas tecnologías permiten investigar la expresión de una parte o incluso todos los genes de una célula o un tejido, es decir, su perfil de expresión génica.

La nueva tecnología de **arrays**, también denominados **chips o matrices de ADN**, proporciona por primera vez, la capacidad de analizar los niveles de expresión de decenas de miles de genes en un tejido concreto y en un momento determinado. Además, los *arrays* no sólo proporcionan información estática sobre la expresión génica (en qué tejido se está expresando el gen), sino también información dinámica (la relación de los patrones de expresión de un gen determinado con el resto de genes del *array*) (97).

Un *array* de ADN es un montaje ordenado de decenas, centenas o miles de moléculas individuales de ADN, con una secuencia conocida, sobre un soporte físico.

Los experimentos por medio de *arrays* consisten en analizar la interacción resultante de la combinación de un grupo de moléculas, como fragmentos de ARN, ADN, proteínas, anticuerpos, etc., con otro grupo predeterminado y conocido de moléculas diana.

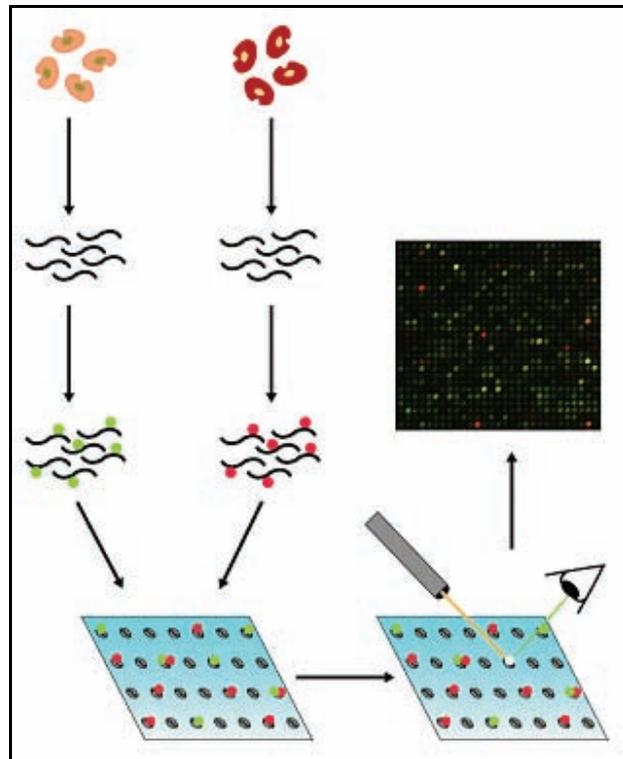
En función del tamaño de los puntos o *spots*, podemos diferenciar entre *macroarrays* y *microarrays*. En los *macroarrays* el punto o *spot* tiene un tamaño de

alrededor de 300 micras o mayor y en los *microarrays* el tamaño del punto es de alrededor de 200 micras de diámetro o menor.

Los *arrays* se fundamentan en una propiedad del ADN: el emparejamiento complementario de sus bases. El ADN consta de cuatro bloques de construcción, reconocidos por la primera letra de sus bases químicas: A (adenina), C (citosina), G (guanina) y T (timina).

En una cadena de ADN la base adenina sólo se emparejará con timina (su complementaria) de otra cadena y la base citosina sólo lo hará con guanina. Por tanto, si una molécula de ADN de una muestra de tejido se une a una sonda con una secuencia conocida, conoceremos también la secuencia de la muestra (puesto que será la complementaria).

Cada una de las sondas de ADN se dispone en un lugar determinado de la rejilla o micromatriz, parecida a un tablero de ajedrez, y las moléculas de ADN que se vierten sobre la plantilla portan un marcador fluorescente que puede detectarse con un *scanner*. Una vez leída la micromatriz por el *scanner*, los datos se convierten en una impresión con un código de colores (Figura 2).



**Figura 2.** Modelo de experimento con *arrays*. Se extraen las muestras de ADNc de dos poblaciones celulares diferentes (por ejemplo tejido tumoral y tejido sano) y se marcan con los fluorocromos Cy3 (verde) y Cy5 (rojo). Posteriormente se hibridan con las sondas de ADN fijadas en el *array*. Tras el escaneado, obtenemos la imagen final de diferentes colores: verde para la muestra A, rojo para la muestra B, y colores intermedios como amarillo o marrón como resultado de la mezcla de ambos fluorocromos.

Puesto que el *microarray* proporciona una foto instantánea de la actividad genética para miles de genes, los datos de muchos experimentos pueden ser comparados y así, genes que tengan patrones de actividad consecuentes pueden ser agrupados. De esta forma, los genes que caracterizan un estado celular particular, como la malignidad, pueden ser identificados proporcionando así nueva información sobre la biología del estado celular (98).

Mediante el uso de *arrays* de ADN se pueden analizar de cientos a miles de variantes genéticas (polimorfismos o mutaciones) simultáneamente.

El material o soporte físico sobre el que se va a generar la matriz es un componente fundamental del proceso. Dependiendo de su composición y resistencia, se podrán llevar a cabo determinados procesos de lavado y eliminación de uniones inespecíficas, podrán o no ser reutilizados, y soportarán diferentes mecanismos de revelado. Además, el tipo de soporte físico utilizado, puede condicionar de forma muy importante el coste de fabricación del *array*.

La actividad de cada gen en el *microarray* puede ser comparada en dos poblaciones celulares diferentes (A y B). Esto es muy útil en el estudio de tumores malignos ya que permite comparar las diferencias de expresión génica que aparecen en el tejido tumoral en relación al tejido sano.

En la actualidad, los *arrays* en general, y en particular los *arrays* de ADN, constituyen una herramienta fundamental en la investigación genética. Sus aplicaciones son innumerables, entre las que se destacan la monitorización de la expresión génica, detección de mutaciones y polimorfismos, secuenciación, diagnóstico clínico, *screening* y aplicaciones farmacológicas, seguimiento de terapia, medicina preventiva, etc.

### 3.- BASES MOLECULARES DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Aunque ya existen modelos preliminares de progresión molecular para la carcinogénesis del cáncer oral, como los descritos por Califano y cols. (99) en 1996, y por Ha y cols. en 2003 (100), todavía desconocemos las vías concretas y las reacciones moleculares precisas que acontecen durante la progresión de estos tumores.

Califano y cols. en 1996 (99), y Mao en 1997 (101), demostraron la asociación de alteraciones cromosómicas estructurales con la aparición del cáncer oral; entre ellas, la asociación existente entre displasia y alteraciones en las regiones cromosómicas 9p21, 3p21 y 17p13; entre carcinoma *in situ* y alteraciones en 11q13, 13q21 y 14q31; y entre carcinoma invasivo y alteraciones en 4q26-28, 6p, 8p y 8q.

Recientemente, se ha producido una gran revolución en el estudio de la expresión génica en el cáncer oral. Sin embargo, sólo un pequeño conjunto de genes ha podido ser implicado, de forma consistente, con la carcinogénesis del cáncer oral. Algunos genes han demostrado una fuerte asociación con el desarrollo del carcinoma oral, como *p53* (asociado con el 90% de los carcinomas orales de células escamosas); *p16* (asociado con el 70%); o el gen *APC* (implicado en el 50%) (101). Además, los tres están localizados en regiones asociadas con el desarrollo de estos tumores: 17p13 en el caso de *p53*; 9p21 en el caso de *p16* y 5q21-22 en el caso de *APC*. Otras anomalías moleculares, como la

alteración en la expresión de *DOC-1* y *RAR-β*, no asociadas a alteraciones cromosómicas estructurales, también han sido asociadas con el cáncer oral (102).

Scully y cols. en 2000 (103, 104, 105), publicaron una revisión muy detallada de los factores genéticos y moleculares asociados al carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, incluyendo las rutas metabólicas de la carcinogénesis, los factores que intervienen en la reparación del ADN, las alteraciones en el ciclo celular y las anomalías cromosómicas, así como las aplicaciones clínico-patológicas derivadas de la identificación de todas estas anomalías. Han visto que son múltiples las aberraciones genéticas asociadas a tumores observadas en la displasia oral y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y que es evidente que el cáncer es un proceso en múltiples pasos que implica una serie de eventos moleculares aberrantes que afectan a una serie de genes, cuyo resultado final es un crecimiento celular desordenado (104). Pero parece claro que es el acúmulo de eventos genéticos el que determina la progresión a la malignidad (99).

### **3.1. CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS Y MICROARRAYS DE ADN**

Para conseguir identificar la expresión génica asociada al COCE, muchos investigadores han combinado técnicas de hibridación de *arrays* de ADN, con otras técnicas moleculares que permiten examinar la expresión génica diferencial. Los *arrays* de ADN son una tecnología muy reciente cuya historia se remonta a mediados de los años 80 (106, 107). Las primeras referencias en la literatura sobre su desarrollo hay que buscarlas a principios de la década de los noventa (108, 109), donde encontramos los primeros artículos sobre el descubrimiento y utilidad de los chips de ADN, terminología que ha ido perdiendo uso en favor del término *arrays* de ADN.

Aunque existen algunas publicaciones al respecto entre los años 1994 y 1997, es en 1998 cuando la experimentación con *arrays* despegó definitivamente y en tan sólo 5 años han aparecido numerosos artículos bibliográficos que describen estudios basados en esta tecnología. Entre ellos, los relacionados con el estudio del cáncer ocupan un lugar destacado, siendo muy numerosos los trabajos relacionados sobre todo con cánceres de mama y colon, pero también con linfomas, cáncer de próstata y cáncer de pulmón (110, 111, 112, 113, 114, 115).

En 1998, Chang y cols. (116) publicaron el primer artículo de *microarrays* aplicados al estudio del cáncer oral. En este artículo, se refiere por primera vez el uso de *microarrays* de ADN para caracterizar los genes que sufren transformaciones durante la progresión del cáncer oral. Encontraron 69 genes con alteraciones en su expresión en líneas celulares de COCE y de queratinocitos orales inmortalizados por medio de infección con el virus del papiloma humano.

Sin embargo, todavía hubo que esperar hasta el año 2000 para empezar a encontrar de forma habitual referencias bibliográficas sobre el uso de *arrays* de ADN como herramienta en el estudio del COCE (8, 117, 118, 119).

En la actualidad, son múltiples los estudios acerca de *microarrays* y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y, concretamente, con el COCE (120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130). La mayoría de estos estudios establecen la hipótesis de una posible asociación entre un número variable de genes y el carcinoma de células escamosas. Muchos de ellos son genes conocidos y previamente descritos, mientras que otros nunca han sido analizados con detenimiento y se desconoce su función biológica. A partir de estos estudios con *arrays* de ADN, estos nuevos genes pueden ser investigados individualmente para descifrar su naturaleza y función.

### **3.2. GENES SOBREENPRESADOS EN EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS SEGÚN UN ESTUDIO CON EL *ARRAY ATLAS GLASS HUMAN 3.8 I MICROARRAY***

Uno de los trabajos acerca de *microarrays* y el cáncer oral es el realizado por nuestro grupo de investigación (11), en el que se estudian 5 pacientes con COCE y se analiza la expresión génica diferencial del COCE mediante el *array Atlas Glass Human 3.8 I Microarray* (AGHM). Este *microarray* consta de 3.757 oligonucleótidos y 9 genes *housekeeping*, así como controles hasta completar un total de 3.888 *spots*. Los genes seleccionados son genes conocidos y bien caracterizados que abarcan un rango amplio de funciones biológicas.

Somoza y cols. (11) encuentran 426 genes que presentan diferencias estadísticamente significativas entre tejido tumoral y tejido normal. De éstos, 322 (75,58%) aparecen inducidos o sobreexpresados y 104 (24,41%) reprimidos o subexpresados.

Basándonos en la función que cada gen desempeña en las células, en la Tabla 3 se muestran las distintas categorías funcionales así como el porcentaje de los 426 genes que presentan alteraciones de expresión. En la Tabla 4 aparecen los grupos funcionales más significativos en los 322 genes sobreexpresados en el tumor, y en la Tabla 5 los grupos funcionales más significativos en los 104 genes subexpresados en el tumor.

CATEGORÍAS FUNCIONALES	%
proteínas implicadas en el metabolismo celular	18.77%
transductores y moduladores intracelulares	12.44%
proteínas y factores de transcripción	12.20%
proteínas reguladoras del tráfico celular	9.15%
receptores celulares	8.92%
proteínas de canal y transportadores de membrana	6.33%
proteínas de traducción	6.10%
proteínas asociadas al citoesqueleto	5.86%
proteínas modificadoras	5.16%
proteínas de adhesión celular	5.16%
proteínas de comunicación extracelular	4.46%
proteínas de modificación post-traducción	4.22%
proteínas transportadoras extracelulares	3.99%
proteínas cuya función no ha sido descrita	3.99%
proteínas de respuesta al estrés	3.28%
proteínas implicadas en la síntesis, recombinación y reparación del ADN	2.58%
proteínas de procesamiento, modificación y transporte de ADN	2.58%
oncogenes y genes supresores tumorales	2.58%
proteínas de la matriz extracelular	1.87%
proteínas del sistema inmunológico	1.87%
antígenos de superficie celular	1.87%
proteínas asociadas a la apoptosis	1.40%
proteínas de unión a ADN y a cromatina	1.17%
proteínas asociadas al ciclo celular	0.70%

**Tabla 3.** Distribución funcional y porcentual de los 426 genes con cambios en su expresión normal (11)

CATEGORÍAS FUNCIONALES	%
Proteínas implicadas en el metabolismo celular	21.11%
Transductores y moduladores intracelulares	11.18%
Proteínas y factores de transcripción	10.24%
Receptores celulares	10.24%

**Tabla 4.** Grupos funcionales más significativos en los 322 genes sobreexpresados en el tumor (11)

CATEGORÍAS FUNCIONALES	%
Proteínas y factores de transcripción	18.26%
Transductores y moduladores intracelulares	16.34%
Proteínas implicadas en el metabolismo celular	11.53%
Proteínas reguladoras del tráfico celular	10.57%

**Tabla 5.** Grupos funcionales más significativos en los 104 genes subexpresados en el tumor (11)

En el Anexo I se muestra la relación de los genes sobreexpresados en el tejido tumoral según Somoza y cols. (11).

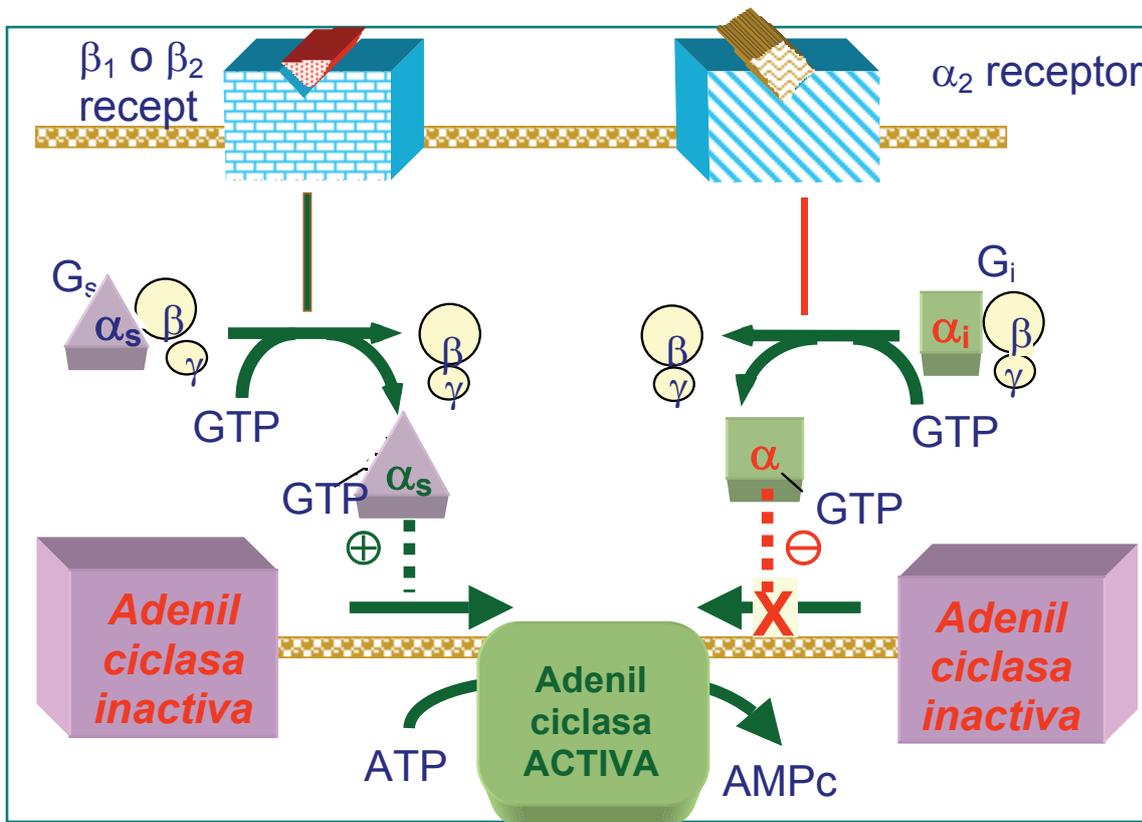
De lo antes expuesto se concluye que aparecen una gran cantidad de genes sobreexpresados en el tejido tumoral cuya función no está claramente determinada. Aunque sería interminable enumerar todos aquellos y sus características diferenciadoras, nos vamos a referir exclusivamente a los genes que han tenido una relación directa con el objetivo de nuestro trabajo, como son: *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*, *ATP6V1C1* y *ATP6V0E*, que describiremos a continuación.

- **ADRBK2** (*adrenergic, beta, receptor kinase 2*)

Este gen, también denominado *GRK3* ó *BARK2*, se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 en posición 11 (22q11).

Es un receptor kinasa beta-adrenérgico que fosforila específicamente la forma agonista del beta-adrenérgico y se relaciona con los receptores unidos a la proteína G. Globalmente, la enzima *ADRBK2* tiene un 85% de similitud de los aminoácidos con *ADRBK1*, con el dominio catalítico de la proteína kinasa teniendo un 95% de similitud. El ARNm de *ADRBK2* es aproximadamente de 8 kilobases con una distribución similar a *ADRBK1*. Estos datos sugieren la existencia de una familia de receptores kinasas con una actividad reguladora de la función del receptor (131).

Los receptores beta-adrenérgicos transducen señales de catecolaminas, norepinefrina y epinefrina, a la proteína G, que se activa en presencia de la proteína transmembrana adenilciclase para producir el segundo mensajero AMPc (Figura 3). Éste activa a la proteína kinasa AMPc-dependiente (PKA o proteína kinasa A), la cual está implicada en numerosas cascadas de señalización paralelas altamente específicas.



**Figura 3.** Mecanismo de actuación de los receptores adrenérgicos.

La distribución en los tejidos de *ADRBK2* es fundamentalmente en el cerebro y el bazo, seguido del pulmón, corazón y riñón (131). Aparece altamente expresado en la vía dopaminérgica en el sistema nervioso central, y media la desensibilización homóloga de una variedad de neurotransmisores y hormonas mediante la fosforilación de receptores unidos a la proteína G (GPCRs) (132). Se piensa que este gen podría estar relacionado con la fosforilación y posiblemente la desensibilización de múltiples receptores ligados a adenilciclase y que estaría implicado en la regulación de diversos receptores unidos a la proteína G (131, 133).

Un polimorfismo en la región promotora de *ADRBK2* se ha asociado a un

trastorno bipolar (132, 133). También se ha presentado *ADRBK2* como un gen candidato que podría estar implicado en la expresión de desórdenes respiratorios durante el sueño (134).

Este gen se ha encontrado en librerías de ADNc del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer (*Cancer Genome Anatomy Project*) (135) perteneciente a diversos tipos de tejidos: adiposo, células B, hueso, encéfalo, cartílago, cerebelo, cerebro, colon, endocrino, esófago, ojo, feto, tracto gastrointestinal, genitourinario, célula germinal, cabeza y cuello, corazón, riñón, hígado, pulmón, nódulo linfático, linforreticular, glándula mamaria, músculo, nervios, ovarios, páncreas, islotes pancreáticos, sistema nervioso periférico, placenta, próstata, retina, piel, bazo, célula madre, estómago, célula T, testículo, tiroides, tejido no caracterizado, útero y vascular.

En el Anexo II se muestra la información referente a este gen y su distribución en los distintos tejidos del organismo, según la base de datos del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer (135), cuya primera meta ha sido recopilar un catálogo completo de todos los genes expresados en las células de diversos tumores.

Se han descrito varias actividades funcionales según el Instituto Bioinformático Europeo (*European Bioinformatics Institute*) (135) (Tabla 6):

<u>Actividades funcionales:</u>
-fosforilación de aminoácidos de las proteínas
-transducción de señales
-unión a ATP
-actividad kinasa del receptor acoplado a proteína G
-actividad kinasa del receptor beta-adrenérgico
-actividad kinasa
-actividad protein-kinasa
-actividad kinasa proteína serina-treonina
-actividad transducción de señales
-actividad transferasa

**Tabla 6.** Actividades funcionales del gen *ADRBK2* (135)

- **ADRB1** (*adrenergic, beta-1-, receptor*)

Este gen, también conocido como *RHR*, *B1AR*, *ADRB1R* ó *BETA1AR*, se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 en posición 24-26 (10q24-q26).

Los receptores beta-adrenérgicos (beta 1, beta 2 y beta 3) son una familia prototipo de receptores ligados a proteínas reguladoras de unión de nucleótidos guanina que median muchos de los efectos fisiológicos de la hormona epinefrina y del neurotransmisor norepinefrina (136).

*ADRB1* es un miembro de la familia de receptores transmembrana ligados a proteína G, que se une a ésta para activar adenilciclase (137, 138). Es el subtipo receptor beta-adrenérgico más abundante en el cerebro mamífero y presenta un patrón de expresión predominantemente neuronal (139).

Los receptores unidos a proteína G (GPCRs) son clásicamente conocidos por transducir señales extracelulares intracelularmente mediante las subunidades alfa, beta y gamma de la proteína G. La unión de formas agonistas promueve un cambio conformacional en GPCRs, permitiendo la liberación de beta y gamma y el cambio del nucleótido guanina en la subunidad alfa que se une con GTP, por lo que puede estimular varios mensajeros secundarios intracelulares como adenilciclase o fosfolipasa C (140) (Figura 3).

Dentro de los efectos de GPCRs se encuentran la estimulación de la fosforilación de las proteínas celulares, la activación de cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos, el crecimiento celular y la proliferación (141, 142, 143).

La activación del receptor *ADRB1* promueve la estimulación, mediada por proteínas G, de adenilciclase (144), permitiendo un incremento de las concentraciones intracelulares de AMPc (145). Recientemente se ha estudiado un polimorfismo de *ADRB1* que consiste en un cambio C/G en el primer nucleótido del codón 389, codificando las isoformas proteicas Arg-389 y Gly-389 respectivamente (146). Esta variación se localiza en una región crítica para la unión de proteína G, y la forma Arg-389 del receptor se asocia con la interacción proteica *ADRB1*-proteína G resultando en una mayor activación de los efectos de adenilciclase (147). Sorprendentemente, las subunidades beta de la proteína G se ha visto que juegan un papel importante en la unión de proteínas G a *ADRB1* (144).

De acuerdo con estudios previos se sabe que AMPc regula la síntesis y secreción de APP (proteína precursora de amiloide); así, el aumento de APP es paralelo al aumento de los niveles de AMPc. Se ha visto que las células con los alelos *ADRB1 C/GNB3 T* mostraron un incremento a la proteína APP en las células HEK-293 (células humanas de riñón embrionario) y de neuroblastoma SK-N-MC (líneas celulares de neuroblastoma humano). Los mismos resultados se

obtuvieron con los niveles de ARNm usando RT-PCR semi-cuantitativa y *microarrays* de ADN (145).

Se ha visto que la combinación de polimorfismos en *GNB3* y *ADRB1* produce susceptibilidad para la enfermedad de Alzheimer cambiando la respuesta celular a la estimulación adrenérgica (145). La presencia de los alelos *ADRB1* C y *GNB3* T conlleva un riesgo para la enfermedad de Alzheimer que podría estar asociado con un aumento de respuesta beta-adrenérgica en las células neuronales *in vivo*. Esta combinación de polimorfismos también resulta en un aumento de la activación de MAPK (quinasas activadas por mitógenos) y APP en células HEK-293 y en SK-N-MC (145). Las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) contribuyen a la transmisión de estímulos extracelulares que terminan finalmente en la fosforilación directa o indirecta de varios factores de transcripción produciendo alteraciones en la expresión génica.

La activación adrenérgica podría promover el aumento de los niveles de AMPc intracelulares mediados por la proteína G/adenilciclasa permitiendo un incremento de la actividad de la proteína kinasa AMPc-dependiente (PKA), siendo éste el mecanismo predominante por el cual este segundo mensajero controla la función celular (145).

El aumento de los niveles de AMPc podría incrementar la expresión de APOE (apolipoproteína E) (148) y una fosforilación elevada de tau (proteína implicada en la enfermedad de Alzheimer) (149). APOE es responsable del transporte de lípidos a los órganos. Sus variantes genéticas E2, E3 y E4 determinan las concentraciones de lípidos en la sangre y la variante E4 se ha asociado además con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer y cáncer de mama.

El nucleótido cíclico Ras GEF (CNrasGEF) es una proteína que puede activar Rap1 independientemente de AMPc (150) y activar Ras en respuesta a

AMPc intracelular elevado de una forma independiente a PKA (151). *ADRB1* se une directamente al dominio PDZ de CNrasGEF permitiendo la activación de Ras inducida por agonistas mediante el AMPc generado por la activación de la subunidad alfa de la proteína G. Por lo tanto, la estimulación de *ADRB1* puede activar directamente la subunidad alfa de la proteína G y CNrasGEF, y estas proteínas actuarán conjuntamente activando Ras (140).

También se ha asociado un polimorfismo de *ADRB1* con la hipertensión (152) y con desórdenes psiquiátricos en personas con ansiedad elevada (153).

*ADRB1* se encuentra en diversos tejidos, pero se expresa fundamentalmente en el corazón, donde media los efectos de la epinefrina en la función cardíaca (154), en el cerebro, donde juega un papel fundamental en la regulación de la plasticidad sináptica (155) y en la formación de la memoria (156).

Se han descrito varias actividades funcionales según el GOA (*Gene Ontology Annotation*) (Tabla 7) y se ha visto que interviene en diversos procesos como la vía de señalización de receptores unidos a proteína G, la activación de adenilciclase y la transducción de señales (135).

<p style="text-align: center;"><u>Actividades funcionales:</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-actividad adrenoceptor</li><li>-actividad receptor beta1-adrenérgico</li><li>-actividad receptor</li><li>-actividad receptor similar a rodopsina</li></ul>
--

**Tabla 7.** Actividades funcionales del gen *ADRB1* (135)

- **ADRA2B** (*adrenergic, alpha-2B-, receptor*)

Este gen, también conocido como *ADRA2L1*, *ADRARL1*, *ADRA2RL1* ó *ALPHA2BAR*, se localiza en la región centromérica del cromosoma 2 (2p13-q13).

Los receptores alfa2-adrenérgicos son miembros de la superfamilia de receptores ligados a la proteína G. Incluyen 3 subtipos homólogos: alfa 2A, alfa 2B y alfa 2C, que son codificados por genes distintos y tienen una distribución diferente a nivel de los tejidos y las células, pero sus propiedades farmacológicas son similares (157).

Estos receptores se expresan fundamentalmente en el sistema nervioso central y periférico. El sistema nervioso simpático regula la función cardiovascular mediante la activación de receptores adrenérgicos en el corazón, los vasos sanguíneos y el riñón. Los receptores alfa2-adrenérgicos tienen un papel decisivo en la regulación de la liberación de neurotransmisores de los nervios simpáticos y de las neuronas adrenérgicas en el sistema nervioso central (158).

Este gen codifica el subtipo alfa 2B, que se observó se asociaba con la subunidad alfa del factor de iniciación eucariótico 2B (eIF-2B), una proteína de intercambio del nucleótido guanina que funciona en la regulación de la traducción.

Estudios funcionales sugieren que la interacción con esta proteína puede estar implicada en la regulación de la señalización mediada por receptores (159). Se ha relacionado este subtipo alfa 2B con la regulación de la presión sanguínea (160).

Una variante polimórfica del subtipo alfa 2B se asocia con la reducción de la tasa metabólica basal en sujetos obesos y puede contribuir en la patogénesis de la obesidad (157). Es conocida desde hace tiempo la influencia que los receptores alfa2-adrenérgicos tienen en el metabolismo mediante la inhibición de la secreción de insulina y la lipólisis (161).

Se ha observado una asociación entre un polimorfismo de este gen y un mayor riesgo de infarto agudo de miocardio y muerte súbita por parada cardíaca (162).

Los receptores alfa2-adrenérgicos median la inhibición inducida por catecolaminas de la adenilciclase mediante la acción de las proteínas G (Figura 3).

Se localiza como una proteína integral de membrana. La secuencia de aminoácidos es la de una proteína de membrana (52,2% en la membrana plasmática).

Se han descrito varias actividades funcionales según el GOA (Tabla 8) y se ha visto que interviene en diversos procesos como la vía de señalización de receptores unidos a proteína G, la señalización célula-célula y la transducción de señales (135).

<p style="text-align: center;"><u>Actividades funcionales:</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-actividad adrenoceptor</li><li>-actividad receptor alfa2-adrenérgico</li><li>-actividad receptor</li><li>-actividad receptor similar a rodopsina</li></ul>
--

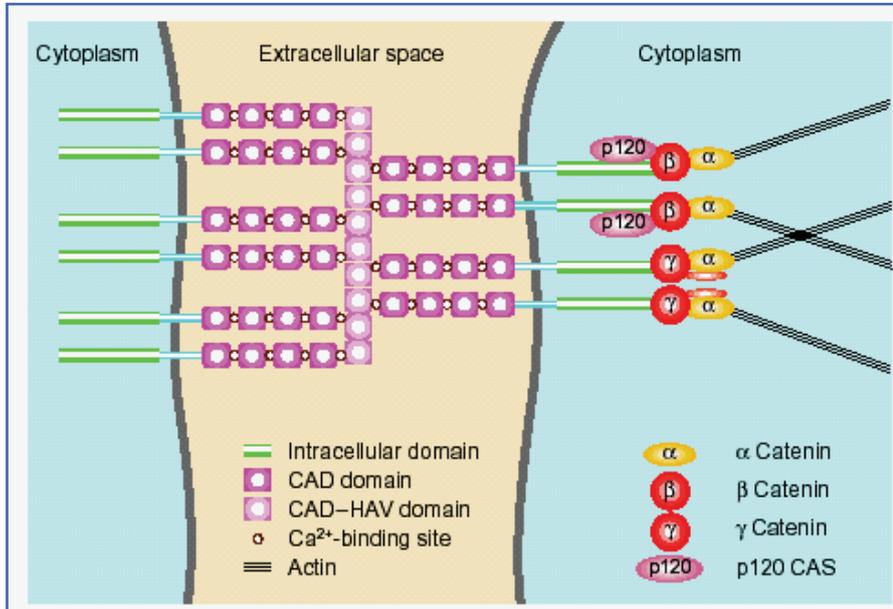
**Tabla 8.** Actividades funcionales del gen *ADRA2B* (135)

- **AXIN 2**

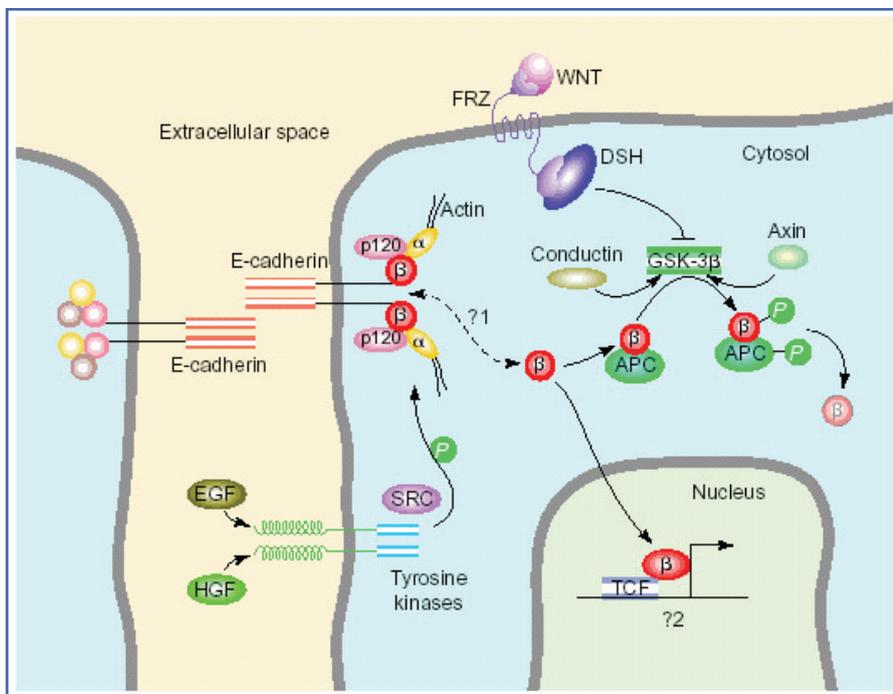
Este gen, también conocido como *conductin* o *axil*, se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 en posición 24 (17q24) (163), región que frecuentemente muestra una pérdida de heterocigosidad en el cáncer de mama (164), neuroblastoma (165), carcinoma hepatocelular (166) y otros tumores.

Juega un importante papel en la regulación de la estabilidad de beta-catenina, como sus homólogos *conductin* en el ratón y *axil* en la rata. Se ha visto que ambos son reguladores negativos de la vía Wnt/beta-catenina (167), la activación de esta vía se ha relacionado directamente con la proliferación celular y la apoptosis (168), y con la carcinogénesis del cáncer de colon (169). En el ratón, *conductin* organiza un complejo multiproteico de poliposis adenomatosa de colon (APC), beta-catenina, GSK3B (kinasa serina/treonina) y *conductin*, que dirige la degradación de beta-catenina y regula los niveles citosólicos de ésta. La activación de la vía Wnt inhibe la actividad de GSK3B, causando un acúmulo de beta-catenina en el citoplasma y en el núcleo permitiendo la transcripción de diversos genes (168). Aparentemente, la desregulación de beta-catenina es un acontecimiento importante en la formación de ciertos tumores (163, 170).

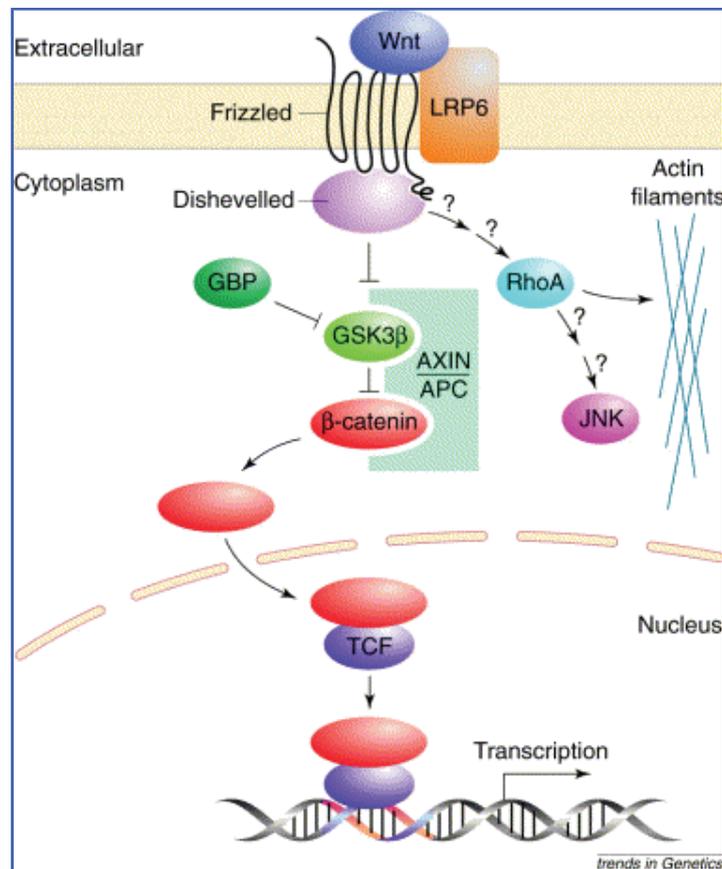
La beta-catenina es una proteína con una función dual que interviene en dos procesos totalmente distintos: por un lado, es una proteína estructural que forma parte de las uniones entre células epiteliales vecinas y regula la adhesión célula-célula mediante la interacción con cadherina (proteína transmembrana), contactando así sus citoesqueletos y constituyendo un fuerte ensamblaje que conecta las células entre sí (Figura 4). Pero también esta proteína puede actuar como un coactivador transcripcional de genes implicados en la proliferación celular. La beta-catenina, como todas las proteínas, está sometida a una cinética de síntesis y degradación. Habitualmente la beta-catenina existe en el citoplasma, unida a cadherina, en una forma no fosforilada. La degradación de esta proteína queda determinada por su fosforilación, y es la maquinaria de fosforilación la que la célula utiliza para regular este proceso (170). Parece que la función principal del gen *AXIN 2* es promover la fosforilación de beta-catenina mediante la quinasa serina/treonina GSK3B (163) (Figura 5). Cuando la velocidad de síntesis es mayor que la de degradación tenemos mayor disponibilidad de beta-catenina citoplasmática (no fosforilada), ésta puede translocarse en el núcleo y unirse a factores de transcripción que resultarán activados, determinando así la transcripción de una serie de genes específicos (*ciclina D1*, *c-myc*, etc) que se han relacionado con la carcinogénesis (171) (Figura 6).



**Figura 4.** Complejo adhesivo de cadherina y  $\beta$ -catenina.



**Figura 5.** Vínculo entre la adhesión celular y la vía de señalización de Wnt. Se observa la adhesión célula-célula mediante la interacción  $\beta$ -catenina/cadherina, así como el papel de AXIN 2 en la vía de señalización de Wnt para promover la fosforilación de  $\beta$ -catenina mediante GSK3B.



**Figura 6.** Movimiento de  $\beta$ -catenina al núcleo determinando la transcripción de genes específicos.

Mutaciones en este gen elevan los niveles de beta-catenina, proteína asociada al desarrollo del cáncer colorrectal. Liu y cols. (172) examinaron el ADN de 105 cánceres colorrectales, de los que 45 tenían errores celulares asociados a este gen. También se han asociado mutaciones en *AXIN 2* con agenesias dentales familiares (173).

Análisis mediante *Northern blot* han mostrado que *AXIN 2* se expresa en

gran medida en órganos como el timo, la próstata, los testículos, el intestino delgado y los ovarios, pero se expresa levemente en el colon (163).

Este gen se ha encontrado en librerías de ADNc del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer (135) perteneciente a diversos tipos de tejidos: corteza suprarrenal, cerebro, cartílago, cerebelo, colon, endocrino, ojo, feto, tracto gastrointestinal, genituario, célula germinal, corazón, riñón, hígado, pulmón, linforreticular, glándula mamaria, nervios, ovario, paratiroides, placenta, próstata, retina, célula madre, estómago, célula T, testículo, timo, tejido no caracterizado, útero y vascular.

En el Anexo II se muestra la información referente a este gen y su distribución en los distintos tejidos del organismo, según la base de datos del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer (135).

Se han descrito varias actividades funcionales según el Instituto Bioinformático Europeo (135) (Tabla 9):

<p style="text-align: center;"><u>Actividades funcionales:</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-receptor de la vía de señalización de Wnt</li><li>-desarrollo</li><li>-transducción de señales</li><li>-intracelular</li><li>-actividad transducción de señales</li></ul>
---

**Tabla 9.** Actividades funcionales del gen *AXIN 2* (135)

- **ATPasas**

Las enzimas ATPasas vacuolares (V-ATPasas) son complejas en su estructura, pero tienen una función primaria: emparejar la hidrólisis de ATP con la translocación de H<sup>+</sup> a través de las membranas biológicas (174).

Las H<sup>+</sup>-ATPasas vacuolares (V-ATPasas) tienen una estructura y un mecanismo de acción similar a las F-ATPasas. En las células eucarióticas las F-ATPasas están confinadas a las organelas semi-autónomas, cloroplastos y mitocondrias, que contienen sus propios genes que codifican algunas de las subunidades de las F-ATPasas. En contraste con las F-ATPasas, cuya función primaria en las células eucarióticas es formar ATP a expensas de la fuerza motivada por protones, las V-ATPasas funcionan exclusivamente como bombas de protones ATP-dependientes (175). El ATP es un compuesto químico lábil que está presente en todas las células. Es una combinación de adenosina, ribosa y tres radicales fosfato. Los últimos dos radicales fosfato están unidos al resto de la molécula por los llamados *enlaces de alta energía*. La liberación de cada uno de los dos radicales fosfato libera 12.000 calorías de energía. Después de que el ATP pierde un radical fosfato, este compuesto pasa a ser difosfato de adenosina (ADP), y tras la pérdida del segundo radical fosfato, se convierte en monofosfato de adenosina (AMP). El ATP está presente en cualquier punto del citoplasma y del nucleoplasma de todas las células, y prácticamente todos los mecanismos fisiológicos que necesitan energía para operar la obtienen directamente del ATP. A su vez, los alimentos se oxidan de forma gradual en la célula, y la energía liberada se utiliza para volver a formar ATP, manteniendo siempre un aporte de esta sustancia; toda esta transferencia de energía tiene lugar por medio de las reacciones acopladas. En resumen, el ATP es un compuesto intermediario que tiene la capacidad peculiar de participar en muchas reacciones acopladas: reacciones con el alimento para extraer la energía y reacciones con muchos mecanismos fisiológicos para proporcionar energía para su función. Por esta

razón, al ATP se le ha llamado “moneda de energía” del organismo, que puede ganarse y gastarse una y otra vez (176).

La fuerza motivada por protones generada por las V-ATPasas en organelas y membranas de las células eucarióticas es utilizada como una fuerza de conducción por numerosos procesos de transporte secundario (174).

Las V-ATPasas translocan protones a través de membranas de diversas organelas intracelulares (lisosomas, endosomas, gránulos secretores, etc.). Este transporte es electrogénico, y establece un gradiente de pH ácido y un potencial transmembrana positivo dentro de estos compartimentos intracelulares (177). La actividad de las V-ATPasas es esencial para muchos procesos celulares, incluyendo el tráfico de membrana intracelular, procesamiento y degradación de proteínas, y endocitosis mediada por receptores. Las V-ATPasas están también presentes en la membrana plasmática de células especializadas secretoras de protones (174).

Las V-ATPasas fueron detectadas por primera vez en organelas conectadas con el sistema vacuolar. Éstas proporcionan la mayoría de la energía requerida para los procesos de transporte en varias organelas del sistema vacuolar de las células eucarióticas (174).

La fuerza de conducción para el acúmulo de neurotransmisores en las vesículas sinápticas, es la fuerza motivada por protones generada por V-ATPasas. Estas enzimas también son vitales para las principales funciones de los endosomas y el aparato de Golgi (174).

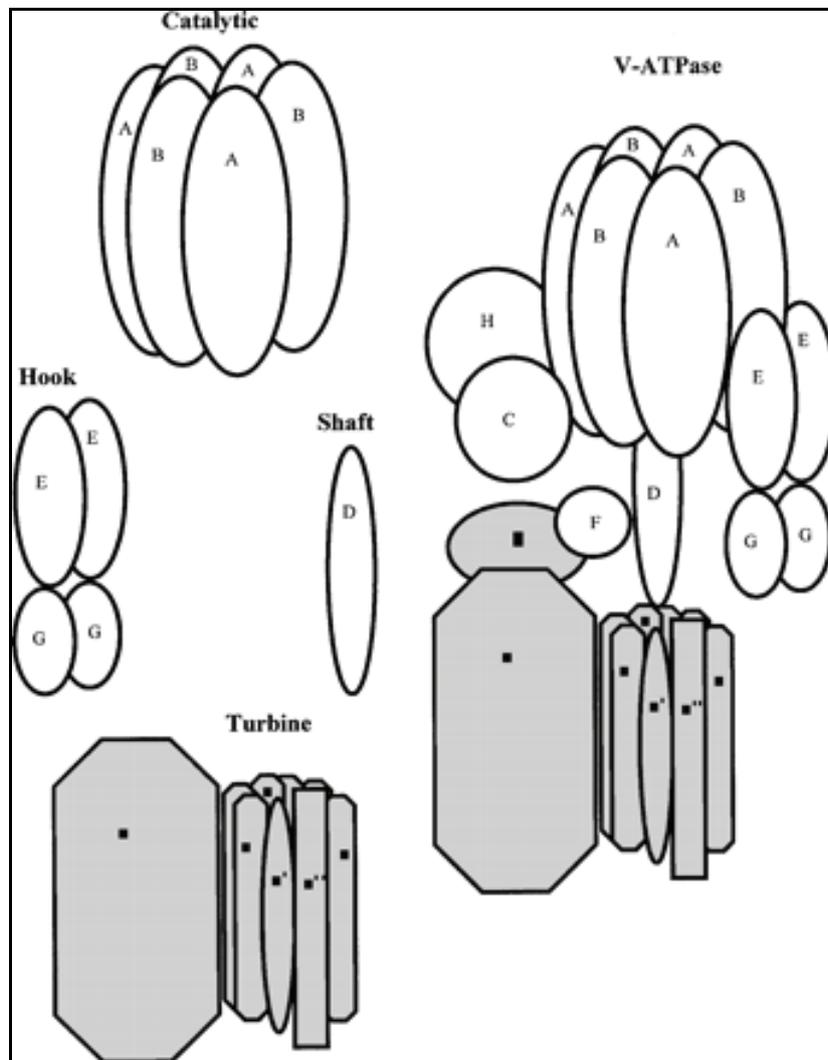
La fuerza motivada por  $\text{Na}^+$ , producida por la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  fue ampliamente reconocida como el principal dador de energía de la membrana plasmática en las células animales. Recientemente se descubrió que las V-ATPasas son más importantes que las  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasas para proporcionar

energía a las membranas plasmáticas animales (174). La V-ATPasa usualmente se localiza de forma apical a las membranas plasmáticas de las células epiteliales, hacia el lado citoplasmático de la membrana, y bombea H<sup>+</sup> hacia fuera. Este bombeo de protones permite siempre un voltaje trans-positivo, pero acompañado de diversos eventos este voltaje puede desaparecer y el trans-compartimento puede volverse ácido, básico, o neutral, dependiendo de la naturaleza de canales paralelos o portadores que acompañan el protón (178). Por esta razón, las V-ATPasas pueden proporcionar energía a la membrana, regular el pH intracelular y causar una acidificación o alcalinización extracelular (174).

La estructura, función, biogénesis y regulación de las V-ATPasas ha sido ampliamente revisada por Stevens y Forgac (179), por lo que explicaremos las subunidades estructurales de V-ATPasa según la nomenclatura propuesta por dichos autores.

Se ha visto que las V-ATPasas son casi idénticas en la composición de sus subunidades en todas las células eucarióticas. Están compuestas por 2 estructuras distintas: un sector catalítico periférico ( $V_1$ ) y un sector de membrana hidrofóbico ( $V_0$ ). El sector catalítico está compuesto por 5 polipéptidos diferentes conocidos como subunidades A, B, C, D y E en orden decreciente, por el peso molecular de 72 a 33kDa, respectivamente. Recientes avances en el conocimiento acerca del mecanismo de acción de las F-ATPasas han clarificado las relaciones entre la función y la estructura de cada una de las subunidades individuales de las enzimas. A cada subunidad de la V-ATPasa se le asigna de una a cuatro partes de un complejo mecanoquímico (174) (Figura 7):

- 1.-Unidad catalítica
- 2.-Tronco o tallo
- 3.-Gancho
- 4.-Turbina



**Figura 7.** Subunidades estructurales de V-ATPasa. Distribución de varias subunidades en 4 partes funcionales de la enzima: *Catalytic*: unidad catalítica; *Shaft*: tronco o tallo; *Hook*: gancho; *Turbine*: turbina.

La función principal del sector catalítico es unir ATP y catalizar la hidrólisis de ATP, mientras que la función principal del sector de membrana es conducir

protones a través de la membrana (174). La energía de estos dos procesos es capaz de catalizar cambios conformacionales inducidos por la vía mecanoquímica. De acuerdo con este concepto, Paul Boyer (180) propuso hace 2 décadas que la hidrólisis catalizada por las subunidades alfa y beta de F-ATPasa inducirán un momento de rotación en el tallo que rotará la turbina y las bombas de protones a través de la membrana. El gancho previene la rotación de la unidad catalítica (Figura 7).

A continuación, analizaremos la estructura y función de las subunidades individualmente (174):

#### 1.-Subunidades catalíticas

1A.- Subunidad A: peso molecular de 68kDa. Su función es unir ATP y catalizar su hidrólisis.

1B.- Subunidad B: tiene un peso molecular de 57kDa. Funciona como una subunidad reguladora que contiene el sitio de unión de ATP y, además, podría contribuir como remanente importante para la función catalítica de la subunidad A.

#### 2.-Tallo o tronco

2A.- Subunidad D: peso molecular de 28kDa. Podría jugar un papel importante en la unión entre la hidrólisis de ATP y el bombeo de protones. Esta subunidad se comporta como el tallo rotatorio que adquiere su momento de rotación de cambios conformacionales en la subunidad A y da el torque a la turbina y los protones en el sector de membrana.

#### 3.-Gancho

3A.- Subunidad E: peso molecular de 27kDa. La estructura de esta subunidad contiene alfa-hélices alongadas, por lo que se ha sugerido que podría

ser una parte del tallo. Aunque hoy día se propone que el estatus funcional de la subunidad E sea en el gancho, que era considerado en el pasado parte del tallo.

3B.- Subunidad G: su peso molecular es de 13kDa. Esta subunidad presenta una homología significativa con la subunidad b de las F-ATPasas. Puesto que la subunidad b es una parte de  $F_0$  y funciona como un gancho que previene la rotación de las subunidades catalíticas, se ha sugerido que la subunidad G puede tener una función similar en las V-ATPasas actuando como parte del gancho durante la reacción catalítica.

#### 4.-Turbina

4A.- Subunidad C: peso molecular de 16kDa. Se cree que es la principal subunidad relacionada con la translocación de protones a través de la membrana.

4B.- Subunidades C' y C'': peso molecular de 17 y 19kDa respectivamente. Cada una de estas subunidades parece ser esencial para la actividad de la enzima.

4C.- Subunidad A: peso molecular de 95kDa. Una copia de esta subunidad es necesaria para la actividad y/o el armazón de la enzima.

4D.- Subunidad d: peso molecular de 40kDa. Se asocia periféricamente con el sector de membrana  $V_0$  en la cara citosólica de la membrana, pero contiene un segmento transmembrana no aparente.

#### 5.-Otras subunidades

5A.- Subunidad F: peso molecular de 14kDa. La inhibición de la actividad de ATPasa (la hidrólisis de ATP y el transporte de protones) puede producirse por anticuerpos específicos para esta subunidad.

5B.- Subunidad H: peso molecular de 54kDa. Esta subunidad es probable que funcione en la regulación de la actividad de la enzima y en la comunicación entre la V-ATPasa y las proteínas conectadas con otros procesos celulares.

Se sabe que las células tumorales se desarrollan en un microambiente hipóxico con un pH extracelular ácido. Para sobrevivir en este ambiente, las células tumorales deben exhibir un sistema regulador del pH citosólico adinámico. Se piensa que las V-ATPasas, que normalmente residen en las organelas ácidas, se localizan también en la superficie celular, regulando el pH y exacerbando la habilidad migratoria de las células metastáticas. Las V-ATPasas pueden proporcionar energía a la membrana, regular el pH intracelular y causar una acidificación o alcalinización extracelular (174).

Datos inmunohistoquímicos revelaron que la V-ATPasa se localiza en la membrana plasmática de las células cancerígenas del cáncer de mama y que lo hace de forma prominente en las células altamente metastáticas y con menor intensidad en las células de bajo poder metastático. El flujo de protones vía V-ATPasa evaluado por espectroscopio fluorescente en células vivas fue mayor en las células más metastáticas que en las menos metastáticas. Curiosamente, las células con poco poder metastático usaban preferentemente los mecanismos de transporte basados en  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$ , mientras que células con alto poder metastático usaban V-ATPasas. Además, estas células eran más invasivas y migratorias que las de bajo poder metastático. Estos datos indican que las V-ATPasas localizadas en la membrana plasmática están implicadas en la adquisición de un fenotipo más metastático.

- **ATP6V1C1** (ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C, isoform 1)

Este gen, también conocido como *VATC*, *Vma5*, *ATP6C*, *ATP6D* ó

*FLJ20057*, se localiza en el brazo largo del cromosoma 8 en posición 22 (8q22.3). Codifica un componente vacuolar de la ATPasa (V-ATPasa), una multisubunidad enzimática que media la acidificación de las organelas intracelulares eucarióticas. La acidificación de organelas dependientes de V-ATPasa es necesaria para procesos intracelulares como clasificación de proteínas, activación de zimógeno, endocitosis mediada por receptores y generación de un gradiente protónico de vesículas sinápticas.

V-ATPasa se compone de un dominio V1 citosólico y un dominio V0 transmembrana. El dominio V1 consiste en: 3 subunidades A y 3 subunidades B, 2 subunidades G y subunidades C, D, E, F y H. El dominio V1 contiene el sitio catalítico de ATP y el dominio V0 consiste en 5 subunidades distintas: a, c, c', c'' y d. La subunidad C es análoga pero no homóloga a la gamma subunidad de las F-ATPasas. Dos variantes de transcripción alternativas que codifican distintas isoformas se han encontrado en este gen.

*ATP6V1C1* se ha encontrado en librerías de ADNc del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer (135) perteneciente a diversos tipos de tejidos: corteza suprarrenal, células B, hueso, médula ósea, encéfalo, cartílago, cerebro, cuello uterino, colon, oído, endocrino, ojo, feto, tracto gastrointestinal, genitourinario, célula germinal, cabeza y cuello, corazón, riñón, hígado, pulmón, nódulo linfático, linforreticular, glándula mamaria, músculo, nervios, ovarios, páncreas, islotes pancreáticos, sistema nervioso periférico, glándula pineal, glándula pituitaria, placenta, combinación de distintos tejidos, próstata, glándula salival, piel, bazo, célula madre, estómago, célula T, testículo, timo, tejido no caracterizado, útero y vascular.

En el Anexo II se muestra la información referente a este gen y su distribución en los distintos tejidos del organismo, según la base de datos del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer (135).

Se han descrito varias actividades funcionales según el Instituto Bioinformático Europeo (135) (Tabla 10):

<u>Actividades funcionales</u>
-biosíntesis de ATP
-transporte de protones acoplado a la síntesis de ATP
-transporte de iones
-transporte
-membrana plasmática
-complejo ATPasa de transporte de protones
-unión de ATP
-actividad transportadora de iones hidrógeno
-actividad ATPasa transportadora de hidrógeno con mecanismo rotacional
-actividad hidrolasa
-actividad hidrolasa catalizando el movimiento transmembrana de sustancias
-actividad transportadora

**Tabla 10.** Actividades funcionales del gen *ATP6V1C1* (135)

- **ATP6V0E** (*ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e*)

Este gen, también conocido como *M9.2*, *ATP6H*, *Vma21* ó *Vma21p*, se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 en posición 35 (5q35.1). Codifica un componente vacuolar de la ATPasa (V-ATPasa), una multisubunidad enzimática que media la acidificación de las organelas intracelulares eucarióticas. V-ATPasa se compone de un dominio V1 citosólico y un dominio V0 transmembrana. El dominio V1 consiste en un hexámero de 3 subunidades A y 3 subunidades B, 2

subunidades G plus, C, D, E, F y H. El dominio V1 contiene el sitio catalítico de ATP. El dominio V0 consiste en 5 subunidades distintas: a, c, c', c'' y d. La proteína codificada es parte de la subunidad V0.

*ATP6V0E* se ha encontrado en librerías de ADNc del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer (135) perteneciente a diversos tipos de tejidos: corteza suprarrenal, células B, hueso, médula ósea, encéfalo, cartílago, cerebro, colon, endocrino, esófago, ojo, feto, tracto gastrointestinal, genitourinario, célula germinal, cabeza y cuello, corazón, riñón, hígado, pulmón, nódulo linfático, linforreticular, glándula mamaria, músculo, nervios, ovario, páncreas, islotes pancreáticos, paratiroides, sistema nervioso periférico, glándula pituitaria, placenta, próstata, retina, glándula salival, piel, bazo, célula madre, estómago, célula T, testículo, tiroides, tejido no caracterizado, útero y vascular.

En el Anexo II se muestra la información referente a este gen y su distribución en los distintos tejidos del organismo, según la base de datos del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer (135).

Se han descrito varias actividades funcionales según el Instituto Bioinformático Europeo (135) (Tabla 11):

Actividades funcionales

- transporte de protones acoplado a la síntesis de ATP
- transporte de iones
- transporte de protones
- transporte
- integral de membrana
- fracción de membrana
- complejo ATPasa de transporte de protones
- actividad transportadora de iones hidrógeno
- actividad ATPasa transportadora de hidrógeno con un mecanismo rotacional
- actividad de síntesis de ATP transportando hidrógeno con un mecanismo rotacional
- actividad hidrolasa
- actividad transportadora

**Tabla 11.** Actividades funcionales del gen *ATP6V0E* (135)



## **4.- VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON MICROARRAYS DE ADN**

El análisis de la expresión génica mediante el uso de *arrays* de ADNc es claramente reproducible y fiable. Sin embargo, los resultados de estos ensayos, debido a la complejidad misma del proceso, pueden verse afectados por múltiples variables desde la preparación de la muestra al análisis de las imágenes finales. Entre otros problemas, la eficiencia de la reacción de retrotranscripción se ve afectada tanto por las enzimas empleadas como por los *primers* y estructuras secundarias del ARN mismo, con lo que esto puede afectar a la representación de los transcritos poco abundantes. Esto se une a que no existe un consenso sobre la significación de las diferencias en la intensidad de hibridación (10).

Actualmente, la tecnología de *arrays* es fundamentalmente útil a la hora de establecer un patrón general de expresión génica y de llevar a cabo un *screening* previo de expresión génica diferencial. La validación de tales resultados requiere un método alternativo como el *Northern blot*. La PCR en tiempo real permite evaluar la acumulación de producto durante la fase logarítmica de la reacción de PCR y actualmente es la estrategia más segura y reproducible para la cuantificación génica, y el método más utilizado para validar los resultados de expresión génica obtenidos mediante la tecnología de *arrays* (10, 181, 182). Hasta ese momento, los genes seleccionados han de ser considerados como candidatos a estar realmente implicados en el proceso de estudio sirviendo como listado de partida para dichas comprobaciones, aunque en muchos de los estudios en los

que se utiliza esta doble metodología, se demuestra que los resultados obtenidos con *microarrays* no difieren sustancialmente de los obtenidos con técnicas convencionales.

#### 4.1. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

La tecnología de la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) es un método que permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad. La clave en la **PCR cuantitativa** es la posibilidad de detectar **en tiempo real** la amplificación de un fragmento de interés. Combina el método de amplificación de la PCR desarrollado por Mullis, con la utilización de moléculas de fluorocromo para poder monitorizar paso a paso y de manera cuantificable el proceso de amplificación de un segmento específico de ADN de interés.

Esta técnica se realiza en un equipo que integra una PCR convencional y un espectrofluorímetro que determina la fluorescencia que se produce en el tubo de amplificación en todo momento a lo largo del proceso (Figura 8). El fluoróforo está presente constantemente en el medio de la reacción y la señal obtenida al final de cada ciclo de amplificación se representa en una gráfica frente al número de ciclos y se obtiene una curva que muestra el transcurso del proceso. El equipo utiliza un láser para emitir la luz que excita el fluoróforo y la tecnología de las cámaras de diodos computerizadas (CCD) para determinar la fluorescencia emitida a distintas longitudes de onda en función del fluoróforo que se utilice. La cámara CCD suele ser multicanal, lo que le permite realizar varios análisis simultáneos en el mismo tubo de PCR.

Para llevar a cabo esta técnica se necesita un termociclador con capacidad para detectar y medir la fluorescencia. La exactitud y la precisión de los aparatos de RT-PCR se ven afectadas, en gran medida, por la razón señal o ruido, la cual

depende del formato de detección (fluoróforos) y de la calidad del sistema óptico. Otro parámetro a tener en cuenta es la homogeneidad de la temperatura dentro del instrumento, ya que la menor desviación de la temperatura llevaría a una cuantificación errónea.



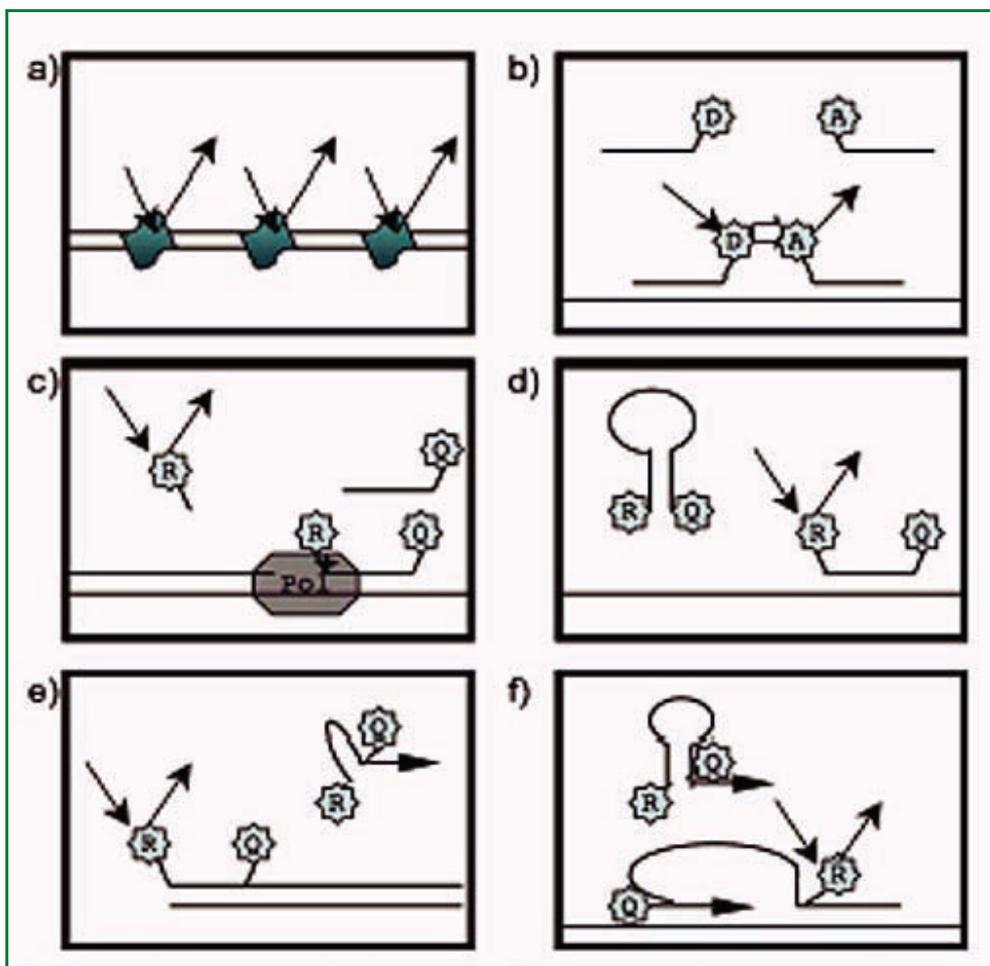
**Figura 8.** PCR Cuantitativo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. Applied Biosystems.

Las estrategias de marcaje disponibles son múltiples (Figura 9), pero las más ampliamente utilizadas se basan en sondas *Taqman* o *SYBR green*.

El *SYBR-Green I* (Figura 9a) es un fluoróforo específico de ADN bicatenario muy usado en la RT-PCR. Este fluoróforo se une con gran afinidad al surco menor del ADN bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces. Aunque de gran sensibilidad, es un marcador de ácidos nucleicos en general y por tanto no asegura la especificidad. Este formato de detección necesita una puesta a punto previa para que la PCR no amplifique productos inespecíficos que luego el fluoróforo detectaría, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados.

Para detectar específicamente una secuencia se utilizan sondas de oligonucleótidos etiquetadas con fluoróforos con distintas formas de detección. La intensidad de la señal se relaciona con la cantidad de producto de PCR de dos formas: a) una disminución del amortiguamiento de la fluorescencia dependiente

del producto, en la que el fluoróforo, la molécula delatora, y el amortiguador, *quencher*, se separan al unirse la sonda a la diana (Figura 9c, d, e, f); b) un incremento de la transferencia de energía resonante fluorescente, FRET, del donador al fluoróforo aceptor al quedar cercanos cuando se une la sonda a la diana (Figura 9b).



**Figura 9.** Formatos de detección. D: donador; A: aceptor; R: delator (fluoróforo); Q: amortiguador. a) SYBR-Green I; b) sondas de hibridación; c) sondas "taqman"; d) balizas moleculares; e) sondas "Sunrise"; f) sondas escorpión

Para el análisis cuantitativo del producto, se analiza la curva de amplificación. El número de copias de la diana al inicio de la reacción se puede cuantificar con gran precisión a través del **ciclo umbral (Ct)**. El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde. De esta manera, utilizando muestras patrones que contienen diluciones seriadas de concentraciones conocidas de la diana, se construye una recta de calibrado que relaciona los Ct con el logaritmo de la cantidad inicial de molde (N<sub>0</sub>). Extrapolando en esta recta los Ct obtenidos para las muestras problema, se puede estimar el valor de sus N<sub>0</sub>.

La eficiencia de la reacción también se puede calcular a partir de los Ct de los patrones. Para lograr una cuantificación correcta, la eficiencia de patrones y muestras problema deben ser iguales, lo que implica una puesta a punto previa de la PCR.

En caso de conocer la concentración absoluta de moléculas de molde en los patrones, los resultados serán absolutos. Pero la cuantificación absoluta no siempre es necesaria. Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos se elige como patrón un transcrito de referencia que no varíe su expresión en los tratamientos a analizar, normalmente un gen de mantenimiento o *housekeeping*. Comparando los Ct del gen de referencia con el gen problema en muestras tratadas y sin tratar, se pueden determinar cambios relativos en la expresión del gen problema.



## **II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**



**-HIPÓTESIS DE TRABAJO:** Los genes *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*, *ATP6V1C1* y *ATP6V0E* se sobreexpresan en el COCE en relación a la mucosa oral normal. La confirmación o no de esta sobreexpresión puede informarnos acerca de los mecanismos moleculares en los que estos genes están implicados en la aparición y desarrollo del COCE.

**-OBJETIVOS:**

- 1.- Estudiar mediante RT-qPCR en el COCE y en la mucosa oral normal la expresión de los genes *ADRBK2*, *ADRB1* y *ADRA2B*, pertenecientes a la familia de los receptores adrenérgicos.
- 2.- Estudiar mediante RT-qPCR en el COCE y en la mucosa oral normal la expresión del gen *AXIN 2*.
- 3.- Estudiar mediante RT-qPCR en el COCE y en la mucosa oral normal la expresión de las ATPasas *ATP6V1C1* y *ATP6V0E*.



### **III. MATERIAL Y MÉTODO**



El presente estudio ha recibido el visto bueno del Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela.

## **1.- SELECCIÓN DE PACIENTES**

Se seleccionan 8 pacientes intervenidos quirúrgicamente de forma consecutiva de COCE en el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela en el período de tiempo comprendido entre marzo de 2004 y marzo de 2005, que no hayan recibido tratamiento de quimioterapia ni radioterapia anteriormente al tratamiento quirúrgico.

De cada historia clínica se tienen en cuenta las siguientes variables: edad, sexo, consumo de tabaco, localización del tumor y estadio del tumor.

### **1.1.- Edad y sexo**

La edad media de presentación es de 62,12 años  $\pm$  22,57 (rango 25-92).

De los 8 pacientes, 4 (50%) son hombres y 4 (50%) mujeres.

### **1.2.-Consumo de tabaco**

De los 8 pacientes, 5 (62,5%) son fumadores y 3 (37,5%) no fumadores; considerando como fumador aquel paciente que lleve 5 ó más años fumando.

### 1.3.- Localización del tumor

En los ocho casos se trata de tumores primarios intraorales: 5 localizados en la lengua (62,5%), 2 en el paladar blando (25%) y 1 en la premaxila (12,5%) (Tabla 12).

LOCALIZACIÓN	Nº DE CASOS	%
Lengua	5	62,5
Paladar Blando	2	25
Premaxila	1	12,5

**Tabla 12.** Localización del tumor primario

### 1.4.- Estadío del tumor

Se han clasificado los tumores en función del estadio tumoral en el momento del diagnóstico según la 5ª edición del Manual de Estadía del Cáncer del *American Joint Committee on Cancer* (42).

En el momento del diagnóstico, uno de los tumores está en estadio I (12,5%), 2 en estadio II (25,%), 1 en estadio III (12,5%) y 4 en estadio IV (50%).

En la Tabla 13 se muestra la información correspondiente a las variables estudiadas en cada paciente.

PACIENTES	1	2	3	4	5	6	7	8
SEXO	V	M	M	V	M	M	V	V
EDAD	57	51	90	54	25	92	52	76
TABACO	Sí	Sí	No	Sí	No	No	Sí	Sí
LOCALIZAC TUMOR	lengua	p.blando	lengua	p.blando	lengua	premaxila	lengua	lengua
ESTADIO TUMOR	I	IV	II	IV	IV	IV	III	II

**Tabla 13.** Variables de estudio en cada paciente

Los pacientes fueron informados de la naturaleza del estudio en el que iban a participar y dieron su autorización por escrito firmando el correspondiente consentimiento informado, según el modelo detallado en el Anexo III.

## 2.- SELECCIÓN DE LOS GENES A ESTUDIO

Como nos hemos referido anteriormente, partimos de un estudio previo realizado en nuestra unidad acerca del análisis de la expresión génica diferencial del COCE en relación a la mucosa oral normal mediante *microarrays* de ADN (11). De los 426 genes que en este trabajo mostraron una expresión diferencial entre mucosa tumoral y mucosa normal, decidimos centrarnos en los genes sobreexpresados en el tejido tumoral. De los 322 genes sobreexpresados, seleccionamos 6 de ellos que cumplen una serie de parámetros estadísticos y que pueden ser interesantes dada su función biológica.

Para su selección, aplicamos un método adicional de restricción estadística, el *z-score*, que permite eliminar aquellos genes con valores poco homogéneos

entre las diferentes muestras. Los valores de restricción utilizados son:  $z\text{-score} > 1$  y  $p < 0.05$ .

Los genes seleccionados son:

-3 genes pertenecientes a la familia de los receptores adrenérgicos: **ADRBK2**, **ADRB1**, **ADRA2B**. Estos 3 subtipos familiares están sobreexpresados sin existir previamente una relación clara documentada con el cáncer.

-El gen **AXIN 2**, por ser previamente conocida su relación con el cáncer y la proliferación celular mediante la regulación de beta-catenina, ampliamente estudiado en el cáncer de colon.

-Las ATPasas **ATP6V1C1** y **ATP6V0E**, por ser 2 genes de la misma familia y cuya actividad como bomba de protones reguladora del pH ya ha sido descrita en relación al desarrollo y crecimiento del tumor en otros tipos de cáncer.

Para el estudio del nivel de expresión de los genes seleccionados, se analiza cada gen por separado viendo las diferencias existentes entre la mucosa oral normal y el tejido tumoral en cada uno de los pacientes estudiados.

### 3.- METODOLOGÍA DE TRABAJO

#### 3.1.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

A cada paciente se le practica una toma de biopsia del tumor y otra de tejido sano, siguiendo la técnica convencional. La toma de tejido sano se realiza de la misma región en la que se encuentra el tumor, pero en el lado contralateral de la boca. Las muestras se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido (temperatura de  $-195^{\circ}\text{C}$ ) tras la toma de la biopsia, y permanecen almacenadas a dicha temperatura hasta su procesado.

### 3.2.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras congeladas siguen un proceso de extracción de ácidos nucleicos (ARN) y retrotranscripción para obtener ADNc.

Todas las muestras son procesadas en el curso de una semana. En todos los casos el tejido tumoral y su correspondiente normal fueron procesados simultáneamente, todo ello para evitar diferencias en cuanto al almacenamiento o bien debidas al estado de los productos empleados que pudieran alterar la relación de cantidad y calidad entre ambos tejidos. Todo el experimento se realiza por duplicado.

Los pasos a seguir son los siguientes:

#### 1.- Homogeneización

Se separa un fragmento de aproximadamente 30 mg de tejido congelado, que se tritura lentamente en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta conseguir su pulverización completa. Entre muestra y muestra se lava cuidadosamente el mortero y todo el equipo con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC).

#### 2.-Extracción del ARN total

A partir del tejido homogeneizado se obtiene el ARN total empleando el kit **RNeasy minikit** (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo especificado. Este kit emplea una membrana para retener el ARN que, tras un lavado para eliminar impurezas, se eluye.

La integridad del ARN se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### 3.-Retrotranscripción

A partir del ARN obtenido se procede a una reacción de retrotranscripción empleando la **transcriptasa reversa AMV** (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y **Random Primer** (Roche). Las cantidades de producto para un volumen final de 20 microlitros vienen especificadas por el fabricante.

Se incuba la mezcla a 37°C durante una hora y tras la desnaturalización de la transcriptasa a 65°C durante 10 minutos se almacena el ADNc obtenido a -20°C hasta su utilización.

Para comprobar la integridad y calidad del ADNc se realiza la amplificación del gen *housekeeping* Glucos-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PDH*) en el equipo de PCR en tiempo real "**LigthCycler**" (Roche).

### 3.3.- CUANTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL

Se cuantifica la presencia en las muestras de transcritos de los genes *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*, *ATP6V1C1* y *ATP6V0E*, mediante el empleo de **sondas taqman**.

En los ensayos basados en la actividad 5' nucleasa (Figura 10), una sonda oligonucleotídica específica hibrida con un secuencia situada entre los dos *primers* de amplificación. Esta sonda está marcada con un fluoróforo en su extremo 5' llamado **reporter** y otro fluoróforo en el extremo 3' llamado **quencher**.

La sonda presenta una modificación en su extremo 3' que impide su extensión durante la amplificación.

La ruptura de la sonda por la actividad 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa durante la elongación de la cadena libera el *reporter* y, consiguientemente, de la proximidad del *quencher* 3', incrementándose la intensidad de la emisión del *reporter* (Figura 10).

El ciclo en el que la intensidad de la emisión de una muestra sobrepasa la

línea de base (ruido de fondo), se conoce como ciclo umbral (**Ct**, *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración de secuencias diana de la sonda: a mayor concentración de ADNc diana, menor es el número de ciclos de amplificación requeridos para detectarla.

**Cromo-4** (MJ Research, Cambridge, Estados Unidos) es un equipo de tiempo real que emplea placas de 96 pocillos. Durante la PCR la sonda taqman que hibrida con la secuencia diana se rompe debido a la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa, liberando el fluoróforo *reporter* (6-carboxi-fluoresceína, FAM) del *quencher* (6-carboxi-tetrametil-rodamina, TAMRA). Un láser excita los electrones de las moléculas del *reporter*, lo que se traduce en una emisión entre 500 y 600 nm que es capturada a través de cables de fibra óptica y focalizada en un detector. La señal es procesada y analizada por medio de un *software* instalado en el equipo.

Las intensidades de las emisiones de las reacciones se miden secuencialmente cada pocos segundos, evaluándose la relación de intensidades entre los fluoróforos del *reporter* y del *quencher*. Dado que la intensidad del fluoróforo del *quencher* varía mínimamente durante la PCR, se puede emplear para normalizar las variaciones en la intensidad del *reporter*.

Durante la PCR el *software* calcula un valor denominado Rn según la ecuación:  **$R_n = (R_{n+}) - (R_{n-})$** .

Rn+ es la intensidad del *reporter* dividida por la intensidad del *quencher* en el ciclo n de la PCR, y Rn- es la intensidad del *reporter* dividida por la intensidad del *quencher* del ciclo n-1 previo de amplificación. Así, Rn representa la cantidad de sonda hibridada y rota por la actividad 5' nucleasa. Un valor de Rn se calcula por cada ciclo durante la fase de elongación y se representa contra el número de ciclos en un diagrama, generándose así una curva de amplificación (Figura 11).

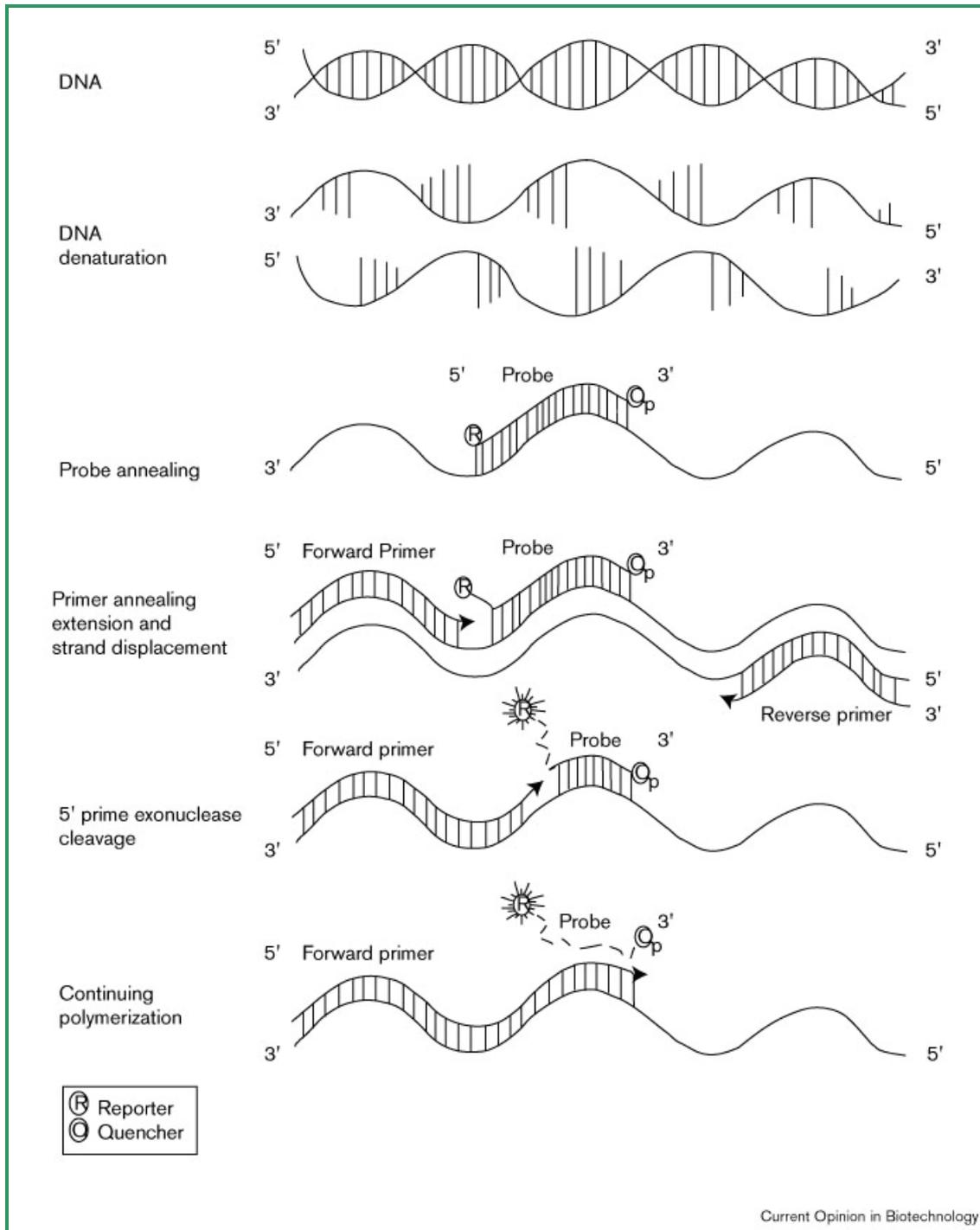
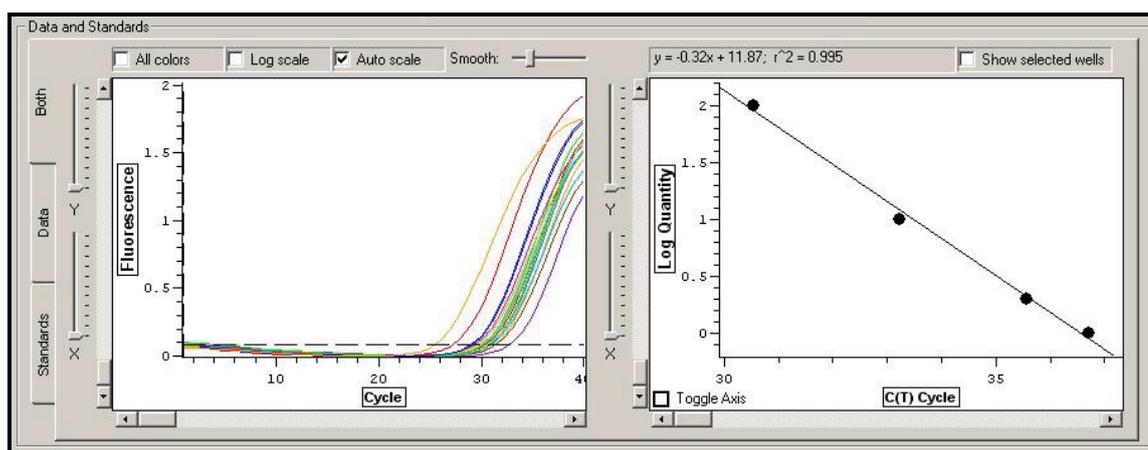


Figura 10. Cuantificación por PCR en tiempo real.

Los ensayos taqman para cada uno de los genes fueron diseñados por Applied Biosystems (Foster City, Estados Unidos), (*Assay-by-design*). Las mezclas provistas incluyen todos los reactivos necesarios salvo el ADNc de la muestra y funcionan con un protocolo único y común a todos.

En la Figura 11 se muestra la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para uno de los genes estudiados, donde se representa la intensidad de señal del fluoróforo frente al número de ciclos. Esta curva mide la cuantificación del ARNm; es decir, el nivel de expresión de un gen.



**Figura 11.** A la izquierda aparece la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para uno de los genes estudiados, donde la línea horizontal discontinua se corresponde con el Ct: ciclo en el que la intensidad de la emisión de una muestra sobrepasa la línea de base (ruido de fondo). La gráfica de la derecha representa la recta de calibrado del gen. El valor de  $r$  nos indica la calidad de la curva (su valor se comprende entre 0 y 1): cuanto más cercano sea a 1 la calidad de la curva es mayor.

#### 4.- NORMALIZACIÓN DE DATOS

Las curvas de expresión de cada gen se normalizan utilizando un gen *housekeeping* (*GUS*) que se expresa siempre y en una tasa constante en todas

las células.

Para hallar el incremento/disminución de la expresión del gen nos basamos siempre en los valores del gen *GUS*: si conocemos las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón del gen *GUS* y la cantidad de ADNc inicial para el gen estudiado en la muestra de mucosa normal, podemos establecer una relación para hallar la cantidad de ADNc que correspondería al gen estudiado en la muestra de tumor. Una vez realizada esta operación, hallamos la diferencia entre el valor que tenemos en la muestra tumoral del gen estudiado y el que hemos obtenido tras realizar los cálculos con los valores de referencia, y vemos si esta diferencia tiene un valor positivo o negativo: si el valor es positivo significa que se está expresando más en el tumor que en el tejido normal y viceversa si el valor es negativo. Con el resultado obtenido establecemos una nueva relación, con la que obtenemos el valor de expresión del gen expresado en porcentaje.

Ejemplo:

Muestras	ADRBK2	GUS
1-Tumor	110,219	176,733
1-Normal	91,3999	175,449

$$\frac{175,449}{176,733} = \frac{91,3999}{X} \quad X = 92,07$$
  

$$110,219 - 92,07 = +18,15$$
  

$$\frac{92,07}{18,15} = \frac{100}{X} \quad X = +19,71\%$$

## 5.- ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN

Con los valores correspondientes al incremento/disminución de la expresión en porcentaje de cada gen en cada paciente obtenemos el nivel de expresión de cada gen. Los valores positivos se corresponden con sobreexpresión en la muestra tumoral y los valores negativos se corresponden con subexpresión en la muestra tumoral.

## 6.- ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para verificar la existencia de asociación entre la expresión del gen y el tumor, se utiliza la **prueba de los signos**. Dado que se intenta la confirmación de la sobreexpresión del gen se utilizan pruebas estadísticas de una cola (o unilaterales).

Consideramos sobreexpresión del gen cuando hay un 5% ó más de expresión en el tumor que en el tejido sano.

Para verificar la posible asociación entre las distintas variables estudiadas (edad, sexo, consumo de tabaco, localización del tumor y estadio del tumor) y el porcentaje de sobreexpresión del gen en el tejido tumoral, se utiliza la prueba **U de Mann-Whitney**.

Se consideran significativos los valores de  $p < 0.05$ .



## **IV. RESULTADOS**



## 1.- ESTUDIO DE LOS GENES

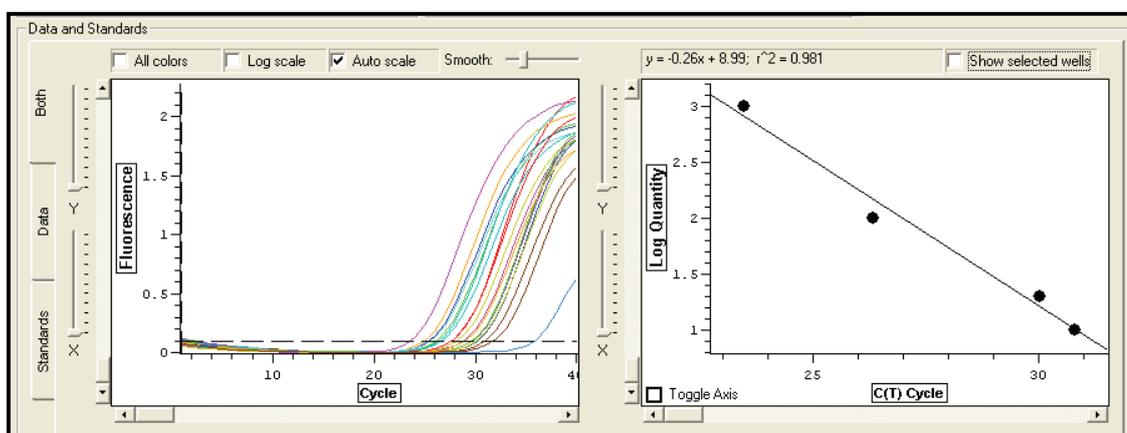
### 1.1.- *ADRBK2* (adrenergic, beta, receptor kinase 2)

En la Tabla 14 se muestran los Ct y las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor empleando la curva patrón de *ADRBK2* para todas las muestras de mucosa normal y tumoral en los 8 pacientes estudiados. Se observan los valores de las réplicas 1 y 2 (puesto que todo el experimento se realiza por duplicado).

Type	Label	Réplica 1		Réplica 2	
		C(T)	cantidad	C(T)	cantidad
Sample	1-Tumor	27.332	110.219	26.197	121.379
Sample	1-Normal	28.647	91.3999	28.928	88.937
Standard	Ct- <i>ADRBK2</i> -1	23.232	1000	23.417	1000
Sample	2-Tumor	25.801	137.05	24.060	145.855
Sample	2-Normal	29.754	78.0748	28.150	84.294
Standard	Ct- <i>ADRBK2</i> -01	26.104	100	27.127	100
Sample	3-Tumor	25.117	151.065	27.219	140.753
Sample	3-Normal	29.280	83.5297	28.111	89.2416
Standard	Ct- <i>ADRBK2</i> -050	29.699	20	29.715	20
Sample	4-Tumor	24.627	161.979	24.071	165.437
Sample	4-Normal	27.313	110.512	27.037	30.3951
Standard	Ct- <i>ADRBK2</i> -001	30.490	10	27.131	10
Sample	5-Tumor	28.446	94.0605	28.129	99.416
Sample	5-Normal	35.421	34.8502	34.517	40.831
Sample	6-Tumor	26.361	126.549	27.707	119.815
Sample	6-Normal	29.334	82.8851	29.052	89.423
Sample	7-Normal	27.945	100.999	26.411	112.771
Sample	7-Tumor	29.254	83.8359	28.783	90.735
Sample	8-Normal	31.367	62.0617	30.066	70.098
Sample	8-Tumor	25.226	148.747	25.088	152.242

**Tabla 14.** Ct y cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor para el gen *ADRBK2*

En la Figura 12 se muestra la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ADRBK2*, donde se representa la intensidad de señal del fluoróforo frente al número de ciclos.



**Figura 12.** A la izquierda aparece la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ADRBK2*, donde la línea horizontal discontinua se corresponde con el Ct. La gráfica de la derecha representa la recta de calibrado del gen. El valor de r nos indica la calidad de la curva.

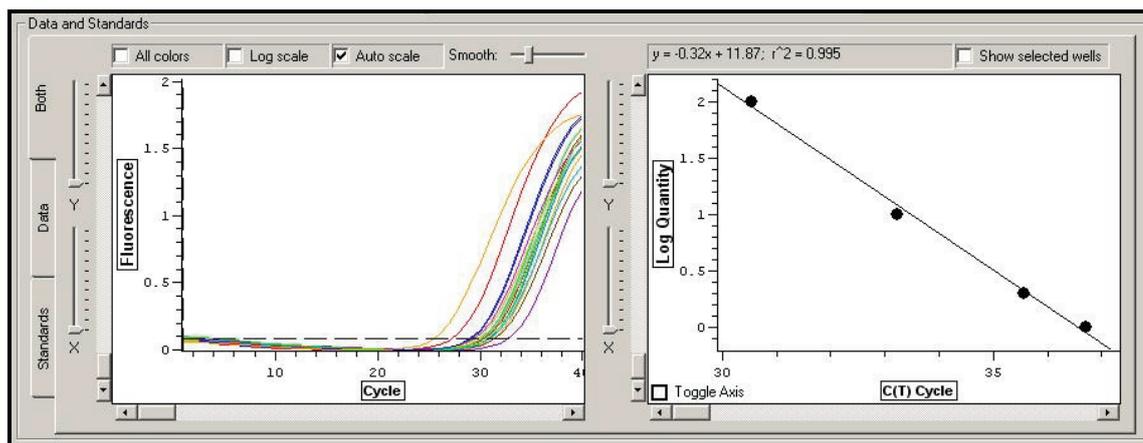
### 1.2.- *ADRB1* (adrenergic, beta-1-, receptor)

En la Tabla 15 se muestran los Ct y las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor empleando la curva patrón de *ADRB1* para todas las muestras de mucosa normal y tumoral en los 8 pacientes estudiados. Se observan los valores de las réplicas 1 y 2.

Type	Label	Réplica 1		Réplica 2	
		C(T)	cantidad	C(T)	cantidad
Sample	1-Tumor	30.772	67.5433	29.306	73.968
Sample	1-Normal	29.976	75.6448	30.032	69.303
Sample	2-Tumor	30.219	73.0723	29.047	80.972
Sample	2-Normal	31.188	63.666	30.072	70.304
Sample	3-Tumor	29.341	82.7999	28.084	90.171
Sample	3-Normal	28.141	98.2255	27.265	104.176
Sample	4-Tumor	31.415	61.6401	30.196	69.062
Sample	4-Normal	31.205	63.5058	30.718	70.623
Sample	5-Tumor	29.217	84.2826	28.340	90.538
Sample	5-Normal	33.138	48.2307	32.670	52.698
Standard	Ct- <i>ADRB1</i> -1	30.001	1000	30.551	1000
Sample	6-Tumor	30.445	70.7605	29.914	79.666
Sample	6-Normal	30.859	66.7175	31.176	60.531
Standard	Ct- <i>ADRB1</i> -01	33.633	100	33.221	100
Sample	7-Normal	31.447	61.3584	30.355	68.769
Sample	7-Tumor	30.581	69.4072	30.107	72.866
Standard	Ct- <i>ADRB1</i> -05	36.214	20	35.579	20
Sample	8-Normal	29.939	76.0474	29.045	83.234
Sample	8-Tumor	25.757	137.912	23.437	125.893
Standard	Ct- <i>ADRB1</i> -001	36.092	10	36.705	10

**Tabla 15.** Ct y cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor para el gen *ADRB1*

En la Figura 13 se muestra la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ADRB1*, donde se representa la intensidad de señal del fluoróforo frente al número de ciclos.



**Figura 13.** A la izquierda aparece la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ADRB1*, donde la línea horizontal discontinua se corresponde con el Ct. La gráfica de la derecha representa la recta de calibrado del gen. El valor de r nos indica la calidad de la curva.

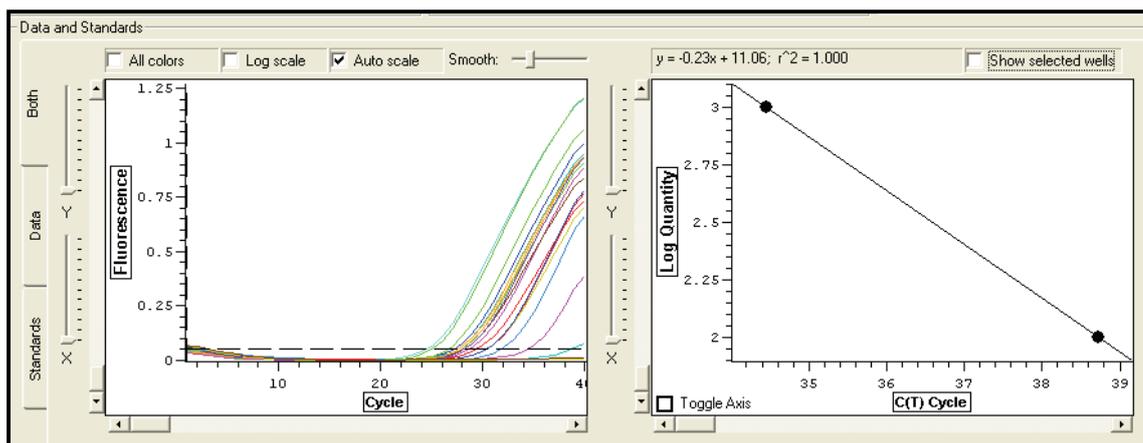
### 1.3.- **ADRA2B** (*adrenergic, alpha-2B-, receptor*)

En la Tabla 16 se muestran los Ct y las cantidades deADNc inicial calculadas a partir de dicho valor empleando la curva patrón de *ADRA2B* para todas las muestras de mucosa normal y tumoral en los 8 pacientes estudiados. Se observan los valores de las réplicas 1 y 2.

Type	Label	Réplica 1		Réplica 2	
		C(T)	cantidad	C(T)	cantidad
Sample	1-Tumor	30.266	72.5856	31.664	69.529
Sample	1-Normal	28.395	94.7455	27.092	100.331
Standard	Ct-ADRA2B-1	35.171	1000	33.916	1000
Sample	2-Tumor	28.685	90.9024	29.473	85.367
Sample	2-Normal	31.149	64.0177	30.161	71.353
Standard	Ct-ADRA2B-01	None	100	None	100
Sample	3-Tumor	27.979	100.516	26.825	120.238
Sample	3-Normal	25.692	139.187	24.516	155.940
Standard	Ct-ADRA2B-050	None	20	38.508	20
Sample	4-Tumor	28.629	91.6309	28.667	85.420
Sample	4-Normal	31.214	63.4264	30.009	70.476
Standard	Ct-ADRA2B-001	30.490	10	38.906	10
Sample	5-Tumor	29.473	81.2609	28.038	88.342
Sample	5-Normal	32.558	52.3815	33.122	47.789
Sample	6-Tumor	28.349	95.3634	27.695	102.749
Sample	6-Normal	29.042	86.4008	28.199	93.474
Sample	7-Normal	31.184	63.6967	30.479	75.446
Sample	7-Tumor	27.271	111.168	26.566	130.250
Sample	8-Normal	29.031	86.5388	28.121	92.637
Sample	8-Tumor	25.263	147.964	23.564	166.960

**Tabla 16.** Ct y cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor para el gen *ADRA2B*

En la Figura 14 se muestra la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ADRA2B*, donde se representa la intensidad de señal del fluoróforo frente al número de ciclos.



**Figura 14.** A la izquierda aparece la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ADRA2B*, donde la línea horizontal discontinua se corresponde con el Ct. La gráfica de la derecha representa la recta de calibrado del gen. El valor de  $r$  nos indica la calidad de la curva.

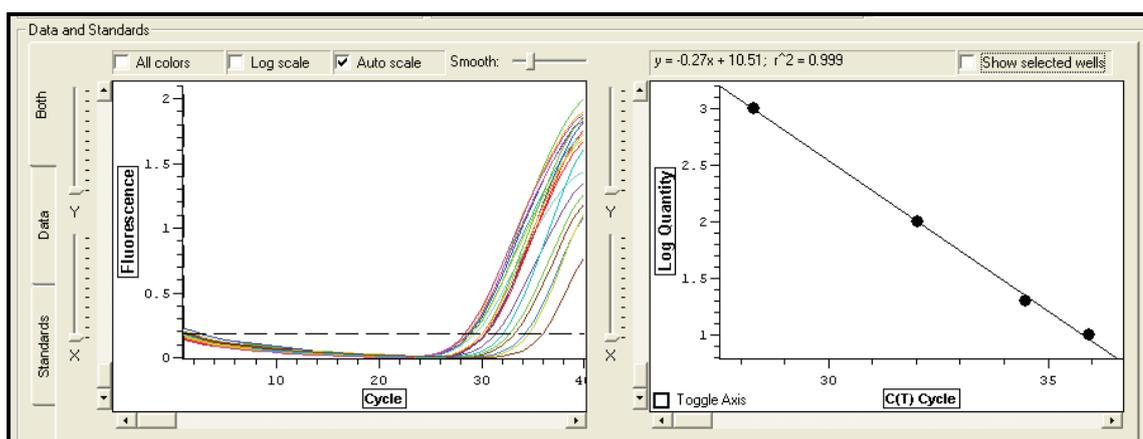
#### 1.4.- *AXIN 2*

En la Tabla 17 se muestran los Ct y las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor empleando la curva patrón de *AXIN2* para todas las muestras de mucosa normal y tumoral en los 8 pacientes estudiados. Se observan los valores de las réplicas 1 y 2.

Type	Label	Réplica 1		Réplica 2	
		C(T)	cantidad	C(T)	cantidad
Sample	1-Tumor	30.190	40.9796	28.982	45.0456
Sample	1-Normal	29.746	46.818	28.526	52.0238
Standard	Ct-AXIN2-1	28.100	1000	27.405	1000
Sample	2-Tumor	28.542	67.1992	27.646	68.691
Sample	2-Normal	30.158	41.3741	29.398	39.5065
Standard	Ct-AXIN2-01	31.805	100	30.612	100
Sample	3-Tumor	28.622	65.594	27.750	66.4801
Sample	3-Normal	29.744	46.8465	28.989	44.9441
Standard	Ct-AXIN2-050	34.302	20	33.471	20
Sample	4-Tumor	28.215	74.1231	27.525	71.3575
Sample	4-Normal	30.001	43.3691	29.306	40.6619
Standard	Ct-AXIN2-001	35.684	10	34.492	10
Sample	5-Tumor	28.366	70.8411	27.692	67.6911
Sample	5-Normal	33.962	13.2075	33.123	12.1826
Sample	6-Tumor	28.784	62.4913	27.871	63.9762
Sample	6-Normal	31.041	31.7383	30.118	31.4708
Sample	7-Normal	28.857	61.1282	28.115	59.2402
Sample	7-Tumor	32.394	21.1481	31.583	19.814
Sample	8-Normal	32.896	18.189	32.161	16.5088
Sample	8-Tumor	29.086	57.0715	28.034	60.778

**Tabla 17.** Ct y cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor para el gen *AXIN 2*

En la Figura 15 se muestra la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *AXIN2*, donde se representa la intensidad de señal del fluoróforo frente al número de ciclos.



**Figura 15.** A la izquierda aparece la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *AXIN2*, donde la línea horizontal discontinua se corresponde con el Ct. La gráfica de la derecha representa la recta de calibrado del gen. El valor de  $r$  nos indica la calidad de la curva.

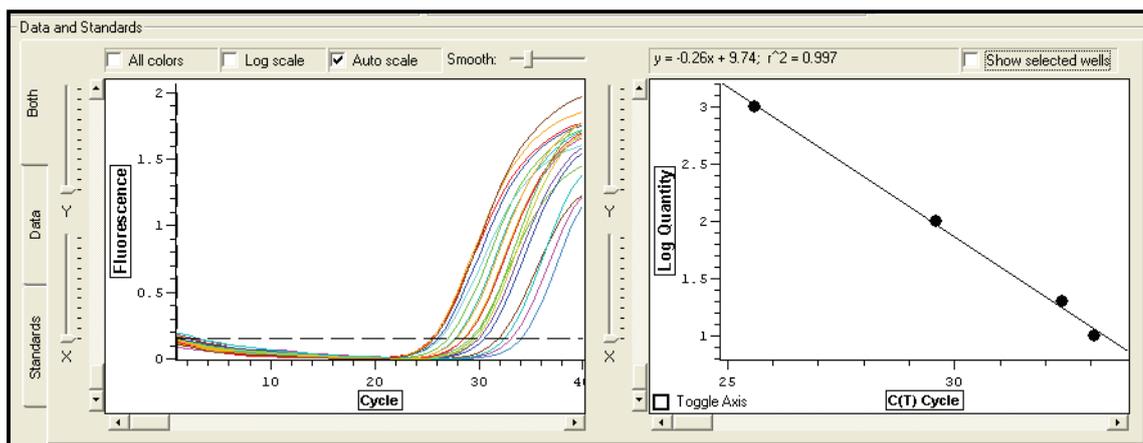
#### 1.5.- *ATP6V1C1* (ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal 42KDa, V1 subunit C, isoform 1)

En la Tabla 18 se muestran los Ct y las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor empleando la curva patrón de *ATP6V1C1* para todas las muestras de mucosa normal y tumoral en los 8 pacientes estudiados. Se observan los valores de las réplicas 1 y 2.

Type	Label	Réplica 1		Réplica 2	
		C(T)	cantidad	C(T)	cantidad
Sample	1-Tumor	25.558	164.537	24.385	192.349
Sample	1-Normal	27.982	79.5055	26.596	95.7064
Sample	2-Tumor	27.132	102.587	26.097	112.016
Sample	2-Normal	30.559	36.6777	29.639	36.613
Sample	3-Tumor	26.151	137.711	25.177	149.772
Sample	3-Normal	29.505	50.33	28.504	52.3872
Sample	4-Tumor	25.571	163.902	24.804	168.524
Sample	4-Normal	28.737	63.3701	28.116	59.2237
Sample	5-Tumor	28.735	63.4133	27.600	69.6984
Sample	5-Normal	34.116	12.6141	33.749	9.99717
Standard	Ct-ATP6V1C1-1	25.752	1000	24.671	1000
Sample	6-Tumor	27.856	82.5592	26.796	89.8478
Sample	6-Normal	30.057	42.6461	29.111	43.2452
Standard	Ct-ATP6V1C1-01	29.745	100	28.764	100
Sample	7-Normal	28.601	66.0234	27.802	65.3902
Sample	7-Tumor	29.245	54.4144	28.320	55.5165
Standard	Ct-ATP6V1C1-05	32.481	20	31.493	20
Sample	8-Normal	31.946	24.1935	31.168	22.5876
Sample	8-Tumor	26.386	128.344	25.637	129.555
Standard	Ct-ATP6V1C1-001	33.174	10	32.290	10

**Tabla 18.** Ct y cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor para el gen *ATP6V1C1*

En la Figura 16 se muestra la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ATP6V1C1*, donde se representa la intensidad de señal del fluoróforo frente al número de ciclos.



**Figura 16.** A la izquierda aparece la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ATP6V1C1*, donde la línea horizontal discontinua se corresponde con el Ct. La gráfica de la derecha representa la recta de calibrado del gen. El valor de r nos indica la calidad de la curva.

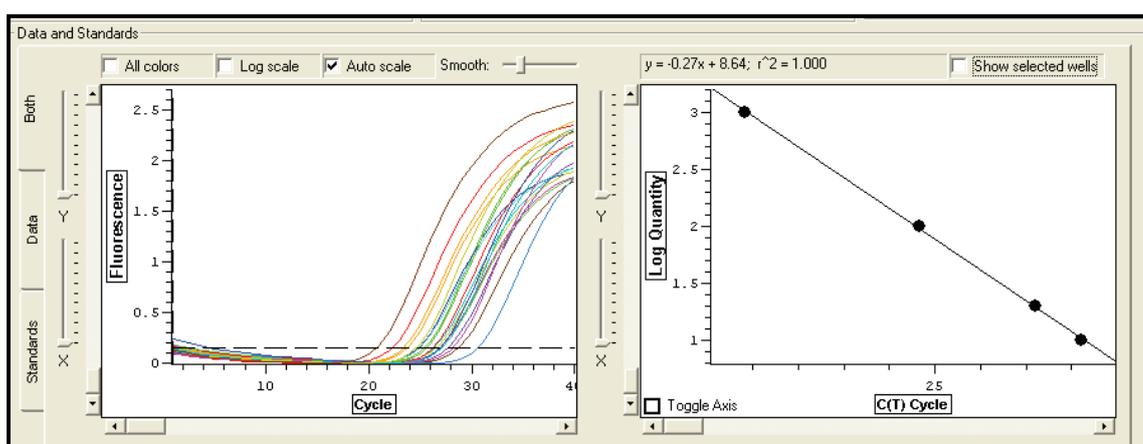
#### 1.6.- *ATP6V0E* (ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal 9KDa, V0 subunit e)

En la Tabla 19 se muestran los Ct y las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor empleando la curva patrón de *ATP6V0E* para todas las muestras de mucosa normal y tumoral en los 8 pacientes estudiados. Se observan los valores de las réplicas 1 y 2.

Type	Label	Réplica 1		Réplica 2	
		C(T)	cantidad	C(T)	cantidad
Sample	1-Tumor	22.364	429.158	21.530	473.835
Sample	1-Normal	23.444	310.357	22.354	365.305
Standard	Ct-ATP6V0E-1	20.888	1000	20.245	1000
Sample	2-Tumor	25.501	167.398	24.637	177.622
Sample	2-Normal	27.049	105.19	26.309	104.778
Standard	Ct-ATP6V0E-01	24.716	100	24.002	100
Sample	3-Tumor	24.960	196.9	24.102	210.316
Sample	3-Normal	25.707	157.373	25.007	158.061
Standard	Ct-ATP6V0E-050	27.239	20	26.611	20
Sample	4-Tumor	23.793	279.508	22.857	311.606
Sample	4-Normal	26.333	130.393	25.707	126.7
Standard	Ct-ATP6V0E-001	28.248	10	27.503	10
Sample	5-Tumor	27.073	104.446	26.093	112.175
Sample	5-Normal	30.609	36.1395	29.711	35.7895
Sample	6-Tumor	26.429	126.697	25.578	131.973
Sample	6-Normal	27.845	82.822	27.172	79.7857
Sample	7-Normal	26.717	116.211	26.057	113.443
Sample	7-Tumor	27.206	100.349	26.192	108.699
Sample	8-Normal	28.823	61.7532	28.210	57.486
Sample	8-Tumor	25.066	190.732	24.1251	200.669

**Tabla 19.** Ct y cantidades de ADNc inicial calculadas a partir de dicho valor para el gen *ATP6V0E*

En la Figura 17 se muestra la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ATP6V0E*, donde se representa la intensidad de señal del fluoróforo frente al número de ciclos.



**Figura 17.** A la izquierda aparece la gráfica correspondiente a la RT-qPCR para el gen *ATP6V0E*, donde la línea horizontal discontinua se corresponde con el Ct. La gráfica de la derecha representa la recta de calibrado del gen. El valor de  $r$  nos indica la calidad de la curva.

## 2.- NORMALIZACIÓN DE DATOS

### 2.1.- *ADRBK2* (adrenergic, beta, receptor kinase 2)

En la Tabla 20 se muestran las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón de *ADRBK2* en las muestras de mucosa tumoral y normal en comparación con las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón del gen *GUS* (gen *housekeeping* que se toma como referencia) en ambas muestras para los 8 pacientes, así como el incremento/disminución (I/D) de la expresión en porcentaje.

Pacientes	<i>ADRBK2</i>		<i>GUS</i>		I/D (%)
	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	
1	110.219	91.3999	176.733	175.449	+19,71%
2	137.05	78.0748	140.985	112.83	+40,48%
3	151.065	83.5296	159.067	99.417	+13,03%
4	161.979	110.512	178.046	121.863	+0,32%
5	94.0605	34.8502	114.481	62.0838	+46,37%
6	126.549	82.8851	146.632	112.26	+16,89%
7	83.8359	100.999	104.294	134.196	+6,8%
8	148.747	62.0617	152.554	82.3166	+29,32%

**Tabla 20.** Cantidades de ADNc inicial de *ADRBK2* y *GUS* en las muestras de mucosa tumoral y normal en los 8 pacientes estudiados y el incremento/disminución (I/D) de la expresión en porcentaje.

## 2.2.- *ADRB1* (adrenergic, beta-1-, receptor)

En la Tabla 21 se muestran las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón de *ADRB1* en las muestras de mucosa tumoral y normal en comparación con las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón del gen *GUS* en ambas muestras para los 8 pacientes, así como el incremento/disminución de la expresión en porcentaje.

Pacientes	<i>ADRB1</i>		<i>GUS</i>		I/D (%)
	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	
1	67.5433	75.6448	176.733	175.449	-11,36%
2	73.0723	63.666	140.985	112.83	-8,15%
3	82.7999	98.2255	159.067	99.417	-47,32%
4	61.6401	63.5058	178.046	121.863	-33,56%
5	84.2826	48.2307	114.481	62.0838	-5,23%
6	70.7605	66.7175	146.632	112.26	-18,8%
7	69.4072	61.3584	104.294	134.196	+45,55%
8	137.912	76.0474	152.554	82.3166	-2,15%

**Tabla 21.** Cantidades de ADNc inicial de *ADRB1* y *GUS* en las muestras de mucosa tumoral y normal en los 8 pacientes estudiados y el incremento/disminución (I/D) de la expresión en porcentaje.

### 2.3.- *ADRA2B* (adrenergic, alpha-2B-, receptor)

En la Tabla 22 se muestran las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón de *ADRA2B* en las muestras de mucosa tumoral y normal en comparación con las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón del gen *GUS* en ambas muestras para los 8 pacientes, así como el incremento/disminución de la expresión en porcentaje.

Pacientes	<i>ADRA2B</i>		<i>GUS</i>		I/D (%)
	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	
1	72.5856	94.7455	176.733	175.449	-23,95%
2	90.9024	64.0177	140.985	112.83	+13,64%
3	100.516	139.187	159.067	99.417	-54,86%
4	91.6309	63.4264	178.046	121.863	-1,12%
5	81.2609	52.3815	114.481	62.0838	-15,87%
6	95.3634	86.4008	146.632	112.26	-15,50%
7	111.168	63.6967	104.294	134.196	+124,58%
8	147.964	86.5388	152.554	82.3166	-7,74%

**Tabla 22.** Cantidades de ADNc inicial de *ADRA2B* y *GUS* en las muestras de mucosa tumoral y normal en los 8 pacientes estudiados y el incremento/disminución (I/D) de la expresión en porcentaje.

#### 2.4.- *AXIN 2*

En la Tabla 23 se muestran las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón de *AXIN2* en las muestras de mucosa tumoral y normal en comparación con las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón del gen *GUS* en ambas muestras para los 8 pacientes, así como el incremento/disminución de la expresión en porcentaje.

Pacientes	<i>AXIN2</i>		<i>GUS</i>		I/D (%)
	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	
1	40.9796	46.818	208.982	203.538	-14,75%
2	67.1992	41.3741	122.712	73.5124	-2,70%
3	65.594	46.8465	159.895	64.9069	-43,16%
4	74.1231	43.3691	191.165	102.255	-8,58%
5	70.8411	13.2075	92.187	21.5749	+25,53%
6	62.4913	31.7383	129.859	71.3896	+8,24%
7	21.1481	61.1282	63.4856	106.058	-42,21%
8	57.0715	18.189	151.239	37.5852	-22,02%

**Tabla 23.** Cantidades de ADNc inicial de *AXIN2* y *GUS* en las muestras de mucosa tumoral y normal en los 8 pacientes estudiados y el incremento/disminución (I/D) de la expresión en porcentaje.

#### 2.5.- *ATP6V1C1* (*ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal 42KDa, V1 subunit C, isoform 1*)

En la Tabla 24 se muestran las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón de *ATP6V1C1* en las muestras de mucosa tumoral y normal en comparación con las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón del gen *GUS* en ambas muestras para los 8 pacientes, así como el incremento/disminución de la expresión en porcentaje.

Pacientes	<i>ATP6VIC1</i>		<i>GUS</i>		I/D (%)
	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	
1	164.537	79.5055	208.982	203.538	+101,56%
2	102.587	36.6777	122.712	73.5124	+67,56%
3	137.711	50.33	159.895	64.9069	+11,07%
4	163.902	63.3701	191.165	102.255	+38,35%
5	63.4133	12.6141	92.187	21.5749	+17,65%
6	82.5592	42.6461	129.859	71.3896	+6,43%
7	54.4144	66.0234	63.4856	106.058	+37,69%
8	128.344	24.1935	151.239	37.5852	+31,84%

**Tabla 24.** Cantidades de ADNc inicial de *ATP6VIC1* y *GUS* en las muestras de mucosa tumoral y normal en los 8 pacientes estudiados y el incremento/disminución (I/D) de la expresión en porcentaje.

#### 2.6.- *ATP6V0E* (ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal 9KDa, V0 subunit e)

En la Tabla 25 se muestran las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón de *ATP6V0E* en las muestras de mucosa tumoral y normal en comparación con las cantidades de ADNc inicial calculadas a partir del Ct empleando la curva patrón del gen *GUS* en ambas muestras para los 8 pacientes, así como el incremento/disminución de la expresión en porcentaje.

Pacientes	<i>ATP6V0E</i>		<i>GUS</i>		I/D (%)
	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	
1	429.158	310.357	208.982	203.538	+34,68%
2	167.398	105.19	122.712	73.5124	-4,67%
3	196.9	157.373	159.895	64.9069	-49,21%
4	279.508	130.393	191.165	102.255	+14,66%
5	104.446	36.1395	92.187	21.5749	-32,36%
6	126.697	82.822	129.859	71.3896	-15,9%
7	100.349	116.211	63.4856	106.058	+44,26%
8	190.732	61.7532	151.239	37.5852	-23,24%

**Tabla 25.** Cantidades de ADNc inicial de *ATP6V0E* y *GUS* en las muestras de mucosa tumoral y normal en los 8 pacientes estudiados y el incremento/disminución (I/D) de la expresión en porcentaje.

### 3.- ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN

En la Tabla 26 se muestran los valores correspondientes al incremento/disminución de la expresión en porcentaje para cada gen en cada paciente. Los valores positivos se corresponden con sobreexpresión en la muestra tumoral y aparecen de color rojo y los valores negativos se corresponden con subexpresión en la muestra tumoral y aparecen de color azul.

Pacientes	<i>ADRBK2</i>	<i>ADRB1</i>	<i>ADRA2B</i>	<i>AXIN 2</i>	<i>ATP6VIC1</i>	<i>ATP6V0E</i>
1	+19,71%	-11,36%	-23,95%	-14,75%	+101,56%	+34,68%
2	+40,48%	-8,15%	+13,64%	-2,70%	+67,56%	-4,67%
3	+13,03%	-47,32%	-54,86%	-43,16%	+11,07%	-49,21%
4	+0,32%	-33,56%	-1,12%	-8,58%	+38,35%	+14,66%
5	+46,37%	-5,23%	-15,87%	+25,53%	+17,65%	-32,36%
6	+16,89%	-18,8%	-15,50%	+8,24%	+6,43%	-15,9%
7	+6,8%	+45,55%	+124,58%	-42,21%	+37,69%	+44,26%
8	+29,32%	-2,15%	-7,74%	-22,02%	+31,84%	-23,24%

**Tabla 26.** Valores correspondientes al incremento/disminución de la expresión en porcentaje de los genes *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN2*, *ATP6VIC1* y *ATP6V0E* en los 8 pacientes estudiados. Los valores positivos se corresponden con sobreexpresión en la muestra tumoral y aparecen de color rojo y los valores negativos se corresponden con subexpresión en la muestra tumoral y aparecen de color azul.

Son muchos los parámetros que pueden condicionar los niveles de expresión de un gen en un individuo, tanto intrínsecos como los derivados del proceso experimental mismo. Al analizar los datos de la tabla no se han tenido en cuenta los valores absolutos de sobreexpresión o subexpresión, sino el hecho de que se repitiera de unos pacientes a otros. Así, *ADRBK2* y *ATP6VIC1* presentan claramente sobreexpresión en el tejido tumoral en todas las muestras, confirmando los resultados previos del *array* (11); sin embargo, en *ADRA2B*, *AXIN 2* y *ATP6V0E* observamos que se sobreexpresa en unas muestras y se

subexpresa en otras, indicándonos que el resultado previo del estudio de *arrays* podría ser un artefacto estadístico.

Si analizamos los valores de expresión en el gen *ADRBK2*, vemos que hay 7 valores positivos (descartamos el paciente 4 debido a que el valor es <5%), existiendo una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión del gen *ADRBK2* y el COCE ( $p=0.0352$ ).

En el gen *ATP6V1C1* aparecen 8 valores positivos, existiendo una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de *ATP6V1C1* y el COCE ( $p=0.0039$ ).

Además, hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el consumo de tabaco y la sobreexpresión del gen *ATP6V1C1* ( $p=0.027$ ).

No hemos encontrado ninguna relación entre las otras variables estudiadas con ninguno de los genes.

En resumen, con los datos obtenidos en nuestro trabajo, hemos validado los genes *ADRBK2* y *ATP6V1C1* sobreexpresados en el COCE, y descartamos *ADRA2B*, *AXIN 2* y *ATP6V0E*. No hemos validado el resultado anterior de *ADRB1*, que aparece ahora subexpresado en nuestros pacientes.



## **V. DISCUSIÓN**



Existe una limitación para predecir la evolución de los pacientes con COCE. Éste es uno de los obstáculos que nos encontramos para el tratamiento efectivo de los mismos. Aunque el pronóstico se correlaciona con diversos factores como la localización anatómica, el tamaño del tumor, su grado de diferenciación y la presencia de ganglios linfáticos invadidos, permanece una variabilidad en el curso clínico de los pacientes aún sin explicación. Por ejemplo, somos incapaces de clasificar tumores por su potencial de producir metástasis o por su resistencia al tratamiento mediante radioterapia.

Aunque el sistema TNM incluye factores pronósticos importantes, no puede predecir con exactitud las propiedades biológicas de los tumores, por lo que no nos permite adecuar el tratamiento al comportamiento biológico del tumor. Así, este sistema no explica la proporción considerable de tumores pequeños con un pronóstico más desfavorable de lo esperado debido a la falta de conocimiento de los procesos biológicos implicados (183). Por todo ello, cabría pensar que el objetivo final debería ser predecir el pronóstico del tumor (184), pero no debemos olvidar que inicialmente tendríamos que conocer de una forma clara los mecanismos patogénicos que participan en la carcinogénesis.

Por otra parte, los márgenes quirúrgicos tras la extirpación de estos tumores sólo se examinan para estudiar la presencia de datos de malignidad a nivel microscópico, sin una evidencia científica de que no existan ya cambios moleculares en los márgenes del tejido extirpado que predispongan a la aparición de recidivas. Esto parece ser insuficiente, por lo que se buscan nuevos métodos como por ejemplo un sistema de estadiaje molecular basado en alteraciones

genéticas para detectar células neoplásicas: la detección de mutaciones en el gen *p53* mediante PCR permitió la identificación de células neoplásicas en 13 de los 25 pacientes estudiados por Brennan y cols. (185) con márgenes quirúrgicos negativos histológicamente. En otro estudio similar, se detectaron mutaciones del gen *p53* en el 72% de los tumores con bordes quirúrgicos considerados como negativos en el examen histológico (186).

El diagnóstico histopatológico proporciona sólo una información parcial e indirecta de los cambios neoplásicos. Es por ello, que consideramos necesario el estudio de los COCE a un nivel genético para poder caracterizar los cambios responsables de la carcinogénesis.

Si queremos un diagnóstico precoz del COCE, la posibilidad de predecir cómo va a evolucionar, y el desarrollo de terapias génicas específicas, parece claro que el primer paso para conseguirlo es descifrar y comprender su comportamiento desde un punto de vista genético.

En nuestro estudio, a partir de un análisis previo con *microarrays* donde se han identificado diversos genes alterados en el COCE, hemos seleccionado una serie de genes para validar su sobreexpresión en dicho tumor mediante RT-qPCR, y estudiar cómo puede influir su comportamiento en el crecimiento y desarrollo del tumor.

Debido a las características de la tecnología de los *arrays* de ADN que analizan cientos o miles de genes simultáneamente, los resultados obtenidos han de ser validados por otros medios antes de poder concluir que el nivel de expresión de algún gen está realmente inducido o reprimido (10). En los experimentos con *arrays* siempre tenemos que contar con la presencia de un determinado número de falsos positivos. Se dice que en un experimento con 10.000 genes, podemos esperar la aparición de hasta 500 falsos positivos, o lo que es lo mismo, hasta un 5% de resultados positivos que no tienen que ver

realmente con diferencias de expresión entre las muestras (187). Además, los *arrays* de ADN representan un método semi-cuantitativo y debemos utilizar un método cuantitativo para nuestro análisis. Para ello, se han utilizado diferentes técnicas convencionales como método de validación de los resultados obtenidos con *arrays* como inmunohistoquímica, *Southern blot*, *Northern blot* ó PCR cuantitativa en tiempo real (129, 130, 188, 189, 190).

La selección del método de validación se lleva a cabo apoyándonos en la revisión bibliográfica de lo que se había publicado hasta la fecha, y también en el asesoramiento técnico por parte de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica del Servicio Galego de Saúde (SERGAS). De acuerdo con la mayoría de los autores, tanto en otros tipos de cáncer (191) como en el COCE y en tumores de glándulas salivales (127, 129, 130, 188, 189, 192), hemos seleccionado la RT-qPCR como el método de validación de elección.

En relación al tipo de tejido analizado, podríamos haber realizado dos tipos principales de estudios: los que utilizan el tejido tumoral íntegro, y los que únicamente emplean fragmentos de tumor elegidos por medio de técnicas de captura o microdissección láser. Las técnicas de microdissección láser nos permiten seleccionar fragmentos de tejido bajo un microscopio. Sin embargo, sabemos que en la carcinogénesis y el desarrollo tumoral, no sólo están implicadas las células parenquimatosas (en nuestro caso células epiteliales), sino que las células estromales también juegan un papel fundamental. Se ha demostrado la gran importancia, por ejemplo, de la angiogénesis en el desarrollo del cáncer. Por tanto, eliminar el estroma en este tipo de investigaciones, en las que se pretende identificar alteraciones genéticas de un tumor determinado, también puede eliminar información vital sobre sus mecanismos de crecimiento e invasión. *Nagata* y cols. (130), encontraron mediante *microarrays* sobreexpresión de varios genes en el COCE, y tras estudiar con inmunohistoquímica las células que expresaban estos genes, observaron que 3 de ellos (*MMP-1*, *MMP-3* y *uPA*) no

estaban localizados en las células tumorales, sino en el estroma neoplásico y, en concreto, en células inflamatorias mononucleadas con citoplasma eosinofílico. Por todo ello, creemos que es fundamental incluir el tejido tumoral completo, incluyendo parénquima y estroma tumoral, reservando el análisis de tejidos específicos para aquellos casos en los que el diseño experimental así lo requieran.

Como nos hemos referido en la metodología, tomamos en un mismo paciente dos muestras, una de tejido tumoral y otra de mucosa oral normal del lado contralateral, y así lo hacemos en todos los pacientes estudiados. Consideramos esto de suma importancia, coincidiendo con otros autores (121), ya que así intentamos evitar el problema de diferencias individuales en la expresión génica. Sin embargo, otros estudios basan su comparación en tejidos normales obtenidos de distintos órganos como las amígdalas, el colon, el hígado, el estómago, el riñón y el cerebro de distintos pacientes (8), con el inconveniente de que estos órganos tienen un perfil de ARNm diferente entre ellos.

En cuanto al tamaño de la muestra, el número de pacientes seleccionados varía de unos estudios a otros. Así, Kornberg y cols. (193) estudian el perfil de expresión génica en 7 pacientes con COCE mediante *arrays*, y su posterior validación con RT-qPCR e inmunohistoquímica. Hwang y cols. (129) estudian 5 pacientes en un intento de caracterizar el tejido epitelial oral canceroso utilizando perfiles de transcripción y Nagata y cols. (130) seleccionan 15 pacientes con COCE para el estudio de posibles biomarcadores de metástasis en los nódulos linfáticos. En nuestro caso, son 8 los pacientes estudiados, número que no difiere de otros trabajos.

El grupo de pacientes analizado muestra una media de edad similar a las descritas en otros estudios (21). En cuanto a la proporción entre hombres y mujeres, el número de mujeres en este trabajo (50%) parece ser superior a la descrita en la mayoría de los estudios (194), pero no pensamos que esto pueda

ser comparable con otros trabajos debido a que nuestro tamaño muestral es muy pequeño. Aunque estudios recientes ya indican un incremento en la incidencia del COCE en mujeres, debido probablemente al mayor consumo de alcohol y tabaco, en nuestro estudio no parece ser debido a esto, puesto que de las 4 mujeres, sólo 1 de ellas es fumadora.

La presentación del COCE en pacientes jóvenes es rara, aunque esta incidencia parece estar aumentando (195). Para algunos autores los pacientes jóvenes presentan tumores más agresivos con tasas de recidivas, metástasis cervicales y mortalidad más elevadas (196). Sin embargo, otros estudios no corroboran estos hallazgos (197). En nuestro trabajo, observamos que la paciente más joven de la serie (de 25 años) presenta un tumor en la lengua en estadio IV muy agresivo, y sufre 2 recidivas posteriormente al tratamiento de cirugía y radioterapia, encontrándose actualmente en un estadio terminal.

Se ha descrito que el consumo de tabaco y alcohol, además de ser un factor de riesgo reconocido, se asocia también a un pronóstico desfavorable en pacientes con COCE (26). Sin embargo, otros autores no encontraron asociación entre el consumo de tabaco y alcohol y el pronóstico en pacientes con COCE (198). La ausencia de datos en relación con el consumo de alcohol en la serie de pacientes estudiada por nosotros no nos permite relacionar la presencia de este hábito y los demás parámetros estudiados.

En relación al consumo de tabaco, sí encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el consumo de tabaco y la sobreexpresión del gen *ATP6V1C1*, gen que validamos su sobreexpresión en el COCE en todos los pacientes estudiados en este trabajo. No hemos encontrado referencias que confirmen este dato, que nosotros consideramos de suma importancia.

La localización más frecuente del tumor en nuestra serie de pacientes es la lengua, con un 62,5% de los casos. Esta localización ya ha sido descrita como la más frecuente por otros autores (13).

El número de genes seleccionado para su validación es similar al de otros estudios. Habitualmente estamos acostumbrados a trabajar con un elevado número de pacientes en los que analizamos un grupo muy reducido de variables o incluso una sola. En esta ocasión, partimos de un gran número de variables analizadas (casi 4.000 genes), de las que nos quedamos con 322 con aumento de su expresión en el tejido tumoral, y de éstas hemos elegido 6 que reúnen una serie de parámetros estadísticos y de interés biológico y que son: *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*, *ATP6V1C1* y *ATP6V0E*. Utilizamos la RT-qPCR como método de validación y lo hacemos en una serie de pacientes distinta a la empleada en el estudio con *microarrays* (11).

El hecho de que sea una serie de pacientes distinta permite una validación más rigurosa, puesto que los hallazgos encontrados se cumplen en distintos grupos de pacientes con COCE (129). Si revisamos la bibliografía vemos que la mayoría de los autores realizan la validación con la misma serie de pacientes y el número de genes seleccionados es similar entre los diversos estudios. Así, Hwang y cols. (129) seleccionan 3 genes para su validación con RT-qPCR. Ibrahim y cols. (127) eligen 4 genes para su validación con RT-qPCR e inmunohistoquímica en un estudio acerca del perfil de expresión génica del COCE en distintas poblaciones. Nagata y cols. (130) han intentado identificar biomarcadores potenciales de las metástasis del COCE en nódulos linfáticos mediante *microarrays* de ADN, para la validación de los resultados del *microarray* eligen 7 genes que se validarán mediante RT-qPCR e inmunohistoquímica. En un estudio similar, Warner y cols. (189) escogen 6 genes para su validación. Otros autores (188), en un estudio acerca de un tumor mixto maligno de glándulas salivales, seleccionan 4 genes (*MGC2177*, *PLAG1*, *PSMC6P*, *LYN*) para su amplificación después de un

experimento con *microarrays* posteriormente validado con RT-qPCR. Al Moustafa y cols. (121) seleccionan 9 genes para su validación con RT-qPCR en un intento de identificar genes implicados en la carcinogénesis de cabeza y cuello. En muchos de estos estudios se confirman los resultados previos obtenidos con los *microarrays*.

No encontramos variaciones en la expresión de los genes estudiados dependientes del estadio tumoral, lo que parece concordar con otros estudios como el de Méndez y cols. (126), que demuestran que la gran mayoría de las alteraciones genéticas observadas en el COCE aparecen ya en estadios iniciales del tumor, no observándose grandes cambios durante la evolución posterior del mismo. El hecho de que el grupo de genes implicados en la patogénesis del COCE sea un grupo reducido y, además, no varíe sustancialmente durante su evolución, nos hace pensar en que algunos de estos genes podrían ser utilizados como marcadores tumorales en el diagnóstico y estudio de la progresión de estos tumores, así como para su uso como dianas terapéuticas durante el desarrollo de terapias génicas.

En cuanto a los resultados, validamos los genes *ATP6V1C1* y *ADRBK2* sobreexpresados en el COCE y no validamos los genes *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2* y *ATP6V0E*.

La discusión de nuestros resultados con otros estudios resulta compleja, puesto que la utilización de un *microarray* u otro conlleva que los genes estudiados no sean los mismos y, por lo tanto, es difícil compararlos. Diversos estudios acerca del COCE utilizan *microarrays* específicos de cáncer como es el caso de Ibrahim y cols. (127), que utilizan el “*Atlas human cancer cDNA expression array membranes (7742-1)*” del laboratorio Clontech, o Nagata y cols. (130) que utilizan el “*IntelliGene Human Cancer CHIP*”, versión 2.1 (Takara), que contienen secuencias de ADNc conocidas relacionadas con el cáncer: los genes

que nosotros seleccionamos no se encuentran en el *microarray* y no pueden ser comparados. Otros trabajos realizados con *microarrays* acerca de la expresión génica diferencial en el COCE incluyen los genes que nosotros estudiamos, como es el caso de Méndez y cols. (126), que encuentran 314 genes con una expresión diferencial de aproximadamente 7.000 genes analizados; Hwang y cols. (129), que estudian también aproximadamente 7.000 genes e identifican 45 genes que se correlacionan con malignidad; o Warner y cols. (189), que incluyen algunos de nuestros genes seleccionados (entre ellos *ATP6V1C1*, pero no *ADRBK2*) y encuentran 23 genes con una expresión diferencial. También hemos revisado estudios similares en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello como el de Al Moustafa y cols. (121), que encuentran cambios significativos en la expresión de 213 genes de 12.530 analizados; o el de Leethanakul y cols. (117), pero en ninguno de estos trabajos han encontrado cambios significativos en la expresión de los genes que hemos seleccionado. Por todo ello, para discutir nuestros resultados, además de hacer una revisión de la bibliografía acerca de los genes seleccionados en el COCE, tenemos que remitirnos también a otros tipos de cáncer, puesto que hay muy pocos estudios acerca de dichos genes relacionados con el COCE.

En relación al gen *AXIN 2*, no encontramos ninguna relación entre éste y el COCE. Este gen se ha relacionado con distintos tipos de tumores, la región en la que se localiza (17q24) es una región que frecuentemente muestra una pérdida de heterocigosidad en diversos tumores, como el cáncer de mama (164), el neuroblastoma (165), o el carcinoma hepatocelular (166). Ampliamente estudiado en el cáncer de colon, se ha visto que mutaciones en este gen elevan los niveles de beta-catenina, proteína asociada directamente al desarrollo del cáncer colorrectal (172). No encontramos en la literatura ningún estudio que relacione este gen con el COCE. Otros autores como Odajima y cols. (199) han estudiado la expresión anormal de beta-catenina en el cáncer oral y han visto que aunque la expresión alterada de beta-catenina puede relacionarse con la progresión del

tumor, mediante la proliferación aumentada y la invasividad por la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), las mutaciones en beta-catenina no parecen ser responsables del desarrollo del tumor y la expresión anormal de beta-catenina en el cáncer oral.

No encontramos relación entre *ATP6V0E* y el COCE, a pesar de ser también una V-ATPasa como *ATP6V1C1*. Esto podría explicarse si observamos que parece ser la subunidad-c de V-ATPasa la implicada en relación con la progresión en otros tumores (200, 201, 202). Queremos destacar que *ATP6V1C1* pertenece al sector catalítico de las V-ATPasas y *ATP6V0E* pertenece al sector de membrana hidrofóbico. Tampoco encontramos relación entre los receptores adrenérgicos *ADRB1* y *ADRA2B* y el COCE, genes que no se habían relacionado previamente con ningún tipo de cáncer.

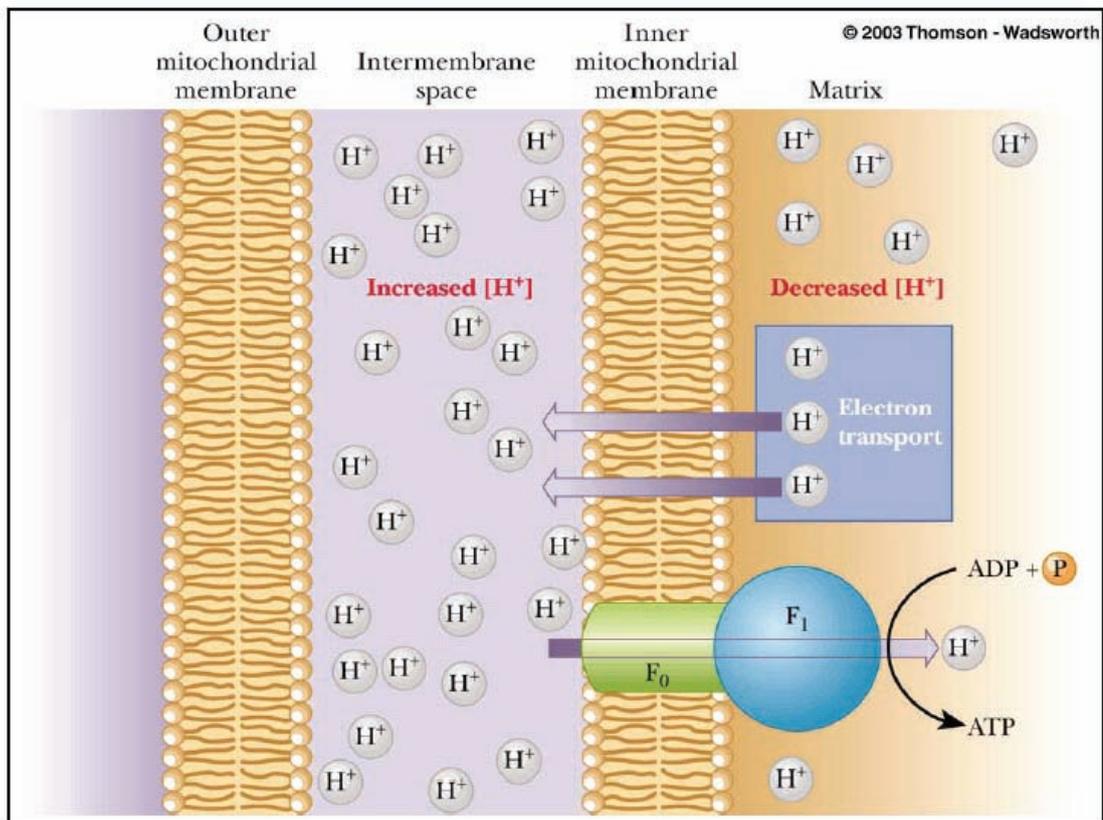
Una posible explicación de la influencia carcinogénica que pueden tener los 2 genes que hemos validado con nuestros resultados sería: a) en relación a *ATP6V1C1* su papel en la regulación del pH citoplasmático y b) en relación a *ADRBK2* su papel en la apoptosis.

#### a) *ATP6V1C1* Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DEL PH CITOPLASMÁTICO

El hecho de que *ATP6V1C1* se sobreexpresa en este tumor podría ser explicado si tenemos en cuenta que la actividad V-ATPasa es esencial para muchos procesos celulares como el tráfico de membrana intracelular, procesamiento y degradación de proteínas y endocitosis mediada por receptores. Además, si nos fijamos en otros tipos de tumores, se ha visto que podría contribuir a la regulación del pH citoplasmático (177). En las células eucarióticas, el pH citosólico parece ser estrictamente regulado dependiendo de diversos mecanismos como el cambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , el antiporte  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , el simporte  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  y V-ATPasa. La transformación celular y carcinogénesis se acompañan de

alteraciones metabólicas con un aumento de la producción de protones, acidificación del medio extracelular y alcalinización del citoplasma (203, 204).

Sabemos que las células tumorales tienen un valor de pH intracelular (pHi) alcalino (7,12-7,65 comparado con 6,99-7,20 en tejidos normales) y un valor de pH extracelular (pHe) intersticial ácido (6,2-6,9 comparado con 7,3-7,4) (205). Por tanto, el microambiente extracelular del tumor es más ácido que el intracelular, creando un gradiente de pH invertido a través de la membrana celular que ya es evidente durante el primer paso de la formación neoplásica y que aumenta con la progresión del tumor. Para sobrevivir en este microambiente, las células tumorales deben exhibir un sistema regulador del pH citosólico. Esto puede explicar el hecho de que las V-ATPasas, que normalmente residen en organelas ácidas, se localicen además en la superficie celular regulando el pH y exacerbando la habilidad migratoria de las células metastáticas. Por tanto, el desarrollo y mantenimiento de este gradiente es debido directamente a la habilidad de las células tumorales a secretar protones (H<sup>+</sup>) y acidificar el medio extracelular (206) (Figura 18). Además, esta capacidad aumenta con la agresividad del tumor (207, 208). Esto explicaría el hecho de que en todos nuestros pacientes aparezca este gen sobreexpresado, con la finalidad de ayudar a las células tumorales a secretar protones para acidificar el medio extracelular.



**Figura 18.** Sistema regulador del pH citosólico que permite la acidificación del medio extracelular mediante la secreción de protones

El aumento del pH intracelular induce la activación del metabolismo glicolítico aeróbico (209), que aumenta la cantidad de lactato celular que es transportado fuera de la célula por la vía co-transportadora  $H^+$ /lactato (MCT) (210). Esto promueve el aumento del pH intracelular y exacerba el desarrollo inicial del microambiente intersticial ácido y el gradiente de pH transmembrana invertido (206). Este incremento del pH intracelular es concomitante con el aumento de la síntesis de ADN (209, 211, 212,), la progresión del ciclo celular (211, 213, 214, 215), el crecimiento independiente de suero y sustrato (209) y el crecimiento *in vivo* del tumor (209, 216), y todo ello desencadena un aumento patológico y

desorganizado de la densidad y el número celular. Una consecuencia del aumento de la densidad celular en el tumor es una mayor dificultad de acceso al sistema circulatorio (217), que causa una eliminación ineficaz de productos metabólicos (como el ácido carbónico). Esto, junto con el aumento de la glicólisis aeróbica (209), proporciona al tumor un microambiente metabólico caracterizado por bajos niveles de suero, hipoxia y un pH extracelular ácido. Este microambiente aumenta la capacidad invasiva del tumor y la expresión de factores y receptores de crecimiento y angiogénicos. Además, la adaptación específica de las células tumorales a su microambiente metabólico hace de éste una fuerza de conducción fundamental en la progresión del tumor hacia un fenotipo metastático más agresivo (206).

Los mecanismos por los que las células malignas acidifican su microambiente intratumoral y la regulación de estos procesos por otros componentes del microambiente no están del todo claros. La producción de lactato comúnmente se ha considerado como el primer mecanismo de acidificación del microambiente (205), pero otros mecanismos de regulación del pH celular contribuyen a la acidificación extracelular en las células tumorales como la activación de NHE1 por la carencia de suero (NHE1 es miembro de una familia que expulsa ácidos y media el cambio de sodio extracelular por protones intracelulares a través de la membrana) (213), la acidez del pH extracelular y la hipoxia. Como hemos visto anteriormente, la bomba de protones tiene un papel fundamental en la acidez del pH extracelular.

El componente ácido del microambiente metabólico intratumoral aumenta el potencial metastático promoviendo la angiogénesis (218), el crecimiento independiente de anclaje (205), la inestabilidad genética (205) y la invasión. Ésta ocurre mediante una compleja serie de interacciones con el tejido huésped en el que la infiltración y la penetración del tejido normal por células cancerígenas se lleva a cabo mediante diversos procesos, varios de ellos regulados por el pH extra

e intracelular (206).

La adquisición de movilidad y fenotipo invasivo es un requisito de la célula para ser metastáticamente competente, una de las características de las células cancerígenas es la habilidad de la célula epitelial de migrar individualmente (206). La disminución del pH extracelular del microambiente tumoral se ha visto que aumenta la movilidad de las células tumorales mediante la formación de pseudopodia, lo que implica migración celular en células menos invasivas. En las células metastáticas induce además un aumento en el número y longitud de pseudopodias (219), proyectándose éstas en la dirección de movimiento de las células tumorales hacia los capilares circulatorios (220). La protusión de pseudopodias y el comportamiento migratorio se reducen por el aumento del pH extracelular, que inhibe la actividad de secreción de proteasas y bloquea la actividad de NHE1 (221). Se ha visto que la mayor invasividad de las células tumorales es el resultado de dos mecanismos complementarios: la ruptura de las interacciones de la matriz celular que se originan debido al aumento de secreción de ácidos y la actividad proteasa, y el aumento de la movilidad celular (206).

Cardone y cols. (206) han estudiado el fenómeno de invasión fijándose en NHE1 y han visto que se lleva a cabo en múltiples pasos: normalmente la matriz extracelular está organizada, las células localizan NHE1 a lo largo de la membrana plasmática y las proteasas en los lisosomas intracelulares. La interacción con elementos del estroma y/o del microambiente metabólico activa NHE1, que resulta en una reorganización del citoesqueleto y la formación de pseudopodia en el extremo anterior de la célula. NHE1 y los lisosomas comienzan a redistribuirse en la pseudopodia, resultando en una extrusión focalizada de ácidos y proteasas. Esto causa la proteólisis de la matriz extracelular y compromete las uniones celulares, lo que resulta en un aumento de la movilidad e invasión celular en las áreas digeridas de la matriz extracelular. Un microambiente metabólico deteriorado y la digestión de la matriz extracelular causa la exposición de sitios de adhesión

ocultos y la liberación de factores latentes asociados a la matriz extracelular. Estas señales, mediante un mecanismo de *feedback*, activan NHE1 y estimulan la secreción de proteasas, aumentando la capacidad invasiva de las células tumorales. Cuando la matriz extracelular ha sido digerida y los factores de crecimiento liberados agotados, la célula tumoral es capaz de hacer una transición de mesenquimal a ameba. Haciendo esto, la célula responde rápidamente a los factores de crecimiento y movilidad que son liberados de la microcirculación más cercana para moverse a través de los gaps en la matriz extracelular hacia los capilares mediante quimiotaxis. NHE1 se localiza en el extremo anterior de las células que se mueven por quimiotaxis (206).

Como nos hemos referido anteriormente, el microambiente tumoral es esencial en la progresión neoplásica, y una de las características de este microambiente es la disminución del pH extracelular. Dado que V-ATPasa es una bomba de protones reguladora del pH celular, su implicación en la progresión neoplásica no debería sorprendernos. Así, diversas observaciones sugieren que las V-ATPasas podrían estar implicadas en la transformación celular, carcinogénesis y metástasis tumoral. Se ha visto que la oncoproteína E5 del papilomavirus bovino se une con la subunidad-c del dominio  $V_0$  de V-ATPasa (200, 201), desencadenando dicha unión una alcalinización de Golgi que se correlaciona con la transformación celular inducida por la oncoproteína E5 (222). La presencia de V-ATPasa en la membrana plasmática de diversas células tumorales humanas se ha demostrado de forma indirecta y se ha asociado con la alcalinización del citoplasma de dichas células (203). Las células del cáncer de mama, a través de V-ATPasa, acidifican su medio extracelular facilitando la reabsorción de la matriz extracelular mediante proteasas y metástasis (207). Ohta y cols. (202) observan que la subunidad-c de V-ATPasa aparece sobreexpresada en tumores pancreáticos invasivos en comparación con tumores benignos o no invasivos, sugiriendo que la V-ATPasa puede tener un papel fundamental en la progresión del tumor. Por otro lado, Philippe y cols. (177) no han encontrado

sobreexpresión de subunidades de V-ATPasa en los gliomas proliferativos, siendo los niveles de ARNm de la subunidad V-ATPasa similares en los gliomas humanos (grado II ó IV) y en tejidos peritumorales.

El pH celular es crucial para diversas funciones biológicas como la proliferación celular, invasión y metástasis, resistencia a medicamentos y apoptosis. Las condiciones hipóxicas son un fenómeno frecuente durante el desarrollo de tumores sólidos y desencadenan una acidosis intra y extracelular. Esta acidosis celular parece ser un desencadenante de la apoptosis y permite la activación de endonucleasas que inducen la fragmentación del ADN. Para evitar la acidificación intracelular bajo estas condiciones, los reguladores de pH deben estar sobre-regulados en las células tumorales. Esto parece que se cumple también en nuestros pacientes con la sobreexpresión de *ATP6V1C1*, puesto que la hipoxia también es un fenómeno característico del COCE, como tumor sólido que es.

En nuestro trabajo encontramos que *ATP6V1C1* con su actividad como bomba de protones reguladora del pH, ampliamente descrita en relación al desarrollo y crecimiento del tumor en otros tipos de cáncer, también está relacionada con el COCE. Además, vemos que existe una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de este gen y el tabaco. En revisiones bibliográficas muy recientes acerca de las bombas de protones como reguladoras del pH citosólico y su relación con el cáncer no se ha descrito en ningún caso una asociación de este gen con el tabaco (206). También se cumple esto en la otra bomba de protones estudiada (*ATP6V0E*), aunque esta relación no llegue a ser estadísticamente significativa, sí se observa una tendencia a una mayor expresión del gen en los pacientes fumadores. Esto podría explicarse si pensamos en el tabaco como un agente tóxico que hace que las condiciones de hipoxia y acidosis intracelular en el tumor se incrementen, resultando de todo ello un aumento de la actividad de la bomba de protones. Como nos hemos referido

anteriormente, no podemos contrastar nuestra opinión con otros estudios por no existir referencias al respecto, pensamos que esto pueda ser debido al efecto local del tabaco en la mucosa y por ello no ha sido descrito previamente en otros tumores por cumplirse sólo en el COCE y no en otros tipos de cáncer.

Por otro lado, es interesante destacar que el aumento de la actividad de la bomba de protones reguladora del pH se logra incrementando la actividad catalítica (*ATP6V1C1*) y no el número de canales intramembrana (*ATP6V0E*), aunque en los casos de mayor estrés (fumadores) sí se ayuda del aumento de estos canales.

No encontramos estudios similares acerca de este gen en el COCE para discutir nuestros resultados, aunque sí ha sido estudiado por Carinci y cols. (223) en lesiones precancerosas con displasia de localización lingual, comparando el perfil génico en displasias leves y severas y han encontrado que era uno de los genes que aparecía subexpresado en la displasia severa. Estos resultados son contrarios a lo que nosotros hemos encontrado, si bien cabe destacar que se trata de lesiones precancerosas y no de un cáncer establecido y además son resultados globales dentro de un perfil de expresión sin validar específicamente este gen.

#### b) INFLUENCIA DEL RECEPTOR BETA-ADRENÉRGICO *ADRBK2* Y SU PAPEL EN LA APOPTOSIS

La activación de receptores beta-adrenérgicos promueve la estimulación, mediada por proteínas G, de adenilciclase (144). Esto permite un incremento de las concentraciones intracelulares de AMPc y produce una mayor actividad de la proteína quinasa AMPc-dependiente PKA (145).

Gu y cols. (224) han descubierto una nueva vía de señalización para la subunidad alfa de la proteína G, distinta de la vía clásica PKA, que explica la acción apoptótica de los receptores beta-adrenérgicos. Esta vía ha sido estudiada

en los timocitos. La muerte celular inducida por los receptores beta-adrenérgicos parece requerir la acción de la proteína tirosín-kinasa Lck, una kinasa de la familia Src. Estos autores han visto que la subunidad alfa de la proteína G estimula directamente la actividad kinasa de Lck. Por otro lado, la activación de esta proteína Lck se ha visto relacionada con procesos de transformación celular (225).

PKA y la familia de tirosín-quinasas Src se han visto implicadas en vías apoptóticas iniciadas por diversos receptores. El hecho de que la subunidad alfa de la proteína G active directamente la familia de tirosín-quinasas Src, puede explicar los efectos fisiológicos de los receptores beta-adrenérgicos y otros receptores de unión a proteína G que utilizan vías independientes de PKA (224).

Yan y cols. (226) observaron que la activación de receptores beta-adrenérgicos y/o el incremento de AMPc en líneas celulares S49 del linfoma T murino, regula el crecimiento y la proliferación de diversas células y, en algunas de ellas, promueve la muerte celular o apoptosis. Este efecto apoptótico derivado de la activación de receptores beta-adrenérgicos ha sido ampliamente estudiado en las células cardíacas (227, 228).

Siguiendo la teoría de Gu y cols. (224) parece lógico pensar que la estimulación de receptores adrenérgicos, mediante la vía Lck, estimula la apoptosis, pero esto no aparece reflejado en nuestros resultados, sino que precisamente lo que hacen las células tumorales es evitar la apoptosis. Por otro lado, la proteína tirosín-kinasa Lck se ha visto implicada en procesos de transformación celular (225), esto podría explicar el hecho de que los receptores beta-adrenérgicos aparezcan sobreexpresados y, vía Lck, se estimulan los procesos de transformación celular en vez de la muerte celular programada. Esto demostraría que la teoría de Gu y cols. (224) de la vía de señalización mediante Lck jugaría un papel importante en el COCE.

Shakib y cols. (229) utilizaron métodos proteómicos en un experimento con fibroblastos de riñón de ratas para caracterizar proteínas que cambiaban su forma

o cantidad en el núcleo bajo condiciones de hipoxia prolongada. Sabemos que las respuestas celulares a la hipoxia dependen de su duración, y una hipoxia crónica prolongada provoca alteraciones de la expresión génica (230, 231). De las 791 proteínas estudiadas por Shakib y cols., detectaron cambios en el 20% y una de estas proteínas es *ADRBK2*. Hay pocos estudios acerca del papel de estas proteínas en el núcleo, pero se sabe que procesos de endocitosis y señalización, en los que interviene, pueden transferir proteínas al núcleo (232, 233).

Se piensa que *ADRBK2* podría estar asociada con procesos de la membrana nuclear, y con proteínas RGS en la matriz nuclear (proteínas reguladoras de la señalización de la proteína G), que influyen la transcripción y el ciclo celular (234). En el núcleo actuaría, por lo tanto, como una forma eficiente de regulación celular (235).

Aunque nosotros sí demostramos una relación entre *ADRBK2* y el COCE, en la literatura no encontramos estudios similares acerca de este gen en el COCE para discutir nuestros resultados, así como tampoco en otros tipos de cáncer. Por ello consideramos muy interesante seguir en esta línea de investigación para poder comprender mejor el papel que este gen desempeña en el COCE.

Como resumen, nuestros resultados confirman que algunos de los genes seleccionados (*ADRBK2* y *ATP6V1C1*) se encuentran sobreexpresados en el COCE. Otros en cambio (*ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN2* y *ATP6V0E*), no han mostrado sobreexpresión. Esto es consecuente si pensamos en los *microarrays* como una herramienta poderosa para observar cambios en la expresión génica a lo largo de genomas completos, pero con el inconveniente de que no existe un consenso sobre la seguridad y sensibilidad de esta tecnología para medir la expresión génica diferencial. Cualquier utilización posterior de dicha información para explicar modelos de carcinogénesis, y, en última instancia, obtener marcadores de utilidad clínica y posibles dianas terapéuticas, requiere el paso obligado de validar los resultados con otra metodología más robusta a la hora de medir diferencias de

expresión, como es la RT-qPCR.

La falta de estudios similares al nuestro dificulta verificar los resultados obtenidos en este trabajo, por lo que consideramos indispensable la realización de nuevas investigaciones en este campo que expliquen mejor la complicada patogenia del COCE.



## **VI. CONCLUSIONES**



1.- Se confirma la sobreexpresión del gen *ADRBK2* en el COCE en relación a la mucosa oral normal mediante RT-qPCR. No hemos encontrado sobreexpresión de los genes *ADRB1* y *ADRA2B* en el COCE en relación a la mucosa oral normal mediante RT-qPCR. La confirmación de la implicación de un receptor adrenérgico en el cáncer y la relación que éste presente con la apoptosis, vía protein kinasas, abre nuevas perspectivas de investigación en este campo.

2.- Mediante RT-qPCR no hemos encontrado sobreexpresión del gen *AXIN 2* en el COCE en relación a la mucosa oral normal.

3.- Se confirma la sobreexpresión de la ATPasa *ATP6V1C1* en el COCE en relación a la mucosa oral normal mediante RT-qPCR. No hemos encontrado sobreexpresión del gen *ATP6V0E* en el COCE en relación a la mucosa oral normal mediante RT-qPCR.

4.- Al igual que en otros cánceres, la regulación del pH por medio de la actividad de la bomba de protones parece confirmarse como un proceso importante y quizá necesario para la progresión del COCE. Es sugestivo de esto además el hecho de que la correlación entre la expresión de *ATP6V1C1* y el tabaco sea significativa, pudiendo esto indicar que el estrés ambiental producido por el tabaco se acompañe de un mayor desarrollo de los mecanismos de protección celular.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- 1.- Stewart BW, Kleihues P, eds. World cancer report. Lyon: IARC press; 2003.
- 2.- Sudbo J, Bryne M, Mao L, Lotan R, Reith A, Kildal W, et al. Molecular based treatment of oral cancer. *Oral Oncol* 2003;39:749-58.
- 3.- Serra Majen L, Ramón Torrel JM. Cáncer oral: Epidemiología y prevención. En: Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Majen L, eds. *Odontología preventiva y comunitaria*. Barcelona: Masson; 2003. p. 173-93.
- 4.- Nieto A, Ramos MR. Rising trends in oral cancer mortality in Spain, 1975-94. *J Oral Pathol Med* 2002;31:147-52.
- 5.- Diz Dios P, Padron Gonzalez N, Seone Leston J, Tomas Carmona I, Limeres Posse J, Varela-Centelles P. "Scheduling delay" in oral cancer diagnosis: a new protagonist. *Oral Oncol* 2005;41:142-6.
- 6.- Siczka E, Datta R, Singh A, Loree T, Rigual N, Orner J, et al. Cancer of the buccal mucosa: are margins and T-stage accurate predictors of local control? *Am J Otolaryngol* 2001;22:395-9.
- 7.- Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 2002;9:369-78.
- 8.- Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, et al. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* 2000;110:374-81.

- 9.- Yue H, Eastman PS, Wang BB, Minor J, Doctolero MH, Nuttall RL, et al. An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E41-1.
- 10.- Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn* 2001;3:26-31.
- 11.- Somoza-Martin JM, Garcia-Garcia A, Barros-Angueira F, Otero-Rey E, Torres-Español M, Gandara-Vila P, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:786-92.
- 12.- Wood NK, Sawyer DR. Cáncer Oral. En: Wood NK, Goaz PW. Diagnóstico diferencial de las lesiones orales y maxilofaciales. Madrid: Harcourt Brace de España; 1998. p. 587-95.
- 13.- García A, Ceballos A, Gándara JM. Cáncer oral. En: Ceballos A, Bullón P, Gándara JM, Chimenos E, Blanco A, Martínez-Sahuquillo A, García A. Medicina Bucal Práctica. Santiago de Compostela: Ed. Danú; 2000. p. 355-68.
- 14.- Moore SR, Pierce AM, Wilson DF. "Oral cancer" – The terminology dilemma. *Oral Dis* 2000;6:191-3.
- 15.- Macfarlane GJ, Boyle P, Evstifeeva TV, Robertson C, Scully C. Rising trends of oral cancer mortality among males worldwide: the return of an old public health problem. *Cancer Causes Control* 1994;5:259-65.
- 16.- Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L. The world cancer report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004;13:139-42.
- 17.- Parkin DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 1988;41:184-97.
- 18.- Milián A, González MA. Tumores malignos de la mucosa oral. En: Bagán JV, Ceballos A, Bermejo A, Aguirre JM, Peñarrocha M. Medicina Oral. Barcelona: Ed. Masson; 1995. p. 186-201.

- 19.- Junquera LM, Albertos JM. Precáncer y Cáncer Oral. En: López JS, Vicente JC, Junquera LM. Patología Quirúrgica Maxilofacial. Madrid: Editorial Síntesis; 1998. p. 262-78.
- 20.- Barasch A, Gofa A, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Squamous cell carcinoma of the gingiva. A case series analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995;80:183-7.
- 21.- Silverman S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. J Am Dent Assoc 2001;132:S7-11.
- 22.- Kleinman DV, Crossett LS, Reis LAG. Cancer of the oral cavity and the pharynx. A statistics review monograph 1973-1978. Washington, DC: Department of Health and Human Services, Center for Diseases Control, 1991.
- 23.- Sciubba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. J Am Dent Assoc 2001;132:S12-18.
- 24.- Pindborg JJ, Kiaer J, Gupta PC, Chawla TN. Studies in oral leukoplakias. Prevalence of leukoplakia among 10,000 persons in Lucknow, India, with special reference to use of tobacco and betel Nut. Bull World Health Organ 1967;37:109-16.
- 25.- De Stefani E, Oreggia F, Rivero S, Fierro L. Hand-rolled cigarette smoking and risk of cancer of the mouth, pharynx and larynx. Cancer 1992;70:679-82.
- 26.- Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. Eur J Cancer B Oral Oncol 1994;30:323-8.
- 27.- Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. Int J Cancer 1989;43:992-1000.

- 28.- Baker SR. Risk factors in multiple carcinomas of the lip. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1980;88:248-51.
- 29.- Cox M, Maitland N, Scully C. Human herpes simplex-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1993;29:215-9.
- 30.- Hoffmann M, Kahn T, Mahnke CG, Goeroegh T, Lippert BM, Werner JA. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta Otolaryngol* 1998;118:138-44.
- 31.- Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, et al. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 2003;9:2620-6.
- 32.- Lanier AP, Henle W, Bender TR, Henle G, Talbot ML. Epstein-Barr virus-specific antibody titers in seven Alaskan natives before and after diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1980;26:133-7.
- 33.- Niedobitek G, Herbst H, Young LS. Epstein-Barr virus and carcinomas. *Int J Clin Lab Res* 1993;23:17-24.
- 34.- Balz V, Scheckenbach K, Gotte K, Bockmuhl U, Petersen I, Bier H. Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res* 2003;63:1188-91.
- 35.- Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head Neck* 2002;24:841-9.

- 36.- Somers KD, Schechter GL. Genetic alterations in head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 1992;25:1065-71.
- 37.- Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res* 1992;52:5997-6000.
- 38.- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. p. 295-303.
- 39.- Haya-Fernandez MC, Bagan JV, Murillo-Cortes J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2004;10:346-8.
- 40.- Ioachim E, Goussia A, Agnantis NJ. Glycoprotein CD44 expression in colorectal neoplasms. An immuno-histochemical study including correlation with cathepsin D, extracellular matrix components, p53, Rb, bcl-2, c-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Virchows Arch* 1999;434:45-50.
- 41.- Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1999;28:226-32.
- 42.- Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hunter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, et al., eds. *American Joint Committee on cancer (AJCC). AJCC Cancer staging manual*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.24-30.
- 43.- Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Oral Cancer: is it more common than cervical? *Br Dent J* 1991;170:170-1.
- 44.- Beenken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck* 1999;21:124-30.

- 45.- Silverman S Jr. Oral cancer. 4<sup>th</sup> ed. Hamilton, Ontario: American Cancer Society, 1998.
- 46.- Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2001;2:239-51.
- 47.- Spencer KR, Ferguson JW, Weisenfeld D. Current concepts in the management of oral squamous cell carcinoma. *Aust Dent J* 2002;47:284-9.
- 48.- Day TA, Davis BK, Gillespie MB, Joe JK, Kibbey M, Martin-Harris B, et al. Oral cancer treatment. *Curr Treat Options Oncol* 2003;4:27-41.
- 49.- Howaldt HP, Kainz M, Euler B, Vorast H. Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *DOSAK. J Craniomaxillofac Surg* 1999;27:275-88.
- 50.- Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000;29:291-8.
- 51.- Harris LB, Sessions RB, Hong WK. Head and neck cancer: a multidisciplinary approach. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.
- 52.- Hancock PJ, Epstein JB, Sadler GR. Oral and dental management related to radiation therapy for head and neck cancer. *J Can Dent Assoc* 2003;69:585-90.
- 53.- Duarte B, Altura O, Iso I. Radioterapia y quimioterapia. En: Martín-Granizo R. Cirugía oral y maxilofacial. 2<sup>a</sup> Ed. Tomo II. Madrid: Litofinter; 2004. p. 1135-64.
- 54.- Hill BT, Price LA. Lack of survival advantage in patients with advanced squamous cell carcinomas of the oral cavity receiving neoadjuvant chemotherapy prior to local therapy, despite achieving an initial high clinical complete remission rate. *Am J Clin Oncol* 1994;17:1-5.
- 55.- Lin JC, Jan JS, Hsu CY, Wong DY. High rate of clinical complete response to weekly outpatient neoadjuvant chemotherapy in oral carcinoma patients using a

new regimen of cisplatin, 5-fluorouracil, and bleomycin alternating with methotrexate and epirubicin. *Cancer* 1999;85:1430-8.

56.- Andreadis C, Vahtsevanos K, Sidiras T, Thomaidis I, Antoniadis K, Mouratidou D. 5-Fluorouracil and cisplatin in the treatment of advanced oral cancer. *Oral Oncol* 2003;39:380-5.

57.- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. Regulación del número celular: células normales y células cancerosas. En: Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. *Genética moderna*. Madrid: Edigrafos;1999. p. 465-89.

58.- Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35:1886-94.

59.- Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, et al. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:51-61.

60.- Blanco J, Bullón M. Ciclo celular. En: Blanco J, Bullón M. *Genética General*. Madrid: Ed. Marbán; 1994. p. 113-9.

61.- Lewin B. Ciclo de la célula y regulación del crecimiento. En: Lewin B. *Genes VII*. Madrid: Ed. Marbán; 2001. p. 835-74.

62.- Urquía García U, Ceballos Salobreña A. Carcinogénesis. En: Ceballos A, Bullón P, Gándara JM, Chimenos E, Blanco A, Martínez-Sahuquillo A, García A. *Medicina Bucal Práctica*. Santiago de Compostela: Ed. Danú; 2000. p. 339-53.

63.- Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:613-23.

64.- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254:1138-46.

65.- Kumar V, Abbas A, Fausto N. Neoplasia. En: Robbins y Cotran *Patología estructural y funcional*. 7ª ed. Madrid: Elsevier; 2005. p. 273-346.

- 66.- Pavelic ZP, Lasmar M, Pavelic L, Sorensen C, Stambrook PJ, Zimmermann N, et al. Absence of retinoblastoma gene product in human primary oral cavity carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32:347-51.
- 67.- Saiz A. Bases moleculares del cáncer oral. *Med Oral* 2001;6:342-9.
- 68.- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
- 69.- Dameron KM, Volper OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265:1582-4.
- 70.- Strohmeyer D, Rossing C, Strauss F, Bauerfeind A, Kaufmann O, Loening S. Tumor angiogenesis is associated with progression after radical prostatectomy in pT2/pT3 prostate cancer. *Prostate* 2000;42:26-33.
- 71.- Vera FJ, Navarro M. Sobreexpresión del gen supresor p53 en el cáncer oral. *Med Oral* 1997;2:283-96.
- 72.- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-9.
- 73.- Summersgill K, Smith E, Ritchie J, Haugen T, Turek L. Human papillomavirus in head and neck cancers. (Abstract) *En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 2001;92:549.
- 74.- Garcia Garcia A, Barros F, Bouzas ML, Peñaranda JM. Li-Fraumeni syndrome and osteosarcoma of the maxilla. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;56:1106-9.
- 75.- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-8.
- 76.- Kumar V, Abbas A, Fausto N. Adaptaciones celulares, lesión celular y muerte celular. *En: Robbins y Cotran Patología estructural y funcional. 7ª ed. Madrid:*

Elsevier; 2005. p. 3-46.

77.- Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 2000;22:1007-17.

78.- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.

79.- Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001;70:249-54.

80.- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.

81.- Guyton A, Hall J. Control genético de la síntesis proteica, de la función celular y de la reproducción celular. En: Guyton A, Hall J. *Tratado de fisiología médica*. 9ª ed. Madrid: Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España; 1996. p. 29-42.

82.- Myers JN. Molecular pathogenesis of squamous cell carcinoma of the head neck. En: Suen JY, Myers EN, eds. *Cancer of the Head Neck*. Philadelphia: WB Saunders; 1996.

83.- Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002;347:1593-603.

84.- Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139-46.

85.- Scully C. Oncogenes, tumor supressors and viruses in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993;22:337-47.

86.- Sugerman PB, Savage NW. Current concepts in oral cancer. *Aust Dent J* 1999;44:147-56.

- 87.- Loning T, Henke RP, Reichart P, Becker J. In situ hybridization to detect Epstein-Barr virus DNA in oral tissues of HIV-infected patients. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987;412:127-33.
- 88.- De Souza YG, Greenspan D, Felton JR, Hartzog GA, Hammer M, Greenspan JS. Localization of Epstein-Barr virus DNA in the epithelial cells of oral hairy leukoplakia by in situ hybridization of tissue sections. *N Engl J Med* 1989;320:1559-60.
- 89.- Gonzalez MA, Gonzalez S, Ruiz I, Rodriguez A, Bagan JV, Ceballos A. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA using in situ hybridization in oral lichen planus. *Med Oral* 1999;4:391-7.
- 90.- Kellokoski JK, Syrjanen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjanen KJ. Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med* 1992;21:459-64.
- 91.- Dawkins HJ, Robbins PD, Sarna M, Carrello S, Harvey JM, Sterrett GF. c-erbB-2 amplification and overexpression in breast cancer: evaluation and comparison of Southern blot, slot blot, ELISA and immunohistochemistry. *Pathology* 1993;25:124-32.
- 92.- Lin SL. Single-cell mRNA library analysis by Northern blot hybridization. *Methods Mol Biol* 2003;221:169-78.
- 93.- Taniguchi M, Miura K, Iwao H, Yamanaka S. Quantitative assessment of DNA microarrays--comparison with Northern blot analyses. *Genomics* 2001;71:34-9.
- 94.- Oste C. Polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1988;6:162-7.
- 95.- Markham AF. The polymerase chain reaction: A tool for molecular medicine. *BMJ* 1993;306:441-6.

- 96.- Reis PP, Rogatto SR, Kowalski LP, Nishimoto IN, Montovani JC, Corpus G, et al. Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. *Oncogene* 2002;21:6480-7.
- 97.- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21:10-4.
- 98.- Berns A. Gene expression in diagnosis. *Nature* 2000;403:491-2.
- 99.- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-92.
- 100.- Ha PK, Benoit NE, Yochem R, Sciubba J, Zahurak M, Sidransky D, et al. A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:3058-64.
- 101.- Mao L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. *Mol Med Today* 1997;3:442-8.
- 102.- Kim DS, Watkinson JC. Gene chip expression analysis in head and neck cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2002;27:296-303.
- 103.- Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma: 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000;36:256-63.
- 104.- Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000;36:311-27.
- 105.- Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol* 2000;36:404-13.

- 106.- Ekins R, Chu FW. Microarrays: their origins and applications. *Trends Biotechnol* 1999;17:217-8.
- 107.- Polsky-Cynkin R, Parsons GH, Allerdt L, Landes G, Davis G, Rashtchian A. Use of DNA immobilized on plastic and agarose supports to detect DNA by sandwich hybridization. *Clin Chem* 1985;31:1438-43.
- 108.- Barinaga M. Will "DNA chip" speed genome initiative?. *Science* 1991;253:1489.
- 109.- Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5022-6.
- 110.- Wang T, Hopkins D, Schmidt C, Silva S, Houghton R, Takita H, et al. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis. *Oncogene* 2000;19:1519-28.
- 111.- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-74.
- 112.- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
- 113.- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
- 114.- Howell SB. DNA microarrays for analysis of gene expression. *Mol Urol* 1999;3:295-300.

- 115.- Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539-48.
- 116.- Chang DD, Park NH, Denny CT, Nelson SF, Pe M. Characterization of transformation related genes in oral cancer cells. *Oncogene* 1998;16:1921-30.
- 117.- Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, Pallente M, Ensley JF, Koontongkaew S, et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays . *Oncogene* 2000;19:3220-4.
- 118.- Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, Shillitoe E, Kellman RM, Ensley JF, et al. Gene expression profiles in squamous cell carcinomas of the oral cavity: use of laser capture microdissection for the construction and analysis of stage-specific cDNA libraries. *Oral Oncol* 2000;36:474-83.
- 119.- Shillitoe EJ, May M, Patel V, Lethanakul C, Ensley JF, Strausberg RL, et al. Genome-wide analysis of oral cancer – early results from the Cancer Genome Anatomy Project. *Oral Oncol* 2000;36:8-16.
- 120.- Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohyama H, Kohno Y, Posner M, et al. Oral cancer in vivo expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 2001;20:6196-204.
- 121.- Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, et al. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21:2634-40.
- 122.- Francioso F, Carinci F, Tosi L, Scapoli L, Pezzetti F, Passerella E, et al. Identification of differentially expressed genes in human salivary gland tumors by

DNA microarrays. *Mol Cancer Ther* 2002;1:533-8.

123.- Hartmann KA, Modlich O, Prisack HB, Gerlach B, Bojar H. Gene expression profiling of advanced head and neck squamous cell carcinomas and two squamous cell carcinoma cell lines under radio/chemotherapy using cDNA arrays. *Radiother Oncol* 2002;63:309-20.

124.- Kuo WP, Hasina R, Lingen MW. Classification of oral squamous cell carcinomas based on gene expression patterns (Abstract). En: *Oral Surg, Oral Med Oral Path* 2002;93:415.

125.- Zhang X, Liu Y, Gilcrease MZ, Yuan XH, Clayman GL, Adler-Storthz K, et al. A lymph node metastatic mouse model reveals alterations of metastasis-related gene expression in metastatic human oral carcinoma sublines selected from a poorly metastatic parental cell line. *Cancer* 2002;95:1663-72.

126.- Mendez E, Cheng C, Farwell DG, Ricks S, Agoff SN, Futran ND, et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002;95:1482-94.

127.- Ibrahim SO, Aarsaether N, Holsve MK, Kross KW, Heimdal JH, Aarstad JH, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinomas and matching normal oral mucosal tissues from black Africans and white Caucasians: the case of the Sudan vs. Norway. *Oral Oncol* 2003;39:37-48.

128.- Kuo WP, Hasina R, Ohno-Machado L, Lingen MW. Classification and identification of genes associated with oral cancer based on gene expression profiles. A preliminary study. *N Y State Dent J* 2003;69:23-6.

129.- Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, Misra J, Ohyama H, Todd R, et al. Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol* 2003;39:259-68.

- 130.- Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 2003;106:683-9.
- 131.- Benovic JL, Onorato JJ, Arriza JL, Stone WC, Lohse M, Jenkins NA, et al. Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family. *J Biol Chem* 1991;266:14939-46.
- 132.- Yu SY, Takahashi S, Arinami T, Ohkubo T, Nemoto Y, Tanabe E, et al. Mutation screening and association study of the beta-adrenergic receptor kinase 2 gene in schizophrenia families. *Psychiatry Res* 2004;125:95-104.
- 133.- Barrett TB, Hauger RL, Kennedy JL, Sadovnick AD, Remick RA, Keck PE, et al. Evidence that a single nucleotide polymorphism in the promoter of the G protein receptor kinase 3 gene is associated with bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2003;8:546-57.
- 134.- Schneider H, Patil SP, Canisius S, Gladmon EA, Schwartz AR, O'Donnell CP, et al. Hypercapnic duty cycle is an intermediate physiological phenotype linked to mouse chromosome 5. *J Appl Physiol* 2003;95:11-9.
- 135.- Cancer Genome Anatomy Project. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgap>. Accedida el 20/07/2005.
- 136.- He J, Xu J, Castleberry AM, Lau AG, Hall RA. Glycosylation of beta(1)-adrenergic receptors regulates receptor surface expression and dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:565-72.
- 137.- Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors and receptor kinases: from molecular biology to potential therapeutic applications. *Nat Biotechnol* 1996;14:283-6.

138.- Wenzel-Seifert K, Liu HY, Seifert R. Similarities and differences in the coupling of human beta1- and beta2-adrenoceptors to G<sub>s</sub> (alpha) splice variants. *Biochem Pharmacol* 2002;64:9-20.

139.- Cash R, Raisman R, Lanfumey L, Ploska A, Agid Y. Cellular localization of adrenergic receptors in rat and human brain. *Brain Res* 1986;370:127-35.

140.- Pak Y, Pham N, Rotin D. Direct binding of the beta1 adrenergic receptor to the cyclic AMP-dependent guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF leads to Ras activation. *Mol Cell Biol* 2002;22:7942-52.

141.- Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 1996;383:547-50.

142.- Luttrell LM, Hawes BE, van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ, Lefkowitz RJ. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1996;271:19443-50.

143.- Wan Y, Kurotaki T, Huang XY. Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996;380:541-4.

144.- McIntire WE, MacCleery G, Garrison JC. The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of G<sub>s</sub> to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J Biol Chem* 2001;276:15801-9.

145.- Bullido MJ, Ramos MC, Ruiz-Gomez A, Tutor AS, Sastre I, Frank A, et al. Polymorphism in genes involved in adrenergic signaling associated with Alzheimer's. *Neurobiology of Aging* 2004;25:853-9.

146.- Maqbool A, Hall AS, Ball SG, Balmforth AJ. Common polymorphisms of beta1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay. *Lancet*

1999;353:897.

147.- Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta 1-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1999;274:12670-4.

148.- Garcia MA, Vazquez J, Jimenez C, Valdivieso F, Zafra F. Transcription factor AP-2 regulates human apolipoprotein E gene expression in astrocytoma cells. *J Neurosci* 1996;16:7550-6.

149.- Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, et al. cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1999;19:7486-94.

150.- de Rooij J, Boenink NM, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL. PDF-GEF1, a guanine nucleotide exchange factor specific for Rap1 and Rap2. *J Biol Chem* 1999;274:38125-30.

151.- Pham N, Cheglakov I, Koch CA, de Hoog CL, Moran MF, Rotin D. The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. *Curr Biol* 2000;10:555-8.

152.- Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, Lindblad U, Ranstam J, Rastam L, et al. Polymorphism in the beta(1)-adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation* 2001;104:187-90.

153.- Stein MB, Schork NJ, Gelernter J. A polymorphism of the beta1-adrenergic receptor is associated with low extraversion. *Biol Psychiatry* 2004;56:217-24.

154.- Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP Jr, Barsh GS, et al. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7375-80.

- 155.- Winder DG, Martin KC, Muzzio IA, Rohrer D, Chruscinski A, Kobilka B, et al. ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by beta-adrenergic receptors. *Neuron* 1999;24:715-26.
- 156.- Cahill L, Prins B, Weber JL, McGaugh. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature* 1994;371:702-4.
- 157.- Heinonen P, Koulu M, Pesonen U, Karvonen MK, Rissanen A, Laakso M, et al. Identification of a three-amino acid deletion in the alpha2B-adrenergic receptor that is associated with reduced basal metabolic rate in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2429-33.
- 158.- Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 1999;402:181-4.
- 159.- Klein U, Ramirez MT, Kobilka BK, von Zastrow M. A novel interaction between adrenergic receptors and the alpha-subunit of eukaryotic initiation factor 2B. *J Biol Chem* 1997;272:19099-102.
- 160.- Small KM, Brown KM, Forbes SL, Liggett SB. Polymorphic deletion of three intracellular acidic residues of the alpha2B-adrenergic receptor decreases G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization. *J Biol Chem* 2001;276:4917-22.
- 161.- Ruffolo RR, Nichols AJ, Stadel JM, Hieble JP. Pharmacologic and therapeutic applications of alpha2-adrenoceptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993;33:243-79.
- 162.- Snapir A, Mikkelsson J, Perola M, Penttila A, Scheinin M, Karhunen PJ. Variation in the alpha2B-adrenoceptor gene as a risk factor for prehospital fatal myocardial infarction and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:190-4.
- 163.- Dong X, Seelan RS, Qian C, Mai M, Liu W. Genomic structure, chromosome

mapping and expression analysis of the human AXIN2 gene. *Cytogenet Cell Genet* 2001;93:26-8.

164.- Phelan CM, Borg A, Cuny M, Crichton DN, Baldersson T, Andersen TI, et al. Consortium study on 1280 breast carcinomas: allelic loss on chromosome 17 targets subregions associated with family history and clinical parameters. *Cancer Res* 1998;58:1004-12.

165.- Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1999;340:1954-61.

166.- Marchio A, Meddeb M, Pineau P, Danglot G, Tiollais P, Bernheim A, et al. Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* 1997;18:59-65.

167.- Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998;280:596-9.

168.- Leung JY, Kolligs FT, Wu R, Zhai Y, Kuick R, Hanash S, et al. Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J Biol Chem* 2002;277:21657-65.

169.- Polakis P. Mutations in the APC gene and their implications for protein structure and function. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:66-71.

170.- Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:95-102.

171.- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-12.

- 172.- Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000;26:146-7.
- 173.- Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 2004;74:1043-50.
- 174.- Nelson N, Harvey WR. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 1999;79:361-85.
- 175.- Nelson N. Evolution of organellar proton-ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1992;1100:109-24.
- 176.- Guyton A, Hall J. Metabolismo de los hidratos de carbono y formación del trifosfato de adenosina. En: Guyton A, Hall J. *Tratado de fisiología médica*. 9ª ed. Madrid: Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España; 1996. p. 927-38.
- 177.- Philippe JM, Dubois JM, Rouzair-Dubois B, Cartron PF, Vallette F, Morel N. Functional expression of V-ATPases in the plasma membrane of glial cells. *Glia* 2002;37:365-73.
- 178.- Harvey WR. Physiology of V-ATPases. *J Exp Biol* 1992;172:1-17.
- 179.- Stevens TH, Forgac M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:779-808.
- 180.- Boyer PD. The binding change mechanism for ATP synthase: some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* 1993;1140:215-50.
- 181.- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993;11:1026-30.
- 182.- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*

1997;22:130-1, 134-8.

183.- Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J, Sorensen FB, Sogaard H, Nielsen JE. Histopathologic, stereologic, epidemiologic, and clinical parameters in the prognostic evaluation of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 1996;18:142-52.

184.- López-Martínez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre JM, De-Pancorbo M. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello. *Med Oral* 2002;7:108-20.

185.- Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995;332:429-35.

186.- Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, Francis R, Phillips E, Huang XH, et al. Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clin Cancer Res* 2000;6:2718-25.

187.- Tilstone. DNA microarrays: vital statistics. *Nature* 2003;424:610-2.

188.- Tsang YT, Chang YM, Lu X, Rao PH, Lau CC, Wong KK. Amplification of MGC2177, PLAG1, PSMC6P, and LYN in a malignant mixed tumor of salivary gland detected by cDNA microarray with tyramide signal amplification. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;152:124-8.

189.- Warner GC, Reis PP, Jurisica I, Sultan M, Arora S, Macmillan C, et al. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis. *Int J Cancer* 2004;110:857-68.

190.- Vigneswaran N, Wu J, Zacharias W. Upregulation of cystatin M during the progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma from primary tumor to metastasis. *Oral Oncol* 2003;39:559-68.

- 191.- Dooley TP, Reddy SP, Wilborn TW, Davis RL. Biomarkers of human cutaneous squamous cell carcinoma from tissues and cell lines identified by DNA microarrays and qRT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:1026-36.
- 192.- Gonzalez HE, Gujrati M, Frederick M, Henderson Y, Arumugam J, Spring PW, et al. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:754-9.
- 193.- Kornberg LJ, Villaret D, Popp M, Lui L, McLaren R, Brown H, et al. Gene expression profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity shows abnormalities in several signaling pathways. *Laryngoscope* 2005;115:690-8.
- 194.- Silverman S Jr, Gorsky M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer. California and national data- 1973 to 1985. *J Am Dent Assoc* 1990;120:495-9.
- 195.- Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol* 2000;36:387-9.
- 196.- Sarkaria JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. *Head Neck* 1994;16:107-11.
- 197.- McGregor AD, Rennie JS. Intra-oral squamous cell carcinoma in patients under 40 years of age. A report of 13 cases and review of the literature. *Br J Plast Surg* 1987;40:270-3.
- 198.- Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:546-52.
- 199.- Odajima T, Sasaki Y, Tanaka N, Kato-Mori Y, Asanuma H, Ikeda T, et al. Abnormal beta-catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation

with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, ki-67 labeling index, and clinicopathological features. *Hum Pathol* 2005;36:234-41.

200.- Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T, McLean P, Smith K, Bubb V, et al. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases. *Nature* 1991;352:347-9.

201.- Andresson T, Sparkowski J, Goldstein DJ, Schlegel R. Vacuolar H(+)-ATPase mutants transform cells and define a binding site for the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Biol Chem* 1995;270:6830-7.

202.- Ohta T, Numata M, Yagishita H, Futagami F, Tsukioka Y, Kitagawa H, et al. Expression of 16kDa proteolipid of vacuolar-type H(+)-ATPase in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1996;73:1511-7.

203.- Martinez-Zaguilan R, Lynch RM, Martinez GM, Gillies RJ. Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol* 1993;265:C1015-29.

204.- McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA, Cala PM. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:676-88.

205.- Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwala ZM. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 2002;16:430-50.

206.- Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005;10:786-95.

207.- Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I, Rochefort H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* 1997;15:382-92.

208.- Parkins CS, Stratford MR, Dennis MF, Stubbs M, Chaplin DJ. The

relationship between extracellular lactate and tumour pH in a murine tumour model of ischaemia-reperfusion. *Br J Cancer* 1997;75:319-23.

209.- Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, et al. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 2000;14:2185-97.

210.- Juel C. Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev* 1997;77:321-58.

211.- Hagag N, Lacal JC, Graber M, Aaronson S, Viola MV. Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol Cell Biol* 1987;7:1984-8.

212.- Ober SS, Pardee AB. Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2766-70.

213.- Reshkin SJ, Bellizzi A, Albarani V, Guerra L, Tommasino M, Paradiso A, et al. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, motility, and invasion induced by serum deprivation. *J Biol Chem* 2000;275:5361-9.

214.- Siczkowski M, Davies JE, Ng LL. Activity and density of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in normal and transformed human lymphocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 1994;267:C745-52.

215.- Doppler W, Jaggi R, Groner B. Induction of v-mos and activated Ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalinisation and cell-cycle progression. *Gene* 1987;54:147-53.

216.- Pouyssegur J, Franchi A, Pages G. pHi, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found Symp* 2001;240:186-96.

217.- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.

- 218.- Orive G, Reshkin SJ, Harguindey S, Pedraz JL. Hydrogen ion dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in cancer angiogenesis and antiangiogenesis. *Br J Cancer* 2003;89:1395-9.
- 219.- Glunde K, Guggino SE, Solaiyappan M, Pathak AP, Ichikawa Y, Bhujwala ZM. Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells. *Neoplasia* 2003;5:533-45.
- 220.- Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Rev Cancer* 2003;3:921-30.
- 221.- Paradiso A, Cardone RA, Bellizzi A, Bagorda A, Guerra L, Tommasino M, et al. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 induces cytoskeletal changes involving reciprocal RhoA and Rac1 signaling, resulting in motility and invasion in MDA-MB-435 cells. *Breast Cancer Res* 2004;6:616-28.
- 222.- Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Supryniewicz F, Schlegel R, Grinstein S. Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol* 2000;148:305-15.
- 223.- Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, Rubini C, Palmieri A, Stabellini G, et al. Genetic protrait of mild and severe lingual dysplasia. *Oral Oncol* 2005;41:365-74.
- 224.- Gu C, Ma YC, Benjamin J, Littman D, Chao MV, Huang XY. Apoptotic signaling through the beta-adrenergic receptor. A new Gs effector pathway. *J Biol Chem* 2000;275:20726-33.
- 225.- Lund TC, Coleman C, Horvath E, Sefton BM, Jove R, Medveczky MM, et al. The Src-family kinase Lck can induce STAT3 phosphorylation and DNA binding activity. *Cell signal* 1999;11:789-96.
- 226.- Yan L, Herrmann V, Hofer JK, Insel PA. Beta-adrenergic receptor/cAMP-mediated signaling and apoptosis of S49 lymphoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C1665-74.

- 227.- Iwai-Kanai E, Hasegawa K. Intracellular signaling pathways for norepinephrine and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2004;259:163-8.
- 228.- Communal C, Colucci WS. The control of cardiomyocyte apoptosis via the beta-adrenergic signaling pathways. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005;98:236-41.
- 229.- Shakib K, Norman JT, Fine LG, Brown LR, Godovac-Zimmermann J. Proteomics profiling of nuclear proteins for kidney fibroblasts suggests hypoxia, meiosis, and cancer may meet in the nucleus. *Proteomics* 2005;5:2819-38.
- 230.- Prabhakar NR. Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 2001;90:1986-94.
- 231.- Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88:1474-80.
- 232.- Aplin AE, Juliano RL. Regulation of nucleocytoplasmic trafficking by cell adhesion receptors and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 2001;155:187-91.
- 233.- Benmerah A. Endocytosis: signaling from endocytic membranes to the nucleus. *Curr Biol* 2004;14:314-6.
- 234.- Chatterjee TK, Fisher RA. RGS12TS-S localizes at nuclear matrix-associated subnuclear structures and represses transcription: structural requirements for subnuclear targeting and transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 2002;22:4334-45.
- 235.- McKnight S. Gene switching by metabolic enzymes--how did you get on the invitation list? *Cell* 2003;114:150-2.

## **VIII. ANEXOS**



## ANEXO I

### GENES SOBREENPRESADOS EN TEJIDO TUMORAL

Relación de genes sobreexpresados en tejido tumoral (se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre tejido normal y tejido tumoral).

Los genes están ordenados de mayor a menor alteración en su expresión (ratio).

nombre:

Nombre completo del gen en inglés.

GENBANK:

Clave utilizada en GenBank para cada gen.

valor:

$\log_2$  del ratio obtenido para cada gen.

Sd:

Desviación estándar para cada gen.



## GENES SOBREENPRESADOS EN TEJIDO TUMORAL

Nombre	genbank	valor	sd
adrenergic, beta, receptor kinase 2	NM_005160	2.92	1.19
angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	NM_001145	2.80	1.73
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5	NM_001152	2.80	1.27
a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109	2.77	1.55
adenylosuccinate synthase	NM_001126	2.67	1.66
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B (140kD)	NM_000938	2.60	1.48
glutathione S-transferase M5	NM_000851	2.49	1.20
myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult	NM_005963	2.47	1.57
ribosomal protein S7	NM_001011	2.33	1.81
a disintegrin and metalloproteinase domain 10	NM_001110	2.29	0.71
axin 2 (conductin, axil)	NM_004655	2.28	1.29
acid phosphatase 2, lysosomal	NM_001610	2.27	0.62
A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	NM_005100	2.26	1.55
ribosomal protein S15a	NM_001019	2.17	1.67
nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kD	NM_006163	2.14	1.49
L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	NM_005327	2.09	1.15
UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	NM_003115	2.06	0.96
gene from NF2/meningioma region of 22q12	NM_003678	2.06	1.36
coilin	NM_004645	2.06	1.25
syntaxin 4A (placental)	NM_004604	2.02	1.16

Nombre	genbank	valor	sd
COX10 (yeast) homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (heme A: farnesyltransferase)	NM_001303	1.97	0.84
oviductal glycoprotein 1, 120kD (mucin 9, oviductin)	NM_002557	1.95	1.13
adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	NM_001128	1.90	0.64
ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) 42kD	NM_001695	1.89	1.07
aspartylglucosaminidase	NM_000027	1.88	1.01
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2	NM_003783	1.88	1.50
ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), alpha polypeptide, 70kD, isoform 1	NM_001690	1.84	1.11
arginine vasopressin (neurophysin II, antidiuretic hormone, diabetes insipidus, neurohypophyseal)	NM_000490	1.80	1.17
lysyl oxidase-like 2	NM_002318	1.80	1.18
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 8 (RNA helicase)	NM_004941	1.80	1.34
ecotropic viral integration site 2B	NM_006495	1.80	1.29
acid phosphatase, prostate	NM_001099	1.79	0.88
N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	NM_001543	1.78	0.84
coagulation factor XI (plasma thromboplastin antecedent)	NM_000128	1.77	0.96
origin recognition complex, subunit 2 (yeast homolog)-like	NM_006190	1.77	1.12
Bloom syndrome	NM_000057	1.72	1.03
amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 (X11-like)	NM_005503	1.71	1.27
kallikrein 2, prostatic	NM_005551	1.71	0.98
integrin, beta 4	NM_000213	1.69	1.00
adrenergic, beta-1-, receptor	NM_000684	1.69	1.06
potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 1	NM_002238	1.69	0.90
ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) 21kD	NM_004047	1.68	1.09
carbonyl reductase 1	NM_001757	1.67	1.13

<b>Nombre</b>	<b>genbank</b>	<b>valor</b>	<b>sd</b>
interleukin 10 receptor, beta	NM_000628	1.66	1.04
amyloid P component, serum	NM_001639	1.66	1.30
bridging integrator 1	NM_004305	1.66	1.29
hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	NM_000860	1.65	1.19
pericentrin	NM_006031	1.65	1.18
ribosomal protein S6	NM_001010	1.64	1.05
actinin, alpha 2	NM_001103	1.63	1.05
ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	NM_001149	1.63	0.85
aldehyde oxidase 1	NM_001159	1.62	0.85
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6	NM_000871	1.61	1.11
ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) non-catalytic accessory protein 1A (110/116kD)	NM_005177	1.61	0.90
serine/threonine kinase 10	NM_005990	1.61	1.12
adrenergic, alpha-2B-, receptor	NM_000682	1.60	0.74
ADP-ribosylarginine hydrolase	NM_001125	1.60	1.18
ADP-ribosylation factor-like 1	NM_001177	1.60	0.97
dopamine receptor D5	NM_000798	1.59	0.73
activin A receptor type II-like 1	NM_000020	1.58	0.72
retinaldehyde-binding protein 1	NM_000326	1.58	1.25
follicle stimulating hormone, beta polypeptide	NM_000510	1.58	0.91
gonadotropin-releasing hormone 2	NM_001501	1.58	1.04
poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)	NM_002856	1.58	1.26
Rab geranylgeranyltransferase, alpha subunit	NM_004581	1.56	1.00

---

<b>Nombre</b>	<b>genbank</b>	<b>valor</b>	<b>sd</b>
keratin, cuticle, ultrahigh sulphur 1	NM_005553	1.56	0.77
glucosidase, beta; acid (includes glucosylceramidase)	NM_000157	1.55	0.74
osteomodulin	NM_005014	1.55	1.22
annexin A1	NM_000700	1.54	1.19
annexin A6	NM_001155	1.54	0.55
growth arrest-specific 7	NM_003644	1.54	1.14
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	NM_002591	1.53	1.07
nuclear localization signal deleted in velocardiofacial syndrome	NM_003776	1.53	1.15
oxytocin receptor	NM_000916	1.52	1.12
ribosomal protein S24	NM_001026	1.52	1.09
ring finger protein 22	NM_006458	1.52	1.04
calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299	1.51	1.11
ribosomal protein L10	NM_006013	1.51	1.07
basonuclin	NM_001717	1.50	0.89
RAB interacting factor	NM_002871	1.50	1.01
spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2)	NM_003126	1.50	1.12
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 (alpha, 35kD)	NM_003758	1.49	1.04
MAX-interacting protein 1	NM_005962	1.49	0.95
small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	NM_003090	1.48	1.02
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	NM_004776	1.48	1.18
adenylosuccinate lyase	NM_000026	1.47	0.53
hepatocyte nuclear factor 3, alpha	NM_004496	1.47	0.46
paired basic amino acid cleaving system 4	NM_002570	1.46	0.61

Nombre	genbank	valor	sd
adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit	NM_004644	1.46	1.09
adrenergic, alpha-1A-, receptor	NM_000680	1.45	0.62
arginine vasopressin receptor 1A	NM_000706	1.45	0.82
ribosomal protein L8	NM_000973	1.44	0.96
opsin 1 (cone pigments), medium-wave-sensitive (color blindness, deutan)	NM_000513	1.43	0.84
benzodiazapine receptor (peripheral)	NM_000714	1.43	0.75
major histocompatibility complex, class I-like sequence	NM_001531	1.43	0.75
annexin A3	NM_005139	1.42	0.78
ribosomal protein L29	NM_000992	1.41	0.92
chromosome 16 open reading frame 7	NM_004913	1.41	1.12
sarcoglycan, delta (35kD dystrophin-associated glycoprotein)	NM_000337	1.40	1.05
procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I	NM_000917	1.40	0.69
syntrophin, alpha 1(dystrophin-associated protein A1, 59kD, acidic component)	NM_003098	1.40	1.07
aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)	NM_000481	1.39	0.50
adrenergic, alpha-2C-, receptor	NM_000683	1.39	0.39
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B	NM_004636	1.39	0.45
collagen, type XIII, alpha 1	NM_005203	1.39	0.71
glutathione S-transferase pi	NM_000852	1.38	0.67
amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 (Fe65)	NM_001164	1.38	0.59
beaded filament structural protein 1, filensin	NM_001195	1.38	0.89
splicing factor, arginine/serine-rich 8 (suppressor-of-white-apricot, Drosophila homolog)	NM_004592	1.38	0.96
histamine receptor H1	NM_000861	1.37	0.98
eukaryotic translation termination factor 1	NM_004730	1.36	0.77

<b>Nombre</b>	<b>genbank</b>	<b>valor</b>	<b>sd</b>
regenerating islet-derived 1 alpha (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein)	NM_002909	1.35	1.06
Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	NM_000061	1.34	0.94
tryptophanyl-tRNA synthetase	NM_004184	1.34	0.82
MCF.2 cell line derived transforming sequence	NM_005369	1.34	0.96
sarcoglycan, beta (43kD dystrophin-associated glycoprotein)	NM_000232	1.33	0.67
peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	NM_000943	1.33	0.99
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1E	NM_000865	1.32	0.77
Niemann-Pick disease, type C1	NM_000271	1.31	0.94
FK506-binding protein 5	NM_004117	1.31	0.75
angiopoietin 1	NM_001146	1.30	1.00
acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	NM_000019	1.28	0.85
retinal outer segment membrane protein 1	NM_000327	1.28	1.02
alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)	NM_001150	1.28	0.83
A kinase (PRKA) anchor protein 6	NM_004274	1.28	0.77
adrenergic, alpha-1D-, receptor	NM_000678	1.27	0.87
afamin	NM_001133	1.27	0.71
caudal type homeo box transcription factor 2	NM_001265	1.27	0.96
protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform	NM_002707	1.27	0.90
small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide (18kD)	NM_004175	1.27	0.72
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	NM_000859	1.26	0.81
adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I	NM_001118	1.26	0.33
RAS protein activator like 1 (GAP1 like)	NM_004658	1.26	0.80

Nombre	genbank	valor	sd
laminin, alpha 3 (nicein (150kD), kalinin (165kD), BM600 (150kD), epilegrin)	NM_000227	1.25	0.73
solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group)	NM_000342	1.25	0.89
diacylglycerol kinase, epsilon (64kD)	NM_003647	1.25	0.82
acid phosphatase 5, tartrate resistant	NM_001611	1.23	0.86
v-myb avian myeloblastosis viral oncogéne homolog	NM_005375	1.23	0.98
meprin A, beta	NM_005925	1.23	0.98
thyrotropin-releasing hormone	NM_007117	1.23	0.76
fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome)	NM_000141	1.22	0.96
glucagon-like peptide 1 receptor	NM_002062	1.22	0.91
beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein)	NM_003766	1.22	0.84
coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator)	NM_000131	1.21	0.61
glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2C	NM_000835	1.21	0.65
a disintegrin and metalloproteinase domain 11	NM_002390	1.21	0.83
angiotensin receptor 1B	NM_004835	1.21	0.77
metallothionein 2A	NM_005953	1.21	0.93
complement component 1, r subcomponent	NM_001733	1.20	0.92
small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	NM_003095	1.20	0.64
gap junction protein, alpha 1, 43kD (connexin 43)	NM_000165	1.19	0.94
adipose differentiation-related protein	NM_001122	1.19	0.93
glutamate receptor, metabotropic 4	NM_000841	1.18	0.69
potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 4	NM_002233	1.18	0.92
calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	NM_000723	1.17	0.49

Nombre	genbank	valor	sd
pyruvate carboxylase	NM_000920	1.16	0.63
eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	NM_003760	1.16	0.41
growth factor independent 1B (potential regulator of CDKN1A, translocated in CML)	NM_004188	1.16	0.56
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	NM_005518	1.16	0.64
vesicle-associated membrane protein 4	NM_003762	1.15	0.85
annexin A2	NM_004039	1.15	0.86
fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3	NM_004457	1.15	0.75
Pirin	NM_003662	1.14	0.74
a disintegrin and metalloproteinase domain 22	NM_004194	1.14	0.90
solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 5	NM_004594	1.14	0.68
arginine vasopressin receptor 2 (nephrogenic diabetes insipidus)	NM_000054	1.13	0.54
homeo box A13	NM_000522	1.13	0.91
peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	NM_000919	1.13	0.50
intercellular adhesion molecule 4, Landsteiner-Wiener blood group	NM_001544	1.13	0.69
outer dense fibre of sperm tails 2	NM_002540	1.13	0.64
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	NM_003079	1.13	0.74
arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	NM_001139	1.12	0.63
glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	NM_002065	1.12	0.46
granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	NM_004131	1.12	0.76
jun D proto-oncogéne	NM_005354	1.12	0.49
nuclear transcription factor Y, beta	NM_006166	1.11	0.78
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	NM_002221	1.10	0.50

Nombre	genbank	valor	sd
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2	NM_003077	1.10	0.54
lipase, gastric	NM_004190	1.10	0.86
annexin A11	NM_001157	1.09	0.76
chromosome X open reading frame 12	NM_003492	1.09	0.40
sorting nexin 3	NM_003795	1.09	0.65
S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	NM_005983	1.09	0.86
ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), subunit 1	NM_001183	1.08	0.23
acrosomal vesicle protein 1	NM_001612	1.08	0.47
crystallin, mu	NM_001888	1.08	0.79
small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide (16kD)	NM_006938	1.08	0.64
cytochrome P450, subfamily IIC (mephenytoin 4-hydroxylase), polypeptide 19	NM_000769	1.07	0.85
acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	NM_001093	1.07	0.85
alkaline phosphatase, intestinal	NM_001631	1.07	0.52
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 7 (zeta, 66/67kD)	NM_003753	1.07	0.58
bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin)	NM_000711	1.06	0.74
neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	NM_005380	1.06	0.63
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta	NM_000815	1.05	0.53
dynamin 1	NM_004408	1.05	0.80
glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3	NM_000828	1.04	0.57
cAMP responsive element binding protein 1	NM_004379	1.04	0.53
T-box 6	NM_004608	1.04	0.43
ARP1 (actin-related protein 1, yeast) homolog A (centractin alpha)	NM_005736	1.04	0.73

Nombre	genbank	valor	sd
minichromosome maintenance deficient (mis5, S. pombe) 6	NM_005915	1.04	0.77
calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	NM_000722	1.03	0.75
axonal transport of synaptic vesicles	NM_004321	1.03	0.63
branched chain aminotransferase 2, mitochondrial	NM_001190	1.02	0.82
sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	NM_003105	1.02	0.66
claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein)	NM_005602	1.02	0.53
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 (gamma, 40kD)	NM_003756	1.01	0.62
ocular albinism 1 (Nettleship-Falls)	NM_000273	1.00	0.76
immature colon carcinoma transcript 1	NM_001545	1.00	0.49
AU RNA-binding protein/enoyl-Coenzyme A hydratase	NM_001698	1.00	0.49
Burkitt lymphoma receptor 1, GTP-binding protein	NM_001716	1.00	0.41
SRY (sex determining region Y)-box 10	NM_006941	1.00	0.71
adenosine deaminase, RNA-specific	NM_001111	0.99	0.66
glypican 1	NM_002081	0.99	0.79
synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	NM_003087	0.99	0.51
complement component 4B	NM_000592	0.97	0.42
carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	NM_001266	0.97	0.74
nucleolar protein 4	NM_003787	0.97	0.69
ATPase, Cu <sup>++</sup> transporting, alpha polypeptide (Menkes syndrome)	NM_000052	0.96	0.50
creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)	NM_001825	0.96	0.57
thyroglobulin	NM_003235	0.96	0.72
bone marrow stromal cell antigen 1	NM_004334	0.96	0.53
glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	NM_001498	0.95	0.37

Nombre	genbank	valor	sd
plastin 1 (I isoform)	NM_002670	0.95	0.68
dentin matrix acidic phosphoprotein	NM_004407	0.95	0.72
RAN binding protein 2	NM_006267	0.95	0.41
pro-melanin-concentrating hormone	NM_002674	0.94	0.57
ephrin-A2	NM_001405	0.93	0.26
peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	NM_000942	0.92	0.61
cAMP responsive element binding protein-like 2	NM_001310	0.92	0.42
BN51 (BHK21) temperature sensitivity complementing	NM_001722	0.92	0.57
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	NM_003401	0.92	0.51
ATX1 (antioxidant protein 1, yeast) homolog 1	NM_004045	0.92	0.36
armadillo repeat gene deletes in velocardiofacial syndrome	NM_001670	0.91	0.71
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, activator of NFKB	NM_003839	0.91	0.62
acetylserotonin O-methyltransferase-like	NM_004192	0.89	0.24
methionine-tRNA synthetase	NM_004990	0.89	0.66
brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	NM_006420	0.89	0.64
A kinase (PRKA) anchor protein 1	NM_003488	0.88	0.54
paralemmin	NM_002579	0.87	0.61
N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (sulfamidase)	NM_000199	0.86	0.66
amphiphysin (Stiff-Mann syndrome with breast cancer 128kD autoantigen)	NM_001635	0.86	0.50
B lymphoid tyrosine kinase	NM_001715	0.86	0.62
jun B proto-oncogéne	NM_002229	0.86	0.50
delta sleep inducing peptide, immunoreactor	NM_004089	0.85	0.65
BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3-like	NM_004331	0.85	0.19

Nombre	genbank	valor	sd
adenylate cyclase 8 (brain)	NM_001115	0.84	0.52
transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kD, elongin A)	NM_003198	0.83	0.35
v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogéne related	NM_004449	0.83	0.48
complement component 8, alpha polypeptide	NM_000562	0.82	0.24
procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2	NM_000935	0.82	0.32
sine oculis homeobox (Drosophila) homolog 1	NM_005982	0.82	0.53
chymotrypsin-like	NM_001907	0.81	0.58
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3	NM_002635	0.80	0.49
ribosomal protein L37	NM_000997	0.79	0.36
arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	NM_001629	0.79	0.46
pyruvate kinase, muscle	NM_002654	0.79	0.48
dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1-related)	NM_004090	0.79	0.61
5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	NM_004044	0.78	0.36
H1 histone family, member 1	NM_005325	0.78	0.46
antigen identified by monoclonal antibody MRC OX-2	NM_005944	0.78	0.41
vitelliform macular dystrophy (Best disease, bestrophin)	NM_004183	0.77	0.52
adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit	NM_001127	0.76	0.18
carboxyl ester lipase-like (bile salt-stimulated lipase-like)	NM_001808	0.76	0.38
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	NM_002153	0.76	0.48
Sp4 transcription factor	NM_003112	0.76	0.42
CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine rich family)	NM_005894	0.76	0.51
PTK6 protein tyrosine kinase 6	NM_005975	0.76	0.43
ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), beta polypeptide, 56/58kD, isoform 1	NM_001692	0.75	0.35

Nombre	genbank	valor	sd
semenogelin II	NM_003008	0.75	0.49
beaded filament structural protein 2, phakinin	NM_003571	0.75	0.43
poly (ADP-ribose) glycohydrolase	NM_003631	0.74	0.53
guanine nucleotide-releasing factor 2 (specific for crk proto-oncogéne)	NM_005312	0.74	0.52
inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kD	NM_005541	0.74	0.55
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (epsilon, 47kD)	NM_003754	0.71	0.32
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase)	NM_006264	0.71	0.54
polymerase (DNA directed), epsilon 2	NM_002692	0.69	0.39
amyloid beta precursor protein-binding protein 1, 59kD	NM_003905	0.69	0.42
fucosidase, alpha-L- 1, tissue	NM_000147	0.68	0.47
natural killer-tumor recognition sequence	NM_005385	0.68	0.52
melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropic hormone)	NM_000529	0.67	0.40
aldehyde dehydrogenase 9 (gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase, E3 isozyme)	NM_000696	0.66	0.48
diacylglycerol kinase, zeta (104kD)	NM_003646	0.66	0.53
sodium channel, voltage-gated, type II, beta polypeptide	NM_004588	0.66	0.33
capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	NM_004930	0.66	0.48
destrin (actin depolymerizing factor)	NM_006870	0.66	0.48
biliverdin reductase A	NM_000712	0.65	0.32
stanniocalcin 2	NM_003714	0.65	0.48
multiple PDZ domain protein	NM_003829	0.65	0.42
dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase (3,2 trans-enoyl-Coenzyme A isomerase)	NM_001919	0.64	0.25
acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	NM_004035	0.63	0.38
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9 (22kD, B22)	NM_005005	0.63	0.45

<b>Nombre</b>	<b>genbank</b>	<b>valor</b>	<b>sd</b>
Golgi vesicular membrane trafficking protein p18	NM_005868	0.63	0.28
calcium/calmodulin-dependent protein kinase I	NM_003656	0.62	0.40
phospholipase A2, group IB (pancreas)	NM_000928	0.61	0.39
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	NM_002815	0.61	0.25
neurofilament, light polypeptide (68kD)	NM_006158	0.61	0.49
epithelial membrane protein 2	NM_001424	0.60	0.46
phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)	NM_002637	0.60	0.37
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	NM_001549	0.59	0.44
anterior gradient 2 ( <i>Xenopus laevis</i> ) homolog	NM_006408	0.59	0.28
GA-binding protein transcription factor, alpha subunit (60kD)	NM_002040	0.58	0.42
glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1	NM_000827	0.57	0.22
neurotensin receptor 1 (high affinity)	NM_002531	0.57	0.42
RAS p21 protein activator 2	NM_006506	0.57	0.38
PHD finger protein 2	NM_005392	0.56	0.33
glucose-6-phosphatase, catalytic (glycogen storage disease type I, von Gierke disease)	NM_000151	0.55	0.22
methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome)	NM_004992	0.55	0.39
membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10)	NM_000902	0.54	0.41
menage a trois 1 (CAK assembly factor)	NM_002431	0.52	0.32
acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	NM_006111	0.52	0.37
protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	NM_002836	0.51	0.30
T-box 10	NM_005995	0.48	0.38
hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	NM_000196	0.47	0.28
myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	NM_003482	0.47	0.36

---

<b>Nombre</b>	<b>genbank</b>	<b>valor</b>	<b>sd</b>
potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3	NM_004980	0.45	0.14
G protein-coupled receptor 17	NM_005291	0.44	0.17
oxysterol binding protein	NM_002556	0.43	0.28
microtubule-associated protein tau	NM_005910	0.42	0.25
oxytocin, prepro- (neurophysin I)	NM_000915	0.34	0.21
caudal type homeo box transcription factor 1	NM_001804	0.30	0.22
potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 4	NM_004978	0.27	0.18
ADP-ribosylation factor 3	NM_001659	0.21	0.13



## ANEXO II

Se muestra la información referente a los genes *ADRBK2*, *ATP6V0E* y *ATP6V1C1* y su distribución en los distintos tejidos del organismo comparando el tejido normal con el tejido canceroso siguiendo una escala de colores que va del azul al rojo que indica el nivel de expresión del gen (de menor a mayor), según la base de datos del **Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer** (135).



<b>ADRBK2</b>
---------------

NORMAL

CANCER

		Cerebro		
		Retina	No hay Datos	
		Tiroides		
		Pulmón		
		Corazón	No Aplicable	
		Mama		
		Estómago		
		Páncreas		
		Hígado		

	Riñón	
	Colon	
	Peritoneo	
	Cordón espinal	No hay Datos
No hay Datos	Ovario	
	Placenta	No Aplicable
	Próstata	
	Médula espinal	No hay Datos
No hay Datos	Cartílago	
	Músculo	No hay Datos

	Piel		
	Nódulo linfático	No hay Datos	
	Células blancas sanguíneas	No hay Datos	
	Vascular	No hay Datos	

**ATP6V0E**

**N O R M A L**

**C A N C E R**

		Cerebro		
		Retina	No hay Datos	
		Tiroides		
		Pulmón		
		Corazón	No Aplicable	
		Mama		
		Estómago		
		Páncreas		
		Hígado		
	<p><b>Tags per 200,000</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #000080; margin-right: 5px;"></span> &lt; 2</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #0000FF; margin-right: 5px;"></span> 2 to 3</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #00BFFF; margin-right: 5px;"></span> 4 to 7</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #ADD8E6; margin-right: 5px;"></span> 8 to 15</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #B0C4DE; margin-right: 5px;"></span> 16 to 31</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #F080F0; margin-right: 5px;"></span> 32 to 63</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #DC143C; margin-right: 5px;"></span> 64 to 127</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #FF0000; margin-right: 5px;"></span> 128 to 255</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #FF0000; margin-right: 5px;"></span> 256 to 512</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #FF0000; margin-right: 5px;"></span> &gt; 512</li> </ul>			

	Riñón	
	Colon	
	Peritoneo	
	Cordón Espinal	No hay Datos
No hay Datos	Ovario	
	Placenta	No Aplicable
	Próstata	
	Médula Ósea	No hay Datos
No hay Datos	Cartílago	
	Músculo	No hay Datos

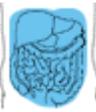
	Piel	
	Nódulo linfático	No hay Datos
	Células blancas sanguíneas	No hay Datos
	Vascular	No hay Datos

**ATP6V1C1****NORMAL****CANCER**

		Cerebro		
		Retina	No hay Datos	
		Tiroides		
		Pulmón		
		Corazón	No Aplicable	
		Mama		
		Estómago		
		Páncreas		
		Hígado		
		Riñón		

Tags per 200,000

-  < 2
-  2 to 3
-  4 to 7
-  8 to 15
-  16 to 31
-  32 to 63
-  64 to 127
-  128 to 255
-  256 to 512
-  > 512

	Colon	
	Peritoneo	
	Cordón espinal	No hay Datos
No hay Datos	Ovario	
	Placenta	No Aplicable
	Próstata	
	Médula Ósea	No hay Datos
No hay Datos	Cartílago	
	Músculo	No hay Datos

	Piel	
	Nódulo linfático	No hay Datos
	Células blancas sanguíneas	No hay Datos
	Vascular	No hay Datos



## **ANEXO III**

### **MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**





Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela

Hospital Clínico Universitario  
Hospital Xeral Básico de Conxo  
Hospital Psiquiátrico de Conxo  
Hospital Gil Casares

NHC :



Data N:

TIS :

Data Int.:

Oño:

Serv: CIR. MAXILOFACIAL

Datos de identificación del paciente

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA REALIZAR ANÁLISIS GENÉTICO DIFERENCIAL DE NEOPLASIAS DE LA CAVIDAD ORAL

El paciente arriba citado autoriza la utilización de la pieza extirpada quirúrgicamente para realizar estudios experimentales sobre la expresión genética diferencial de sus células. Asimismo, y con la misma finalidad, autoriza a la obtención de una muestra de mucosa oral sana con la finalidad antes descrita.

La finalidad de este estudio es puramente experimental para ampliar el conocimiento científico del comportamiento de los tumores de la cavidad oral. No va a implicar ninguna interferencia con el diagnóstico ni con el tratamiento de la enfermedad. Asimismo, el resultado de los estudios antes mencionados serán absolutamente confidenciales.

Santiago, 1 de febrero de 2004

Fdo: Dr Abel García  
Jefe de Sección

El paciente