

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS  
IMPLICADAS EN LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR  
CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO.  
CORRELACIÓN CLÍNICA.**

**TESIS DOCTORAL**

**RAQUEL SEIJAS TAMAYO**

**DIRECTORES**

**PROF. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ**

**PROF. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO**

**Salamanca, 2013**

PROF. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ,  
CATEDRÁTICO DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE MEDICINA,  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PROF. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO,  
CATEDRÁTICO DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE MEDICINA,  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS IMPLICADAS EN LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO. CORRELACIÓN CLÍNICA.” que presenta la licenciada en medicina Raquel Seijas Tamayo, ha sido realizado bajo su dirección y reúne, a su juicio, todos los requisitos necesarios, para ser presentado ante el tribunal correspondiente, a fin de optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, se expide el presente certificado.

En Salamanca, a 5 de julio, de 2013.

Juan Jesús Cruz Hernández

Rogelio González Sarmiento

*A mis padres,  
por su dedicación y entrega*

*A mi hermana Ana,  
por su particular forma de  
entender la vida*

*A mi sobrino Alejandro,  
por ser la alegría de la casa*

*A Josean, por estar a mi lado*

## **Agradecimientos**

A los Profesores Juan Jesús Cruz Hernández y Rogelio González Sarmiento, directores de este trabajo, por darme la oportunidad de realizar este estudio bajo su supervisión, por su disponibilidad y por su apoyo permanente. Por ser un ejemplo de dedicación a los demás.

Al Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico de Salamanca, por ser una parte indispensable de mi formación, por trasmitirme no solamente conocimientos científicos, sino el trato personal con el paciente, buscando siempre un cuidado integral del mismo.

Al laboratorio de la Unidad de Medicina Molecular del departamento de Medicina, por hacerme un hueco para poder realizar mis experimentos y análisis. Especialmente a Clara por el tiempo dedicado a enseñarme todo lo necesario para el estudio de los polimorfismos y su continua atención, así como a Irene por sus consejos y ayuda con p53.

Al Grupo de Epidemiología Genética y Molecular, especialmente a su jefa, la Dra Núria Malats, por permitirme formar parte de un Grupo en el que cada día aprendo un poquito más.

Al Grupo de Carcinogénesis epitelial del CNIO, dirigido por el Dr. F.X. Real, por haberme acogido con tanto cariño las temporadas que he pasado por allí.

A todos los profesores que a lo largo de mi vida me han hecho crecer tanto a nivel intelectual como personal.

A mis amigos, que con su soporte y afecto han facilitado la realización de este trabajo.

A todos los pacientes, familias, personal de enfermería, administrativos... y todas las personas que de una manera u otra han hecho posible que este estudio se llevara a cabo.

## **Financiación**

Este trabajo de tesis doctoral ha sido financiado parcialmente por:

La “Asociación para el desarrollo de la Oncología Médica” del Servicio de Oncología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

Ayuda de posgrado para la Formación del Profesorado Universitario (FPU).  
Ministerio de Educación y Ciencia. Referencia AP2009-1073.

Ayuda para contratos de formación en investigación “Río Hortega”, post  
Formación Sanitaria Especializada. Acción Estratégica de Salud. Instituto de  
Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. Número de  
expediente CM10/00006.

## Comunicación de los resultados

Los resultados de este trabajo han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

- **Influencia de determinados polimorfismos en genes reparadores del ADN, en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, en la respuesta al tratamiento basado en cisplatino**

Raquel Seijas Tamayo, Elvira del Barco Morillo, Jesús Herranz Valera, Juan Carlos Adansa, Clara Cieza Borrella, Irene Rodríguez-Hernández, Rogelio González Sarmiento, Juan Jesús Cruz Hernández.

2º Simposio Nacional SEOM. Madrid, Octubre de 2012. Comunicación Oral.

- **Influencia de determinados polimorfismos en genes reparadores del ADN, en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, en el desarrollo precoz de la enfermedad**

Raquel Seijas Tamayo, Elvira del Barco Morillo, Carolina López Ordóñez, Clara Cieza Borrella, Irene Rodríguez-Hernández, Mercedes Sánchez Barba, Jesús Herranz Valera, Rogelio González Sarmiento, Juan Jesús Cruz Hernández.

XIII Congreso Nacional SEOM. Málaga, Octubre de 2011. Comunicación Oral.

- **Single Nucleotide Polymorphisms in DNA repair genes and association with head and neck cancer risk in our region. Preliminary results**

Seijas Tamayo, Raquel; Cieza Borrella, Clara; Rodríguez Hernández, Irene; Herranz Valera, Jesús; López Ordóñez, Carolina; del Barco Morillo, Elvira; González Sarmiento, Rogelio; Cruz Hernández, Juan Jesús.

XIII Congreso Nacional de ASEICA. Salamanca, septiembre de 2011. Póster.

- **Polimorfismos en genes reparadores del ADN, en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, en función de la edad.**

Raquel Seijas Tamayo, Clara Cieza Borrella, Irene Rodríguez-Hernández, Carolina López Ordóñez, Mercedes Sánchez Barba, Elvira del Barco Morillo, Rogelio González Sarmiento, Juan Jesús Cruz Hernández.

Ganador del tercer premio en el Concurso de Pósters de Oncología Básica y Traslacional en Oncología para Jóvenes Investigadores celebrado durante el III Simposium Bases biológicas del cáncer y terapias personalizadas. Salamanca, mayo de 2011. Póster.

# ÍNDICE

<b>Listado de abreviaturas</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1-. Epidemiología del cáncer de cabeza y cuello (CCC)</b>	<b>7</b>
1.1 Incidencia	8
1.2 Mortalidad	9
1.3 Prevalencia	10
<b>2-. Factores de riesgo</b>	<b>11</b>
2.1 Tabaco	11
2.2 Alcohol	12
2.3 Infecciones	13
2.4 Factores dietéticos	14
2.5 Factores ocupacionales	15
2.6 Radiaciones	15
2.7 Susceptibilidad genética	16
2.8 Otros factores de riesgo	17
<b>3-. Patogénesis</b>	<b>17</b>
3.1 Modelos de carcinogénesis en CCC	17
3.2 Cancerización de campo	20
<b>4-. Historia natural de la enfermedad</b>	<b>23</b>
4.1 Crecimiento local y segundos tumores	23
4.2 Diseminación linfática	23
4.3 Diseminación hemática	23
<b>5-. Diagnóstico</b>	<b>24</b>
5.1 Screening	24
5.2 Manifestaciones clínicas	24
5.3 Exploración física	24
5.4 Exámenes complementarios y estudio de extensión	25
5.5 Confirmación histológica	25

6-. Anatomía Patológica	26
6.1 Tipo histológico	26
6.2 Grado histológico	28
7-. Estadificación	28
8-. Factores pronósticos	29
8.1 Factores relacionados con el paciente	29
8.2 Factores relacionados con el tumor	31
8.3 Factores relacionados con el tratamiento	32
9-. Tratamiento	33
10-. Efectos adversos del tratamiento	34
11-. Genes de baja penetrancia y cáncer	37
11.1 Modelo poligénico	37
11.2 Estudios de asociación	38
11.2.1 Método del gen candidato	39
11.2.2 Estudios de asociación de genoma completo (GWAS)	40
12-. Mecanismos de reparación del ADN	41
12.1 Vía de reparación por escisión de bases	43
12.1.1 XRCC1 Arg399Gln	45
12.1.2 APEX Asp148Glu	47
12.2 Vía de reparación por escisión de nucleótidos	48
12.2.1 XPD Lys751Gln	50
12.2.2 ERCC1 Asn118Asn	52
12.3 Vía de la recombinación homóloga y vía de unión de extremos de ADN no homólogos	53
12.3.1 XRCC3 Thr241Met	55
13-. Funciones y polimorfismos del gen p53	56
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>59</b>



<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>62</b>
1-. Sujetos del estudio	62
1.1 Pacientes	62
1.2 Controles	63
2-. Obtención de la muestra y extracción del ADN	63
3-. Estudio de polimorfismos en genes reparadores del ADN (XRCC1, APEX1, XPD, ERCC1, XRCC3)	65
4-. Estudio del polimorfismos del codón 72 del gen p53	69
4.1 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR	69
4.2 Electroforesis en gel de agarosa	70
4.3 Digestión con endonucleasa	71
5-. Análisis estadístico	72
<b>RESULTADOS</b>	<b>76</b>
1-. Descripción de los casos	76
1.1 Características tumorales	76
1.2 Hábitos tóxicos	77
1.3 Antecedentes oncológicos familiares	78
1.4 Antecedentes oncológicos personales	79
1.5 Lugar de procedencia	79
1.6 Estado civil	79
1.7 Tratamiento realizado	80
1.8 Recaída de la enfermedad	81
2-. Descripción de los controles	82
2.1 Hábitos tóxicos	82
2.2 Antecedentes familiares	82
2.3 Lugar de procedencia	82
3-. Polimorfismos en casos y controles para valorar su posible implicación en el riesgo de padecer la enfermedad (marcadores de riesgo)	83

4-. Polimorfismos en casos mayores y menores o iguales a 50 años para valorar su posible implicación en el desarrollo de la enfermedad a una edad temprana (marcadores de riesgo)	89
5-. Polimorfismos en relación con la respuesta al tratamiento (marcadores predictivos de respuesta)	93
6-. Polimorfismos en relación con la supervivencia libre de enfermedad (marcadores pronósticos)	97
6.1 Enfermedad local	97
6.2 Enfermedad localmente avanzada	105
7-. Polimorfismos en relación con la toxicidad secundaria al tratamiento (marcadores predictivos de toxicidad)	108
7.1 Toxicidad secundaria a la QT de inducción	108
7.2 Toxicidad secundaria al tratamiento con RT	110
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>112</b>
1-. Vía de reparación por escisión de bases (BER)	115
1.1 XRCC1 codón 399	115
1.2 Apex codón 148	118
2-. Vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER)	118
2.1 XPD codón 751	119
2.2 ERCC1 codón 118	122
3-. Vía de reparación por recombinación homóloga (HR)	122
3.1 XRCC3 codón 241	123
4-. Control del ciclo celular: polimorfismo en el codón 72 de <i>p53</i>	126
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>130</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>131</b>

## Listado de abreviaturas

5-FU: 5-Fluorouracilo

A: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AP: anatomía patológica

APE (*Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease*): endonucleasaapurínica/apirimidínica

Arg (R): arginina

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

Asn (D): asparagina

Asp (D): ácido aspártico

BER (*Base Excision Repair*): reparación por escisión de bases

C: citosina

CCC: cáncer de cabeza y cuello

CECC: cáncer escamoso de cabeza y cuello

CS (*Cockayne syndrome*): síndrome de Cockayne

DSB (*Double Strand Breaks*): roturas del ADN de doble cadena

ERCC (*Excision-Repair Cross-Complementing*): reparación por escisión del grupo de complementación cruzada

G: guanina

GGR (*Global Genome Repair*): reparación global del genoma

Gln (Q): glutamina

Glu (E): ácido glutámico

GWAS (*Genome-Wide Association Study*): estudio de asociación del genoma completo

HR: Hazard Ratio

HR (*Homologous Recombination*): recombinación homóloga

IC: intervalo de confianza

Lys (K): lisina

Met (M): metionina

NER (*Nucleotide excision repair*): reparación por escisión de nucleótidos

NHEJ (*Non-homologous end joining*): unión de extremos no homólogos

OR: Odds Ratio

ORL: otorrinolaringología, otorrinolaringológico/a

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

PF: cisplatino+5-FU

Pro (P): prolina

QT: quimioterapia

TPF: taxotere+cisplatino+5-FU

RT: radioterapia

SLE: supervivencia libre de enfermedad

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*): polimorfismo de un solo nucleótido

SSB (*Single Strand Breaks*): roturas del ADN de cadena simple

T: timina

TCR (*Transcription Coupled Repair*): reparación acoplada a la transcripción

Thr (T): treonina

TTD: Tricotiodistrofia

UV: ultravioleta

VEB: virus de Epstein-Barr

VPH: virus del papiloma humano

XP: Xeroderma pigmentosum

XPD: Xeroderma pigmentosum grupo D

XRCC (*X-ray Repair Cross-Complementation*): reparación de rayos X del grupo de complementación cruzada

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de cabeza y cuello (CCC), incluido, en ocasiones, dentro de los tumores de vías aerodigestivas superiores, comprende un grupo de neoplasias localizadas en labio y cavidad oral, faringe (nasofaringe, orofaringe, hipofaringe), laringe, seno maxilar, cavidad nasal y seno etmoidal, melanoma de mucosas, glándulas salivares mayores y glándula tiroides<sup>(1)</sup>.

Son tumores que presentan una gran heterogeneidad tanto desde el punto de vista epidemiológico como histológico, de localización, historia natural, tratamiento, etc. Por lo tanto, el abordaje del cáncer de cabeza y cuello es complejo y debe realizarse de manera multidisciplinar.

En el presente trabajo nos centramos en el estudio de los cánceres epidermoides de cavidad oral, oro e hipofaringe y laringe para poder realizar un estudio más homogéneo, dentro de la gran diversidad.

### 1-. EPIDEMIOLOGÍA DEL CCC

Con el objetivo de conocer y comparar los datos de incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer, de los diferentes países a nivel mundial, nace el proyecto GLOBOCAN.

En el artículo publicado por GLOBOCAN en el año 2010, se recoge la incidencia y mortalidad por cáncer en el año 2008 a nivel mundial. Los datos referentes al CCC se obtienen a través de las cifras de cáncer de labio y cavidad oral, nasofaringe, faringe diferente de nasofaringe, y laringe; ocupando el 7º puesto tanto en incidencia, con 633.000 casos nuevos, como en mortalidad, con 355.000 muertes por estos cánceres<sup>(2)</sup>.

En España, gracias al informe realizado en el año 2005 por el Grupo de Epidemiología Ambiental y Cáncer del Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III), "La situación del cáncer en España"<sup>(3)</sup>, podemos conocer, de forma detallada, la realidad sobre el cáncer en España y compararla con la existente en otros países europeos.

Este informe ha sido actualizado, posteriormente, con los datos de mortalidad e incidencia hasta el año 2006: "La situación del cáncer en España

1975-2006<sup>(4)</sup>. En este informe actualizado se recogen muchos de los datos descritos a continuación sobre el CCC.

### 1.1 Incidencia

La incidencia del cáncer de laringe, cavidad bucal y faringe varía de forma substancial entre hombres y mujeres en todos los registros españoles, debido al diferente porcentaje de mujeres y hombres que fuman. Así, las tasas de incidencia, entre los años 1998-2002, son mucho mayores en hombres variando, en los diferentes registros poblacionales españoles, entre 6-7:1 para los cánceres de cavidad bucal y faringe, siendo esta diferencia todavía mayor en el caso del cáncer de laringe, 20-60:1 dependiendo del registro<sup>(4)</sup>.

La prevalencia de hombres fumadores disminuyó del 64,1% en 1978 a 35,3% en 2006/07, mientras que en mujeres aumentó del 17,6% a 23,9% en los mismos años<sup>(5)</sup>. Este cambio en el consumo de tabaco se traduce en un cambio de tendencia en la incidencia por sexos de los tumores relacionados con el tabaco.

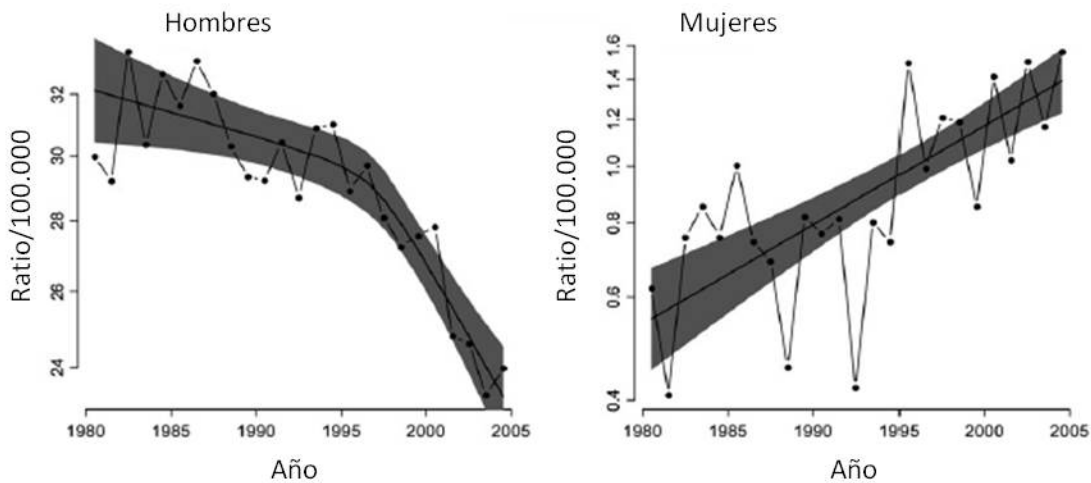


Figura 1: Tendencias en las tasas de incidencia para el cáncer laríngeo en España entre personas mayores de 30 años, por sexo, ajustado por edad y por registro. Figura modificada de Izarzugaza et al.<sup>(6)</sup>

En relación a otros países de Europa, en el año 2002, España ocupaba el tercer lugar en incidencia de cáncer de la cavidad bucal y faringe en hombres, solamente precedido por Hungría y Francia; ocupando, las mujeres, una situación intermedia. En cuanto al cáncer de laringe España es también el tercer país de

## INTRODUCCIÓN

Europa con mayor incidencia (según estimaciones para el año 2002); sin embargo, la incidencia en mujeres se sitúa en los últimos lugares en relación a otros países de la Unión Europea<sup>(4)</sup>.

Según los datos calculados por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), la incidencia anual de CCC en España para el año 2015 será de unos 16.000 casos incidentes.

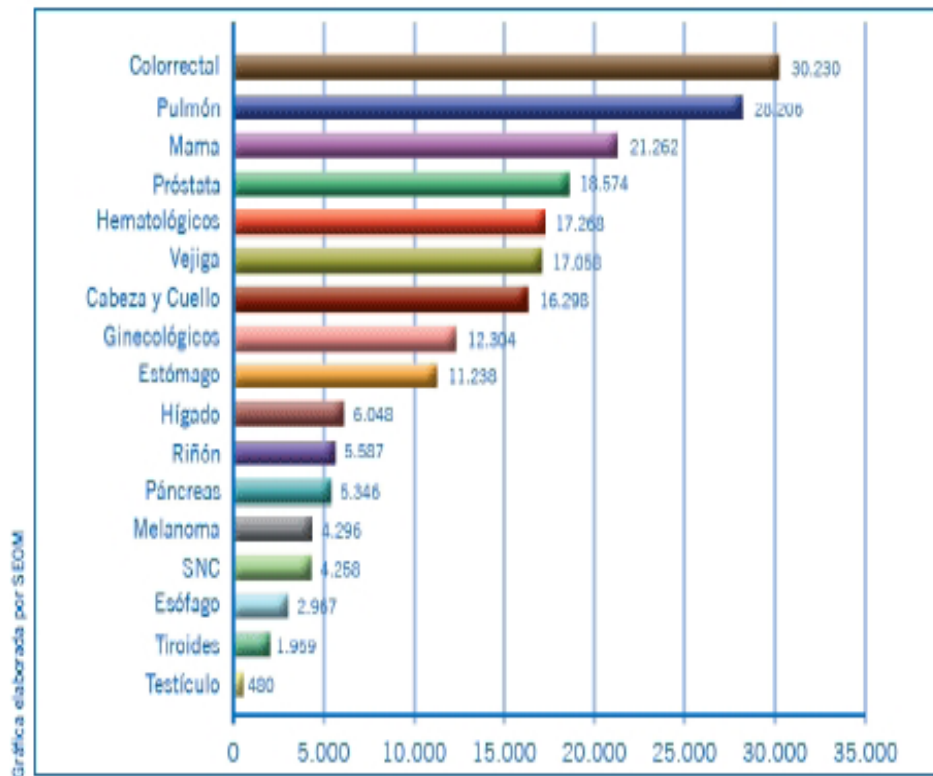


Figura 2: Incidencia de cáncer en España por tipo de tumor (estimado año 2015) Fuente: GLOBOCAN 2002. Datos extrapolados para la población estimada para 2015 en España por el Instituto Nacional de Estadística (INE). Gráfica elaborada por SEOM. Figura tomada de SEOM<sup>(7)</sup>.

### 1.2 Mortalidad

En el quinquenio 2002-2006 se registraron 8.893 defunciones por cáncer de cavidad oral y faringe, y 7.847 por cáncer de laringe, en hombres en España. Tomados en cuenta conjuntamente (16.740) constituyeron la 7ª causa de muerte por cáncer en hombres. En el caso de las mujeres, las cifras son mucho menores, con 2.086 defunciones por cáncer de cavidad oral y faringe, y 359 por cáncer de laringe<sup>(4)</sup>.

## INTRODUCCIÓN

En Castilla-León se produjeron, en el mismo quinquenio, 567 y 124 defunciones por cáncer de cavidad oral y faringe, y 583 y 18 por cáncer de laringe, en hombres y mujeres respectivamente<sup>(4)</sup>.

El porcentaje de cambio anual de las tasas ajustadas de mortalidad (población europea) entre 1997-2006 muestra una disminución en el caso de los varones en el cáncer de cavidad bucal y faringe de -2,83 (IC95% de -3,32 a -2,33) y de laringe de -4,32 (IC95% de -4,82 a -3,81). Sin embargo, en mujeres se aprecia una tendencia al alza, de 0,38 (IC95% de -0,72 a 1,49) para el cáncer de cavidad bucal y faringe, y de 0,83 (IC95% de -1,89 a 3,63) en el caso del cáncer de laringe<sup>(4)</sup>; en consonancia con lo expuesto en la incidencia.

### 1.3 Prevalencia

La prevalencia hace referencia al número de pacientes con cáncer en una determinada población, independientemente del momento en que fueron diagnosticados. La prevalencia depende de la frecuencia de aparición de la enfermedad (incidencia) y de la letalidad de la misma (supervivencia). Es un indicador útil para planificar los recursos asistenciales necesarios en relación a la carga de enfermedad que soporta la población<sup>(3,8)</sup>.

Los datos a 5 años incluyen pacientes diagnosticados en los últimos 5 años y que permanecen vivos. A partir de datos de Globocan 2002<sup>(9)</sup>. Cabanes et al<sup>(4)</sup> describen un número de casos prevalentes en España a 5 años de 18.258 para cavidad oral y faringe y de 14.016 para el cáncer de laringe en hombres, lo que supone el 4º tumor más prevalente si se tienen en cuenta conjuntamente (32.274). En el caso de las mujeres el número es mucho menor, dada su baja incidencia, con 3.910 y 629 casos prevalentes a 5 años para cáncer de cavidad oral y faringe, y laringe respectivamente.



### 2-. FACTORES DE RIESGO

Los factores clásicos relacionados de forma más directa con el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello (CCC) son el consumo de tabaco y alcohol. Además existen otros factores relacionados con su aparición que también se revisan a continuación.

#### 2.1 Tabaco

Numerosos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la relación entre el consumo de tabaco en todas sus formas y el cáncer de cabeza y cuello, así como la disminución del riesgo cuando este hábito cesa.

La principal actividad carcinogénica reside en las múltiples y diversas partículas que contiene el humo del tabaco que actúan como iniciadores, promotores o como cocarcinógenos<sup>(10)</sup>.

A finales de la década de 1950 un destacado estudio de casos y controles estableció la relación entre el consumo de tabaco y el cáncer de cavidad oral<sup>(11)</sup>. Un año después se publicó un estudio de cohorte, de más de 180.000 varones, que demostraba un aumento del riesgo de muerte debido a CCC en fumadores de cigarrillos comparado con varones no fumadores<sup>(12)</sup>. Posteriormente, la fuerza y consistencia de la asociación entre el hábito tabáquico y el CCC ha sido demostrado en numerosos estudios de caso-control y de cohorte donde el riesgo en el fumador se incrementa entre 3-12 veces, estando en relación con la duración del hábito y la dosis de tabaco, así como una disminución del riesgo tras el abandono del mismo<sup>(10)</sup>.

Otros tumores malignos de cabeza y cuello como el carcinoma nasofaríngeo o los nasosinusales tienen una asociación más débil con el hábito tabáquico<sup>(13)</sup>.

Así, la especificidad de la relación entre el tabaco y el desarrollo de cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) con un aumento del riesgo en las zonas expuestas al mismo, la coherencia y la analogía de la explicación de CECC inducido por tabaco y la carcinogénesis pulmonar, y la plausibilidad biológica del bien establecido modelo de la carcinogénesis inducida por tabaco han ayudado a establecer el tabaco como el principal agente etiológico en el CECC<sup>(10)</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Los fumadores de pipa o los consumidores de tabaco no fumado, que tienen una posición habitual para la pipa o para mascararlo, desarrollan displasias y cáncer en el sitio donde suelen situarlo, lo que se sugiere que el trauma físico y térmico podrían ser factores que contribuyeran a su aparición<sup>(10)</sup>. Además, el acúmulo de saliva, que contiene sustancias cancerígenas, en las regiones dependientes de la gravedad podría ser la causa de una mayor frecuencia de la localización de los carcinomas de cavidad oral a lo largo de las superficies lateral y ventral de la lengua y en el suelo de la boca<sup>(14)</sup>.

Las notables diferencias en la localización del CCC y la diferente incidencia observada entre las diferentes regiones, culturas y grupos demográficos, se deben, en gran parte, a los diferentes patrones de consumo de tabaco y de otras sustancias<sup>(15)</sup>.

Asimismo, la exposición prolongada al humo del tabaco en no fumadores se ha reconocido legalmente como factor de riesgo en relación con la dosis de exposición<sup>(16)</sup>.

### **2.2 Alcohol**

El consumo de alcohol se asocia a un incremento en el riesgo de padecer cáncer de las vías aerodigestivas superiores, siendo el segundo agente en importancia después del tabaco.

Se han indicado diversos mecanismos en la carcinogénesis alcohólica como deficiencias nutricionales e hipovitaminosis, factores metabólicos, deficiencias de células T y de su actividad mitótica, disminución de la acción protectora de la saliva, etc.<sup>(17)</sup>; siendo, probablemente, la irritación local el efecto más importante, ya que se asocia con el desarrollo de cáncer en los subsitios de las vías aerodigestivas superiores donde hay mayor contacto durante la ingestión y la deglución<sup>(18)</sup>.

Asimismo, se ha indicado el influjo etiológico de algunos colutorios comercializados que tienen un contenido elevado de alcohol<sup>(19)</sup>.

Sin embargo, el mayor efecto cancerígeno del alcohol se produce al potenciar el efecto del tabaco, asociación muy frecuente en esta enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

Este efecto es aditivo, si bien en algunas localizaciones, como la cavidad bucal, el efecto es multiplicativo<sup>(20)</sup>.

Aunque algún estudio describe diferente riesgo en función del tipo de bebida alcohólica<sup>(18)</sup>, la mayoría de investigadores consideran que lo realmente importante es el contenido en alcohol de la misma<sup>(10)</sup>.

Por sí mismo, el consumo de tabaco muestra un riesgo atribuible más alto que el alcohol para los cánceres de cavidad oral (76% versus 55%), faringe (69% versus 45%) y laringe (70% versus 26%)<sup>(20)</sup>.

### 2.3 Infecciones

Existe evidencia científica de la implicación de dos agentes infecciosos virales relacionados con la aparición de CCC, el virus de Epstein-Barr (VEB) y el virus del papiloma humano, principalmente el subtipo 16 (VPH-16). Otros agentes como el herpes simple o el *Helicobacter pylori* podrían ser también factores de riesgo, pero se precisan estudios confirmatorios<sup>(10)</sup>.

Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 están implicadas en la degradación de p53<sup>(21)</sup>, y en la supresión de la función pRb<sup>(22,23)</sup>, respectivamente.

Numerosos estudios caso-control han confirmado la relación del VPH con el CCC, con una mayor positividad del VPH en los casos, bien en el tumor o en suero, respecto a los controles<sup>(24,25)</sup>. En los que se realizó análisis por subgrupos se comprobó que los que presentaban seropositividad con mayor frecuencia eran los pacientes con tumores orofaríngeos, así como los que no tenían historia de tabaquismo<sup>(26-28)</sup>.

Además, el consumo de tabaco supone un riesgo adicional para el desarrollo de CCC en presencia de infección por VPH. Siendo esto consistente con los datos de laboratorio disponibles que muestran evidencia de la plausibilidad biológica de la interacción entre el tabaquismo y la progresión de la infección por VPH en la carcinogénesis<sup>(29)</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Se considera que el VPH está implicado en el desarrollo de un subgrupo de CECC que posee características moleculares, clínicas y epidemiológicas diferentes (ver Tabla 1).

Tabla 1: Diferentes características en CCC con el VPH negativo y positivo<sup>(30)</sup>

<b>Característica</b>	<b>CCC, VPH negativo</b>	<b>CCC, VPH positivo</b>
<b>Incidencia</b>	Disminuyendo	Aumentando
<b>Etiología</b>	Fumar, abuso de alcohol	Sexo oral
<b>Edad</b>	Mayores de 60 años	Menores de 60 años
<b>Cancerización de campo</b>	Sí	Desconocido
<b>Mutaciones de TP53</b>	Frecuente	Infrecuente
<b>Lugar preferente</b>	Ninguno	Orofaringe
<b>Pronóstico</b>	Pobre	Bueno

En lo que se refiere al VEB, su asociación con el cáncer de nasofaringe ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios epidemiológicos, con independencia de los subtipos histológicos, la etnia considerada, el lugar geográfico o los patrones endémicos o esporádicos. Así, el carcinoma de nasofaringe podría ser el mejor ejemplo de carcinoma relacionado con virus y ha servido como modelo para el estudio de la carcinogénesis inducida por virus<sup>(10)</sup>.

Incluso, la demostración de ADN de VEB en ganglios cervicales metastásicos de tumor primario desconocido, se ha usado para la identificación de un primario nasofaríngeo<sup>(31)</sup>.

### 2.4 Factores dietéticos

Diversos estudios epidemiológicos han establecido una relación inversa entre el consumo de frutas, verduras, productos frescos, aceite de oliva y la incidencia de CCC, y una relación directa con el consumo de grasa animal y el pescado ahumado y salado, posiblemente debido al alto contenido en nitrosaminas<sup>(10)</sup>.

Ciertas vitaminas como la A,  $\beta$ -carotenos, C y E podrían ejercer un papel protector. Sin embargo, las dietas son complejas y difíciles de evaluar y validar, precisándose estudios más precisos para definir la relación existente entre la dieta

## INTRODUCCIÓN

y los niveles séricos de los diferentes micronutrientes. Además, el tabaquismo se ha asociado con disminución de la ingesta y los niveles séricos de carotenoides, y bajos niveles de folato han sido asociados con el consumo de alcohol. A pesar de esto, estudios epidemiológicos nutricionales prospectivos y retrospectivos han aportado importantes pistas para la prevención y el desarrollo de estos cánceres<sup>(10)</sup>.

Un metaanálisis ha confirmado el efecto protector del consumo de frutas y verduras<sup>(32)</sup>, así como otros estudios lo han descrito tras ajustar el análisis por el consumo de tabaco y alcohol<sup>(33,34)</sup>.

### **2.5 Factores ocupacionales**

Aunque, globalmente, la exposición a factores ocupacionales juega un papel limitado en el CCC, en algunos casos concretos constituye un aspecto relevante. Así, existe un claro incremento del riesgo de tumores malignos en la región nasosinusal en los trabajadores de la metalurgia, madera, industria textil y del cuero, así como en las refinerías<sup>(10)</sup>.

En un estudio europeo, multicéntrico, de casos y controles se evaluó el papel de las exposiciones ocupacionales en el riesgo de cáncer de laringe / hipofaringe. Encontraron un aumento del riesgo de cáncer de hipofaringe con la exposición al polvo de acero y a los compuestos de hierro y humos, sin una clara relación dosis-respuesta. El cáncer de laringe se asoció significativamente con la exposición al polvo de aleaciones duras y a los disolventes clorados sin relación dosis-respuesta. Además, se sugiere un posible vínculo entre una alta exposición al formaldehído y el cáncer de laringe, no encontrando asociación con la exposición al asbesto. Señalan el papel de la exposición ocupacional al polvo de carbón como uno de los más importantes en el cáncer de laringe e hipofaringe presentando un claro patrón dosis-respuesta<sup>(35)</sup>.

### **2.6 Radiaciones**

La exposición a irradiación gamma se ha asociado con cáncer de tiroides, sarcomas de cabeza y cuello, cáncer de glándulas salivares y senos paranasales<sup>(10)</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Mientras que la irradiación terapéutica de los tumores malignos de cabeza y cuello no parece inducir la aparición de segundas neoplasias epidermoides en las vías aerodigestivas superiores, sí se ha asociado con la aparición de sarcomas de cabeza y cuello<sup>(36)</sup>.

También la irradiación con fines diagnósticos de este área se ha relacionado con el cáncer de glándulas salivares en dependencia con la dosis administrada<sup>(37)</sup>.

### 2.7 Susceptibilidad genética

El factor de riesgo más importante para el CECC es el antecedente de consumo de tabaco y alcohol. Sin embargo, solamente una fracción de fumadores desarrolla cáncer y no todos los pacientes con CECC son grandes fumadores o bebedores. Por lo tanto, variaciones en la susceptibilidad genética podrían ser importantes en la etiología de la enfermedad.

Varios estudios de asociación sugieren un componente genético de la enfermedad mostrando clusters familiares de CECC<sup>(38-40)</sup>.

Además, los familiares de primer grado de pacientes con CECC muestran un incremento del riesgo entre 2 y 4 veces para CECC. Este riesgo parece ser mayor (aproximadamente ocho) para hermanos de pacientes con CECC y para familiares de primer grado con múltiples tumores primarios de CECC<sup>(39,40)</sup>.

Estudios de casos y controles que cuantifican la capacidad de reparación del ADN y la sensibilidad cromosómica a mutágenos observan una reducción en la capacidad de reparación del ADN y una baja expresión de genes reparadores en los casos, así como un aumento de sensibilidad a carcinógenos, con una mayor frecuencia de roturas cromosómicas y aductos del ADN significativamente más altas en los pacientes con CCC que en los controles<sup>(41)</sup>.

Una de las mayores áreas de estudio, en los últimos años, se centra en la evaluación de polimorfismos genéticos en determinados genes clave, envueltos en vías celulares esenciales como factores de susceptibilidad al cáncer. Dado que el consumo de tabaco y el alcohol es un factor de riesgo mayor para el desarrollo de la enfermedad, numerosos estudios moleculares epidemiológicos han valorado la asociación entre el riesgo de CCC y variantes en los genes metabolizadores de

los carcinógenos procedentes del alcohol y el tabaco, siendo el genotipo GSTM1 null el más consistente marcador de susceptibilidad polimórfica. Además de estos genes metabolizadores se han estudiado polimorfismos que son críticos en el mantenimiento de la estabilidad genómica, como los genes reparadores del ADN o genes implicados en el control del ciclo celular o en la apoptosis, alguno de los cuales se describirán con más detalle a lo largo del trabajo<sup>(42)</sup>.

### **2.8 Otros factores de riesgo**

Mientras que la educación y el estatus ocupacional no se encuentran relacionados de forma independiente en cuanto al riesgo de CCC, factores relativos a la inestabilidad social se asocian con un incremento del riesgo cuando se controlan otras variables. Individuos divorciados, solteros y aquellos que pasaron largo tiempo en el desempleo durante la edad laboral activa tienen 1,5-2,4 veces más riesgo de su desarrollo<sup>(43)</sup>.

También el reflujo gastroesofágico se relaciona con la aparición de cáncer de laringe y de faringe con independencia de la edad, sexo, hábito tabáquico o enólico<sup>(44)</sup>.

## **3-. PATOGÉNESIS**

### **3.1 Modelos de carcinogénesis en CCC**

En general, el cáncer surge a través de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos en genes que actúan a las vías de señalización asociadas al cáncer, causando la adquisición de fenotipos relacionados con el cáncer que han sido bien resumidos por Hanahan y Weinberg<sup>(45)</sup>, incluyendo el potencial replicativo ilimitado, las señales de crecimiento autosuficientes, la insensibilidad a las señales de anti-crecimiento, la capacidad de evadir la apoptosis, la activación de invasión, metástasis y la angiogénesis. Recientemente, este resumen ha sido actualizado, introduciendo nuevos conceptos como la inestabilidad genómica subyacente o la evasión del sistema immune<sup>(46)</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Así, el desarrollo del CCC se produce, como en el resto de tumores, por una serie de alteraciones moleculares, a través de las cuales se activan protooncogenes que estimulan el crecimiento celular, y se inactivan genes supresores, que inhiben la proliferación celular en condiciones normales, conduciendo a la célula hacia una proliferación neoplásica.

El desarrollo del cáncer invasivo lleva consigo unos pasos previos a la progresión maligna a través de grados crecientes de displasia, que son el resultado de la acumulación de diversas alteraciones genéticas. Las técnicas moleculares pueden identificar alteraciones en lesiones premalignas e invasivas permitiendo el desarrollo de hipotéticos modelos de progresión en la carcinogénesis del CCC.

En 1996, se postuló el primer modelo de progresión genética en varios pasos para el CCC basándose en la caracterización genética de cambios morfológicos en el epitelio escamoso<sup>(47)</sup>. La pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 3p, 9p y 17p parecían suceder en la displasia, reflejando, aparentemente, una carcinogénesis temprana, mientras otras alteraciones en los cromosomas 11q, 4q y en el cromosoma 8 estaban típicamente presentes en carcinomas correspondiéndose, probablemente, con una fase relativamente tardía en la carcinogénesis.

Uno de los más recientes es el descrito por Leemans et al. en el que se tiene en cuenta la formación del campo de cancerización<sup>(30)</sup>. Según este modelo un progenitor o célula stem adulta adquiere una (o más) alteraciones genéticas, incluyendo una mutación en TP53, y forma un parche que contiene células hijas alteradas genéticamente que pueden ser detectadas por tinción de p53 mutante. Para escapar del control del crecimiento normal y / o ganar ventajas de crecimiento, este parche o unidad clonal se desarrolla en un campo de expansión lateral, reemplazando la mucosa normal del epitelio. Eventualmente, un subclón en el campo se convierte en un cáncer invasivo, y progresa a metástasis.



## INTRODUCCIÓN

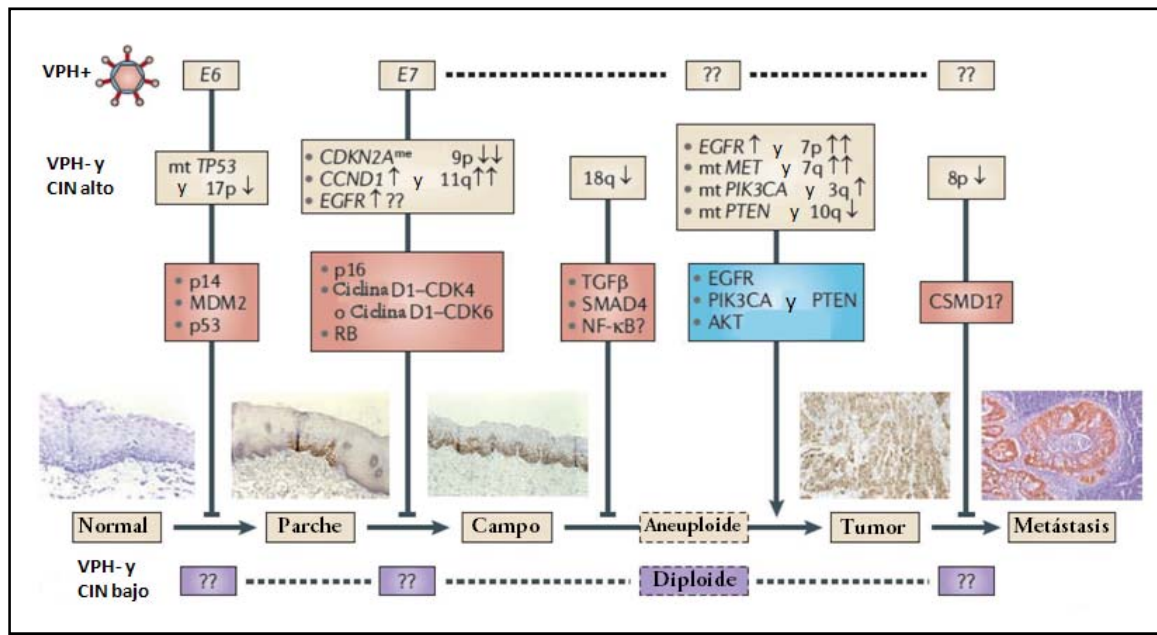


Figura 3: Propuesta de un modelo de carcinogénesis molecular del CECC. Figura modificada de Leemans et al.<sup>(30)</sup>

↑ indica sobreexpresión o ganancia; ↑↑ indica alto nivel de amplificación; ↓ indica pérdida, y ↓↓ indica una pérdida de homocigosidad. CCND1, ciclina D1; CDK, quinasas dependientes de ciclina; CDKN2A, inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina; me, metilado; mt, mutado; NF-κB, el factor nuclear-κB; PIK3CA, fosfoinositol-3 quinasa subunidad α; TGF β, factor de crecimiento transformante β.

En este modelo se pueden diferenciar tres pasos críticos: la conversión, de una sola célula madre mutada en un parche, en un grupo de células madre sin el adecuado control de crecimiento (campo); el proceso de transformación, por el cual un campo se convierte en un carcinoma invasivo, y el desarrollo de metástasis. Tanto la aneuploidía como la acumulación de cambios genéticos asociados al cáncer en los campos, están relacionados con el riesgo de progresión maligna.

Las vías de señalización establecidas que participan en CECC se representan, estratificadas para los tres subtipos de tumores (ver figura 3): CECC inducido por el virus del papiloma humano (VPH-positivo (VPH +), y tumores no causados por el VPH (VPH-), que tienen numerosos cambios genéticos numéricos (inestabilidad cromosómica alta (alta CIN)) o VPH- con pocos cambios genéticos (baja CIN). Para los tumores VPH- de bajo CIN no existen datos moleculares detallados disponibles en la actualidad.

## INTRODUCCIÓN

Alteraciones genéticas y cromosómicas se indican en los cuadros de color amarillo, las vías oncogénicas se muestran en el cuadro azul y las vías de supresores tumorales se muestran en los cuadros de color rojizo. El orden de la alteración de p53 o de retinoblastoma (Rb) no se ha establecido definitivamente y puede no ser relevante. El factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y MET se encuentran mutados y amplificadas en tumores y pueden transmitir señales a través de Ras-MAPK, PI3K-AKT-PTEN y otras vías.

La elección de colocar a EGFR y MET en la ruta PI3K-AKT es arbitraria y exige una investigación más detallada<sup>(30)</sup>.

### 3.2 Cancerización de campo

En 1953, el término “cancerización de campo” fue propuesto para explicar la gran propensión a desarrollar recaídas locales tras el tratamiento del CECC y la alta probabilidad de desarrollar múltiples tumores independientes en la mucosa de cabeza y cuello<sup>(48)</sup>. Slaughter et al. estudiaron cuidadosamente muestras de cáncer de cavidad oral y asociaron la frecuente observación de cambios displásicos alrededor de estos tumores con la aparición de recaídas locales y con múltiples tumores primarios. Debido al desarrollo en la investigación molecular durante las pasadas dos décadas, el proceso de cancerización de campo ha sido definido en términos moleculares<sup>(49)</sup>.

De este modo, usando marcadores genéticos, como la pérdida de heterocigosidad en determinados cromosomas, combinado con mutaciones en TP53, han mostrado que en al menos el 35% de los tumores orofaríngeos y de cavidad oral analizados, el carcinoma estaba rodeado de epitelio con cambios genéticos<sup>(50)</sup>. Este epitelio tiene un aspecto macrocópico normal aunque puede mostrar displasias desde un punto de vista histológico<sup>(51)</sup>.

Estos campos se encuentran a menudo en los márgenes quirúrgicos tras la extirpación tumoral, lo que significa que pueden continuar en el paciente<sup>(50)</sup>. En estudios retrospectivos se ha visto que estos campos no resecaados son una importante fuente de recaídas locales y de segundos tumores primarios, tan frecuentemente vistos en pacientes tratados con CCC<sup>(52,53)</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La comparación de los perfiles genéticos de los carcinomas y del tejido peritumoral a menudo indica una relación clonal, y en esto se basa la hipótesis de que esas células preneoplásicas contiguas preceden al desarrollo de un carcinoma invasivo<sup>(49)</sup>.

Hay alguna información de lo que parece preceder al desarrollo de campos. Van Houten et al.<sup>(54)</sup> describieron pequeñas zonas focales p53 positivas en la mucosa epitelial adyacente al tumor. Algunas fueron secuenciadas y mostraron una mutación en TP53, pero esta mutación no era idéntica a la hallada en los tumores correspondientes, indicando que estas zonas no estaban relacionadas clonalmente con el tumor. Estas zonas p53 positivas fueron consideradas equivalentes a “unidades clonales” definidas como una familia de células procedentes de un progenitor común del epitelio escamoso. Estas unidades clonales de p53 mutado son consideradas el primer cambio oncogénico de la mucosa<sup>(49)</sup>.

Sobre la base de los últimos hallazgos moleculares, la cancerización de campo se define como la presencia de una o más áreas de la mucosa formada por células epiteliales que presentan alteraciones genéticas o epigenéticas asociadas al cáncer. Un campo de precursores o el campo (en azul claro en figura 4), es monoclonal en su origen y no muestra crecimiento invasivo o comportamiento metastásico, que son las características de un carcinoma invasor. Un campo es preneoplásico, por definición, y puede tener aberraciones histológicas características de la displasia, pero no necesariamente<sup>(55,56)</sup>.

Una leucoplasia es la manifestación clínica de un campo, pero la mayoría de los campos son clínicamente invisibles. Algunos campos pueden ser visualizados por fluorescencia, identificando campos subclínicos de alto riesgo con cambios cancerosos y precancerosos<sup>(57,58)</sup>.

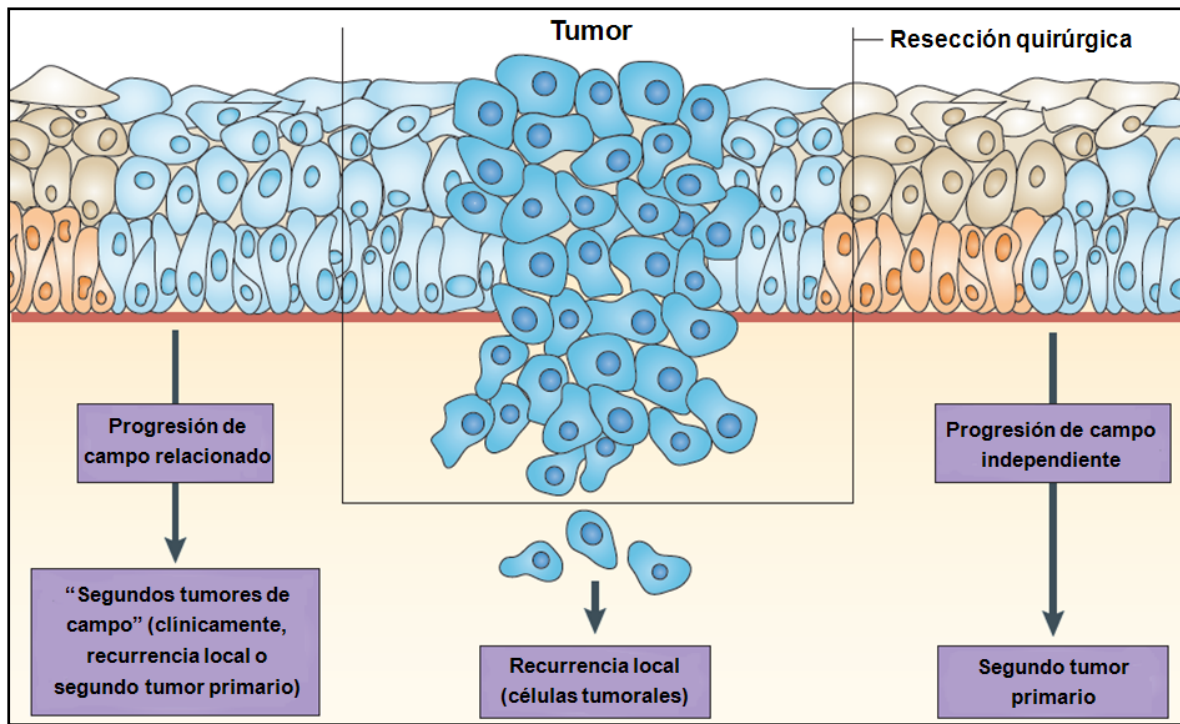


Figura 4: Relación entre la cancerización de campo y los tipos de recaída. Figura modificada de Leemans et al.<sup>(30)</sup>

Una importante implicación clínica de un campo es que puede ser el origen de recidivas locales y segundos tumores primarios después de la resección quirúrgica del cáncer inicial. Estas dos posibilidades se pueden distinguir clínicamente en base a su distancia del tumor índice o el intervalo de tiempo tras el cual se desarrollan (mientras que una recidiva local la distancia es inferior a 2 cm o se produce antes de 3 años del tumor primario, la distancia de un segundo tumor primario es mayor de 2 cm o se produce más de 3 años después del tumor primario). Se necesitan cambios genéticos adicionales para transformar un campo en un nuevo carcinoma. El campo y el tumor primario comparten alteraciones genéticas y deben ser considerados con un origen clonal común. Los tumores que surgen en un campo no resecado han sido descritos como "segundos tumores de campo" en lugar de verdaderas recidivas locales (que se desarrollan a partir de células tumorales residuales) o verdaderos segundos tumores primarios (que tienen un origen que es independiente del tumor primario)<sup>(59)</sup>.

### 4-. HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

#### 4.1 Crecimiento local y segundos tumores

Los CCC suelen iniciarse en la mucosa, rara vez lo hacen en la submucosa (p. ej.: suelo de boca y nasofaringe) o intraductalmente (glándulas salivares). Crecen inicialmente por infiltración local. La invasión locoregional ósea y nerviosa es tardía, mientras que el músculo puede afectarse de forma precoz<sup>(60)</sup>.

Los pacientes con CCC presentan a menudo segundos tumores metacrónicos y/o sincrónicos en el tracto aerodigestivo superior. Los segundos tumores no son inducidos por el tratamiento, sino que reflejan la exposición de la mucosa a los mismos carcinógenos que provocaron el carcinoma primario<sup>(61)</sup> (concepto de cancerización de campo descrito previamente).

#### 4.2 Diseminación linfática

La diseminación linfática se produce con relativa facilidad. La afectación de los ganglios depende del origen primario del tumor y se relaciona con el grado de diferenciación tumoral (mayor en los tumores indiferenciados), el tamaño tumoral y la región anatómica en la que se localizan<sup>(60)</sup>.

No es infrecuente encontrar pacientes con tumores de origen desconocido que se presentan con adenopatías ganglionares cervicales, obligando a realizar una búsqueda exhaustiva en la zona ORL, tratándose a estos pacientes como si fueran portadores de un tumor en esta localización<sup>(61)</sup>.

#### 4.3 Diseminación hemática

La diseminación por vía hemática generalmente es tardía. La incidencia de metástasis a distancia se sitúa en torno al 10%, aunque asciende de manera significativa cuando se determinan sobre autopsias. Es más frecuente en los tumores de nasofaringe, orofaringe, laringe supraglótica e hipofaringe, especialmente cuando existe afectación ganglionar o si son de gran tamaño<sup>(61)</sup>.

El sitio más común de metástasis a distancia es el pulmón (60%), seguido de hueso (20-24%), hígado, etc., siendo frecuentes las localizaciones múltiples metastásicas<sup>(62)</sup>.

### 5-. DIAGNÓSTICO

#### 5.1 Screening

No se conocen, en el momento actual, programas de screening con eficacia demostrada, para la detección precoz del cáncer de cabeza y cuello, excepto la inspección visual oral en regiones de alto riesgo para el cáncer de cavidad oral<sup>(63,64)</sup>, aunque se recomienda un seguimiento cercano en individuos con factores de riesgo, especialmente en aquellos con elevado consumo de tabaco y alcohol<sup>(65)</sup>.

#### 5.2 Manifestaciones clínicas

La clínica es muy variada y depende de la localización. Suelen debutar como induraciones, excrecencias, masas, ulceraciones, disfonía, disfagia, odinofagia, obstrucción nasal unilateral, rinorrea, etc. También puede haber disfunciones orgánicas como pérdida de audición y, si existe invasión de la base del cráneo, especialmente en tumores de nasofaringe, diplopía u otra sintomatología neurológica<sup>(61)</sup>.

Aproximadamente el 5% de los pacientes debutan con metástasis cervicales palpables como primera manifestación de un CCC, llegando al 50% en el caso de tumores de nasofaringe e hipofaringe, donde constituyen de forma frecuente el primer signo de la enfermedad. Sin embargo, son raras las manifestaciones derivadas de la presencia de metástasis a distancia como primer signo o síntoma del CCC<sup>(65)</sup>.

#### 5.3 Exploración física

Ante todo paciente con sospecha clínica de un CCC, debe realizarse una exploración física completa<sup>(60)</sup>. Con especial atención deben llevarse a cabo:

- Examen de cavidad oral y orofaringe
- Laringoscopia indirecta
- Palpación cuidadosa de todas las áreas ganglionares.

### 5.4 Exámenes complementarios y estudio de extensión

Dentro del estudio inicial es recomendable incluir las siguientes exploraciones:

- Analítica completa: incluyendo hemograma, ionograma y pruebas de función hepática<sup>(65)</sup>.
- Tomografía axial computarizada (TC) y/o resonancia magnética nuclear (RM): para determinar la extensión locorregional de la enfermedad eligiéndose una u otra en función de la rentabilidad diagnóstica y terapéutica según la localización; así, por ejemplo, la RM parece más útil que la TC en la determinación de la extensión de los tumores de base de lengua o nasofaringe<sup>(61)</sup>.

El estudio de extensión a distancia incluye de forma rutinaria una radiografía de tórax, con el fin de descartar metástasis pulmonares o la existencia de un cáncer de pulmón concomitante, y se recomienda, de forma general, la realización de una ecografía hepática<sup>(65)</sup>. En pacientes con N2 o N3 es recomendable la realización de TC torácica y abdominal<sup>(61)</sup>. La realización de otros estudios con TC o gammagrafía ósea estará indicada solamente si existe sospecha clínica de diseminación a distancia o en el contexto de ensayos clínicos<sup>(65)</sup>. En los últimos años ha cobrado una especial importancia la realización de TC/PET (tomografía con emisión de positrones) en la detección de recidivas e incluso en la estadificación inicial<sup>(61)</sup>.

### 5.5 Confirmación histológica

El diagnóstico definitivo de un CCC viene dado por el estudio histológico del tumor primario. Cuando esto no es posible debe realizarse la biopsia de alguna de las adenopatías afectas (es preferible la biopsia a la realización de PAAF)<sup>(61)</sup>.

Se recomienda realizar una panendoscopia directa bajo anestesia general con toma de biopsias de todas aquellas lesiones sospechosas de malignidad, tanto en la esfera ORL como las que puedan apreciarse en el árbol bronquial y esofágico, teniendo en cuenta la cancerización de campo y la frecuencia de tumores sincrónicos que comparten factores de riesgo<sup>(61)</sup>.

### 6-. ANATOMÍA PATOLÓGICA

#### 6.1 Tipo histológico

Más del 90% de los CCC son **carcinomas epidermoides** que se inician en la mucosa y que se caracterizan por una diferenciación escamosa. La presencia de otro tipo de tumor como sarcoma, melanoma, osteosarcoma, etc., suele ser excepcional<sup>(61)</sup>.

Aunque el CECC constituye el tipo histológico más frecuente en esta área, y se asume como una única entidad, a la que se considera de forma homogénea en el diagnóstico y tratamiento, muy pocas veces se tiene en cuenta que bajo el epígrafe de carcinoma epidermoide se incluyen también variedades histológicas con características pronósticas y de respuesta al tratamiento muy diferentes al carcinoma epidermoide convencional. Sin embargo, en la mayoría de los ensayos clínicos no se especifica si estas variedades histológicas están incluidas y en qué proporción. No hay cifras exactas de qué proporción de pacientes con CECC presentan estas variantes, y puede que haya diferencias en función del área geográfica y la calidad de los servicios de Anatomía Patológica, pero casi todas estas variedades se cifran en torno al 2-5% de los casos de CECC. Teniendo en cuenta las más frecuentes, que son el carcinoma basaloide, el verrucoso y el papilar, se puede establecer que el número de CECC no convencionales puede rondar el 10% de los casos<sup>(66)</sup>.

El **CECC tipo verrucoso** es una variedad histológica que representa entre el 1-10% de los CCC. Afecta principalmente a cavidad oral (55,9%) y laringe (35,2%). Son tumores de diagnóstico diferencial difícil. Frecuentemente no está bien caracterizado en el diagnóstico patológico, y se describen hasta un 52% de errores diagnósticos. Ante un examen histológico poco minucioso, este tipo histológico puede ser considerado como un CECC bien diferenciado convencional. Lo más interesante de estos tumores es que tienen un muy bajo potencial metatásico, pero una alta capacidad de invasión local<sup>(67)</sup>. Su tratamiento, en caso de identificarse de inicio correctamente, es la cirugía.



## INTRODUCCIÓN

El **CECC tipo basaloide** es otra variedad rara con células parecidas a la capa basal del epitelio. Constituyen el 2% de los casos de CECC. Generalmente, conviven el mismo tumor componente basaloide y epidermoide típico. Parece que también puede estar ligado con más frecuencia a la infección VPH, incluso fuera de la orofaringe. Lo más interesante de esta variante es su comportamiento clínico diferente, habiendo dos características diferenciales: mayor incidencia de metástasis a distancia frente al CECC convencional (41 vs. 6%), que es la principal causa de muerte, con una marcada menor incidencia de metástasis ganglionares (15 vs. 51%). Aunque se han etiquetado frecuentemente como de peor pronóstico, no está claro que esto sea así, ya que son tumores habitualmente bastante quimio y radiosensibles<sup>(66)</sup>. En dos estudios de caso-control se ha visto una mayor proporción de metástasis a distancia con un similar o mejor control locorregional<sup>(68)</sup>.

**El carcinoma escamoso papilar** ha sido definido por primera vez como variedad diferente del carcinoma de células escamosas en la clasificación de los Tumores de la Cabeza y Cuello de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2005<sup>(69)</sup>. Se caracteriza por un crecimiento exofítico papilar con un pronóstico favorable. Se localizan con mayor frecuencia en laringe y cavidad oral. La incidencia de marcadores relacionados con la infección por VPH es mucho más alta en estos tumores con respecto al CECC convencional (más del 50%), incluso fuera de la orofaringe<sup>(66)</sup>.

Hay bastante poca información en cuanto a su quimio y radiosensibilidad, por lo que es difícil establecer pautas al respecto. Precisamente por esa falta de datos y por su buen pronóstico con cirugía, esta última debería ser la primera opción siempre que fuera posible<sup>(70)</sup>.

Es importante, con vistas al tratamiento y al pronóstico de la enfermedad, conocer el tamaño tumoral, grado de diferenciación, número de mitosis, afectación de los bordes de resección, infiltración vascular o la infiltración linfática o invasión perineural<sup>(61)</sup>.

### 6.2 Grado histológico

En general, se puede afirmar que cuanto más se parece una neoplasia al tejido originario, mejor es la diferenciación o grado. Así, los tumores se pueden clasificar en:

- . Grado 1: bien diferenciado
- . Grado 2: moderadamente diferenciado
- . Grado 3: pobremente diferenciado
- . Grado 4: indiferenciado

Grado 3 y 4 se pueden combinar, en ocasiones, como G3-4: pobremente diferenciado o indiferenciado<sup>(1)</sup>.

### 7-. ESTADIFICACIÓN

El sistema de estadificación más útil desde el punto de vista clínico es el TNM (tumor, node, metastasis) actualizada con la colaboración entre el American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union for International Cancer Control (UICC). La AJCC y el UICC modifican periódicamente el sistema TNM en respuesta a nuevos conocimientos clínicos adquiridos y una mejor comprensión de la biología del cáncer y de factores que afectan al pronóstico<sup>(71)</sup>.

El sistema TNM clasifica y agrupa los tumores por:

T: tamaño del tumor primario o de la afectación de estructuras vecinas, definida específicamente para cada sitio tumoral.

N: estado de los ganglios linfáticos regionales de drenaje, categorizado por el número de ganglios afectados, la región de afectación y el tamaño. La clasificación ganglionar es común para todos, con excepción del carcinoma de nasofaringe.

M: presencia o ausencia de metástasis a distancia, por diseminación vascular o en ganglios linfáticos más allá de los definidos como "regionales".

## INTRODUCCIÓN

Agrupación por estadios del American Joint Committee on Cancer<sup>(72)</sup>.  
Excepto glándulas salivares:

### - Estadio 0

.Tis, N0, M0

### - Estadio I

.T1, N0, M0

### - Estadio II

.T2, N0, M0

### - Estadio III

.T3, N0, M0

.T1, N1, M0

.T2, N1, M0

.T3, N1, M0

### - Estadio IVa

.T4a, N0, M0

.T4a, N1, M0

.T1, N2, M0

.T2, N2, M0

.T3, N2, M0

.T4a, N2, M0

### - Estadio IVb

.Cualquier T, N3, M0

.T4b, cualquier N, M0

### - Estadio IVc

.Cualquier T, cualquier N, M1

## 8-. FACTORES PRONÓSTICOS

Los factores pronósticos son aquellos datos que aportan información sobre la evolución de una enfermedad.

### 8.1 Factores relacionados con el paciente

#### Edad y comorbilidad

La edad avanzada constituye para algunos autores un factor de mal pronóstico, relacionándose con una menor supervivencia, aunque varios estudios sobre quimioterapia neoadyuvante no encuentran diferencias en la respuesta al tratamiento en función de la edad<sup>(60)</sup>.

Se sabe que en el CECC la eficacia de tratamientos como la quimioterapia (QT) y la radioterapia (RT) depende en gran parte de que se puedan administrar a dosis plenas y en intervalos de tiempo precisos. Si la comorbilidad impide cumplir esos requisitos probablemente no vamos a obtener los mismos resultados en

## INTRODUCCIÓN

eficacia y, sin embargo, se pueden generar complicaciones por toxicidad que pueden incluso poner en peligro la vida del paciente<sup>(66)</sup>. Así, la edad avanzada condiciona la presencia de un mayor número de comorbilidades, pudiendo condicionar la elección de un determinado tratamiento, y, por lo tanto, la eficacia del mismo.

Parece que la edad sólo constituye un factor pronóstico adverso en sí mismo, independientemente de la comorbilidad, cuando se rebasa la edad de 80 años, y sólo para supervivencia global, no para supervivencia específica por cáncer<sup>(73)</sup>.

### **Sexo y raza**

No se puede afirmar de forma clara que existan diferencias pronósticas entre hombres y mujeres, aunque algunos estudios apunten a ello. Tampoco parecen existir diferencias globales en función de la raza<sup>(60)</sup>.

### **Estado general del paciente o performance status (PS):**

Los pacientes con un buen PS antes de iniciar el tratamiento tienen mejor pronóstico en términos de respuesta y supervivencia global. Existe una relación directa del PS con el estado de nutrición, la astenia, pérdida de peso y la presencia o no de enfermedades concomitantes<sup>(60)</sup>.

### **Situación social**

Esta variable, está directamente relacionada con otras variables tan importantes como la comorbilidad, el hábito enólico y tabáquico, y de forma indirecta, con otras como el estadio global. La falta de soporte familiar, el domicilio alejado del centro hospitalario, la pobre educación sanitaria, la precariedad económica, etc., influyen decisivamente en la viabilidad de cualquier tratamiento. Generalmente, todo esto implica tratamientos incompletos o interrumpidos, y muchas veces condicionan a priori la indicación de tratamientos con intención curativa<sup>(66)</sup>.

### **Consumo de tabaco**

El consumo persistente de tabaco tras el diagnóstico se ha relacionado con un incremento de la toxicidad del tratamiento (especialmente RT), sin que exista un impacto demostrado en la probabilidad de respuesta. Además, incrementa la

tasa de recidivas locorregionales y de segundas neoplasias, lo que repercute en una menor supervivencia<sup>(60)</sup>.

### 8.2 Factores relacionados con el tumor

**El estadio**, basado en la clasificación TNM, constituye el factor más importante a la hora de determinar el pronóstico y probabilidad de supervivencia en CCC. La afectación ganglionar constituye el factor pronóstico desfavorable de más relevancia, estando la supervivencia inversamente relacionada con el número y tamaño de ganglios afectados, así como con la afectación nodal bilateral. La invasión de la cápsula ganglionar incrementa el riesgo de recidiva locorregional y de metástasis a distancia<sup>(60)</sup>.

**La localización tumoral** constituye un factor pronóstico importante. Se sabe que dentro de la faringe y cavidad oral, la hipofaringe, la base de lengua y la pared posterior faríngea tienen un peor pronóstico. Dentro de la laringe, el pronóstico también varía drásticamente a favor de la glotis frente a las demás localizaciones laríngeas<sup>(66)</sup>.

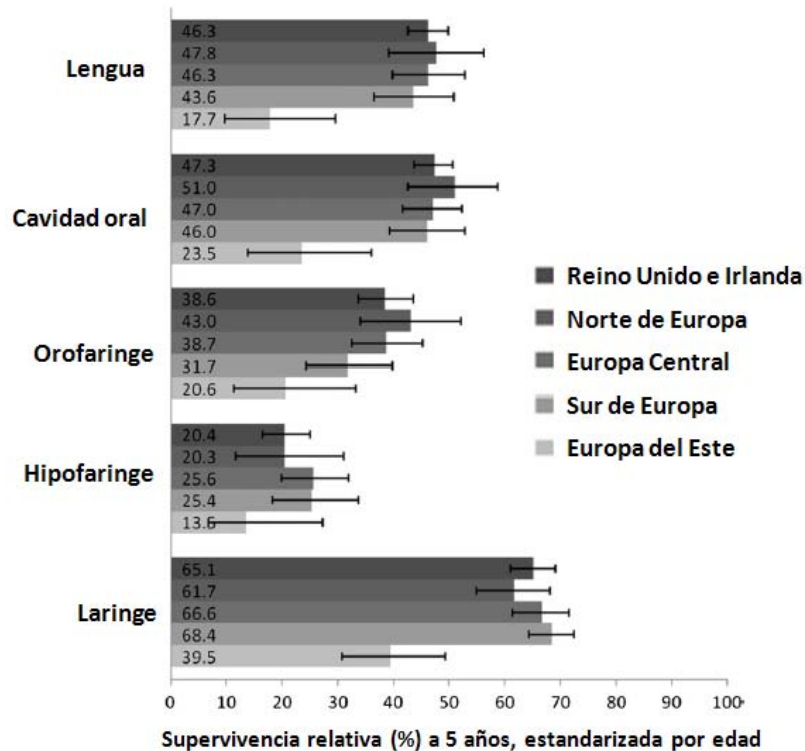


Figura 5: Supervivencia relativa (%) a 5 años con intervalos de confianza al 95%, estandarizada por edad para CCC por área Europea y localización anatómica de origen. Figura modificada de Zigon et al.<sup>(74)</sup>

## INTRODUCCIÓN

En la figura 5 se puede apreciar las diferencias de supervivencia en función de la localización tumoral así como entre las diferentes regiones europeas.

**Grado de diferenciación tumoral.** Los tumores más diferenciados se asocian con menor afectación ganglionar y menos recidivas locales. El CCC moderadamente o escasamente diferenciado se asocia con más recidivas y menor supervivencia<sup>(60)</sup>.

**El contenido de ADN tumoral.** Medido mediante técnicas de citometría de flujo, parece ser un factor pronóstico de relevancia, de manera que los tumores aneuploides se asocian con una menor supervivencia que los diploides<sup>(60)</sup>.

Se han estudiado múltiples **oncogenes y genes supresores de tumores**. La sobreexpresión de los oncogenes de EGFR, ras y myc en algunos estudios se asocia a peor pronóstico. Las alteraciones en genes supresores como p53, p21, p27 y p16 son frecuentes y se relacionan en diferentes estudios con una mayor agresividad clínica y peor pronóstico. En concreto, las mutaciones en p53 parecen conferir mayor tasa de recaídas tras tratamiento quirúrgico y más radorresistencia. Sin embargo, en ocasiones, los resultados relacionados con estos factores son contradictorios y no es posible aún establecerlos como uso rutinario ni emplearlos en la selección de pacientes para protocolos terapéuticos<sup>(60)</sup>.

### 8.3 Factores relacionados con el tratamiento

En el momento actual la respuesta al tratamiento en pacientes tratados con quimioterapia de inducción -y en aquellos que reciben tratamiento con radioterapia en menor medida- se considera uno de los factores pronósticos más importantes en los pacientes con CCC, de manera que el alcanzar una respuesta completa tras quimioterapia, especialmente si es una respuesta completa histológica, se ha mostrado en diversos estudios como el factor pronóstico favorable para supervivencia más importante<sup>(65)</sup>.

### 9-. TRATAMIENTO

La valoración multidisciplinar en comités de tumores es fundamental. Se sabe que realizar tratamientos en el contexto de equipos multidisciplinarios mejora los resultados terapéuticos en términos de supervivencia<sup>(75)</sup>.

Clásicamente los tumores de cabeza y cuello se han clasificado clínicamente en:

- **Enfermedad localizada** (Estadios I y II). Suponen aproximadamente el 30-40% de estos tumores.

En general, los resultados son similares con cirugía y radioterapia, y la preservación del órgano es una alternativa que siempre debe valorarse.

Las tasas de control local con cirugía y/o radioterapia son altas y se cifran entre el 70-90%, dependiendo de la localización, histología del tumor, experiencia del centro y estado funcional de cada paciente<sup>(62)</sup>.

- **Enfermedad localmente avanzada** (Estadios III, IVa y IVb). La mayoría de pacientes son diagnosticados en esta fase (60-70%).

Es un campo de continua investigación clínica y es donde se están produciendo mayores avances en los últimos años.

El tratamiento tradicional ha sido la combinación de cirugía y RT, pero la supervivencia era limitada y los pacientes sufrían grandes secuelas funcionales y psicológicas.

La quimioterapia de inducción y radioterapia posterior se inició en los años ochenta, con esquema de cisplatino y 5-FU (PF). Las respuestas excedían el 80%, y el 50% de ellas eran remisiones completas, pero con apenas impacto en la supervivencia<sup>(76)</sup>.

Otra línea de investigación ha sido la simultaneidad entre quimioterapia y radioterapia, lo que ha permitido un aumento de supervivencia y en algunos casos una preservación del órgano<sup>(77)</sup>.

Ensayos posteriores con taxanos (T) añadidos al platino-fluorouracilo (PF), conocido como el esquema TPF, han demostrado mejorar la supervivencia

## INTRODUCCIÓN

cuando se compara al PF y preservar órganos tras la consiguiente irradiación o quimioirradiación<sup>(78,79)</sup>.

Otro gran avance en el tratamiento de estos tumores están siendo las terapias biológicas. La administración de cetuximab, un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico, ha demostrado un beneficio cuando se compara contra radioterapia exclusiva en control local y supervivencia<sup>(80)</sup>.

- **Enfermedad metastásica** (Estadio IVc). La incidencia de tumores que se presentan de inicio con enfermedad metastásica oscila entre el 6-8% del total de los tumores de cabeza y cuello.

Generalmente se tratan con quimioterapia con intención paliativa en un intento de preservar el confort y la calidad de vida de los pacientes. Las respuestas son mejores cuando se compara poliquimioterapia con monoterapia, pero el beneficio en supervivencia es muy limitado<sup>(62)</sup>.

Nuevas terapias dirigidas a diana, quimioterapia y terapias sistémicas combinadas están siendo estudiadas en este campo. En el estudio EXTREME<sup>(81)</sup>, se demuestra una mayor supervivencia global en pacientes con CECC recurrente o metastásico tratados con PF más Cetuximab comparado con pacientes tratados con PF.

## 10.-EFECTOS ADVERSOS DE LOS TRATAMIENTOS

El tratamiento de estas neoplasias se ha intensificado en la última década, por lo que se evidencia un importante aumento de los efectos tóxicos agudos y tardíos. Para evaluar los efectos adversos existen diferentes escalas de toxicidad, siendo la clasificación "Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)" establecida por el NIC (National Cancer Institute) la más utilizada. Esta escala se actualiza periódicamente e incluye 5 grados de severidad de las toxicidades:

- Grado 1: Leve; asintomático o síntomas leves; solamente observación clínica, no está indicada la intervención.



## INTRODUCCIÓN

- Grado 2: Moderada; indicada una mínima intervención, local o no invasiva; no existe limitación para las actividades básicas de la vida diaria.
- Grado 3: Grave o de importancia médica, pero no potencialmente mortal; indicada la hospitalización o prolongación de la hospitalización; existe limitación para las actividades básicas de la vida diaria (limita el autocuidado).
- Grado 4: Pone en peligro la vida del paciente; indicada una intervención urgente.
- Grado 5: Muerte relacionada con los efectos adversos.

Las principales toxicidades secundarias al tratamiento con cisplatino (base del tratamiento quimioterápico del CCC) son<sup>(82)</sup>:

- **Nefrotoxicidad:** es una toxicidad limitante de dosis. Puede observarse una disfunción renal leve y reversible o una insuficiencia renal con necrosis tubular que puede ser irreversible. La nefrotoxicidad es acumulativa. La diuresis forzada por hidratación antes y después de la administración de cisplatino reduce el riesgo.
- **Mielosupresión:** leucopenia, trombopenia y anemia, la mayoría reversibles y dependientes de dosis.
- **Naúseas y vómitos:** tanto de forma aguda (primeras 24 horas) como retardada (después de 24 horas tras tratamiento).
- **Ototoxicidad:** el efecto es acumulativo, puede ser irreversible y uni o bilateral.
- **Neurotoxicidad:** también es un efecto limitante de dosis. Se caracteriza por neuropatía periférica, típicamente bilateral y sensorial.

En lo que se refiere al tratamiento con RT, históricamente la toxicidad derivada del tratamiento radioterápico se ha separado en dos grandes grupos: agudos y crónicos. Así la definición clásica de efectos agudos y crónicos es la siguiente:

- **Agudos:** aparecen durante el tratamiento o en el periodo inmediatamente posterior a la irradiación. Siguiendo los criterios del Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) y del NCI, se considera toxicidad aguda a toda aquellas alteraciones ocurridas antes de los 90 días de finalizado el tratamiento.

## INTRODUCCIÓN

- **Crónicos o tardíos:** aparecen meses o años tras el tratamiento, poniendo la barrera en los 90 días.

Como en cualquier área anatómica, los diferentes tipos de toxicidad vienen determinados por los órganos y tejidos sanos de riesgo incluidos en los campos de irradiación necesarios para el tratamiento. En el área de cabeza y cuello son los siguientes: piel y tejido celular subcutáneo, mucosas, glándulas salivares, ojo, oído, laringe, tiroides, articulación temporo-mandibular, tejidos blandos, médula cervical.

De entre todos los que podemos encontrar en esta área anatómica, la mucositis y la xerostomía son definitorios de los tratamientos radioterápicos en el área de cabeza y cuello.

- **Mucositis:** La mucosa de las vías aero-digestivas superiores es especialmente sensible a la acción de la irradiación. Afecta sobre todo a la cavidad oral y a la faringe que son las áreas más frecuentemente incluidas en los campos de tratamiento, pero afectará a la mucosa de cualquier localización que se irradie (fosas nasales, esófago...). La mucositis severa puede ocasionar interrupciones del mismo o reducción en la dosis, lo que puede comprometer la supervivencia y el control locorregional, sobre todo si el retraso es mayor de 5 días.

- **Xerostomía** o boca seca: es el otro efecto secundario más frecuente entre los pacientes que reciben tratamiento radioterápico por un cáncer del área ORL. Se puede definir como la disminución objetiva del flujo salivar y la alteración de su composición cualitativa<sup>(83)</sup>.

Diversos estudios han confirmado que durante el tratamiento con quimiorradioterapia, las toxicidades agudas son severas y comprometen la calidad de vida de los enfermos con un detrimento del estado funcional, más del 90% de los pacientes tienen mucositis de cualquier grado, dermatitis grados 2-3 en más de la mitad de los pacientes, el dolor está presente en el 75% de los casos y el 66% tienen dificultad para masticar y para tragar. Aproximadamente el 27% de los pacientes tiene que ser ingresado, con una estancia media de 6 días. Un mes después del tratamiento, la astenia sigue presente hasta en el 65% de los casos, las alteraciones emocionales en el 95%, la hiporexia en el 85%, el dolor en el 65%

## INTRODUCCIÓN

y las dificultades para alimentarse son prácticamente universales. En los meses posteriores estos problemas mejoran y a los 6 meses del tratamiento las limitaciones para realizar actividades de la vida cotidiana han descendido del 70 al 25%. El riesgo de aspiración broncopulmonar puede persistir de forma crónica en un 68% de pacientes.

Los tratamientos se asocian a dolor, nutrición deficiente, estancias hospitalarias prolongadas, aumento de los costes e infecciones potencialmente mortales. La toxicidad crónica, como la xerostomía, fibrosis, alteraciones en la respiración y deglución, tienen impacto en la calidad de vida del paciente, en áreas como la relación social y familiar.

Son necesarios protocolos activos y continuados de manejo de estas toxicidades para evitar las interrupciones del tratamiento, por lo que esto supone para el control local. Los tratamientos concomitantes aumentan la incidencia de toxicidad severa (grado 3-4) comparado con radioterapia exclusiva<sup>(62)</sup>.

## 11.-GENES DE BAJA PENETRANCIA Y CÁNCER

### 11.1 El modelo poligénico: Los genes de baja penetrancia como factores de susceptibilidad en el cáncer esporádico

Hasta finales del XX, la investigación sobre los factores causantes de la susceptibilidad heredada a padecer cáncer, estuvo centrada en la identificación de genes de alta penetrancia o alta susceptibilidad. Mutaciones germinales en estos genes, dan lugar a un patrón de herencia mendeliano, en el que la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad se transmite, en general, de forma autosómica dominante, aunque también existen síndromes que presentan un patrón de herencia recesivo<sup>(84)</sup>.

Ejemplos clásicos de genes de alta penetrancia son BRCA1 y BRCA2, implicados en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario<sup>(85,86)</sup>, el gen APC<sup>(87)</sup> implicado en el cáncer de colon polipósico familiar, MLH1 y MSH2<sup>(88,89)</sup> asociados al cáncer de colon no polipósico y muchos otros.

## INTRODUCCIÓN

La frecuencia de las mutaciones en estos genes es muy baja en la población general ( $<0.005$ ), pero cuando aparecen, el riesgo que confieren a padecer cáncer es muy alto (riesgo relativo mayor de 10).

Sin embargo, estos que podemos considerar como claramente hereditarios, globalmente tan sólo representan el 1% de los casos de cáncer, ya que la mayor parte de las veces aparecen de forma esporádica. Esta mayoría de cánceres, presenta también un componente hereditario que reside en los genes de baja penetrancia. A diferencia de los anteriores, las variantes en los genes de baja penetrancia son comunes en la población general (frecuencia  $>0.05$ ) y el riesgo que confieren a padecer la enfermedad es bajo (incremento del riesgo menor a 1.5 veces el poblacional). A nivel individual, cada variante modificaría muy poco el riesgo, pero en unión con otros factores, tanto genéticos como ambientales, serían responsables de las diferencias en la susceptibilidad a padecer cáncer que existen entre los individuos de la población general<sup>(90)</sup>.

Actualmente se piensa que existen muchas de estas variantes, que aparecen en diferentes combinaciones en los distintos individuos de la población general, dando lugar a un rango de susceptibilidades que provocaría las diferencias interindividuales a padecer cáncer. La identificación de estas variantes, así como las interacciones que existen entre los riesgos asociados a las mismas cuando aparecen en un mismo individuo, entraña numerosas dificultades y es un campo en el que queda mucho por explorar. Sin embargo, en los últimos años, se ha producido un gran avance en el descubrimiento de algunas de estas variantes a través de los estudios de asociación de genoma completo, conocidos comúnmente como GWAS (Genome Wide Association Studies).

La estrategia para encontrar este tipo de variantes son los estudios de asociación.

### **11.2 Estudios de asociación: Métodos para la identificación de variantes de baja penetrancia**

La estrategia principal para la identificación de los genes de baja penetrancia es el estudio de asociación, en el que se compara la frecuencia de una variante genética en un grupo de individuos afectados de la enfermedad (casos) con un grupo de individuos sanos (controles). Cuando la distribución de frecuencias

difiere entre los dos grupos de forma estadísticamente significativa, se puede asumir que existe una asociación entre la variante genética y la enfermedad.

### 11.2.1 Método del gen candidato

Los primeros estudios de asociación estaban siempre basados en el análisis de genes candidatos, potencialmente implicados en los procesos de carcinogénesis. Los genes candidatos deben cumplir dos características principales:

La primera es que exista una posible relación funcional entre el gen de interés y la etiología de la enfermedad. En el caso del cáncer, serían candidatos aquellos genes implicados en procesos celulares, cuya alteración pueda potencialmente modificar el riesgo a padecer un tumor. Algunos ejemplos serían los genes que participan en el metabolismo y detoxificación de carcinógenos, reguladores del ciclo celular, reparación del ADN o apoptosis.

La segunda característica es que los genes presenten variantes en su secuencia, que sean polimórficas en la población general y que al mismo tiempo tengan alguna repercusión funcional. En este sentido, los SNPs o Polimorfismos de cambio de un Solo Nucleótido, son variantes genéticas que se consideran como mejores candidatas a representar variantes de baja penetrancia.

Para que una variante se considere SNP, debe ocurrir en al menos el 1% de la población general. Suponen la forma más abundante de variación genética, con un rango de frecuencia que va desde 1 cada 300 hasta 1 cada 2000 pares de bases. En los inicios de la secuenciación completa del genoma humano, se identificaron más de 1.4 millones de SNPs<sup>(91)</sup>. Actualmente, los datos de la literatura sugieren que existen al menos 10 millones de SNPs con una frecuencia del alelo menor (minor allele frequency, MAF) mayor del 1% y 5 millones con MAF>10%<sup>(92)</sup>, pero los estudios de secuenciación a gran escala que se han realizado recientemente indican que estas estimaciones pueden ser incluso bajas<sup>(93)</sup>.

El hecho de que los SNPs sean tan numerosos y estén repartidos al azar a lo largo de todo el genoma, es una de las características que les convierte en marcadores genéticos ideales para identificar genes de baja penetrancia. Otra

ventaja que presentan es que son fáciles de determinar de manera inequívoca utilizando multitud de técnicas disponibles actualmente en los laboratorios de biología molecular.

En principio, esta aproximación parece la ideal, ya que maximizando la verosimilitud biológica, las posibilidades de éxito son mayores. Sin embargo, este tipo de análisis depende del conocimiento que se tenga en el momento de la funcionalidad de los genes y normalmente este conocimiento es limitado<sup>(90)</sup>.

### **11.2.2 Estudios de asociación de genoma completo (GWAS)**

En los últimos años, los estudios de asociación en todo el genoma o GWAS (Genome Wide Association Studies), han emergido como una auténtica revolución en la identificación de variantes de bajo riesgo tanto en tumores como en otras enfermedades, en las que se considera que el componente genético tiene un peso importante. El principio de los GWAS es el mismo que el de los estudios de asociación, con la importante diferencia de que en vez de analizar un SNPs o grupo discreto de SNPs, se analizan cientos de miles de SNPs marcadores del genoma completo. La ventaja de esta estrategia, es que al realizarse un barrido en todo el genoma, no es necesario disponer de información previa sobre la probabilidad a priori que puede tener un gen determinado, por su función, de ser causante de la susceptibilidad, eliminando todas las limitaciones que en este sentido tiene la estrategia del "gen candidato". Por otra parte, lo que parecía una aproximación de difícil aplicación, ha sido posible en los últimos años gracias a la convergencia de las nuevas tecnologías que permiten genotipar cientos de miles de SNPs a la vez en una sola muestra<sup>(94)</sup>. Los resultados de los GWAS están siendo muy prometedores, identificando loci inesperados y apuntando a nuevas vías implicadas en la patogénesis de estas enfermedades.

### 12-. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

La supervivencia y proliferación normales de la célula requieren la continuidad de su ADN dúplex y la precisión extrema de la información de su secuencia de ADN. Ambas son vulnerables a agresiones endógenas y exógenas como el calor, los accidentes metabólicos, la radiación, las sustancias ambientales y la quimioterapia. Por ejemplo, la lesión del ADN sólo a partir de fuentes endógenas da lugar a una cifra estimada de 20.000 lesiones en una única célula cada día<sup>(95)</sup>.

No obstante, menos de uno de cada 1000 cambios de bases accidentales provoca una mutación permanente; el resto son eliminados con una eficiencia extraordinaria mediante la reparación del ADN. Además, la reparación del ADN participa en casi todos los procesos relacionados con la replicación, la transcripción y la recombinación<sup>(96)</sup>. Un 10% de los genes del genoma están implicados en la reparación y replicación del ADN<sup>(97)</sup>. Así la inactivación de un gen de reparación del ADN podría dar lugar a una elevada tasa de mutación, y defectos en la capacidad de reparación del ADN se relacionan con varias enfermedades genéticas humanas<sup>(97,98)</sup>, incluyendo diversas formas de cáncer como el cáncer de mama de inicio temprano y el cáncer de colon no polipósico hereditario<sup>(99)</sup>. Por otra parte, el aumento de la reparación del ADN podría contribuir a la resistencia del tumor a los agentes antitumorales que dañan el ADN<sup>(100)</sup>. Todo ello subraya la importancia fundamental de la reparación del ADN para mantener la supervivencia y proliferación normales de la célula y para el tratamiento del tumor.

En las células de mamíferos existen seis vías específicas del tipo de lesión para la reparación del ADN (ver Figura 6), que utilizan enzimas específicas para resolver diferentes modalidades de lesiones: 1) la vía de la reparación directa (DR) para la lesión causada por O6-alquilguanina; 2) la vía de la reparación por escisión de bases (BER) para la reparación de la lesión de bases, como bases oxidadas-reducidas, alquiladas y desaminadas; 3) la vía de la reparación por escisión de nucleótidos (NER) para la reparación de las lesiones del grueso del ADN producidas por aductores del ADN por radiación, sustancias o proteínas; 4) la vía de reparación de errores (MMR) para la sustitución de las bases mal

## INTRODUCCIÓN

emparejadas; 5) la vía de la recombinación homóloga (HR); 6) la vía de unión de extremos de ADN no homólogos (NHEJ). Estas dos últimas vías intervienen en la reparación de las roturas de las cadenas dobles de ADN (DSB)<sup>(101)</sup>.

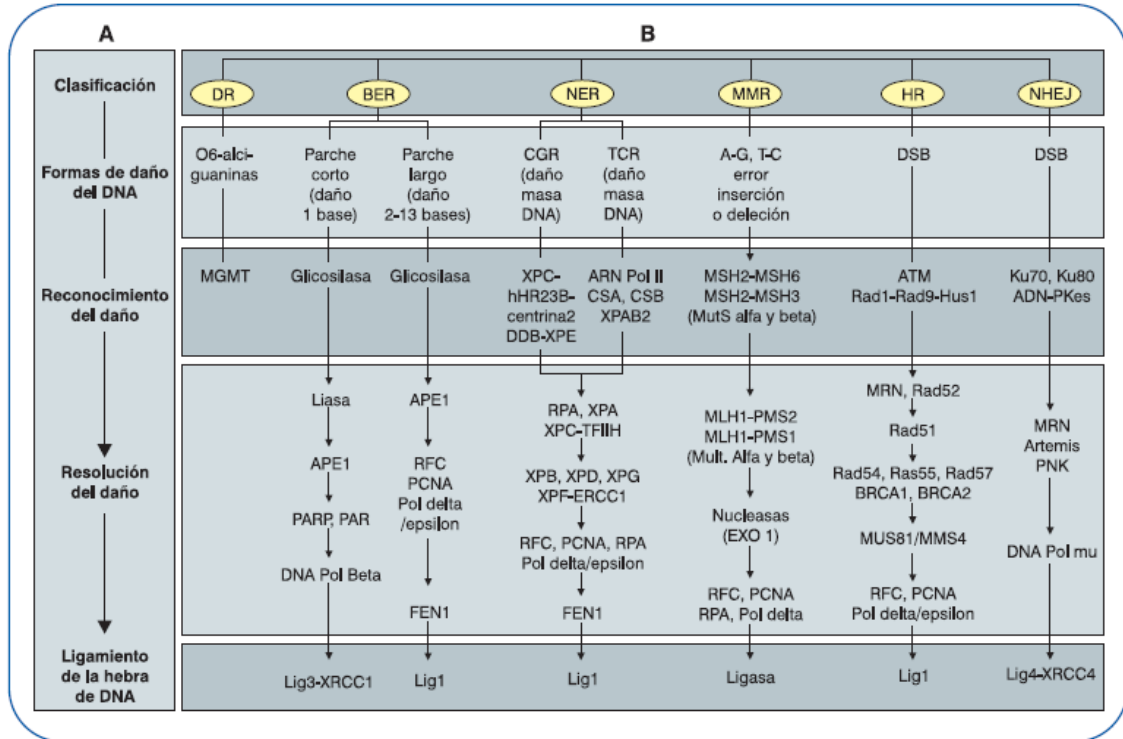


Figura 6: Vías de reparación del ADN. Figura tomada de Miao y Ding<sup>(101)</sup>.

Varias vías de reparación pueden compartir factores de reparación generales como las helicasas del ADN, el factor de replicación C, el antígeno nuclear de proliferación celular, y las polimerasas y ligasas del ADN. Por el contrario, lesiones concretas podrían ser reparadas por más de una vía<sup>(100,102,103)</sup>.

El proceso general de reparación del ADN consta de tres pasos principales: reconocimiento de la lesión, resolución de la lesión y el volver a unir la cadena de ADN (Fig.6). Los sensores específicos de la lesión del ADN identifican primero las lesiones del ADN; a continuación, otros factores de reparación eliminan secuencialmente las bases o nucleótidos aberrantes mediante incisión y escisión del ADN; seguidamente, se resintetiza nuevo ADN mediante ADN polimerasas, siguiendo las normas del emparejamiento de bases para sustituir las eliminadas en el paso previo; finalmente, los huecos del ADN se sellan mediante las ligasas. Algunos mecanismos de reparación precisan todos estos pasos, pero otros únicamente consisten en partes de ellos<sup>(101)</sup>.



A continuación se explican las vías de reparación estudiadas en el presente trabajo.

### **12.1 Vía de la reparación por escisión de bases (BER)**

La vía de la reparación por escisión de bases (BER) es el principal mecanismo para la reparación de la alquilación del ADN y de la lesión oxidativa. La mayor parte de dichas lesiones de bases se derivan del metabolismo fisiológico endógeno como la oxidación de bases de ADN por especies de oxígeno reactivas que se generan en las células mediante metabolismo aeróbico, la desaminación espontánea de bases de ADN, o la metilación de bases de ADN mediante S-adenosilmetionina. Por otro lado, los agentes que lesionan el ADN, en concreto los alquilantes, son el principal origen exógeno de la alquilación de bases y la lesión oxidativa del ADN<sup>(104)</sup>.

La vía BER se puede subdividir en dos subvías metabólicas según la longitud de sus sustratos de reparación: la BER de parche corto sólo repara lesiones de bases únicas, mientras que la BER de parche largo repara lesiones de 2-13 bases en un único sitio (ver Figura 7).

En la vía BER, tanto de parche corto como largo, la identificación de la lesión (base específica modificada) la lleva a cabo una ADN glicosilasa, actuando posteriormente la endonucleasaapurínica 1 (APE1)<sup>(105)</sup>.

Tras la fragmentación de la unión fosfodiéster, la resolución de la lesión en la BER de parche corto y en la de parche largo se realiza de diferente forma, caracterizada por las diversas enzimas empleadas, debido a la diferencia en los tamaños de los huecos que hay que reparar.

El resellado de la cadena de ADN dañada lo finaliza la ligasa 3 con la ayuda de XRCC1 en la BER de parche de reparación corto, y la ligasa 1 en la BER de parche de reparación largo.

## INTRODUCCIÓN

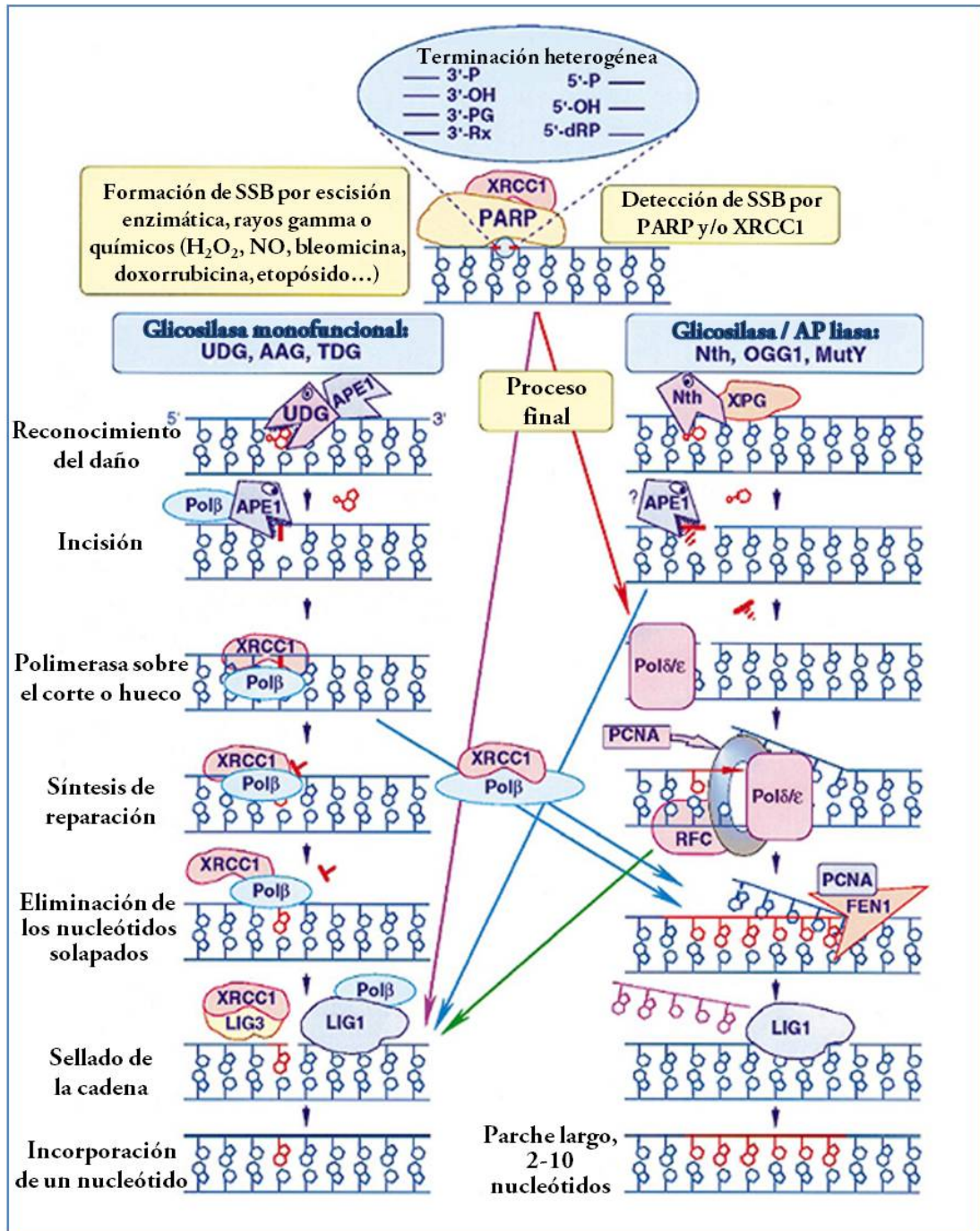


Figura 7: Diagrama de la vía de reparación BER con énfasis en el papel de XRCC1. Figura modificada de Thompson y West<sup>(106)</sup>.

El mecanismo BER es clave para mantener la integridad del ADN celular. Uno de los motivos es que es la vía de reparación predominante para el procesamiento de pequeñas lesiones de bases. La tasa estimada de 10.000 lesiones de bases por célula de mamífero por día subraya su crucial importancia<sup>(105,107)</sup>. Además, la delección de los genes en la vía BER (incluidos

## INTRODUCCIÓN

APE1, FEN1, XRCC1, Pol beta y algunas glucosilasas del ADN) es letal para el embrión<sup>(104)</sup>. Otra razón es que la vía BER es el componente fundamental para reparar varias formas especiales de roturas de cadena sencilla de ADN (Simple strand break, SSB). Las SSB inducidas por radiación ionizante y por especies reactivas de oxígeno pueden ser identificadas y unidas por PARP1. Además la vía BER puede participar en la reparación de alguna lesión compleja del ADN en coordinación con otros mecanismos como la reparación de la escisión del nucleótido<sup>(101)</sup>.

Dentro de esta vía de reparación unos de los SNPs más estudiados son el cambio de Arg por Gln en el codón 399 del gen XRCC1 y el cambio de Glu por Asp en el codon 148 del gen APE1.

### 12.1.1 XRCC1 Arg399Gln

El gen XRCC1 (X-ray repair cross complementation group 1) está constituido por 17 exones, se localiza en el cromosoma 19q13.2 y codifica una proteína de 633 aminoácidos. XRCC1 es una proteína de 70kDa esencial en la reparación de roturas de cadena simple del ADN y por escisión de bases<sup>(108)</sup>. Estas funciones se llevan a cabo a pesar de la falta de actividad enzimática propia<sup>(109)</sup>.

Se cree que actúa como una proteína de andamiaje para facilitar el reclutamiento de las enzimas de reparación del ADN, actuando como una plataforma de carga para el proceso de reparación<sup>(110,111)</sup>.

XRCC1 interactúa con múltiples enzimas de reparación del ADN, cada una con un enlace único específico a los dominios funcionales de XRCC1<sup>(108)</sup>.

Estudios en modelos animales han demostrado que la falta de XRCC1 en línea germinal es incompatible con la vida<sup>(113)</sup> y líneas celulares deficientes en la proteína XRCC1 presentan hipersensibilidad a agentes alquilantes así como a las radiaciones ionizantes<sup>(114)</sup>.

La expresión de XRCC1 en los tejidos es ubicua pero no uniforme<sup>(115)</sup>.

## INTRODUCCIÓN

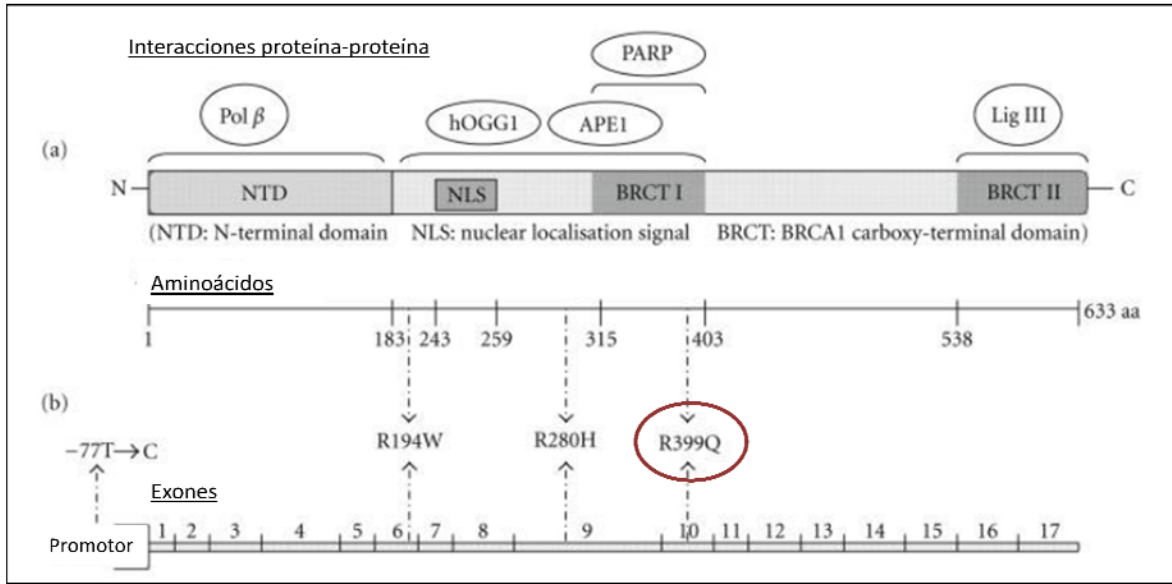


Figura 8: Proteína XRCC1 humana y estructura del gen. Figura modificada de Sterpone y Cozzi<sup>(112)</sup>. El óvalo rojo rodea al polimorfismo a estudio.

(a) El diagrama muestra los dominios de XRCC1 y las regiones de interacción con otros componentes de BER

(b) El diagrama muestra la estructura del gen con los SNPs más comunes y estudiados: -77 T → C, R194W, R280H y R399Q.

Se han descrito diversas variantes genotípicas de XRCC1 que se asocian con modificaciones en las funciones de reparación. La más ampliamente estudiada es la que se produce en el codón 399 que consiste en un cambio de Guanina (G) por Adenosina (A) en la secuencia del ADN, lo que, al transcribirse, supone una sustitución de Arginina (Arg) por Glutamina (Gln). Aunque la configuración general de ambas proteínas es similar y hay poca desviación real en el sitio del propio polimorfismo, la sustitución produce importantes cambios conformacionales en diversos sitios del dominio BRCT1, incluyendo la pérdida de las características estructurales secundarias, tales como las hélices alfa que pueden ser fundamentales para las interacciones proteína-proteína. Estos resultados apoyan la hipótesis de que este polimorfismo en XRCC1 podría afectar la capacidad de reparación del ADN mediante la alteración de la estructura del dominio BRCT1 y por lo tanto la capacidad de XRCC1 para coordinar BER<sup>(116)</sup>.

Esta variante es relativamente frecuente en caucásicos y asiáticos donde aproximadamente el 10% presentan la variante homocigota.

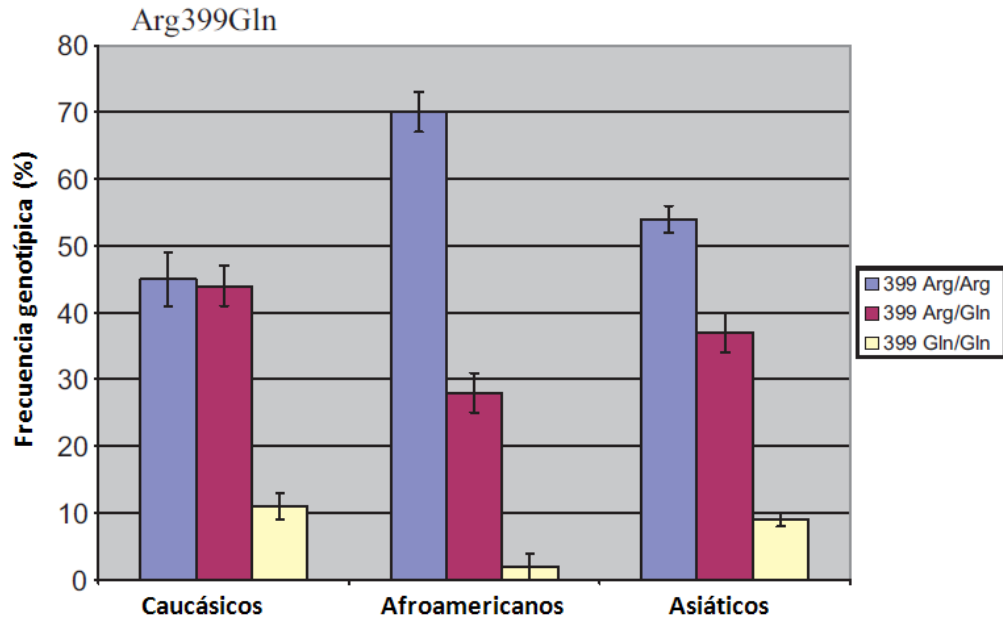


Figura 9: Frecuencia de polimorfismos en regiones codificantes de XRCC1. Figura modificada de Ginsberg et al.<sup>(108)</sup>

Si bien hay varias líneas de evidencia que muestra que el polimorfismo en el codón 399 polimorfismo (Gln/Gln) puede disminuir la capacidad de reparación, la importancia cuantitativa de este hecho requiere una evaluación adicional<sup>(108)</sup>.

### 12.1.2 APEX Glu148Asp

APE1 (apurinic endonuclease 1), también conocido como APE, APEX, HAP1 (Human AP endonuclease 1), y REF-1 (redox factor-1) es una proteína multifuncional que juega un papel central en la vía BER. Además es un coactivador transcripcional de numerosos factores de transcripción implicados en el desarrollo de cáncer<sup>(117)</sup>, siendo considerado una prometedora herramienta para el tratamiento del cáncer<sup>(118)</sup>.

El gen se localiza en el cromosoma 14q11.2-12<sup>(119)</sup>.

Los ratones con mutación homocigota del gen, que carecen de una actividad funcional, mueren durante el desarrollo embrionario. Por el contrario, los ratones con mutación heterocigota del gen, se desarrollan a la vida adulta sin anomalías aparentes<sup>(120)</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Se han identificado un total de 18 SNPs en APE1<sup>(121)</sup>, siendo el SNP 1349 T>G, en el quinto exón (rs1130409) uno de los más estudiados. Estudios funcionales de este polimorfismo sugieren que el alelo G podría tener alterada la actividad endonucleasa y de unión al ADN, así como una disminución de su capacidad para relacionarse con otras proteínas BER y para reparar el daño oxidativo al ADN<sup>(122,123)</sup>.

### 12.2 Vía de la reparación por escisión de nucleótidos

La vía de la reparación por escisión del nucleótidos (NER) se considera el mecanismo de reparación del ADN más versátil y flexible, ya que se ocupa de una amplia variedad de lesiones estructurales del ADN no relacionadas<sup>(124)</sup>.

Se trata del sistema de reparación más importante para procesar lesiones voluminosas del ADN que conllevan una deformación de la hélice del ADN<sup>(125)</sup>. Estas lesiones del ADN se forman por la exposición a la radiación o a sustancias como hidrocarburos aromáticos policíclicos y agentes intercalantes del ADN como cisplatino, o por aductos de proteína con ADN<sup>(126)</sup>. Los fotoproductos del ADN inducidos por radiación ultravioleta (UV) también pueden ser sustratos de la vía NER<sup>(127)</sup>. Además, elimina todas las lesiones sencillas de bases únicas<sup>(126)</sup>.

La vía NER se puede subdividir en reparación acoplada a la transcripción (Transcription coupled repair, TCR) y reparación global del genoma (Global genome repair, GGR) dependiendo de si las lesiones del ADN afectan las cadenas transcritas de los genes expresados. La TCR elimina determinados tipos de lesión del ADN de las cadenas transcritas de los genes expresados, mientras que la GGR repara las cadenas no transcritas de los genes expresados y también las regiones no expresadas del genoma. En general, la TCR es mucho más rápida y eficiente que la GGR. La diferencia clave de estas dos subvías radica en su distinto reconocimiento de la lesión<sup>(128)</sup>.

Después del reconocimiento diferencial de la lesión, el proceso de reparación posterior es común para la GGR y la TCR<sup>(124,126)</sup>.

Una vez detectadas las lesiones, se crea un complejo preincisión formado por factores de reparación como RPA, XPA, TFIIH, XPG, XPB y XPD, que se

## INTRODUCCIÓN

unen de forma coordinada a la zona de la lesión. XPB y XPD funcionan como ATPasa y helicasa dependiente de ADN, desenrollando el ADN en la dirección 3' a 5' (XPB) y en la dirección opuesta (XPD). Para abrir totalmente la doble hélice alrededor de la lesión, es necesario que la proteína RPA de unión al ADN de cadena única se una a la cadena de ADN no dañada. Esa unión de RPA puede proteger la cadena de ADN no dañada, facilitando el reclutamiento de otros factores de reparación, y junto con XPA, realizar una doble verificación de la curvatura y el desenrollado del ADN. La apertura completa facilita la incisión doble de los ~25 nucleótidos que contienen la lesión mediante la endonucleasa 3' XPG y la endonucleasa 5' ERCC1-XPF específicas de estructura. El hueco generado por la eliminación de la lesión se rellena con la síntesis de reparación realizada por ADN Pol delta y Pol épsilon con la ayuda de PCNA, el factor C de replicación (RFC) y RPA. Finalmente, la vía NER acaba en el lugar de unión del extremo 5' del nuevo fragmento sintetizado con la secuencia original mediada por la ligasa I (ver Figura 10).

Los mecanismos básicos de la vía NER se han conservado muchísimo a lo largo de la evolución.

La importancia de la NER sigue estando recalcada por el hecho de que hay al menos cinco síndromes genéticos directamente relacionados con defectos en este mecanismo de reparación.

La xerodermia pigmentosa (XP) se caracteriza por sensibilidad a la luz solar, neurodegeneración lenta y progresiva, y susceptibilidad al cáncer de piel por defectos en uno o más de siete genes (XPA a G).

El síndrome de Cockayne (CS) está causado por mutaciones en los genes CSA o CSB.

El defecto genético en la tricotiodistrofia (TTD) se atribuye a mutaciones específicas en los componentes TFIIH de XPB y XPD. A diferencia de XP, ni CS ni TTD presentan un riesgo elevado de cáncer.

La combinación de XP/CS está implicada en la TCR y la GGR.

## INTRODUCCIÓN

La quinta enfermedad relacionada con la NER es el raro síndrome cráneo-oculo-facialesquelético<sup>(124,130–132)</sup>.

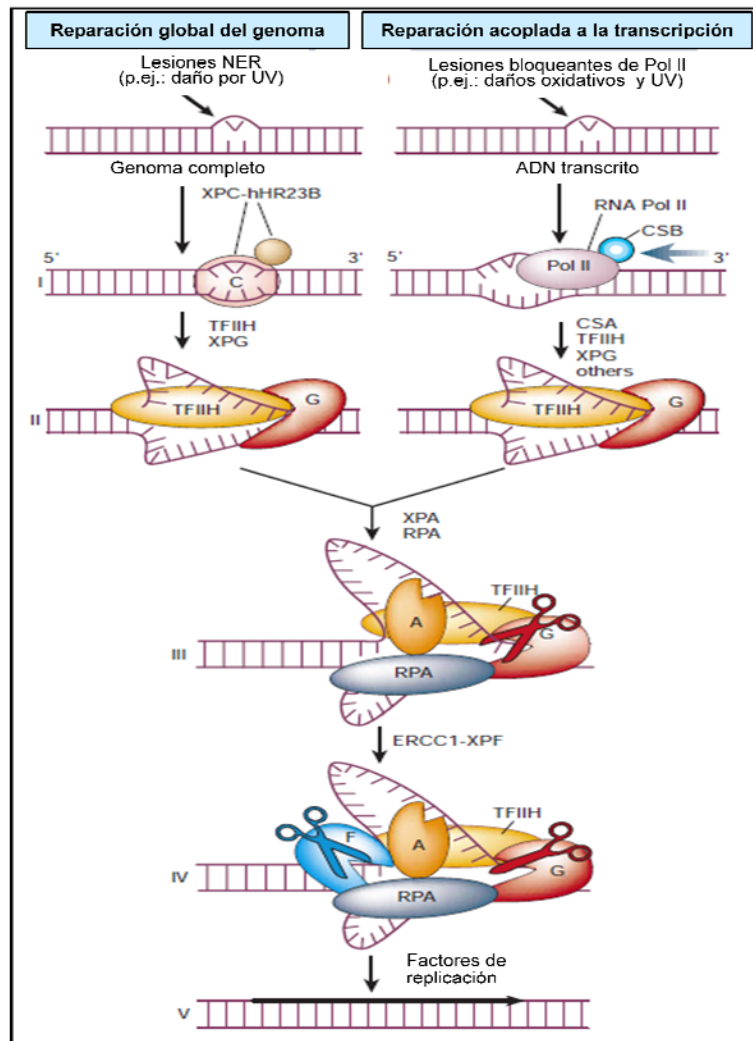


Figura 10: Modelo del mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos del genoma global y de reparación acoplada a la transcripción. Figura modificada de Hoeijmakers<sup>(129)</sup>.

### 12.2.1 XPD Lys751Gln

El gen XPD (xeroderma pigmentosum group D), también llamado ERCC2 (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency group 2) está localizado en el cromosoma 19q13.3. La proteína XPD humana es una de las 10 subunidades de TFIIH, un factor proteico necesario para el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa II y que tiene también una importante función en la reparación por escisión de nucleótidos (NER)<sup>(133)</sup>.



## INTRODUCCIÓN

XPD es una helicasa dependiente de ATP de 87 kDa (760 aminoácidos) que abre la hélice de ADN en el sentido 5'-3'<sup>(134)</sup> para permitir a la maquinaria de transcripción del ARN acceder al promotor, y a la maquinaria NER acceder a la lesión.

XPD es un gen esencial y su disrupción en ratones produce la mortalidad preimplantación<sup>(135)</sup>. Se conocen múltiples SNPs en el gen XPD. Uno de los más estudiados es el cambio de una Adenina(A) por una Citosina (C) en la posición 2329 descrito por primera vez por Lehmann y colaboradores<sup>(136)</sup>.

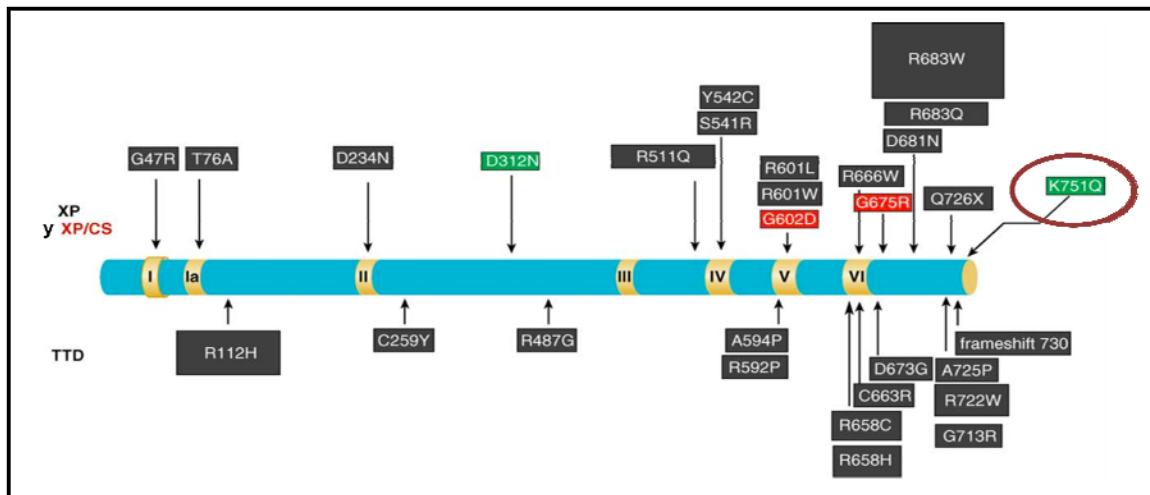


Figura 11: Localización de alguna de las mutaciones en la proteína humana XPD. Figura modificada de Clarkson y Wood<sup>(137)</sup>. El óvalo rojo rodea al polimorfismo a estudio. En la parte superior del esquema se muestran las mutaciones que han sido asociadas solamente con XP (cuadros negros) y con XP/Síndrome de Cockayne (cuadros rojos). En la parte inferior se muestran las mutaciones asociadas con TTD. El tamaño de los cuadros refleja el número de veces que una mutación particular ha sido encontrada. Las posiciones de los dos polimorfismos comunes se indican con cuadros verdes. Los números romanos I-VI denotan los siete dominios con actividad helicasa.

El cambio de Lisina (Lys) por Glutamina (Gln) en el codón 751 parece producir un cambio conformacional de la proteína<sup>(138)</sup>, pudiendo producir un cambio en su capacidad de reparación.

Se ha observado una diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de este polimorfismo entre diferentes grupos étnicos. Así, la prevalencia de la variante homocigota Gln/Gln es de 6,9% en afroamericanos, 1,1% en asiáticos y 13,4% en caucásicos<sup>(139)</sup>.

### 12.2.2 ERCC1 Asn118Asn

La proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1 también conocida como ERCC1 (Excision repair cross- complementing group 1), es un enzima altamente conservada, componente esencial en el proceso NER, requerido en el paso de incisión<sup>(140,141)</sup>.

El gen ERCC1 contiene 10 exones y está formado por unas 14 kb<sup>(142)</sup>. Este gen se localiza en el cromosoma 19q13.2-q13.3<sup>(143)</sup>.

Los ratones knockout para ERCC1 desarrollan anomalías y una drástica reducción del tiempo de vida<sup>(144,145)</sup>.

Entre las proteínas implicadas en NER, un defecto en ERCC1 parece estar asociado con el defecto de reparación del ADN más severo<sup>(140)</sup>. La baja expresión de niveles de ARNm de ERCC1 en linfocitos de sangre periférica se ha relacionado con un aumento, estadísticamente significativo, del riesgo de carcinoma escamoso de cabeza y cuello y un aumento, no significativo, del riesgo de cáncer de pulmón<sup>(146,147)</sup>.

Aunque el polimorfismo estudiado (19007 T > C) no produce un cambio de aminoácido (polimorfismo sinónimo), se sabe que incluso nucleótidos de genes que codifican proteínas que no alteran los aminoácidos están bajo presión evolutiva, y análisis adicionales sugieren que estos sitios afectan a la transcripción del RNA, la unión de microRNA y cómo se establecen los estados de la cromatina<sup>(148)</sup>.

Así, el polimorfismo sinónimo 19007 T > C (codon 118, rs11615) de ERCC1, se ha asociado con diferentes niveles de ARNm<sup>(149)</sup>, lo que podría tener implicaciones tanto en la predisposición a padecer un cáncer, así como con la respuesta al tratamiento y toxicidad<sup>(150)</sup>.

### 12.3 Vía de la recombinación homóloga y vía de unión de extremos de ADN no homólogos

Los sustratos de recombinación homóloga (Homologous recombination, HR) y de unión de extremos de ADN no homólogos (Non-homologous end joining, NHEJ) son las roturas de doble cadena (DSB). En la HR, los DSB se derivan de dos cortes simultáneos en cadenas opuestas de la hélice de ADN y ambos deben estar lo suficientemente próximos el uno del otro (menos de 12 pb). Los DSB pueden ser generados por especies de oxígeno reactivas, radiaciones ionizantes, agentes radiomiméticos (como metiletanosulfonato y bleomicina) e inhibidores de las topoisomerasas, así como por la detención y el colapso de la horquilla de replicación. Los DSB son también productos normales de la recombinación V(D)J y de los procesos de cambio de clase de las inmunoglobulinas, e intermediarios físicos durante la recombinación mitótica y meiótica, la replicación del ADN y la transposición de los elementos móviles<sup>(151,152)</sup>.

La **HR** repara los DSB mediante los siguientes pasos: reconocimiento del daño, preparación de los extremos 3' de los DSB, invasión de la cadena, migración de la rama, formación de la unión Holliday y resolución. Las uniones Holliday, son estructuras encadenadas de cuatro cadenas que pueden moverse a lo largo del ADN por un proceso de migración de la rama y, en consecuencia, se extiende o encoge la región del heterodúplex de ADN. Durante el último paso de HR, las uniones Holliday son escindidas por una resolvasa que corta los productos cruzados y no cruzados (Fig. 12)<sup>(151-154)</sup>.

Los pasos generales para **NHEJ** son: la unión del extremo y formación de un puente, procesamiento del extremo y unión<sup>(155,155-157)</sup>.

La HR precisa una molécula de ADN no dañada y una amplia homología de secuencias, al contrario que la NHEJ. La complejidad de la estructura del ADN terminal roto puede contribuir también a la elección del mecanismo de reparación del DSB, aunque sigue sin identificarse el mecanismo exacto. Un DSB único, que puede unirse directamente, es un buen sustrato para la NHEJ, mientras que las roturas más difíciles pueden ser más propensas a atraer el mecanismo de HR. En general, los DSB difíciles precisan más tiempo para su reparación, lo que

## INTRODUCCIÓN

concuerta con la posibilidad de que sean reparados preferentemente por el mecanismo de HR<sup>(154)</sup>.

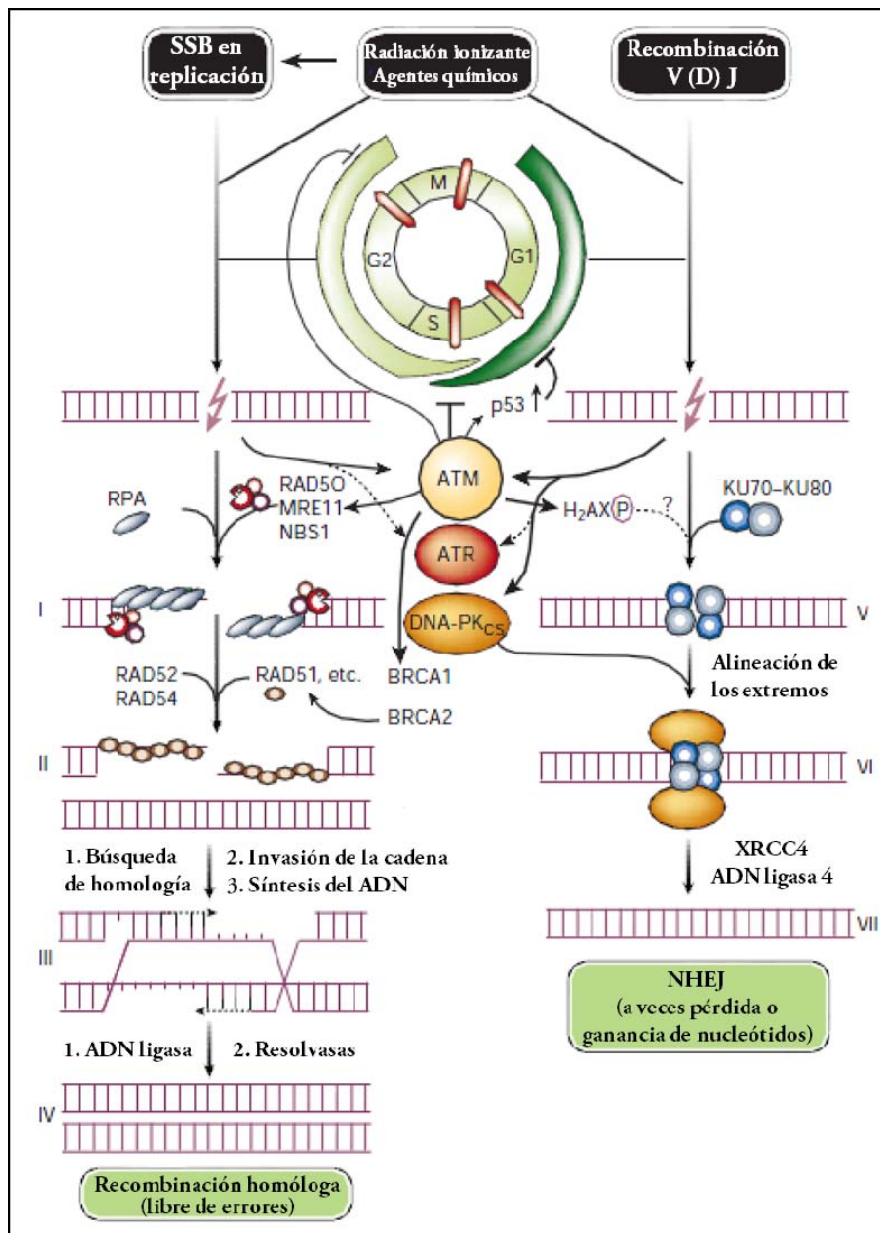


Figura 12: Mecanismos de HR y NHEJ. Figura modificada de Hoeijmakers<sup>(129)</sup>.

Los DSB son la forma más letal de lesiones del ADN y aparecen con una frecuencia elevada. Aunque se ha sugerido que las células son capaces de tolerar una baja cantidad de lesiones de ADN irreparables, un único DSB de ADN puede ser citotóxico o en determinadas condiciones es suficiente para activar la apoptosis<sup>(151)</sup>. Además, se ha establecido una unión causal entre los DSB y la inestabilidad genómica. Por ejemplo, volver a juntar DSB de forma errónea puede

dar lugar a la eliminación o inserción de mutaciones y a translocaciones del cromosoma. De hecho, se ha demostrado que los defectos en las vías de la HR o la NHEJ dan lugar a cáncer<sup>(154)</sup>. Por ello, los mecanismos de reparación de los DSB, es decir HR y NHEJ, son sumamente cruciales para mantener la supervivencia celular, la proliferación y la estabilidad genómica.

### 12.3.1 XRCC3 Thr241Met

El gen XRCC3 (X-ray repair cross complementation Group 3) se localiza en la región 14q32.3<sup>(158)</sup>.

La proteína XRCC3 es un miembro de la familia de proteínas relacionadas con Rad 51<sup>(159)</sup>, que participa en la reparación de Roturas de Doble Cadena del ADN a través del mecanismo de recombinación homóloga, fundamental para el mantenimiento de la integridad cromosómica<sup>(160)</sup>.

Uno de los polimorfismos más estudiados de este gen es la sustitución de Citosina por Timina en el exón 7, lo que supone el cambio de treonina (Thr) por metionina (Met) en el codón 241.

La frecuencia de este polimorfismo difiere entre los grupos étnicos; así, la prevalencia del homocigoto Met/Met es de 0,2 % en asiáticos, 4,6% en afroamericanos y 12,4% en caucásicos<sup>(139)</sup>.

El impacto del mismo sobre el fenotipo reparador se ha estudiado mediante la medición de aberraciones cromosómicas tras la irradiación de muestras de sangre procedente de donantes sanos no fumadores, obteniéndose un incremento estadísticamente significativo en el número de deleciones cromosómicas<sup>(161)</sup>. Asimismo, se ha descrito un aumento estadísticamente significativo en la presencia de aductos en el ADN en personas sanas portadoras de la variante homocigota (Met/Met)<sup>(162)</sup>.

### 13-. FUNCIONES Y POLIMORFISMOS DEL GEN P53

TP53, que codifica p53, es un gen supresor de tumores que se encuentra frecuentemente mutado en cánceres esporádicos. El supresor de tumores p53 juega un papel fundamental en la preservación de la estabilidad genómica, actuando frente al daño al ADN, hipoxia, estrés metabólico y activación oncogénica<sup>(163,164)</sup>.

p53 modula la transcripción de genes que gobiernan la mayor defensa contra el crecimiento tumoral, incluyendo la parada del ciclo celular, apoptosis, mantenimiento de la integridad genética, inhibición de la angiogénesis y senescencia celular<sup>(165)</sup>.

El mal funcionamiento de la vía de p53 es una característica casi universal en los tumores humanos<sup>(164,165)</sup>. Las mutaciones somáticas de TP53 que suponen la ausencia o disfunción de p53 es uno de los mecanismos más frecuentes de daño de la vía de p53 durante la tumorigénesis. En el síndrome de Li-Fraumeni las mutaciones de TP53 se producen en la línea germinal y confieren un aumento del riesgo de desarrollar varios cánceres, incluyendo sarcomas, mama, cerebrales y tumores adrenocorticales a una edad temprana<sup>(166)</sup>.

A diferencia de las mutaciones asociadas con el síndrome de Li-Fraumeni o las mutaciones somáticas de los tumores, la mayoría de polimorfismos se espera que sean fenotípicamente silentes, con variantes ocasionales que podrían afectar al riesgo de cáncer comprometiendo la actividad normal de p53, aunque los efectos de estas variantes son más sutiles que las mutaciones de p53 asociadas con cáncer o con el síndrome de Li-Fraumeni.

Se han identificado más de 200 SNPs en TP53. Debido a la importancia de p53 en la supresión tumoral, los polimorfismos que alteran la función de p53 podrían afectar al riesgo de cáncer, progresión y/o respuesta al tratamiento<sup>(167)</sup>.

Más del 90% de polimorfismos en TP53 se encuentran en secuencias no codificantes. Sin embargo, uno de los polimorfismos más estudiados de p53 se localiza en el codón 72 de p53 que puede tener la secuencia CCC, codificando prolina (p53-P72), o CGC, que codifica arginina (p53-R72).

## INTRODUCCIÓN

Un análisis comparativo de secuencias sugiere que p53-P72 es la forma ancestral, aunque p53-R72 ocurre con una alta frecuencia (>50%) en alguna población<sup>(168)</sup>.

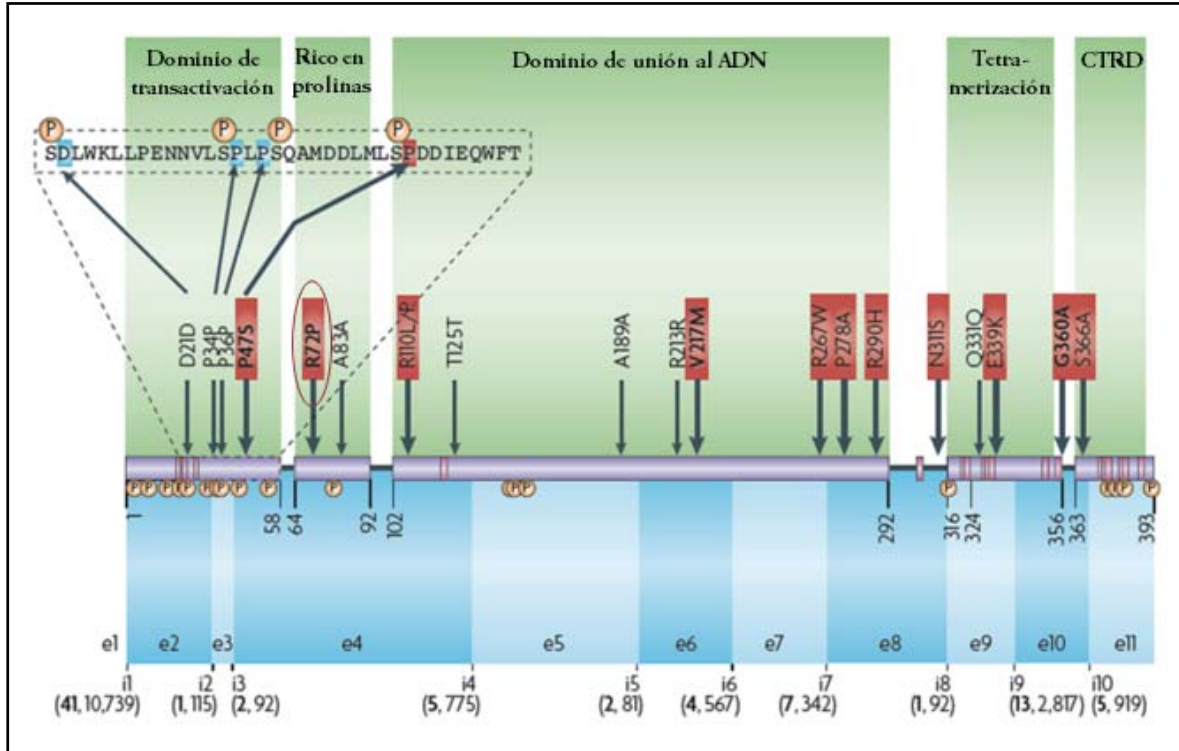


Figura 13: SNPs en p53: localizaciones en la proteína p53 y secuencias de ADN. Figura modificada de Whibley et al.<sup>(167)</sup> Los círculos amarillos (P) indican lugares de fosforilación y los rectángulos rosas indican otros lugares de modificaciones post-traslacionales incluyendo acetilación y metilación, entre otras. Los polimorfismos exónicos están indicados sobre la estructura de la proteína, en rojo los no-sinónimos. Las regiones intrónicas se muestran debajo de la estructura proteica, con el número de polimorfismos validados identificados en cada intrón en negrita, y el tamaño del intrón (i) en pares de bases; e, exón. El óvalo rojo rodea al polimorfismo a estudio.

La proteína p53 está formada por tres dominios mayores: un dominio de transactivación amino-terminal, un dominio central de unión al ADN, el cual es crucial en la transactivación transcripcional por p53 y la región más frecuentemente mutada en cánceres, y un dominio de tetramerización carboxy-terminal. Los dominios C-terminal y N-terminal contienen numerosos lugares de modificación postranslacional que alteran la estabilidad, actividad y las interacciones proteína-proteína de p53. Otras estructuras importantes de p53 son el dominio rico en prolina y el dominio regulador C-terminal (CTRD).

## INTRODUCCIÓN

El codón 72 está en el exón 4 en el segmento de TP53 que codifica un dominio rico en prolinas, entre el dominio de transactivación N-terminal y el dominio de unión al ADN, en el cual se encuentran la mayoría de mutaciones asociadas a tumores. La contribución precisa del dominio rico en prolinas a la regulación y función de p53 no está clara. A diferencia del dominio de unión al ADN, el dominio rico en prolinas está peor conservado a lo largo de la evolución y no es una localización frecuente de las mutaciones asociadas a tumores<sup>(167)</sup>. Estudios de delección en células y ratones apoyan que el dominio rico en prolinas es esencial para p53 para producir una respuesta apoptótica completa al estrés e inhibir la tumorigénesis<sup>(169-172)</sup>.

Líneas celulares que expresan la variante p53-R72 sufren apoptosis más eficientemente que líneas celulares que expresan p53-P72<sup>(173)</sup>. Así, el consenso actual es que p53-R72 es más efectivo induciendo apoptosis y protegiendo a las células estresadas del desarrollo neoplásico que p53-P72. Sin embargo, todavía no se conoce cómo de universales son estas diferencias funcionales entre p53-P72 y p53-R72 en diferentes tipos celulares o si son relevantes *in vivo*<sup>(167,174)</sup>.

Los diferentes alelos de p53 codifican bien residuos de prolina (p53-codon72-Pro) o arginina (p53-codon72- Arg) y fueron descritos por primera vez en 1988 por Buchman et al<sup>(175)</sup>.

El primer estudio que evidenció que no eran funcionalmente equivalentes se publicó en 1999 por Thomas et al<sup>(176)</sup>. Los autores observaron que p53- codon72-Arg era más eficiente suprimiendo la transformación de los oncogenes E7 and EJ-ras e iniciando la apoptosis. En un estudio posterior Dumont et al. señalaron una mayor capacidad del alelo Arg para inducir apoptosis<sup>(173)</sup>. Concretamente, usando una p53 mutante, sensible a temperatura, observaron que p53- codon72-Arg se trasloca de manera más eficiente a la mitocondria, donde interactúa con proteínas proapoptóticas, tales como GRP75 y Hsp60, desencadenando así la apoptosis.

Con posterioridad, tres estudios adicionales, también señalaron el mayor potencial apoptótico de p53-codon72-Arg tanto en presencia<sup>(177)</sup> como en ausencia de quimioterapia<sup>(174,178,179)</sup>.



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los cánceres de cabeza y cuello (CCC) constituyen un amplio número de tumores localizados en diferentes regiones anatómicas del área cérvico-facial, siendo la mayoría de los CCC de estirpe escamosa. Tomados conjuntamente suponen una de las neoplasias más frecuentes en el mundo desarrollado. La incidencia estimada en España para el año 2015 es de 16.298, con una prevalencia de 36.831 personas afectadas por la enfermedad<sup>(7)</sup>.

Desde un punto de vista epidemiológico, los factores clásicos relacionados de forma más directa con el desarrollo de CCC son el consumo de tabaco y alcohol; sin embargo, sólo un determinado porcentaje de personas expuestas a estos carcinógenos desarrollan la enfermedad indicando la existencia de variaciones genéticas que modifican el riesgo. Además, estudios poblacionales han demostrado un riesgo incrementado de 3 a 8 veces de sufrir un CCC en personas con antecedentes en familiares de primer grado, implicándose una susceptibilidad genética en su aparición<sup>(65)</sup>.

Los seres humanos compartimos 99,9% de la información genética. El restante 0,1% varía entre cada individuo, siendo las variaciones más comunes aquellas en las que cambia un solo nucleótido, conocidas como SNP concentrándolos uno en cada 1.250 nucleótidos. Se piensa que los SNP son diferentes de las mutaciones que provocan enfermedad, porque éstos producen un fenotipo no discernible. Sin embargo, éstos pueden afectar a la función del gen y pueden predisponer a la enfermedad aun sin alteración aparente de la estructura de la proteína codificada por dicho gen<sup>(180)</sup>.

La frecuencia de los alelos de los SNP menos comunes en la población general es al menos del 1%, mientras que las mutaciones patogénicas son, en general, mucho más raras. Debido a su alta incidencia en la población, los SNPs son muy informativos y han sido ampliamente usados en estudios de asociación genética para el riesgo de desarrollar enfermedades multifactoriales como es el caso del cáncer<sup>(181,182)</sup>.

Multitud de agentes tanto exógenos (tabaco, alcohol, radiaciones ultravioleta, etc.) como endógenos (agua oxigenada, moléculas de oxígeno reactivas y ciertos

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

metabolitos que actúan como agentes alquilantes) pueden producir daño en el ADN. Polimorfismos en los genes reparadores del ADN podrían alterar la capacidad de reparación del daño al ADN; déficits en la capacidad de reparación podrían conducir a inestabilidad genética y carcinogénesis.

Además, teniendo en cuenta que los tratamientos del cáncer se basan a menudo en la inducción del daño al ADN, polimorfismos en las vías de reparación podrían ser importantes para la respuesta al tratamiento, toxicidad y supervivencia<sup>(183)</sup>.

Por otra parte, numerosos estudios demuestran que las variantes alélicas del codón 72 de P53 poseen diferente actividad funcional: en condiciones celulares normales, el alelo Arginina actúa de forma más eficiente que el alelo Prolina en la inducción de la apoptosis<sup>(184)</sup>, mecanismo imprescindible tras el fallo de los sistemas de reparación.

En este contexto, nos planteamos los siguientes objetivos:

### **OBJETIVOS GENERALES**

- 1-. Estudiar, en pacientes diagnosticados de cáncer de cabeza y cuello, la presencia de variantes alélicas en genes reparadores del ADN (XRCC1, APEX1, ERCC1, XPD, XRCC3) y en el codón 72 de p53, que puedan modificar el riesgo de desarrollar la enfermedad.
- 2-. Analizar la posible implicación de dichas variantes alélicas en la respuesta al tratamiento y en la aparición de efectos secundarios en los pacientes con tumores de cabeza y cuello.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1-. Comparar las distribuciones alélicas y genotípicas de los polimorfismos a estudio entre pacientes con cáncer de cabeza y cuello y pacientes sin neoplasia, con el fin de determinar una posible relación entre los diferentes genotipos y la predisposición al desarrollo de este tipo de tumores.

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

- 2-. Identificar la presencia de polimorfismos en genes reparadores del ADN y en el codón 72 de p53, que puedan aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de cabeza y cuello a edades tempranas ( $\leq 50$  años).
- 3-. Analizar la relación entre la presencia de polimorfismos en genes reparadores y en el codón 72 de p53 con la respuesta al tratamiento, para evaluar su posible papel predictivo en esta enfermedad.
- 4-. Analizar la relación entre la presencia de polimorfismos en genes reparadores y en el codón 72 de p53 con la supervivencia libre de enfermedad, para evaluar su posible papel pronóstico en esta enfermedad.
- 5-. Estudiar la distribución de alelos y genotipos, de los polimorfismos en genes reparadores y en el codón 72 de p53, para conocer la posible implicación de los mismos en la aparición de toxicidad secundaria al tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1.- SUJETOS DEL ESTUDIO

### 1.1.- Pacientes

La muestra a estudio está constituida por pacientes, diagnosticados de cáncer epidermoide de cabeza y cuello, en diferentes estadios de la enfermedad.

Se seleccionaron los pacientes con tumores de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe, por compartir histología (la mayoría de ellos epidermoides) y factores de riesgo (fundamentalmente consumo de tabaco y alcohol).

Al realizar el estudio sobre polimorfismos de la línea germinal no se producen modificaciones de los mismos, independientemente del momento de inclusión de los pacientes en el estudio. Por este motivo los pacientes fueron reclutados desde los diferentes Servicios del Complejo Hospitalario de Salamanca (ORL del Hospital Clínico Universitario y Virgen de la Vega, Maxilofacial, Oncología Médica y Oncología Radioterápica) bien en el momento del diagnóstico, durante el tratamiento o en las revisiones posteriores.

Se realizó una revisión de las Historias Clínicas de los diferentes Servicios para obtener los datos de las variables a estudio.

Se incluyeron en el estudio un total de 185 casos (ver figura 14).

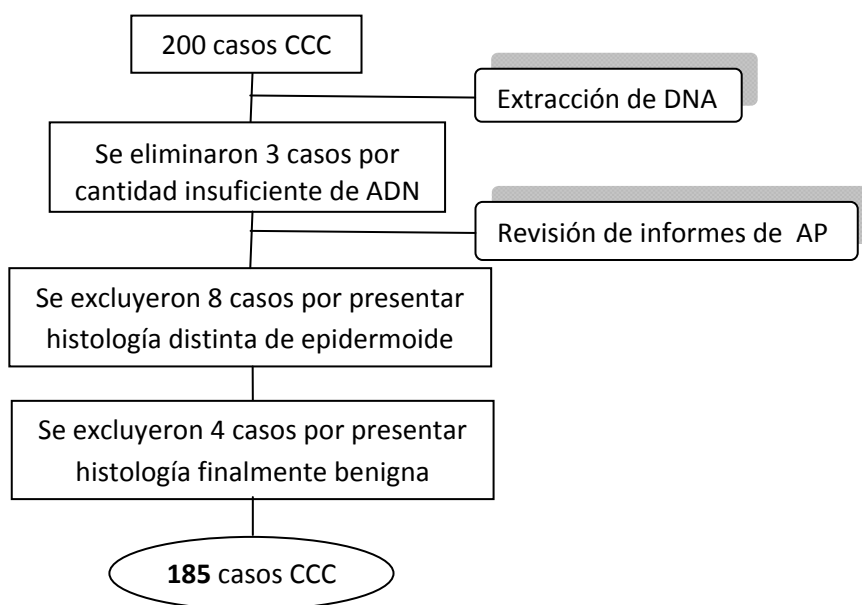


Figura 14: Diagrama de selección de los casos incluidos en el estudio

### 1.2- Controles

Las muestras elegidas como controles fueron las correspondientes a pacientes, atendidos por distintas patologías, en diferentes Servicios del Hospital, con factores de riesgo para padecer la enfermedad, que no hubiesen padecido ningún tipo de cáncer hasta el momento de ser reclutados. De este modo, se seleccionaron personas mayores de 65 años de edad, fumadores de más de 20 cigarrillos/día durante al menos 20 años.

Se recogieron un total de 150 controles. Una de las muestras no se pudo incluir en el estudio por cantidad insuficiente de ADN y, por lo tanto, no poder conocer sus variantes alélicas.

De este modo se incluyeron en el estudio un total de 149 controles.

### 2.- OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DEL ADN.

Las muestras fueron obtenidas, previo consentimiento informado, mediante la extracción de sangre periférica, realizada en condiciones estériles, en tubos "Venoject" de 10 ml con EDTA y se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento.

Todas las muestras fueron identificadas con su correspondiente número de laboratorio para mantener la confidencialidad de los datos personales y genéticos, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas.

A partir de las células de sangre periférica se extrajo ADN genómico de alto peso molecular.

En la sangre periférica, las células nucleadas se aislaron mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50 mL de ddH<sub>2</sub>O durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4°C). Tras la recuperación de la interfase creada y lisis de los glóbulos rojos con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0.25 M Sacarosa; 50 mM Tris-HCl pH: 7.5; 25 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) el cual proporcionó la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos. Se precipitaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. El botón de células nucleadas de

## MATERIAL Y MÉTODOS

la sangre se resuspendió en tampón Fornace a una concentración estimada de  $5 \times 10^6$  células/mL, tras lo cual se añadió EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético) 0.5 M pH 8 (concentración final 10 mM), un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, concentración final 1%) para romper las membranas celulares; y proteinasa K (Boehringer Mannheim, concentración final 50 µg/mL) para degradar las proteínas. La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas.

Tras la incubación, se procedió a la extracción y purificación del ADN tratándolo con una mezcla de fenol tamponado a pH 8 (para prevenir que el ADN fuera “atrapado” en la fase intermedia: entre la fase acuosa y la orgánica) y de CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1).

Tras una centrifugación a 580 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se recuperó la fase acuosa sobrenadante conteniendo el ADN en solución, y se añadió un volumen igual de CIAA con el fin de retirar restos proteicos y fenol y, tras mezclarlos hasta su homogeneización, se sometió a una nueva centrifugación en condiciones idénticas, recuperando nuevamente la fase acuosa. Posteriormente, la fase acuosa se transfirió a tubos Corex® estériles y el ADN de ésta solución final se precipitó mediante la adición de 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C). El ADN se transfirió a un eppendorf, se lavó con etanol al 70% con una breve centrifugación a 16,000 rpm, y se dejó evaporar el etanol residual, para resuspender finalmente el ADN en 100 µl de agua bidestilada (ddH<sub>2</sub>O) estéril.

La concentración y el grado de contaminación proteica del ADN así obtenido se calculó tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente, en un espectrofotómetro automático de ADN/ARN (GeneQuant, Pharmacia) por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de ADN/ml} = (\text{D.O.260}) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)$$

Nota: 50 es un factor de corrección introducido ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de absorbancia que tienen 50 µg de ADN/ml.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El cociente D.O.260/D.O.280 se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2.0. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del ADN. Valores superiores parecen indicar un exceso de ARN, el cual se eliminó tratando la solución de ADN con ARNasa y purificando nuevamente.

La muestra de ADN con una concentración aproximada entre 1,000 y 1,500 µg/ml se almacenó en tubos eppendorf a -20 °C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como su posible contaminación por microorganismos.

Algunas de las muestras extraídas, contaron con una concentración muy baja de ADN y por tanto fue necesario realizar una amplificación del ADN genómico con el Illustra™ GenomiPhi V2 ADN Amplication Kit (GE Healthcare, Amersham Biosciences).

### **3.- ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN GENES REPARADORES DEL ADN (XRCC1, APEX1, XPD, ERCC1, XRCC3)**

En el estudio de los polimorfismos de los genes reparadores del ADN hemos realizado la discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman.

En la PCR con sondas Taqman los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado.

Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR con sondas Taqman incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR con sondas Taqman pueden ser de dos tipos: agentes

intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Para la discriminación alélica nosotros hemos empleado sondas específicas marcadas con fluorocromos: Un donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (*quencher*) o apantallador en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En todos nuestros ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM.

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, en ese momento, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Figura 15).

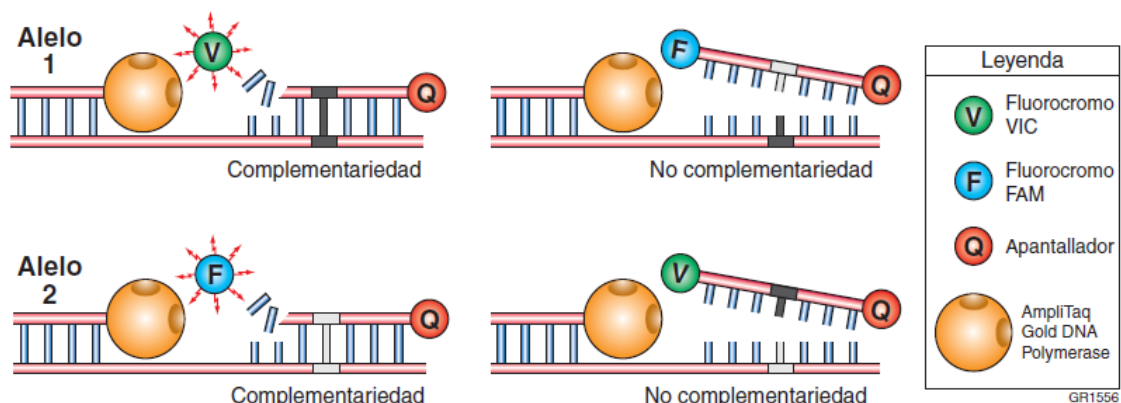


Figura 15: Mecanismo de discriminación alélica mediante sondas Taqman empleando fluorocromos VIC y FAM. Figura tomada de la Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System.

El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Si sólo se observa fluorescencia para el fluorocromo VIC implica una homocigosidad para el alelo 1; del mismo modo, si sólo se observa fluorescencia para el fluorocromo FAM implica una homocigosidad para el alelo 2; si ambas señales son fluorescentes significa que existe heterocigosidad.

Nuestro estudio se realizó en un termociclador de Applied Biosystems que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados.

Las gráficas de puntos resultantes permiten la discriminación alélica en cada uno de los pacientes para el polimorfismo estudiado (Figura 16).

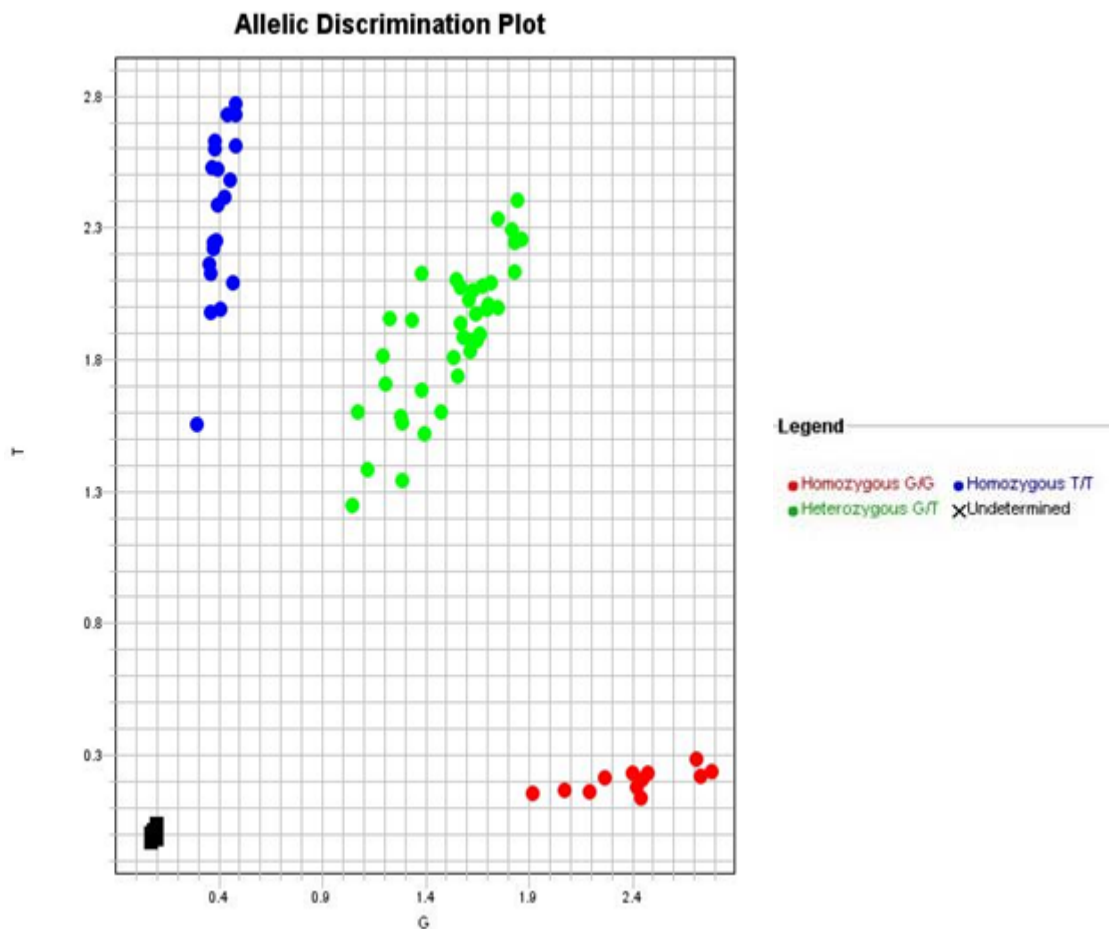


Figura 16: Gráfico de discriminación alélica en el que cada nube de puntos representa a un genotipo: los dos tipos de homocigotos en los extremos y los heterocigotos en el centro. Los cuadrados negros se corresponden con los controles negativos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En las siguientes tablas se describe el volumen y los componentes de la reacción de PCR (Tabla 2), las sondas utilizadas (Tabla 3) y el mecanismo de reparación implicado (Tabla 4).

Tabla 2: Componentes de la reacción de PCR a tiempo real y las cantidades a añadir de cada uno de ellos

Reactivos	Cantidades (10 µL)
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> Genotyping Master Mix	5µL
Sonda+oligonucleótidos de Applied	0,25 µL
ddH <sub>2</sub> O	4,25 µL
ADN	0,5 µL

Tabla 3: Identificador y secuencia de las sondas utilizadas

GEN	Identificador	Secuencia de contexto ([VIC/FAM])
<b>XRCC1</b>	C_622564_10	GGGTTGGCGTGTGAGGCCTTACCTC[C/T]GGGAGGGCAGCCGCCGACGCATGCG
<b>APEX1</b>	C_8921503_10	AATTCTGTTTCATTTCTATAGGCGA[G/T]GAGGAGCATGATCAGGAAGGCCGGG
<b>XPB/ERCC2</b>	C_3145033_10	TGCTGAGCAATCTGCTCTATCCTCT[G/T]CAGCGTCTCCTCTGATTCTAGCTGC
<b>ERCC1</b>	C_2532959_10	TTACGTCGCCAAATCCAGGGCAC[A/G]TTGCGCACGAACTTCAGTACGGGAT
<b>XRCC3</b>	C_8901525_10	GAAGGCACTGCTCAGCTCACGCAGC[A/G]TGGCCCCAGGGACTGCAGATGCCT

Tabla 4: Mecanismo de reparación implicado, rs, función y cambio de aminoácido en función de los diferentes polimorfismos estudiados

GEN	Mecanismo de reparación	rs	Función	Aminoácido
<b>XRCC1</b>	Escisión de bases	25487	Missense	Arg399Gln
<b>APEX1</b>	Escisión de bases	1130409	Missense	Asp148Glu
<b>XPB/ERCC2</b>	Escisión de nucleótidos	13181	Missense	Lys751Gln
<b>ERCC1</b>	Escisión de nucleótidos	11615	Synonymus	Asn118Asn
<b>XRCC3</b>	Recombinación homóloga	861539	Missense	Thr241Met

### **4.- ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL CODON 72 DEL GEN P53 (rs1042522)**

En el exón 4 del gen P53 existe un polimorfismo ampliamente estudiado que consiste en el cambio de una Citosina (C) por una Guanina (G) que a su vez produce un cambio de Prolina (Pro) por Arginina (Arg) en el codón 72 de la proteína.

El análisis de este polimorfismo se realizó mediante amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de un fragmento de 291 pb del exón 4 y posterior digestión con endonucleasa de restricción.

Las endonucleasas de restricción reconocen secuencias específicas en el ADN y lo escinden en ese punto. El estudio de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP) es una técnica que permite discriminar distintos alelos de un gen analizando el tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del ADN.

#### **4.1 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR**

Las muestras de ADN obtenidas fueron amplificadas por PCR dando lugar a un fragmento de 291 pb.

Las reacciones de amplificación se realizaron con el producto comercial PCR Master Mix (Promega) (ADN Taq polimerasa; dATP, dGTP, dCTP, dTTP; MgCl<sub>2</sub>). Se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL: 12.5 µL de Master Mix, 10.5 µL de agua libre de nucleasas; 0.5 µL de cada oligo cebador (sentido=forward y anti-sentido=reverse) y 1 µL de ADN obtenido por el método anteriormente descrito (concentración 0.1-0.2 µg/mL).

Como control negativo, para asegurar que no existía contaminación y que las reacciones eran específicas para cada muestra de partida, se preparó un tubo de reacción con todos los componentes antes citados excepto el ADN molde.

Para amplificar el codón 72 del gen P53 se utilizó el programa especificado en la siguiente tabla (Tabla 5).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 5: Programa utilizado para la amplificación por PCR del codón 72 del gen P53.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	5 min.	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	35
Anillamiento	58°C	30 seg.	
Extensión	72°C	30 seg.	
Extensión final	72°C	10 min.	1

La secuencia de oligonucleótidos utilizada para la amplificación se describe en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 6: Secuencia de los oligonucleótidos forward y reverse en dirección (5'-3') utilizados para la amplificación del codón 72 del gen p53.

	Secuencia de los oligonucleótidos (5'-3')
p53 Codón 72 <i>forward</i>	5'-TCTACAGTCCCCCTTGCCGT-3'
p53 Codón 72 <i>reverse</i>	5'-CTGACCGTGCAAGTCACAGA-3'

Para excluir contaminación cruzada, todos los experimentos fueron realizados en ambientes especialmente diseñados para PCR y siempre incluyendo controles negativos. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático.

### 4.2 Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 2% (Gibco-BRL) preparado con tampón TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0 mM pH=8.3). El primer pocillo del gel se reservó para separar, en paralelo con las muestras a estudiar, un marcador de tamaño correspondiente con el ADN del fago  $\Phi$ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII. Este marcador de tamaño genera

## MATERIAL Y MÉTODOS

fragmentos de 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072 kb.

La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 120 voltios durante 30 minutos.

Para monitorizar la migración del ADN en el gel, utilizamos dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga: el xileno cianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 5 kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5 kb.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando SYBR® Safe ADN Gel Stain (1:10000, Invitrogen), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del ADN emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254 nm). Los resultados obtenidos fueron almacenados mediante un sistema de fotografía digital (Kodak DC40) acoplado a un programa informático de tratamiento de imágenes (Kodak Digital Science 1D).

### 4.3 Digestión con endonucleasa

El producto de PCR se digirió con la enzima de restricción BstUI (Bsh1236I, Fermentas) que reconoce el sitio de corte generado en la secuencia por el cambio de Citosina por Guanina (Figura 17).

Para llevar a cabo la digestión, se mezclaron 12 µL del producto de PCR con 10 unidades de la enzima de restricción (1 µL) y 2 µL de su tampón correspondiente. Todo ello se incubó durante 4-6 horas a 37°C.

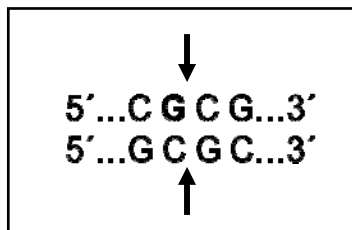


Figura 17: Sitio de reconocimiento de la enzima BstUI en la secuencia del exón 4 amplificada para el estudio del polimorfismo del codón 72. Cuando la Guanina es sustituida por Citosina desaparece el punto de corte.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los fragmentos generados tras la digestión se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3%, generando tres patrones de bandas diferentes correspondientes a los tres genotipos posibles (Figura 18):

- Genotipo C/C (Homocigoto Prolina): un fragmento de 291 pb.
- Genotipo G/G (Homocigoto Arginina): un fragmento de 165 pb y otro de 126 pb.
- Genotipo C/G (Heterocigoto Arginina/Prolina): un fragmento de 291 pb, otro de 165 pb y otro de 126 pb.

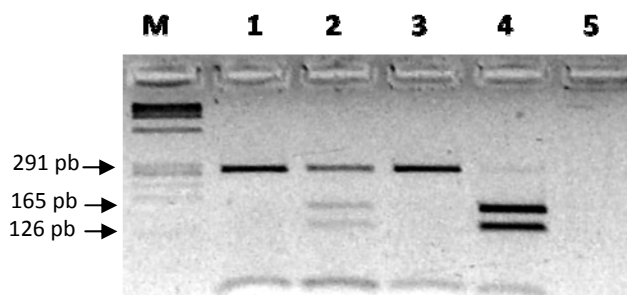


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los fragmentos amplificados por PCR para el estudio del polimorfismo del codón 72 donde se observan los tres genotipos posibles: los pacientes 1 y 3 son homocigotos para el alelo Prolina, el paciente 4 es homocigoto para el alelo Arginina y el paciente 2 es heterocigoto. 5: Control negativo. M: Marcador.

## 5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo para conocer las características de los sujetos a estudio en lo referente a su edad, sexo, características tumorales, hábitos tóxicos (consumo de tabaco y alcohol), antecedentes oncológicos (tanto familiares como personales), el lugar de procedencia (medio rural o urbano), estado civil, tratamiento realizado o si sufrieron o no recaída. Para las variables cuantitativas se calcularon la mediana y la desviación típica. En el caso de las variables categóricas nominales y ordinales se calculó la proporción de pacientes en cada categoría.

Para poder realizar el análisis de asociación previamente es necesario comprobar que se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg. El principio de

## MATERIAL Y MÉTODOS

equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones normales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar un determinado genotipo depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo<sup>(185)</sup>.

El método más sencillo para comprobar la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg se basa en el test de chi-cuadrado, que compara las frecuencias observadas con las esperadas. Si el test no es estadísticamente significativo implica que no se puede rechazar la hipótesis nula (frecuencias observadas=frecuencias esperadas) y, por lo tanto, se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Si se observara una desviación del equilibrio se debería revisar el método de genotipificación ya que se pueden producir sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otros.

En la muestra de casos es posible que no se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg, pudiendo indicar una asociación del polimorfismo con la enfermedad.

Para valorar si existía asociación entre alguno de los genotipos estudiados y los diferentes grupos de comparación (casos controles, pacientes mayores y menores de 50 años, pacientes con y sin respuesta completa, mayor o menor toxicidad) se realizaron **tablas de contingencia** 3x2 conteniendo las frecuencias de cada uno de los 3 genotipos en los grupos de comparación. De este modo, se comparan los valores observados de cada genotipo con los valores esperados asumiendo que ambos grupos tienen frecuencias genotípicas idénticas. La existencia de diferencias en las frecuencias genotípicas entre ambos grupos puede indicar la asociación de un genotipo determinado con uno de los grupos. Para determinar si las diferencias en la distribución genotípica entre los dos grupos eran estadísticamente significativas, y no se debía simplemente al azar, se realizó la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

Para poder conocer la magnitud del riesgo que cada genotipo aporta al desarrollo de la enfermedad según los diferentes modelos de herencia (ver más

## MATERIAL Y MÉTODOS

adelante), se realizó un modelo de **regresión logística** binaria que nos aporta el Odds Ratio (OR) y su intervalo de confianza del 95% de cada genotipo ( o suma de genotipos) respecto al de referencia. Además, el análisis de regresión logística nos permite ajustar el modelo de riesgo de desarrollar la enfermedad (en nuestro caso por el consumo de tabaco).

Para la obtención de los OR en el caso de que la muestra a estudio fuera demasiado pequeña (estudio predictivo de respuesta) se prefirió utilizar tablas de contingencia de 2x2, para así poder calcular si las diferencias entre genotipos eran estadísticamente significativas mediante el test exacto de Fisher.

Para la realización del **análisis de supervivencia** se tuvo en cuenta que uno de los factores pronósticos más importantes es el estadio de la enfermedad al diagnóstico. Por este motivo se definieron dos grupos de pacientes bien diferenciados: 1) pacientes con enfermedad local al diagnóstico (estadios I y II), y 2) pacientes con enfermedad localmente avanzada (estadios III y IV no metastásicos). Se estudió la supervivencia libre de enfermedad (SLE), definida como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la primera recaída de la enfermedad (bien localmente o a distancia). Se censuraron aquellos pacientes que no habían sufrido recaída a los 120 meses (10 años) de seguimiento o en la fecha de la última visita recogida en la historia.

Mediante el **método de Kaplan-Meier** se obtuvieron las medianas de supervivencia libre de enfermedad con sus correspondientes IC del 95%, así como las diferentes curvas de supervivencia, tanto a nivel global como para los distintos genotipos. Para valorar si las diferencias observadas entre los diferentes genotipos eran estadísticamente significativas se realizó el test de log-rank.

Se utilizó un modelo de **regresión de Cox**, siguiendo los modelos de herencia (explicados más adelante), para poder calcular la magnitud del riesgo de recaída que aporta cada genotipo respecto al genotipo de referencia , mediante los hazard ratio (HR) y sus intervalos de confianza del 95% (IC 95%).

En los intervalos de confianza del 95%, tanto de los OR como de los HR, aquellos IC que no contienen el 1 indican que el resultado es estadísticamente significativo, es decir, que ese genotipo aumenta (OR o HR >1) o disminuye (OR o



HR<1), de una manera significativa, el riesgo de padecer la enfermedad o de recaída respecto al genotipo de referencia.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS, versión 17.0 (SPSS Inc, Chicago IL, Estados Unidos). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor asociado a la prueba estadística era menor a 0,05.

Para establecer los **modelos de herencia** consideramos que el alelo variante de cada polimorfismo modifica el riesgo para padecer la enfermedad. Ya que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias de dicho alelo variante.

Los principales modelos de herencia son<sup>(185)</sup>:

**Modelo codominante:** Es el más general; cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente. Se comparan heterocigotos y homocigotos variantes por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente.

**Modelo dominante:** Supone que una única copia del alelo variante es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos y homocigotos variantes tienen el mismo riesgo. Se puede comparar la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos del alelo más frecuente.

**Modelo recesivo:** Supone que son necesarias 2 copias del alelo variante para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos y homocigotos del alelo más frecuente tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante.

**Modelo aditivo:** Supone que cada copia del alelo variante modifica el riesgo en una cantidad aditiva; por tanto, los homocigotos variantes tienen el doble de riesgo que los heterocigotos. Se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos y peso 2 a los homocigotos variantes.

# RESULTADOS

## 1.-DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS

Estudiamos un total de 185 casos de cáncer de cabeza y cuello, con una mediana de edad de 62 años y una desviación típica de 10,88.

En el momento del diagnóstico, el paciente más joven tenía 37 años, y el de mayor edad 87.

El género mayoritario fue el masculino, con 169 varones (91,4%) diagnosticados de cáncer de cabeza y cuello, frente a 16 mujeres (8,6%).

### 1.1 Características tumorales

En la tabla 7 se describen las características de los tumores de nuestra muestra.

La mayoría de los tumores se encontraban localizados en la laringe (60%), con un 24,3% en faringe y un 15,7% en cavidad oral.

En el momento del diagnóstico un 43,3% presentaba tumores localizados (estadios I y II), el 53% localmente avanzados (estadios III y IV no metastásicos), el 1% metástasis al diagnóstico (2 pacientes) y un 2,7% in situ.

Como se describe en el apartado anterior (material y métodos) se seleccionaron los pacientes con histología escamosa o epidermoide, incluyendo 14 (7,6%) pacientes con carcinoma de células escamosas basaloide (variante agresiva, de alto grado) y 5 (2,7%) carcinomas verrucosos (variante del carcinoma de células escamosas bien diferenciado).

En cuanto a la diferenciación tumoral un 25,4% eran tumores bien diferenciados, el 32,5% moderadamente y un 25,9% pobremente diferenciados. En 25 pacientes no se conocía el grado tumoral y en los 5 in situ no se describía grado.

## RESULTADOS

Tabla 7: Distribución de las diferentes características tumorales en lo referente a localización, estadio, histología y diferenciación tumoral

Características tumorales		Pacientes	
		N=185	Porcentaje
Localización	Laringe	111	60,0%
	Faringe	45	24,3%
	Cavidad oral	29	15,7%
Estadio	In situ	5	2,7%
	I	49	26,5%
	II	31	16,8%
	III	34	18,4%
	IV	66	35,6%
Histología	Epidermoide	166	89,7%
	Basaloide	14	7,6%
	Verrucoso	5	2,7%
Diferenciación tumoral (Grado)	In situ	5	2,7%
	Buena (1)	47	25,4%
	Moderada (2)	60	32,5%
	Pobre (3)	48	25,9%
	No conocido	25	13,5%

### 1.2 Hábitos tóxicos

Los datos referentes al hábito tabáquico se resumen en las tablas 8 y 9; y los referentes al hábito enólico en la tabla 10.

En el momento del diagnóstico fumaban un 63,2% de los pacientes, el 25,4% eran exfumadores (abandono del hábito tabáquico al menos un año antes del diagnóstico) y nunca había fumado el 11,4%.

Tabla 8: Consumo de tabaco de los pacientes con CCC incluidos en el estudio

Hábito tabáquico	Pacientes	
	N=185	Porcentaje
Fumador	117	63,2%
Exfumador	47	25,4%
No fumador	21	11,4%

## RESULTADOS

Dependiendo de la cantidad de cigarrillos consumidos al día se puede agrupar a los pacientes en varias categorías (ver tabla 9).

Tabla 9: Cantidad de tabaco consumido diariamente (nºcigarrillos/día)

Cantidad de cigarrillos/día	Pacientes	
	N=185	Porcentaje
No fumador	21	11,4%
≤10	7	3,8%
11-20	57	30,8%
21-40	72	38,9%
>40	18	9,7%
No conocido	10	5,4%

En función de las unidades básicas de etanol (UBE) consumidas al día se agrupan en diferentes categorías (ver tabla 10).

Tabla 10: Cantidad de alcohol consumido diariamente (UBE/día)

Cantidad de UBE/día	Pacientes	
	N=185	Porcentaje
≤5	59	31,9%
≤8	36	19,5%
8-10	38	20,5%
>10	50	27,0%
No conocido	2	1,1%

### 1.3 Antecedentes oncológicos familiares

Dentro de los pacientes con antecedentes familiares de neoplasia, 20 de ellos (10,8% del total) se correspondían con tumores en la esfera ORL.

Tabla 11: Frecuencia y porcentaje, de los pacientes estudiados, con antecedentes oncológicos familiares

Antecedentes oncológicos	Pacientes	
	N=185	Porcentaje
Sí	84	45,4%
No	99	53,5%
No conocidos	2	1,1%

## RESULTADOS

### 1.4 Antecedentes oncológicos personales

Con antecedentes oncológicos personales nos referimos a los pacientes que presentaban otra neoplasia además de su tumor ORL.

Tabla 12: Frecuencia y porcentaje, de los pacientes estudiados, con antecedentes oncológicos personales

Antecedentes oncológicos	Pacientes	
	N=185	Porcentaje
Sí	31	16,8%
No	154	83,2%

### 1.5 Lugar de procedencia

En función del lugar de procedencia de los pacientes se pueden dividir en aquellos procedentes del medio rural (pueblos de provincia) o urbano (capitales de provincia).

Tabla 13: Frecuencia y porcentaje de pacientes en función de su lugar de procedencia

Lugar de procedencia	Pacientes	
	N=185	Porcentaje
Rural	102	55,1%
Urbano	83	44,9%

### 1.6 Estado civil

En el momento del diagnóstico la mayoría de los pacientes estaban casados (67,6%).

Tabla 14: Frecuencia y porcentaje de pacientes en función de su estado civil en el momento del diagnóstico

Estado civil	Pacientes	
	N=185	Porcentaje
Casados	125	67,6%
Divorciado	7	3,8%
Soltero	23	12,4%
Viudo	13	7,0%
No conocido	17	9,2%

## RESULTADOS

### 1.7 Tratamiento realizado

Los pacientes recibieron diferentes regímenes de tratamiento según sus características tumorales individuales. Tres personas fueron tratadas en otro centro, no conociendo el tratamiento realizado, uno de ellos tratado en Salamanca a la recaída de la enfermedad.

Tabla 15: Tipos de tratamientos realizados tras el diagnóstico del primer tumor de CCC

Tratamiento realizado	Pacientes	
	N=185	Porcentaje
Cirugía	93	50,3%
QT inducción	44	23,8%
RT adyuvante	29	15,7%
QT+RT	10	5,4%
RT	4	2,1%
QT paliativa	2	1,1%
No conocido	3	1,6%

Los esquemas de QT de inducción administrados se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 16: Esquemas de tratamiento de quimioterapia de inducción administrados

QT inducción	Pacientes	
	N=44	Porcentaje
Cisplatino+5-FU x 4 ciclos	26	59,1%
Cisplatino+5-FU x 3 ciclos*	4	9,1%
Cisplatino+5-FU+LV x 4 ciclos	4	9,1%
TPF x 3-ciclos	7	15,9%
NeoTPF x 4ciclos	2	4,5%
Cisplatino+Docetaxel x 4 ciclos	1	2,3%

- Cisplatino+5-FU: Cisplatino 25mg/m<sup>2</sup> + 5-Fluorouracilo 1000mg/m<sup>2</sup> IV días 1 a 4 cada 3 semanas
- \*Un paciente Cisplatino 1000mg/m<sup>2</sup> día 1 + 5-Fluorouracilo 1000mg/m<sup>2</sup> IV días 1 a 5 cada 3 semanas
- Cisplatino+5-FU+LV: Cisplatino 25mg/m<sup>2</sup> + 5-Fluorouracilo 1000mg/m<sup>2</sup>IV + Leucovorín 250mg/m<sup>2</sup> días 1 a 4 cada 3 semanas
- TPF: Taxotere 75mg/m<sup>2</sup> día 1 + Cisplatino 75mg/m<sup>2</sup> día 1 + 5-Fluorouracilo 750 mg/m<sup>2</sup> IV días 1 a 5 cada 3 semanas
- NeoTPF: Taxotere 75mg/m<sup>2</sup> día 1 + Cisplatino 75mg/m<sup>2</sup> día 1 + 5-Fluorouracilo 750 mg/m<sup>2</sup> IV días 1 a 5 cada 3 semanas + Cetuximab 250mg/m<sup>2</sup> semanal (dosis de carga Cetiximab 400 mg/m<sup>2</sup>)
- Cisplatino 40mg/m<sup>2</sup> días 1 y 2 + Docetaxel 85mg/m<sup>2</sup> IV día 1 cada 3 semanas

## RESULTADOS

Entre los pacientes programados para tratamiento con QT de inducción bajo el esquema Cisplatino + 5-FU x 4 ciclos uno de ellos recibió solamente 2 ciclos de Cisplatino + 5-FU por falta de respuesta y otro solamente un ciclo por toxicidad renal importante (fracaso renal).

### 1.8 Recaída de la enfermedad

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de pacientes que tuvieron una recaída de la enfermedad, bien localmente o a distancia. Entre los no conocidos se encuentran dos pacientes que padecían otros tumores distintos, no sabiendo cuál era el tumor de origen de las metástasis y otros dos que fueron tratados en otros centros hospitalarios tras el diagnóstico.

Tabla 17: Frecuencia y porcentaje de pacientes que sufrieron recaída de la enfermedad, bien de manera local o a distancia

Recaída	Pacientes	
	N=185	Porcentaje
No	109	58,9%
Locorreginal	65	35,1%
A distancia	7	3,8%
No conocido	4	2,2%

De los pacientes que presentaron recidiva locorregional un 47,7% presentaron dos o más recidivas.

Tabla 18: Frecuencia y porcentaje de pacientes que sufrieron una o más recidivas de la enfermedad, a nivel locorregional

Recaída	Pacientes	
	N=65	Porcentaje
Una	34	52,3%
Dos o más	31	47,7%

## RESULTADOS

### 2.- DESCRIPCIÓN DE LOS CONTROLES

Se estudiaron un total de 149 controles hospitalarios, todos ellos varones, con una mediana de edad de 76 años y una desviación típica de 6,11. El control de menor edad tenía 65 años, y el de mayor edad 98.

#### 2.1 Hábitos tóxicos

Los datos referentes al consumo de tabaco de los controles se recogen en la siguiente tabla (tabla 20).

Tabla 19: Cantidad de tabaco consumido diariamente (número de cigarrillos/día)

Cantidad de cigarrillos/día	Pacientes	
	N=149	Porcentaje
≤10	1	0,7%
11-20	88	59,1%
21-40	47	31,5%
>40	13	8,7%

#### 2.2 Antecedentes familiares

Casi un 40% de los controles tenía antecedentes oncológicos familiares; siendo una cifra similar al porcentaje de casos (45,4%).

Tabla 20: Frecuencia y porcentaje de controles con antecedentes oncológicos familiares

Antecedentes oncológicos	Pacientes	
	N=149	Porcentaje
Sí	58	38,9%
No	91	61,1%

#### 2.3 Lugar de procedencia

La mayoría de los controles procedían del medio rural (64,4%).

Tabla 21: Frecuencia y porcentaje de los controles en función de su lugar de procedencia

Lugar de procedencia	Pacientes	
	N=149	Porcentaje
Rural	96	64,4%
Urbano	53	35,6%



## RESULTADOS

### 3. Polimorfismos en casos y controles para valorar su posible implicación en el riesgo de padecer la enfermedad (marcadores de riesgo).

Previamente a la realización del análisis de asociación se comprobó que se cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg (ver material y métodos).

En la nuestro estudio, se cumple el equilibrio tanto en los casos como en los controles.

Tabla 22: Frecuencias y porcentajes de los diferentes genotipos en casos y controles. Se comprueba que existe equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ )

Polimorfismos y genotipo		Casos		p-valor	Controles		p-valor
		N=185	Porcentaje		N=149	Porcentaje	
<b>XRCC1 Arg399Gln</b>	GG	73	39,4%	0,354	63	42,3%	0,307
	GA	91	49,2%		72	48,3%	
	AA	21	11,4%		14	9,4%	
<b>APEX Asp148Glu</b>	TT	59	31,9%	0,105	41	27,5%	0,316
	TG	81	43,8%		80	53,7%	
	GG	45	24,3%		28	18,8%	
<b>XPB Lys751Gln</b>	AA	78	42,2%	0,795	63	42,3%	0,439
	AC	83	44,8%		71	47,7%	
	CC	24	13,0%		15	10,0%	
<b>ERCC1 Asn118Asn</b>	TT	69	37,3%	0,437	59	39,6%	0,909
	TC	92	49,7%		69	46,3%	
	CC	24	13,0%		21	14,1%	
<b>XRCC3 Thr241Met</b>	CC	78	42,2%	0,065	61	40,9%	0,591
	CT	75	40,5%		71	47,7%	
	TT	32	17,3%		17	11,4%	
<b>p53 Arg72Pro</b>	GG	109	58,9%	0,223	90	60,4%	0,883
	GC	62	33,5%		52	34,9%	
	CC	14	7,6%		7	4,7%	

## RESULTADOS

Para evitar el posible efecto que pudiera tener el género en el desarrollo de la enfermedad se excluyeron a las mujeres del análisis, quedando un total de 169 varones casos frente a 149 varones controles.

En la siguiente tabla de contingencia de 3X2 se presenta la frecuencia y porcentaje de los polimorfismos analizados, en el grupo de casos y de controles de nuestra muestra, para valorar la distribución de los diferentes genotipos en cada grupo. Se realizó el test de chi-cuadrado para la obtención del p-valor.

Tabla 23: Distribución de los polimorfismos estudiados en casos y controles

Polimorfismo y genotipo		Casos		Controles		p-valor
		N=169	Porcentaje	N=149	Porcentaje	
<b>XRCC1 Arg399Gln</b>	GG	67	39,6%	63	42,3%	0,890
	GA	85	50,3%	72	48,3%	
	AA	17	10,1%	14	9,4%	
<b>APEX Asp148Glu</b>	TT	52	30,8%	41	27,5%	0,140
	TG	73	43,2%	80	53,7%	
	GG	44	26,0%	28	18,8%	
<b>XPB Lys751Gln</b>	AA	70	41,4%	63	42,3%	0,616
	AC	76	45,0%	71	47,7%	
	CC	23	13,6%	15	10,1%	
<b>ERCC1 Asn118Asn</b>	TT	63	37,3%	59	39,6%	0,832
	TC	84	49,7%	69	46,3%	
	CC	22	13,0%	21	14,1%	
<b>XRCC3 Thr241Met</b>	CC	71	42,0%	61	40,9%	0,411
	CT	71	42,0%	71	47,7%	
	TT	27	16,0%	17	11,4%	
<b>p53 Arg72Pro</b>	GG	99	58,6%	90	60,4%	0,547
	GC	57	33,7%	52	34,9%	
	CC	13	7,7%	7	4,7%	

## RESULTADOS

Teniendo en cuenta que uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la enfermedad es el consumo de tabaco se realizó un análisis de regresión logística ajustado por consumo de tabaco (fumadores de menos o igual de un paquete al día o de más de un paquete al día).

En las siguientes tablas se muestran las frecuencias y porcentajes de los diferentes genotipos y la fuerza de asociación con el riesgo de desarrollar la enfermedad en función del genotipo de referencia en cada caso, teniendo en cuenta distintos modelos de herencia (ver material y métodos). Se realizó un modelo de regresión logística para el cálculo de los OR con sus IC y el p-valor.

Tabla 24: Distribución de los diferentes genotipos y su asociación con el riesgo de CCC (**modelo codominante**). Riesgo que aporta cada genotipo respecto al de referencia (homocigoto común)

Genotipo	Casos		Controles		OR <sup>1</sup> (95%IC)	p-valor
	N=169	Porcentaje	N=149	Porcentaje		
<b>XRCC1 Arg399Gln (rs25487)</b>						
GG	67	39,6%	63	42,3%	Ref.	
GA	85	50,3%	72	48,3%	1,24(0,77-2,01)	0,377
AA	17	10,1%	14	9,4%	1,30(0,58-2,90)	0,515
<b>APEX Asp148Glu (rs1130409)</b>						
TT	52	30,8%	41	27,5%	Ref.	
TG	73	43,2%	80	53,7%	0,74(0,43-1,25)	0,263
GG	44	26,0%	28	18,8%	1,21(0,64-2,31)	0,552

<sup>1</sup>Odds ratios ajustadas por consumo de tabaco

## RESULTADOS

Tabla 24 (continuación): Distribución de los diferentes genotipos y su asociación con el riesgo de CCC (**modelo codominante**). Riesgo que aporta cada genotipo respecto al de referencia (homocigoto común)

Genotipo	Casos		Controles		OR <sup>1</sup> (95%CI)	p-valor
	N=169	Porcentaje	N=149	Porcentaje		
<b>XPD Lys751Gln (rs13181)</b>						
AA	70	41,4%	63	42,3%	Ref.	
AC	76	45,0%	71	47,6%	1,08(0,67-1,76)	0,740
CC	23	13,6%	15	10,1%	1,50(0,70-3,20)	0,297
<b>ERCC1 Asn118Asn (rs11615)</b>						
TT	63	37,3%	59	39,6%	Ref.	
TC	84	49,7%	69	46,3%	1,07(0,66-1,75)	0,770
CC	22	13,0%	21	14,1%	0,92(0,45-1,89)	0,823
<b>XRCC3 Thr241Met (rs861539)</b>						
CC	71	42,0%	61	40,9%	Ref.	
CT	71	42,0%	71	47,7%	0,92(0,56-1,50)	0,746
TT	27	16,0%	17	11,4%	1,52(0,75-3,08)	0,249
<b>p53 Arg72Pro (rs1042522)</b>						
GG	99	58,6%	90	60,4%	Ref.	
GC	57	33,7%	52	34,9%	0,96(0,59-1,56)	0,863
CC	13	7,7%	7	4,7%	1,84(0,69-4,87)	0,220

<sup>1</sup>Odds ratios ajustadas por consumo de tabaco

## RESULTADOS

Tabla 25: Distribución de los diferentes genotipos y su asociación con el riesgo de CCC (**modelo dominante**). Riesgo que aporta el genotipo heterocigoto junto el homocigoto variante respecto al de referencia (homocigoto común)

Genotipo	Casos		Controles		OR <sup>1</sup> (95%CI)	p-valor
	N=169	Porcentaje	N=149	Porcentaje		
<b>XRCC1 Arg399Gln (rs25487)</b>						
GG	67	39.6%	63	42.3%	Ref.	
GA+AA	102	60.4%	86	57.7%	1,25(0,79-1,99)	0,341
<b>APEX Asp148Glu (rs1130409)</b>						
TT	52	30.8%	41	27.5%	Ref.	
TG/GG	117	69.2%	108	72.5%	0,86(0,52-1,42)	0,564
<b>XPD Lys751Gln (rs13181)</b>						
AA	70	41.4%	63	42.3%	Ref.	
AC+CC	99	58.6%	86	57.7%	1,15(0,73-1,83)	0,539
<b>ERCC1 Asn118Asn (rs11615)</b>						
TT	63	37.3%	59	39.6%	Ref.	
TC+CC	106	62.7%	90	60.4%	1,04(0,65-1,65)	0,869
<b>XRCC3 Thr241Met (rs861539)</b>						
CC	71	42.0%	61	40.9%	Ref.	
CT+TT	98	58.0%	88	59.1%	1,04(0,65-1,64)	0,875
<b>p53 Arg72Pro (rs1042522)</b>						
GG	99	58,6%	90	60,4%	Ref.	
GC+CC	70	41,4%	59	39,6%	1,06(0,67-1,68)	0,800

<sup>1</sup>Odds ratios ajustadas por consumo de tabaco.

## RESULTADOS

Tabla 26: Distribución de los diferentes genotipos y su asociación con el riesgo de CCC (**modelo recesivo**). Riesgo que aporta el genotipo heterocigoto junto el homocigoto variante respecto al de referencia (homocigoto variante)

Genotipo	Casos		Controles		OR <sup>1</sup> (95%CI)	p-valor
	N=169	Porcentaje	N=149	Porcentaje		
<b>XRCC1 Arg399Gln (rs25487)</b>						
AA	17	10,1%	14	9,4%	Ref.	
GA+GG	152	89,9%	135	90,6%	0,86(0,41-1,84)	0,707
<b>APEX Asp148Glu (rs1130409)</b>						
GG	44	26,0%	28	18,8%	Ref.	
TG+TT	125	74,0%	121	81,2%	0,68(0,39-1,18)	0,172
<b>XPD Lys751Gln (rs13181)</b>						
CC	23	13,6%	15	10,1%	Ref.	
AC+AA	146	86,4%	134	89,9%	0,70(0,34-1,42)	0,323
<b>ERCC1 Asn118Asn (rs11615)</b>						
CC	22	13,0%	21	14,1%	Ref.	
TC+TT	147	87,0%	128	85,9%	1,13(0,58-2,20)	0,719
<b>XRCC3 Thr241Met (rs861539)</b>						
TT	27	16,0%	17	11,4%	Ref.	
CT+CC	142	84,0%	132	88,6%	0,63(0,33-1,22)	0,173
<b>p53 Arg72Pro (rs1042522)</b>						
CC	13	7,7%	7	4,7%	Ref.	
GC+GG	156	92,3%	142	95,3%	0,53(0,20-1,40)	0,201

<sup>1</sup>Odds ratios ajustadas por consumo de tabaco.

#### **4. Polimorfismos en casos mayores y menores o iguales a 50 años para valorar su posible implicación en el desarrollo de la enfermedad a una edad temprana (marcadores de riesgo).**

A continuación se presenta el análisis de la frecuencia de los polimorfismos descritos en relación con los diferentes grupos de edad (pacientes  $\leq 50$  y  $>50$  años).

Se realizó una tabla de contingencia de 3x2 para valorar la frecuencia de los diferentes genotipos en los pacientes mayores y menores o iguales de 50 años, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,012$ ) en el polimorfismo Arg399Gln de XRCC1 (rs25487). Se realizó el test de chi-cuadrado para la obtención del p-valor. Ver tabla 27.

Teniendo en cuenta la relación significativa en XRCC1 se realizó una comparación de los genotipos de XRCC1 entre el grupo de pacientes  $\leq 50$  años y el grupo  $>50$  años según los diferentes modelos de herencia (ver material y métodos), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa al enfrentar el genotipo variante (AA) frente a los otros dos (GG+GA); por lo tanto, se trataría de un modelo de herencia recesivo, es decir, precisa tener los dos alelos con la variante para aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad a una edad temprana.

En las tablas 28, 29 y 30 se muestran las frecuencias y porcentajes de los diferentes genotipos de XRCC1, siguiendo los modelos de herencia. Para calcular el riesgo que aporta cada genotipo o pareja de genotipos frente al de referencia, para la manifestación de la enfermedad a una edad temprana, se realizó un análisis de regresión logística para la obtención de los OR y sus IC al 95%.

Se realizaron tablas de contingencia de 2x2 para valorar posibles diferencias en la distribución por sexos ( $p=0,516$ ), consumo de tabaco ( $p=0,179$ ) o alcohol ( $p=0,982$ ) entre ambos grupos ( $>50$  y  $\leq 50$  años), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

Tabla 27: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en el total de los casos, así como en función de la edad (pacientes  $\leq 50$  y  $> 50$  años).

Genotipo		Total		$\leq 50$ años		$> 50$ años		p-valor
		N=185	Porcentaje	N=35	Porcentaje	N=150	Porcentaje	
<b>XRCC1</b> Arg 399Gln	GG	73	39,4%	11	31,4%	62	41,3%	<b>0,012</b>
	GA	91	49,2%	15	42,9%	76	50,7%	
	AA	21	11,4%	9	25,7%	12	8,0%	
<b>APEX</b> Asp148Glu	TT	59	31,9%	14	40,0%	45	30,0%	0,131
	TG	81	43,8%	17	48,6%	64	42,7%	
	GG	45	24,3%	4	11,4%	41	27,3%	
<b>XPB</b> Lys751Gln	AA	78	42,2%	10	28,6%	68	45,3%	0,183
	AC	83	44,8%	20	57,1%	63	42,0%	
	CC	24	13,0%	5	14,3%	19	12,7%	
<b>ERCC1</b> Asn118Asn	TT	69	37,3%	14	40,0%	55	36,7%	0,365
	TC	92	49,7%	19	54,3%	73	48,7%	
	CC	24	13,0%	2	5,7%	22	14,7%	
<b>XRCC3</b> Thr241Met	CC	78	42,2%	11	31,4%	67	44,7%	0,181
	CT	75	40,5%	19	54,3%	56	37,3%	
	TT	32	17,3%	5	14,3%	27	18,0%	
<b>p53</b> Arg72Pro	GG	109	58,9%	25	71,4%	84	56,0%	0,066
	GC	62	33,5%	6	17,2%	56	37,3%	
	CC	14	7,6%	4	11,4%	10	6,7%	



## RESULTADOS

Tabla 28: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función de la edad (pacientes  $\leq 50$  y  $> 50$  años). Modelo codominante.

XRCC1 Arg 399Gln	$\leq 50$ años		$> 50$ años		OR (95%CI)	p-value
	N=35	Porcentaje	N=150	Porcentaje		
GG	11	31,4%	62	41,3%	Ref.	
GA	15	42,9%	76	50,7%	1,11(0,48-2,59)	0,805
AA	9	25,7%	12	8,0%	<b>4,23(1,44-12,40)</b>	<b>0,009</b>

Tabla 29: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función de la edad (pacientes  $\leq 50$  y  $> 50$  años). Modelo dominante.

XRCC1 Arg 399Gln	$\leq 50$ años		$> 50$ años		OR (95%CI)	p-value
	N=35	Porcentaje	N=150	Porcentaje		
GG	11	31,4%	62	41,3%	Ref.	
GA+AA	24	68,6%	88	58,7%	1,53(0,70-3,37)	0,283

Tabla 30: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función de la edad (pacientes  $\leq 50$  y  $> 50$  años). Modelo recesivo.

XRCC1 Arg 399Gln	$\leq 50$ años		$> 50$ años		OR (95%CI)	p-value
	N=35	Porcentaje	N=150	Porcentaje		
GG+GA	26	74,3%	138	92,0%	Ref.	
AA	9	25,7%	12	8,0%	<b>3,98(1,52-10,40)</b>	<b>0,005</b>

Teniendo en cuenta que el consumo de tabaco es uno de los factores de riesgo mejor conocidos de la enfermedad, y siendo el factor más próximo a la significación, se decidió ajustar por consumo de tabaco, persistiendo la

## RESULTADOS

significación para el polimorfismo XRCC1 y sin apenas modificación en la magnitud de los OR.

Tabla 31: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función de la edad (pacientes ≤50 y >50años). Modelo codominante.

XRCC1 Arg 399Gln	≤50 años		>50 años		OR <sup>1</sup> (95%CI)	p-value
	N=35	Porcentaje	N=150	Porcentaje		
GG	11	31,4%	62	41,3%	Ref.	
GA	15	42,9%	76	50,7%	1,17(0,49-2,83)	0,721
AA	9	25,7%	12	8,0%	4,46(1,46-13,60)	<b>0,008</b>

<sup>1</sup>Odds ratios ajustadas por consumo de tabaco

Tabla 32: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función de la edad (pacientes ≤50 y >50años). Modelo dominante.

XRCC1 Arg 399Gln	≤50 años		>50 años		OR (95%CI)	p-value
	N=35	Porcentaje	N=150	Porcentaje		
GG	11	31,4%	62	41,3%	Ref.	
GA+AA	24	68,6%	88	58,7%	1,62(0,71-3,67)	0,249

<sup>1</sup>Odds ratios ajustadas por consumo de tabaco

Tabla 33: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función de la edad (pacientes ≤50 y >50años). Modelo recesivo.

XRCC1 Arg 399Gln	≤50 años		>50 años		OR (95%CI)	p-value
	N=35	Porcentaje	N=150	Porcentaje		
GG+GA	26	74,3%	138	92,0%	Ref.	
AA	9	25,7%	12	8,0%	<b>4,06(1,53-10,80)</b>	<b>0,005</b>

<sup>1</sup>Odds ratios ajustadas por consumo de tabaco

**5. Estudio de polimorfismos en relación con la respuesta al tratamiento (marcadores predictivos de respuesta)**

Para la valoración de la respuesta al tratamiento con quimioterapia de inducción se tuvieron en cuenta las revisiones realizadas por ORL tras cada ciclo de tratamiento quimioterápico y/o se evaluó según los criterios de evaluación de respuesta para tumores sólidos (Response Evaluation Criteria in Solid tumors RECIST) teniendo en cuenta el TAC previo al inicio del tratamiento y el realizado después del mismo.

Se consideró respuesta completa en el caso de no evidenciarse tumor tras el tratamiento, éste fue el caso de 20 pacientes. Cinco de los pacientes tratados con QT de inducción no respondieron al tratamiento o progresaron y el resto presentaron respuesta parcial.

Dos de los pacientes tratados con QT de inducción no se conoce su respuesta: uno porque fue suspendido el tratamiento tras el primer ciclo de QT por toxicidad (programado Cisplatino+5-FUx4) y otro porque no aparece registrada la respuesta hasta después del tratamiento con QT+RT (tratado con TPF) por lo que se descartaron del análisis. Por lo tanto, de los 44 pacientes tratados con QT de inducción, estudiaremos la respuesta al tratamiento en 42.

Tabla 34: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función del tipo de respuesta clínica obtenida tras el tratamiento de inducción basado en cisplatino

Genotipo		Respuesta completa		No respuesta Completa		p-valor <sup>1</sup>
		N=21	Porcentaje	N=21	Porcentaje	
<b>XRCC1</b> <b>Arg399Gln</b>	GG	8	38,1%	8	38,1%	1,000
	GA	10	47,6%	10	47,6%	
	AA	3	14,3%	3	14,3%	
<b>APEX</b> <b>Asp148Glu</b>	TT	7	33,3%	3	14,3%	0,254
	TG	10	47,6%	15	71,4%	
	GG	4	19,1%	3	14,3%	

<sup>1</sup>Test de chi cuadrado

## RESULTADOS

Tabla 34 (continuación): Distribución de los diferentes genotipos de genes reparadores del ADN estudiados, en función del tipo de respuesta clínica obtenida tras el tratamiento de inducción basado en cisplatino

Genotipo		Respuesta completa		No respuesta Completa		p-valor <sup>1</sup>
		N=21	Porcentaje	N=21	Porcentaje	
<b>XPD Lys751Gln</b>	AA	11	52,4%	10	47,6%	0,827
	AC	9	42,9%	9	42,9%	
	CC	1	4,8%	2	9,5%	
<b>ERCC1 Asn118Asn</b>	TT	7	33,3%	6	28,6%	0,572
	TC	13	61,9%	12	57,1%	
	CC	1	4,8%	3	14,3%	
<b>XRCC3 Thr241Met</b>	CC	5	23,8%	8	38,1%	<b>0,049</b>
	CT	7	33,3%	11	52,4%	
	TT	9	42,9%	2	9,5%	
<b>p53 Arg72Pro</b>	GG	13	61,9%	15	71,4%	0,762
	GC	6	28,6%	4	19,1%	
	CC	2	9,5%	2	9,5%	

Teniendo en cuenta la diferente distribución de genotipos de XRCC3 entre ambos grupos, en el límite de la significación, se decidió realizar una comparación de cada genotipo de XRCC3 frente a los otros dos genotipos mediante tablas de 2x2.

Tabla 35: Distribución de los diferentes genotipos del gen XRCC3, en función del tipo de respuesta clínica obtenida tras el tratamiento de inducción basado en cisplatino, tomando como referencia el homocigoto común

Genotipo		Respuesta Completa		No respuesta Completa		p-valor <sup>2</sup>
		N=21	Porcentaje	N=21	Porcentaje	
<b>XRCC3</b>	CC	5	23,8%	8	38,1%	0,505
	CT+TT	16	76,2%	13	61,9%	

<sup>2</sup>Test de Fisher

OR= 0,51 ( IC 95%: 0,13-1,93 )

## RESULTADOS

Tabla 36: Distribución de los diferentes genotipos del gen XRCC3, en función del tipo de respuesta clínica obtenida tras el tratamiento de inducción basado en cisplatino, tomando como referencia el heterocigoto

Genotipo		Respuesta Completa		No respuesta Completa		p-valor <sup>2</sup>
		N=21	Porcentaje	N=21	Porcentaje	
<b>XRCC3</b>	CT	7	33,3%	11	52,4%	0,350
	CC+TT	14	66,7%	10	47,6%	

<sup>2</sup>Test de Fisher

OR= 0,45 ( IC 95%: 0,13-1,58 )

Tabla 37: Distribución de los diferentes genotipos del gen XRCC3, en función del tipo de respuesta clínica obtenida tras el tratamiento de inducción basado en cisplatino, tomando como referencia el homocigoto variante

Genotipo		Respuesta Completa		No respuesta Completa		p-valor <sup>2</sup>
		N=21	Porcentaje	N=21	Porcentaje	
<b>XRCC3</b>	TT	9	42,9%	2	9,5%	<b>0,032</b>
	CC+CT	12	57,1%	19	90,5%	

<sup>2</sup>Test de Fisher

**OR= 7,1 (IC 95%: 1,31-38,77)**

Para determinar si las diferencias en la distribución genotípica eran estadísticamente significativas, se realizó el test de Fisher para las tablas de contingencia 2x2 (debido al reducido número de observados-esperados) y de Chi-cuadrado para la tabla de contingencia 3x2; se consideraron significativos los valores  $p < 0.05$ .

Solamente uno de los pacientes tratados con QT de inducción pertenecía al estadio II; se repitió el análisis sin este paciente y continúa siendo significativo para genotipo TT de XRCC3 [OR (IC95%):6,33(1,15-35,01), p-valor=0,032].

## RESULTADOS

Para comparar la distribución de las variables que podrían influir en la respuesta al tratamiento, entre el grupo de pacientes con y sin respuesta completa, se realizó una tabla de contingencia 2x2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a la edad o el sexo de los pacientes, la localización o el estadio tumoral, y el tratamiento recibido.

Tabla 38: Distribución de diferentes variables (edad, sexo, localización tumoral, estadio tumoral, tratamiento) en los grupos de pacientes con y sin respuesta completa, en los pacientes tratados con QT de inducción

<b>Características</b>		<b>Total</b> N= 42 (%)	<b>RCC</b> N= 21 (%)	<b>No RCC</b> N= 21 (%)	<b>p-valor</b> <sup>1</sup>
<b>Edad: media (SD)</b>		56,1 (10,2)	55,3 (9,1)	56,9 (11,3)	0,604 <sup>†</sup>
<b>Sexo</b>	<b>Varón</b>	40 (95,2%)	19 (90,5%)	21 (100%)	0,147
	<b>Mujer</b>	2 (4,8%)	2 (9,5%)	0	
<b>Localización tumoral</b>	<b>C. oral</b>	3 (7,1%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)	0,740
	<b>Faringe</b>	21 (50%)	10 (47,6%)	11 (52,4%)	
	<b>Laringe</b>	18 (42,9%)	10 (47,6%)	8 (38,1%)	
<b>Estadio tumoral</b>	<b>II</b>	1 (2,4%)	1 (4,8%)	0	0,202
	<b>III</b>	12 (28,6%)	8 (38,1%)	4 (19%)	
	<b>IVa-b</b>	29 (69%)	12 (57,1%)	17 (81%)	
<b>QT inducción</b>	<b>Cis+5FU</b>	33 (78,5%)	18 (85,7%)	15 (71,4%)	0,115
	<b>TPF</b>	6 (14,3%)	1 (4,8%)	5 (23,8%)	
	<b>NeoTPF</b>	2 (4,8%)	2 (9,5%)	0	
	<b>Cis+Dtx</b>	1 (2,4%)	0	1 (4,8%)	

<sup>1</sup>Test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), <sup>†</sup> t-Student

### **6. Estudio de polimorfismos en relación con la supervivencia libre de enfermedad (marcadores pronósticos)**

Teniendo en cuenta que uno de los factores pronósticos más importantes es el estadio al diagnóstico de la enfermedad, se decidió realizar el análisis de supervivencia dividiendo a los pacientes en dos grupos bien diferenciados: pacientes con enfermedad local (estadios I y II) al diagnóstico y pacientes con enfermedad localmente avanzada (estadios III y IV no metastásicos).

Para el análisis de supervivencia libre de enfermedad se excluyeron a dos pacientes a los que no se les realizó seguimiento por ser tratados en otro centro, un paciente que falleció en el postoperatorio y dos pacientes con tumores en otras localizaciones además de su tumor en el área ORL.

De este modo contamos con un total de 78 pacientes diagnosticados de enfermedad local y 95 de enfermedad localmente avanzada para la realización del análisis de supervivencia libre de enfermedad (SLE).

Se censuraron aquellos pacientes que no habían sufrido recaída a los 120 meses (diez años) de seguimiento o en la última visita recogida en la historia.

A continuación se muestran las tablas con las mediasnas de SLE, los HR y sus correspondientes IC y p-valor, y las curvas de SLE; calculados mediante el método de KM y regresión de Cox, siguiendo los diferentes modelos de herencia, para los pacientes con enfermedad local y localmente avanzada al diagnóstico.

#### **6.1 Enfermedad local**

La mediana de seguimiento de los pacientes con enfermedad local fue de 60 meses. De los 78 pacientes con enfermedad localizada al diagnóstico, se produjo una recaída de la enfermedad en un total de 32 pacientes, de los cuales, 30 recayeron dentro de los 5 primeros años (60 meses) tras el diagnóstico. La mediana de SLE estimada para este grupo de pacientes es de 120 meses con un IC95%= 32,3-207,6.

## RESULTADOS

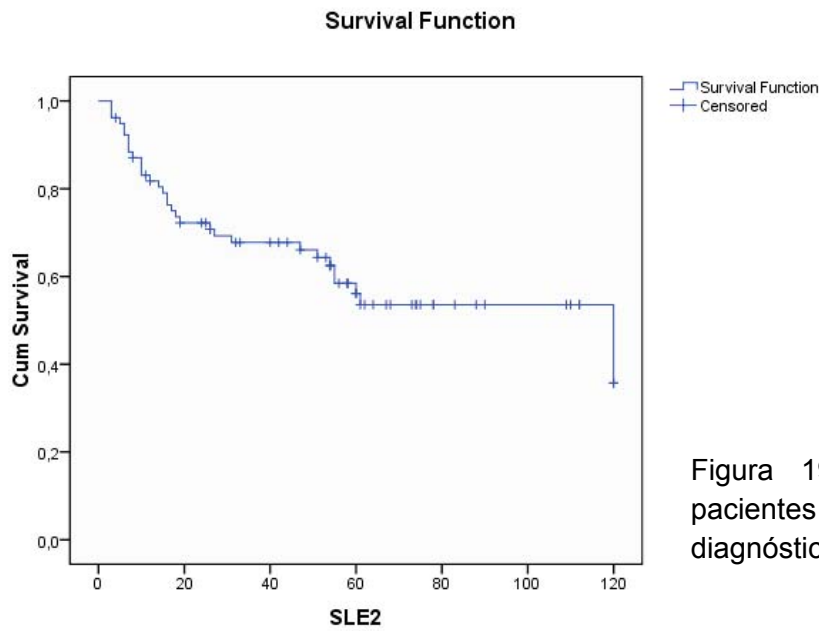


Figura 19: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico

Tabla 39: Número de pacientes y eventos (recaídas de la enfermedad) según los diferentes genotipos, con las medianas de SLE y sus IC95% en pacientes con enfermedad local al diagnóstico.

Genotipo	Nº pacientes	Nº eventos	Mediana SLE (meses)	IC 95% (meses)	p-valor (Log-rank)
<b>XRCC1 codominante</b>					
GG	33	12	120	28,1-211,9	0,514
GA	38	17	61	-	
AA	7	3	60	41,2-78,8	
<b>XRCC1 dominante</b>					
GG	33	12	120	28,1-211,9	0,269
GA+AA	45	20	61	-	
<b>XRCC1 recesivo</b>					
AA	7	3	60	41,2-78,8	0,987
GG+GA	71	29	120	21,5-218,5	
<b>APEX codominante</b>					
TT	24	10	-	-	0,751
TG	33	13	120	43,7-196,26	
GG	21	9	-	-	
<b>APEX dominante</b>					
TT	24	10	-	-	0,721
TG+GG	54	22	120	40,2-199,8	
<b>APEX recesivo</b>					
GG	21	9	-	-	0,451
TT+TG	57	23	120	33,9-206,1	



## RESULTADOS

Tabla 39 (continuación). Número de pacientes y eventos (recaídas de la enfermedad) según los diferentes genotipos, con las medianas de SLE y sus IC95% en pacientes con enfermedad local al diagnóstico

Genotipo	Nº pacientes	Nº eventos	Mediana SLE (meses)	IC 95% (meses)	p-valor (Log-rank)
<b>XPD codominante</b>					
AA	30	8	-		<b>0,021</b>
AC	36	16	61	39,3-82,7	
CC	12	8	16	0,0-36,4	
<b>XPD dominante</b>					
AA	30	8	-	-	<b>0,025</b>
AC+CC	48	24	55	39,8-70,1	
<b>XPD recesivo</b>					
CC	12	8	16	0,0-36,4	<b>0,022</b>
AA+AC	66	24	120	21,3-218,7	
<b>ERCC1 codominante</b>					
TT	31	8	120	-	0,069
TC	34	18	55	42,7-67,3	
CC	13	6	61	-	
<b>ERCC1 dominante</b>					
TT	31	8	120		<b>0,022</b>
TC+CC	47	24	55	41,1-68,9	
<b>ERCC1 recesivo</b>					
CC	13	6	61		0,563
TT+TC	65	26	120	19,4-220,6	
<b>XRCC3 codominante</b>					
CC	34	15	61	-	0,632
CT	32	11	-	-	
TT	12	6	120	24,7-215,3	
<b>XRCC3 dominante</b>					
CC	34	15	61	-	0,543
CT+TT	44	17	120	10,6-229,4	
<b>XRCC3 recesivo</b>					
TT	12	6	120	24,7-215,3	0,626
CC+CT	66	26	-	-	
<b>p53 codominante</b>					
GG	45	17	120	27,0-213,0	0,146
GC	26	10	-	-	
CC	7	5	16	0,6-31,4	
<b>p53 dominante</b>					
GG	45	17	120	27,0-213,0	0,513
GC+CC	33	15	60	49,0-71,0	
<b>p53 recesivo</b>					
CC	7	5	16	0,6-31,4	<b>0,050</b>
GG+GC	71	27	120	21,7-218,3	

## RESULTADOS

Tabla 40. Número de pacientes y eventos (recaídas de la enfermedad) según los diferentes genotipos, con sus respectivos HRs y sus IC95% en pacientes con enfermedad local al diagnóstico

Genotipo	Nº pacientes	Nº eventos	HR	IC 95%	p-valor
<b>XRCC1 codominante</b>					
GG	33	12	Referencia		
GA	38	17	1,54	0,73-3,23	0,255
AA	7	3	1,27	0,36-4,53	0,708
<b>XRCC1 dominante</b>					
GG	33	12	Referencia		
GA+AA	45	20	1,49	0,73-3,06	0,275
<b>XRCC1 recesivo</b>					
AA	7	3	Referencia		
GG+GA	71	29	0,99	0,30-3,26	0,987
<b>APEX codominante</b>					
TT	24	10	Referencia		
TG	33	13	1,03	0,45-2,35	0,943
GG	21	9	1,37	0,55-3,39	0,498
<b>APEX dominante</b>					
TT	24	10	Referencia		
TG+GG	54	22	1,14	0,54-2,42	0,723
<b>APEX recesivo</b>					
GG	21	9	Referencia		
TT+TG	57	23	0,74	0,34-1,62	0,455
<b>XPD codominante</b>					
AA	30	8	Referencia		
AC	36	16	2,07	0,88-4,86	0,094
CC	12	8	3,80	1,41-10,26	<b>0,008</b>
<b>XPD dominante</b>					
AA	30	8	Referencia		
AC+CC	48	24	2,43	1,09-5,44	<b>0,031</b>
<b>XPD recesivo</b>					
CC	12	8	Referencia		
AA+AC	66	24	0,40	0,18-0,91	<b>0,028</b>
<b>ERCC1 codominante</b>					
TT	31	8	Referencia		
TC	34	18	2,65	1,11-6,36	<b>0,029</b>
CC	13	6	2,36	0,79-7,02	0,124
<b>ERCC1 dominante</b>					
TT	31	8	Referencia		
TC+CC	47	24	2,57	1,11-5,98	<b>0,028</b>
<b>ERCC1 recesivo</b>					
CC	13	6	Referencia		
TT+TC	65	26	0,77	0,31-1,88	0,566

## RESULTADOS

Tabla 40 (continuación): Número de pacientes y eventos (recaídas) según los diferentes genotipos, con sus respectivos HRs y sus IC95% en pacientes con enfermedad local al diagnóstico

Genotipo	Nº pacientes	Nº eventos	HR	IC 95%	p-valor
<b>XRCC3 codominante</b>					
CC	34	15	Referencia		
CT	32	11	0,72	0,33-1,57	0,405
TT	12	6	1,07	0,40-2,85	0,893
<b>XRCC3 dominante</b>					
CC	34	15	Referencia		
CT+TT	44	17	0,80	0,40-1,63	0,546
<b>XRCC3 recesivo</b>					
TT	12	6	Referencia		
CC+CT	66	26	0,80	0,32-1,99	0,628
<b>p53 codominante</b>					
GG	45	17	Referencia		
GC	26	10	1,00	0,46-2,20	0,985
CC	7	5	2,52	0,92-6,86	0,071
<b>p53 dominante</b>					
GG	45	17	Referencia		
GC+CC	33	15	1,26	0,63-2,52	0,517
<b>p53 recesivo</b>					
CC	7	5	Referencia		
GG+GC	71	27	0,40	0,15-1,04	0,060

Teniendo en cuenta el aumento del riesgo de recaída (HR) que se observa en el modelo codominante de XPD se decidió calcular el riesgo según el modelo de herencia aditivo, que se lleva a cabo considerando los genotipos como una variable continua. Así, encontramos que cada alelo variante supone un aumento de riesgo de casi el doble (1,95) de sufrir una recaída.

Tabla 41: Riesgo que aporta cada alelo variante de XPD según el modelo aditivo

	HR	IC 95%		p-valor
		Inferior	Superior	
XPD	1,95	1,20	3,18	0,007

A continuación se muestran las curvas de supervivencia de los genotipos significativos o al límite de la significación.

## RESULTADOS

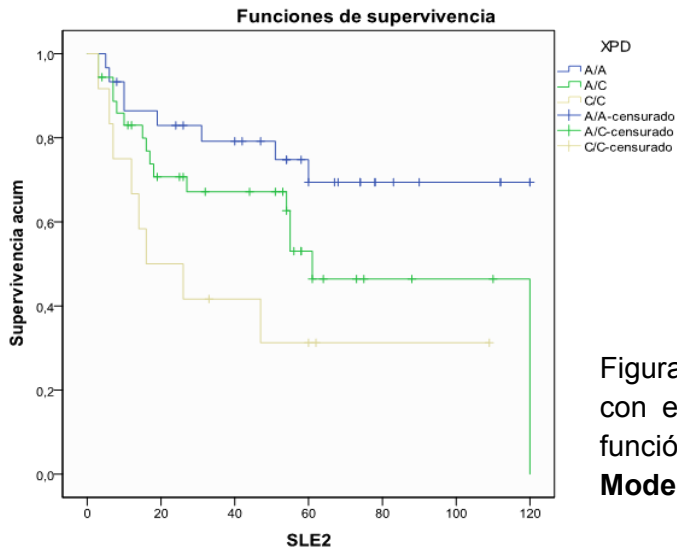


Figura 20: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico en función de los genotipos de XPD. **Modelo codominante**

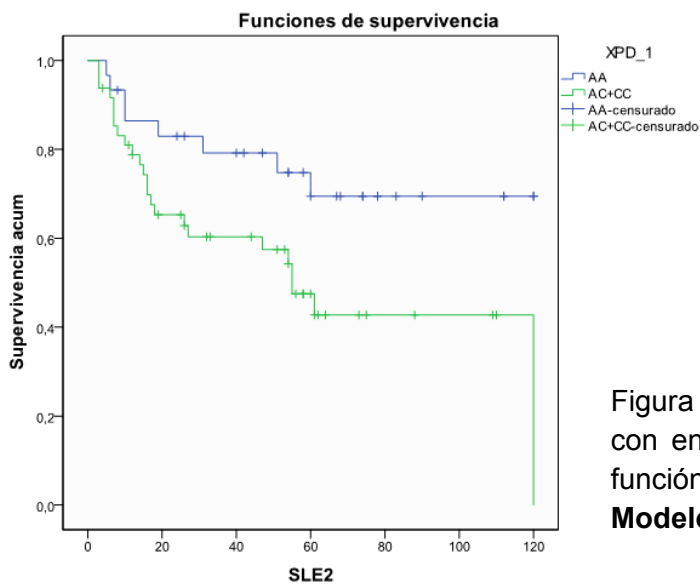


Figura 21: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico en función de los genotipos de XPD. **Modelo dominante**

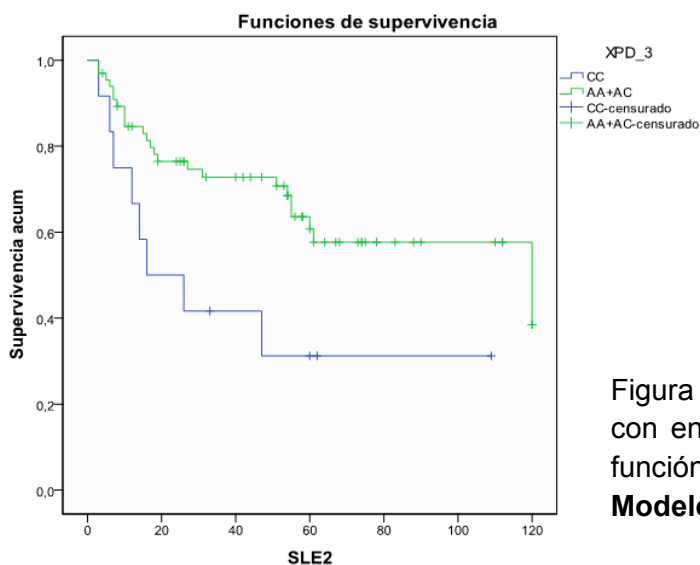


Figura 22: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico en función de los genotipos de XPD. **Modelo recesivo**

## RESULTADOS

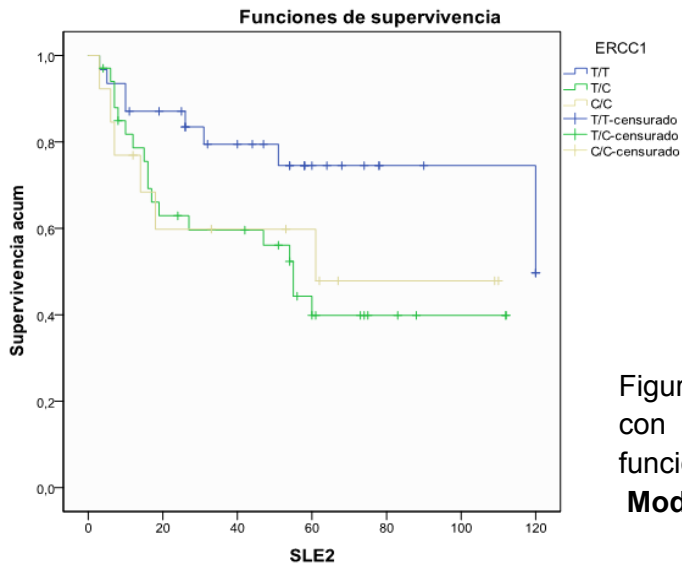


Figura 23: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico en función de los genotipos de ERCC1.

**Modelo codominante**

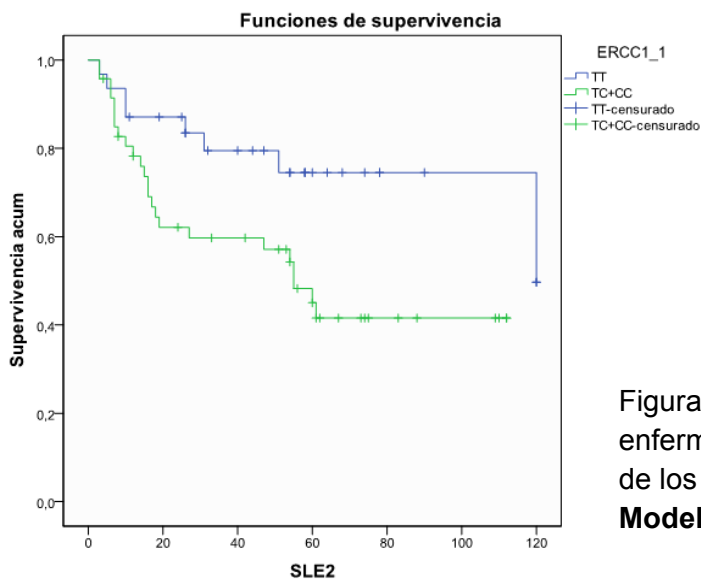


Figura 24: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico en función de los genotipos de ERCC1.

**Modelo dominante**

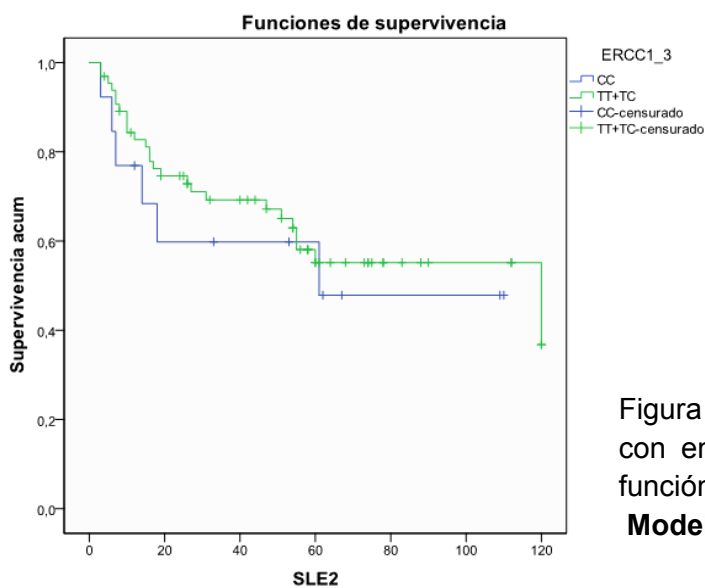


Figura 25: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico en función de los genotipos de ERCC1.

**Modelo recesivo**

## RESULTADOS

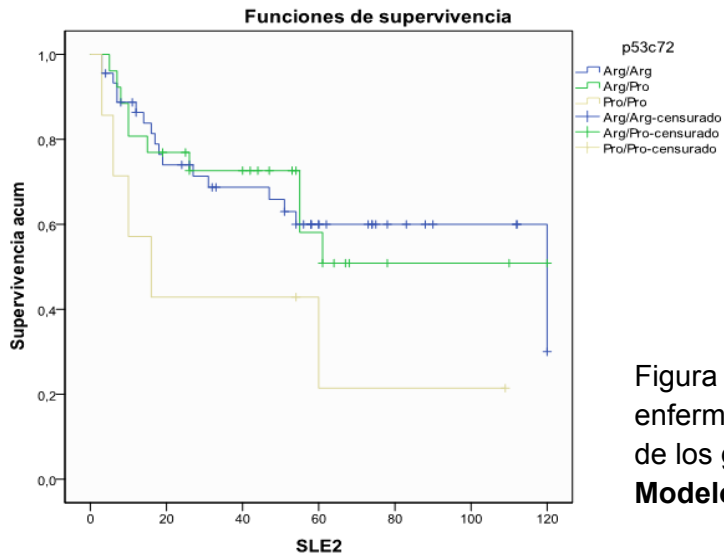


Figura 26: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico en función de los genotipos de p53.  
**Modelo codominante**

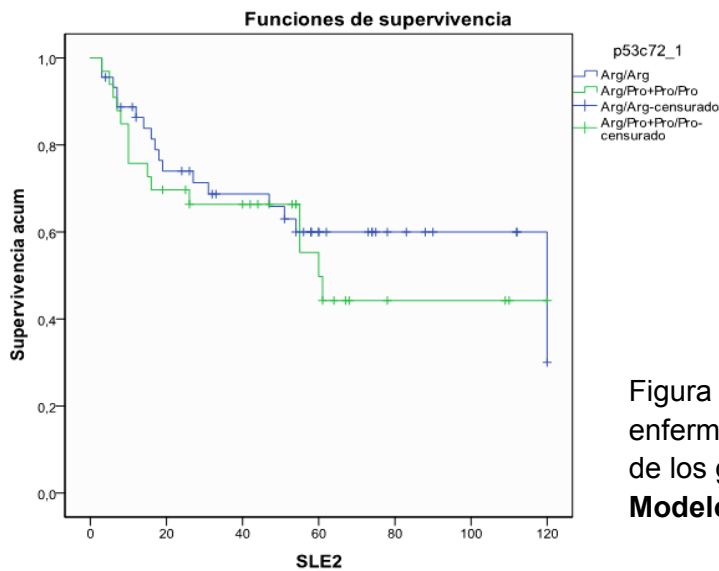


Figura 27: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico en función de los genotipos de p53.  
**Modelo dominante**

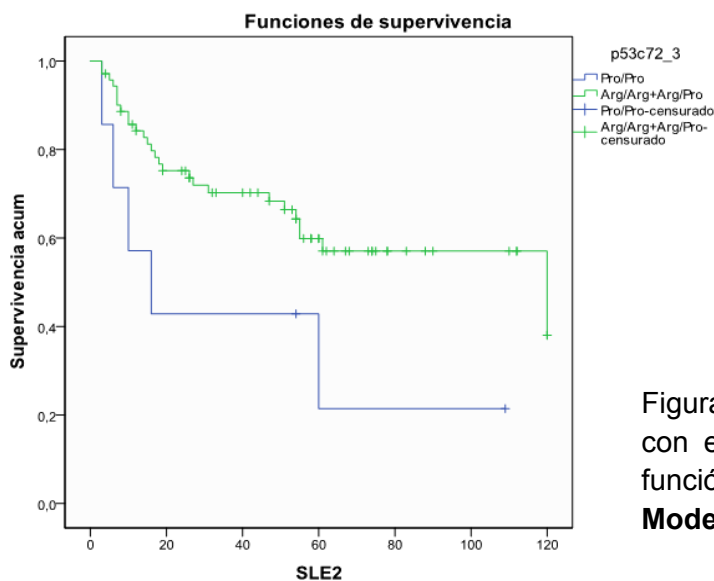


Figura 28: Curva de SLE en pacientes con enfermedad local al diagnóstico en función de los genotipos de p53.  
**Modelo recesivo**

## RESULTADOS

### 6.2 Enfermedad localmente avanzada

La mediana de seguimiento de los pacientes con enfermedad localmente avanzada fue de 57 meses. De los 95 pacientes con enfermedad localmente avanzada al diagnóstico, se objetivó una recaída de la enfermedad en un total de 40 pacientes, de los cuales, 34 recayeron dentro de los 5 primeros años (60 meses) tras el diagnóstico. La mediana de SLE estimada para este grupo de pacientes es de 120 meses con un IC95%= 82,5-157,5.

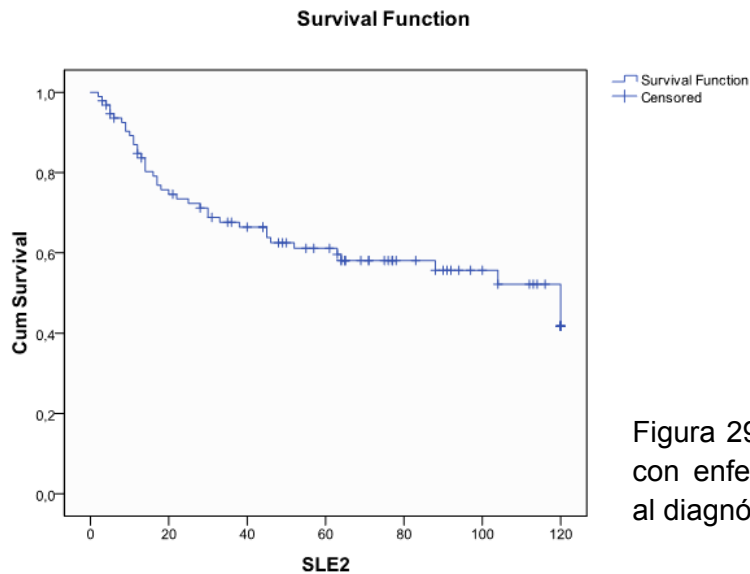


Figura 29: Curva de SLE en pacientes con enfermedad localmente avanzada al diagnóstico

Tabla 42: Número de pacientes y eventos (recaídas de la enfermedad) según los diferentes genotipos, con las medianas de SLE y sus IC95% en pacientes con enfermedad localmente avanzada al diagnóstico

Genotipo	Nº pacientes	Nº eventos	Mediana SLE (meses)	IC 95% (meses)	p-valor (Log-rank)
<b>XRCC1 codominante</b>					
GG	34	15	104	64,0-144,0	0,707
GA	48	18	-	-	
AA	13	7	120	21,8-218,2	
<b>XRCC1 dominante</b>					
GG	34	15	104	64,0-144,0	0,986
GA+AA	61	25	120	-	
<b>XRCC1 recesivo</b>					
AA	13	7	120	21,8-218,2	0,431
GG+GA	82	33	120	-	
<b>APEX codominante</b>					
TT	31	12	120	9,3-230,7	0,850
TG	45	20	104	63,3-114,6	
GG	19	8	-	-	

## RESULTADOS

Tabla 42 (continuación): Número de pacientes y eventos (recaídas) según los diferentes genotipos, con las medianas de SLE y sus IC95% en pacientes con enfermedad localmente avanzada al diagnóstico

Genotipo	Nº pacientes	Nº eventos	Mediana SLE (meses)	IC 95% (meses)	p-valor (Log-rank)
<b>APEX dominante</b>					
TT	31	12	120	9,3-230,7	0,616
TG+GG	64	28	104	40,3-167,6	
<b>APEX recesivo</b>					
GG	19	8	-		0,672
TT+TG	76	32	120	82,5-158,0	
<b>XPD codominante</b>					
AA	45	18	120	43,2-196,8	0,727
AC	41	19	104	23,0-185,0	
CC	9	3	-	-	
<b>XPD dominante</b>					
AA	45	18	120	43,2-196,8	0,645
AC+CC	50	22	104	-	
<b>XPD recesivo</b>					
CC	9	3	-	-	0,639
AA+AC	86	37	120	66,1-173,9	
<b>ERCC1 codominante</b>					
TT	33	15	46	-	0,233
TC	52	20	120	96,4-143,6	
CC	10	5	22	-	
<b>ERCC1 dominante</b>					
TT	33	15	46	-	0,202
TC+CC	62	25	120	97,0-143,0	
<b>ERCC1 recesivo</b>					
CC	10	5	22	-	0,395
TT+TC	85	35	120	82,2-157,7	
<b>XRCC3 codominante</b>					
CC	40	17	120	41,2-198,7	0,976
CT	36	17	104	19,6-188,4	
TT	19	6	-	-	
<b>XRCC3 dominante</b>					
CC	40	17	120	41,2-198,7	0,873
CT+TT	55	23	120	16,3-223,6	
<b>XRCC3 recesivo</b>					
TT	19	6	-	-	0,939
CC+CT	76	34	120	18,7-83,4	
<b>p53 codominante</b>					
GG	57	28	104	42,7-165,3	0,227
GC	32	9	120	-	
CC	6	3	12	8,8-15,2	
<b>p53 dominante</b>					
GG	57	28	104	42,7-165,3	0,228
GC+CC	38	12	-	-	
<b>p53 recesivo</b>					
CC	6	3	12	8,8-15,2	0,392
GG+GC	89	37	120	83,8-156,2	



## RESULTADOS

Tabla 43. Número de pacientes y eventos (recaídas de la enfermedad) según los diferentes genotipos, con sus respectivos HRs y sus IC95% en pacientes con enfermedad localmente avanzada al diagnóstico

Genotipo	Nº pacientes	Nº eventos	HR	IC 95%	p-valor
<b>XRCC1 codominante</b>					
GG	34	15	Referencia		
GA	48	18	0,91	0,46-1,81	0,783
AA	13	7	1,31	0,53-3,22	0,555
<b>XRCC1 dominante</b>					
GG	34	15	Referencia		
GA+AA	61	25	0,99	0,52-1,89	0,987
<b>XRCC1 recesivo</b>					
AA	13	7	Referencia		
GG+GA	82	33	0,72	0,32-1,64	0,437
<b>APEX codominante</b>					
TT	31	12	Referencia		
TG	45	20	1,15	0,56-2,36	0,699
GG	19	8	1,29	0,52-3,17	0,581
<b>APEX dominante</b>					
TT	31	12	Referencia		
TG+GG	64	28	1,19	0,60-2,33	0,619
<b>APEX recesivo</b>					
GG	19	8	Referencia		
TT+TG	76	32	0,84	0,39-1,85	0,674
<b>XPD codominante</b>					
AA	45	18	Referencia		
AC	41	19	1,23	0,64-2,36	0,526
CC	9	3	0,84	0,25-2,84	0,776
<b>XPD dominante</b>					
AA	45	18	Referencia		
AC+CC	50	22	1,16	0,62-2,17	0,647
<b>XPD recesivo</b>					
CC	9	3	Referencia		
AA+AC	86	37	1,32	0,41-4,29	0,642
<b>ERCC1 codominante</b>					
TT	33	15	Referencia		
TC	52	20	0,60	0,30-1,18	0,137
CC	10	5	1,09	0,39-3,01	0,869
<b>ERCC1 dominante</b>					
TT	33	15	Referencia		
TC+CC	62	25	0,66	0,35-1,26	0,207
<b>ERCC1 recesivo</b>					
CC	10	5	Referencia		
TT+TC	85	35	0,67	0,26-1,71	0,400

## RESULTADOS

Tabla 43 (continuación): Número de pacientes y eventos (recaídas) según los diferentes genotipos, con sus respectivos HRs y sus IC95% en pacientes con enfermedad localmente avanzada al diagnóstico

Genotipo	Nº pacientes	Nº eventos	HR	IC 95%	p-valor
<b>XRCC3 codominante</b>					
CC	40	17	Referencia		
CT	36	17	1,07	0,55-2,10	0,840
TT	19	6	1,00	0,39-2,54	1,00
<b>XRCC3 dominante</b>					
CC	40	17	Referencia		
CT+TT	55	23	1,05	0,56-1,97	0,874
<b>XRCC3 recesivo</b>					
TT	19	6	Referencia		
CC+CT	76	34	1,03	0,43-2,47	0,939
<b>p53 codominante</b>					
GG	57	28	Referencia		
GC	32	9	0,56	0,27-1,20	0,137
CC	6	3	1,39	0,42-4,62	0,587
<b>p53 dominante</b>					
GG	57	28	Referencia		
GC+CC	38	12	0,66	0,34-1,31	0,234
<b>p53 recesivo</b>					
CC	6	3	Referencia		
GG+GC	89	37	0,60	0,18-1,97	0,401

### 7. Estudio de polimorfismos en relación con la toxicidad secundaria al tratamiento (marcadores predictivos de toxicidad).

#### 7.1 Toxicidad secundaria a la QT de inducción

De los 34 pacientes que recibieron QT de inducción a base de Cisplatino+ 5-Fluorouracilo uno de ellos recibió solamente dos ciclos por falta de respuesta, siendo tratado finalmente con cirugía por lo que se excluyó del análisis de toxicidad. Cuatro pacientes fueron tratados en otro centro no conociendo su toxicidad. De este modo, se valoró la toxicidad en un total de 29 pacientes tratados con el esquema cisplatino+5-FU. No se incluyeron en este análisis pacientes con otros regímenes quimioterápicos debido a la diferente toxicidad producida por los mismos.

## RESULTADOS

Teniendo en cuenta el escaso número de pacientes se compararon las distribuciones de aquellos pacientes que precisaron retrasar el tratamiento como consecuencia de su toxicidad, en función de los diferentes genotipos. Los retrasos del tratamiento fueron secundarios a neutropenias grados 3-4, dos neutropenias grado 2-3, una trombopenia grado 3 y se produjo una interrupción del tratamiento por fracaso renal. El mayor grado de anemia fue grado 2.

Tabla 44: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función de si se produjo o no un retraso en el tratamiento con quimioterapia de inducción basada en Cisplatino+ 5-Fluorouracilo

Genotipo		No toxicidad-leve		Retraso tratamiento		p-valor
		N=15	Porcentaje	N=14	Porcentaje	
<b>XRCC1 Arg399Gln</b>	GG	5	33,3%	8	57,1%	0,209
	GA	8	53,3%	3	21,4%	
	AA	2	13,3%	3	21,4%	
<b>APEX Asp148Glu</b>	TT	4	26,7%	2	14,3%	0,051
	TG	7	46,7%	12	85,7%	
	GG	4	26,7%	0	0,0%	
<b>XPD Lys751Gln</b>	AA	6	40,0%	8	57,1%	0,196
	AC	6	40,0%	6	42,9%	
	CC	3	20,0%	0	0,0%	
<b>ERCC1 Asn118Asn</b>	TT	5	33,3%	4	28,6%	0,316
	TC	8	53,3%	10	71,4%	
	CC	2	13,3%	0	0,0%	
<b>XRCC3 Thr241Met</b>	CC	7	46,7%	3	21,4%	0,315
	CT	6	40,0%	7	50,0%	
	TT	2	13,3%	4	28,6%	
<b>p53 Arg72Pro</b>	GG	9	50,0%	9	64,3%	0,962
	GC	5	33,3%	4	28,6%	
	CC	1	6,7%	1	7,1%	

## RESULTADOS

### 7.2 Toxicidad secundaria al tratamiento con RT

Para el análisis de toxicidad por RT se incluyeron los pacientes que recibieron RT como tratamiento adyuvante tras la cirugía, bien del tumor primario o a la recaída. Se excluyeron los pacientes que recibieron tratamiento con QT+RT concomitante ya que suelen presentar una toxicidad mayor. Así, se incluyen en el análisis un total de 50 pacientes.

Se compararon las frecuencias de mucositis grado 1-2 vs 3-4 en función de los diferentes genotipos (Tabla 45). En un caso no se conocía el grado de mucositis.

Tabla 45: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función del grado de mucositis (1-2 vs 3-4) con el tratamiento radioterápico adyuvante tras cirugía

Genotipo		Mucositis 1-2		Mucositis 3-4		p-valor
		N=38	Porcentaje	N=11	Porcentaje	
<b>XRCC1 Arg399Gln</b>	GG	14	36,8%	4	36,4%	0,595
	GA	21	55,3%	5	45,4%	
	AA	3	7,9%	2	18,2%	
<b>APEX Asp148Glu</b>	TT	14	36,8%	6	54,5%	0,574
	TG	14	36,8%	3	27,3%	
	GG	10	26,3%	2	18,2%	
<b>XPD Lys751Gln</b>	AA	17	44,7%	2	18,2%	0,075
	AC	13	34,2%	8	72,7%	
	CC	8	21,1%	1	9,1%	
<b>ERCC1 Asn118Asn</b>	TT	13	34,2%	3	27,3%	0,264
	TC	19	50,0%	8	72,7%	
	CC	6	15,8%	0	0,0%	
<b>XRCC3 Thr241Met</b>	CC	18	47,4%	9	81,8%	0,111
	CT	15	39,5%	2	18,2%	
	TT	5	13,1%	0	0,0%	
<b>p53 Arg72Pro</b>	GG	21	55,3%	7	63,6%	0,884
	GC	13	34,2%	3	27,3%	
	CC	4	10,5%	1	9,1%	

## RESULTADOS

También se analizó la aparición de dermatitis, como consecuencia del tratamiento, en función de los distintos genotipos (Tabla 46).

Tabla 46: Distribución de los diferentes genotipos de los genes reparadores del ADN estudiados, en función de la aparición o no de dermatitis con el tratamiento raditerápico adyuvante tras cirugía

Genotipo		No dermatitis		Sí dermatitis		p-valor
		N=23	Porcentaje	N=27	Porcentaje	
<b>XRCC1 Arg399Gln</b>	GG	9	39,1%	9	33,3%	0,898
	GA	12	52,2%	15	55,6%	
	AA	2	8,7%	3	11,1%	
<b>APEX Asp148Glu</b>	TT	10	43,5%	10	37,0%	0,888
	TG	8	34,8%	10	37,0%	
	GG	5	21,7%	7	25,9%	
<b>XPD Lys751Gln</b>	AA	11	47,8%	8	29,6%	0,333
	AC	9	39,1%	12	44,4%	
	CC	3	13,0%	7	25,9%	
<b>ERCC1 Asn118Asn</b>	TT	10	43,5%	6	22,2%	0,265
	TC	10	43,5%	17	63,0%	
	CC	3	13,0%	4	14,8%	
<b>XRCC3 Thr241Met</b>	CC	13	56,5%	14	51,9%	0,932
	CT	8	34,8%	10	37,0%	
	TT	2	8,7%	3	11,1%	
<b>p53 Arg72Pro</b>	GG	15	65,2%	14	51,9%	0,093
	GC	8	34,8%	8	29,6%	
	CC	0	0,0%	5	18,5%	

## DISCUSIÓN

Hay tres vías principales implicadas en la reparación del daño al ADN, dependiendo del tipo y la magnitud del daño. La vía BER repara pequeñas modificaciones en las bases, incluyendo lesiones oxidativas y roturas de cadena simple (SSBs), producidas a través de la exposición de las células a especies reactivas de oxígeno (ROS) y agentes tóxicos endógenos. La vía NER repara un amplio espectro de daño genómico, incluyendo los aductos voluminosos inducidos por hidrocarburos aromáticos policíclicos, tales como los presentes en los benzopirenos del humo del tabaco y enlaces cruzados causados por la luz ultravioleta y agentes quimioterápicos. Por último, las roturas de doble cadena (DSBs) y de cadena simple (SSBs) producidas, entre otros factores, por especies reactivas de oxígeno endógenas, se pueden reparar bien a través de una vía de reparación libre de errores (recombinación homóloga) o propensa a producirlos (recombinación no homóloga)<sup>(186)</sup>.

Diferencias heredadas en la capacidad de metabolizar carcinógenos, en el sistema de reparación del ADN y/o en el control de ciclo celular/apoptosis, influyen sobre el riesgo de desarrollar cánceres inducidos por el tabaco, haciendo que ciertos individuos requieran menor exposición a carcinógenos que otros para desarrollar una neoplasia.

Del mismo modo, el pronóstico de los pacientes con CCC, depende de importantes factores clínicos relacionados con el tumor, el tratamiento o con el propio paciente. Sin embargo, estos factores pueden verse influenciados por factores genéticos, como en el caso de los polimorfismos de los genes reparadores del ADN. Estos polimorfismos pueden intervenir tanto en la respuesta al tratamiento (cuanto menor sea la capacidad de reparación, mejor respuesta a tratamientos que producen daño al ADN, como en el caso de la QT y RT), como en la recaída de la enfermedad (por una mayor o menor respuesta al tratamiento y por una mayor o menor susceptibilidad a padecer la enfermedad).

En este trabajo, hemos pretendido analizar la influencia de diferentes polimorfismos en genes reparadores del ADN (XRCC y APEX1 de la vía BER, XPD y ERCC1 de la vía NER y XRCC3 de la vía por recombinación homóloga) y del ciclo celular /apoptosis (p53) en el cáncer de cabeza y cuello, no sólo en

## DISCUSIÓN

cuanto a su aportación al riesgo de desarrollar este tipo de tumores, sino también en cuanto a la posibilidad de que estos polimorfismos afecten a la edad de presentación del tumor, al riesgo de recaída o a la respuesta y toxicidad secundarias al tratamiento.

Para ello, se ha realizado, mediante la aproximación del gen candidato, un estudio de asociación de casos y controles para valorar su implicación en el riesgo, y de cohorte (con los pacientes diagnosticados de cáncer de cabeza y cuello) para el resto de objetivos (edad de presentación del tumor, supervivencia libre de enfermedad, respuesta y toxicidad secundarias al tratamiento).

Una de las críticas que se hacen a los estudios de asociación de enfermedades complejas es que con frecuencia sus resultados no pueden ser replicados. Se ha señalado el pequeño tamaño muestral como una de las principales causas de esta discrepancias, al carecer de poder estadístico suficiente. Esto ha tratado de solventarse con la realización de revisiones de la literatura y meta-análisis que incluyen los estudios publicados para un determinado SNP, aumentando así el tamaño muestral. Estos análisis sistemáticos han puesto de manifiesto que los diferentes resultados obtenidos para un mismo polimorfismo podrían ser debidos a las diferencias en la población estudiada, bien en cuanto a la enfermedad (por ejemplo, severidad o localización tumoral), o a la propia persona (raza, edad, sexo, o hábitos de vida). Así, los polimorfismos que modifican el riesgo de un tipo de cáncer en una determinada etnia podrían carecer de significado en otra, siendo necesario tener también en cuenta las diferencias en las frecuencias alélicas entre las diferentes etnias; así, por ejemplo, en un meta-análisis se han encontrado diferencias significativas en la frecuencia del alelo Gln 399 del gen XRCC1 entre europeos, asiáticos y africanos<sup>(187)</sup> y en otro meta-análisis<sup>(188)</sup> encontraron diferencias significativas en la prevalencia del alelo Met/Met de XRCC3 entre afroamericanos, asiáticos y caucásicos; precisando un análisis estratificado para poder encontrar una asociación. También se ha observado que en los estudios de casos y controles, los grupos pueden no ser comparables para variables importantes para el desarrollo de la enfermedad como el consumo de tabaco, la profesión o la exposición al sol de modo que las diferencias observadas entre uno y otro grupo puede que no guarden relación con la enfermedad sino con estas otras variables,

## DISCUSIÓN

haciendo los estudios difícilmente reproducibles. Otra posible fuente de error, es el sesgo de publicación, ya que los estudios con resultados negativos muchas veces no son publicados por la tendencia, por parte de las revistas, a publicar estudios con resultados de asociación estadísticamente significativa y a rechazar los estudios con resultados no significativos<sup>(189,190)</sup>.

Con la acumulación de datos sobre los polimorfismos en genes reparadores del ADN, algunos SNPs parecen tener riesgos opuestos en diferentes localizaciones tumorales. Estos resultados podrían reflejar simplemente una asociación por azar, aunque una posible explicación podría ser la existencia de un equilibrio entre las señales de apoptosis y efectos de reparación específico para cada tejido. Así, variantes de reparación menos eficientes de determinadas vías de reparación podrían dar lugar a una señal de protección (acumulación de daño, parada del ciclo celular y apoptosis) en algunos tejidos, mientras que en otros pueden ser factores de riesgo (no reparación o intento fallido de reparación del daño y mutación secundaria)<sup>(188)</sup>.

En cuanto a las limitaciones observadas en los estudios de asociación para valorar el riesgo de desarrollar cáncer de cabeza y cuello, son similares a las expuestas anteriormente de manera general. Así, Flores-Orbando et al. comprobaron la existencia de numerosos estudios epidemiológicos que evalúan la asociación del cáncer de cabeza y cuello con polimorfismos en genes reparadores del ADN, encontrándose con resultados contradictorios, en lugar de concluyentes. Por lo tanto, consideraron necesaria la realización de una revisión sistemática y un meta-análisis de la literatura publicada para valorar la asociación de las variantes en genes reparadores del ADN con el cáncer de cabeza y cuello. Algunas de las principales limitaciones que se exponen en el meta-análisis son que la mayoría de estudios no informan sobre el estado de fumador o las localizaciones tumorales estudiadas, la heterogeneidad en la raza y el pequeño número de estudios para cada grupo étnico<sup>(191)</sup>.

Las publicaciones sobre polimorfismos genéticos y el pronóstico del CCC tienen limitaciones comunes a los estudios de asociación, como el pequeño tamaño muestral o el sesgo de publicación. En una revisión sistemática realizada por Hopkins et al. sobre la influencia de las variantes genéticas en el pronóstico



del CCC, encontraron un total de 22 estudios de genes candidatos, con una mediana global de tamaño muestral de 110 individuos. Casi la mitad de los polimorfismos incluidos en dichos estudios formaban parte de las vías de reparación del ADN. De los estudios observados, el 77% tenía al menos un resultado primario estadísticamente significativo, y casi todos tenían al menos una asociación secundaria positiva, lo que hace pensar en un posible sesgo de publicación. En prácticamente todos ellos se refieren a sí mismos como exploratorios o con la necesidad de ser validados o replicados<sup>(192)</sup>.

A continuación comentamos nuestros resultados y publicaciones relacionadas con los polimorfismos estudiados según las diferentes vías de reparación.

### **1-. VÍA DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES (BER)**

En nuestro estudio no hemos encontrado una asociación significativa entre los polimorfismos estudiados de esta vía (XRCC1 y APEX) con el riesgo de desarrollar la enfermedad a cualquier edad, en el estudio de casos y controles. Sin embargo, sí encontramos una relación estadísticamente significativa ( $p=0,009$ ) entre la variante Gln/Gln del gen XRCC1 con un desarrollo de la enfermedad antes de los 51 años de edad ( $OR=3,98$ ;  $IC95\%=1,52-10,40$ ) al comparar a los sujetos con enfermedad menores, con los mayores de esa edad; siguiendo un modelo de herencia recesivo, es decir, precisa tener los dos alelos variantes para que se produzca un aumento del riesgo. Tampoco se encontró una asociación significativa de los polimorfismos de esta vía con el pronóstico de la enfermedad, la respuesta al tratamiento o la toxicidad.

#### **1.1-. XRCC1 codón 399:**

Respecto a las publicaciones previas, hemos encontrado numerosos estudios que han analizado la asociación entre este polimorfismo y el riesgo de cáncer. Sin embargo, los resultados sugieren diferentes direcciones en función del tipo de cáncer. Así, por ejemplo, se ha observado una disminución del riesgo para el cáncer de piel no melanoma, cáncer de esófago o de vejiga y un aumento del riesgo para el cáncer de mama y cáncer gástrico<sup>(193)</sup>. En un meta-análisis que estudia la relación de polimorfismos entre el gen XRCC1 y el riesgo de cáncer, se

## DISCUSIÓN

incluyen 37 estudios de casos y controles para el polimorfismo Arg399Gln con un total de 11542 casos de diferentes tumores y 13694 controles y no se encuentra asociación entre este polimorfismo (Arg399Gln) y el riesgo de cáncer global<sup>(187)</sup>.

En el caso del cáncer de pulmón o de cabeza y cuello los resultados son inconsistentes, con resultados en ambas direcciones. En el caso del CCC se ha encontrado tanto un aumento del riesgo asociado con el genotipo Gln/Gln<sup>(194)</sup>, como una disminución del mismo<sup>(195)</sup> o la falta de asociación<sup>(196)</sup>.

En un reciente meta-análisis específico de cáncer de cabeza y cuello, publicado por Flores-Obando et al<sup>(191)</sup> se estudia un total de 3582 casos y 5347 controles con el polimorfismo Arg399Gln, y no se encuentra asociación entre este polimorfismo y el riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral, faríngeo o laríngeo, en los estudios que utilizaron controles hospitalarios pero existe una gran heterogeneidad en los estudios que utilizan controles sanos. Así, de los 10 estudios que utilizaron controles sanos, solamente 2 encontraron diferencias estadísticamente significativas, y uno de ellos solamente incluye cánceres de cavidad oral. Encuentran una asociación marginal entre las variantes GA+AA con el riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral, faríngeo o laríngeo en población caucásica (meta-OR: 1.14, 95% CI: 1.01–1.27).

En cuanto a la relación existente entre este polimorfismo con el desarrollo precoz de la enfermedad no existe consenso sobre la etiología y características clínicas de los adultos jóvenes diagnosticados de CECC. Numerosos estudios describen una ausencia de los factores de riesgo típicos de la enfermedad (consumo de tabaco y alcohol)<sup>(197)</sup>, conduciendo esto a la búsqueda de otros posibles factores de riesgo como pueden ser deficiencias en el sistema inmune<sup>(198)</sup>, abuso de marihuana y/o hachís<sup>(199)</sup>, mayor consumo de tabaco y alcohol<sup>(200)</sup>, o infecciones por el HPV<sup>(201)</sup>.

Junto a estos factores de riesgo ambientales, uno de los factores que podría tener una gran importancia para desarrollar la enfermedad a una edad temprana es un aumento en la predisposición genética.

A este respecto, hemos encontrado un estudio realizado en Polonia<sup>(202)</sup> en el que se estudia la relación entre tres polimorfismos en genes reparadores del ADN

## DISCUSIÓN

(XPD, XRCC1 y XRCC3), que coinciden con los estudiados en el presente trabajo, comparando un grupo de adultos jóvenes (<45 años) con CECC, con pacientes >45 años y con sujetos sanos <45 años. En este estudio no encuentran diferencias significativas entre las distribuciones genotípicas del gen XPD entre los pacientes <45 años con los otros dos grupos. Pero sí observan una menor frecuencia de la variante AA de XRCC1 y una mayor frecuencia del heterocigoto CT de XRCC3 en pacientes jóvenes respecto a controles sanos, siendo las diferencias estadísticamente significativa. Sin embargo, no se mantiene esa significación al compararlo con pacientes de CCC mayores de 45 años.

En nuestro estudio, al contrario que en el anteriormente expuesto, encontramos un aumento en la frecuencia de la variante AA de XRCC1 en los pacientes jóvenes (<50 años), si bien, esto puede ser debido al diferente grupo de comparación, ya que en el estudio polaco solamente se observa una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan los casos <45 años con el grupo de personas sanas <45 años y no es significativo al compararlos con los pacientes >45 años (en nuestro estudio >50 años). También puede deberse a diferencias entre las frecuencias genotípicas entre poblaciones (española y polaca). Además, el resultado del estudio polaco también podría verse influenciado por diferentes hábitos tóxicos en los grupos de casos y controles ya que no se recoge dicha información. En nuestro estudio sí se conocía esa información y se ajustó por el número de cigarrillos consumidos. No se realizó ajuste por un mayor número de variables debido al escaso tamaño muestral fundamentalmente en el grupo de pacientes <50 años.

Por otra parte, parece más razonable que las personas con el homocigoto variante tengan una mayor predisposición a desarrollar la enfermedad como consecuencia de la menor eficiencia de reparación de esta variante. Así, los portadores de esta variante parecen tener un mayor nivel de aductos en el ADN<sup>(203)</sup>, así como daño al ADN producido por el tabaco<sup>(204,205)</sup>.

Además Wei Zhou et al<sup>(206)</sup> también encuentran una mayor frecuencia del genotipo Gln/Gln en pacientes con cáncer de pulmón <55 años que en los controles, con una OR ajustada del genotipo Gln/Gln frente a Arg/Arg de 2,4 (IC95%: 1,3-4,2) para pacientes menores de 55 años.

### 1.2.- Apex codón 148:

Al igual que XRCC1 diversos estudios han investigado la asociación entre APE1 Asp148Glu y el riesgo de cáncer, encontrando diferentes resultados entre los distintos grupos étnicos y los diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, en un estudio, el genotipo APE1 148Glu/Glu se asoció con el riesgo de cáncer de pulmón en una población japonesa<sup>(207)</sup> frente a otro estudio en el que se observó una reducción significativa del riesgo de melanoma en caucásicos<sup>(208)</sup>. Sin embargo, estudios en otros tipos de cáncer no encuentran evidencia de asociación entre este polimorfismo (Asp148Glu APE1) y el riesgo de cáncer de pulmón<sup>(209)</sup>, vejiga<sup>(210)</sup>, o próstata<sup>(211)</sup>.

En un importante estudio que incluye 830 pacientes diagnosticados de CECC y 854 controles hospitalarios no se encontró asociación entre este polimorfismo y un cambio en el riesgo de padecer la enfermedad<sup>(196)</sup>.

### 2.- VÍA DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER)

En nuestro estudio no hemos encontrado una asociación significativa entre los polimorfismos estudiados de esta vía (XPD y ERCC1) con el riesgo de desarrollar la enfermedad, tanto a cualquier edad como en menores de 51 años. Tampoco se encontró una asociación significativa de los polimorfismos de esta vía con la respuesta al tratamiento o la toxicidad. Sin embargo, sí observamos una relación estadísticamente significativa con el pronóstico de la enfermedad. En nuestro estudio nos hemos centrado en la influencia sobre la SLE, estratificando el análisis según el estadio al diagnóstico de la enfermedad. En los resultados obtenidos en los pacientes con enfermedad localizada (estadios I y II), se observa un mayor riesgo de sufrir una recaída de la enfermedad en aquellos pacientes con algún alelo variante del polimorfismo en XPD, siguiendo un modelo de herencia aditivo (cada alelo variante supone un aumento del riesgo de 1,95 de sufrir una recaída, con un p-valor=0,007).

El polimorfismo estudiado de ERCC1 también nos aporta resultados estadísticamente significativos en los pacientes con enfermedad localizada bajo un modelo de herencia dominante, con aumento del riesgo de recaída de 2,57 (IC

95%:1,11-5,98) en los pacientes con algún alelo variante, respecto a los pacientes con el homocigoto común ( $p=0,028$ ).

Respecto a los pacientes con enfermedad avanzada (estadios III y IV), no encontramos resultados estadísticamente significativos, lo que podría ser una consecuencia de la aplicación de tratamientos que producen daño en el ADN (QT y/o RT) que compensaría el riesgo que aporta el polimorfismo para una recaída de la enfermedad con el beneficio de una mayor respuesta al tratamiento.

### **2.1-. XPD codón 751:**

El polimorfismo estudiado de XPD es el polimorfismo más frecuentemente estudiado de la vía de reparación NER. Supone un cambio de aminoácido asociado con un cambio conformacional de la proteína<sup>(212)</sup>, con niveles más bajos de ARNm de XPD<sup>(213)</sup>, y con una menor eficiencia de reparación<sup>(214)</sup> y un mayor número de aductos en el ADN<sup>(215)</sup>.

Aunque hay diversos estudios publicados con diversos cánceres en los que no se encuentra asociación<sup>(193)</sup>, parece existir una relación entre este polimorfismo y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón<sup>(216,217)</sup>. En un metaanálisis basado en 56 estudios de casos y controles que incluían un total de 25.932 casos y 27.733 controles en los que se estudiaba el polimorfismo de XPD Lys 751 Gln, se objetivó un pequeño aumento del riesgo de cáncer (OR, 1.10; IC 95%:1,03-1,16) en las personas con el genotipo Gln/Gln comparado con el genotipo Lys /Lys<sup>(218)</sup>.

En lo referente al CCC existe un importante estudio de casos y controles, de base hospitalaria, que incluye 854 controles libres de cáncer y 829 pacientes de nuevo diagnóstico de CECC (253 de cavidad oral, 424 de faringe y 152 de laringe) en el que se estudió la asociación de diferentes genes reparadores de la vía NER (ERCC1, XPA, XPC, XPD, y XPG) con el riesgo de CECC. Cuando se evalúa cada polimorfismo de manera separada con el riesgo de desarrollar la enfermedad, solamente se encuentra un aumento significativo del riesgo de CECC con el alelo XPC 499Val en el modelo recesivo; no encontrando asociación significativa con el polimorfismo XPD Lys751Gln<sup>(219)</sup>.

## DISCUSIÓN

En el metaanálisis de Flores-Obando et al<sup>(191)</sup> se evalúan un total de 12 estudios sobre este polimorfismo que suponen un total de 3289 casos y 5135 controles. No se encuentra asociación entre las variantes homocigota y heterocigota con el riesgo de cáncer de cavidad oral, faríngeo o laríngeo, observándose una moderada heterogeneidad entre los estudios. Para las variantes combinadas (heterocigota + homocigota variante) se observó una gran heterogeneidad que no se resolvió estratificando por raza y fuente de los controles.

En cuanto a los estudios publicados sobre la influencia de estos polimorfismos en el pronóstico de la enfermedad, en un estudio publicado recientemente, en el que se intenta validar el papel de 23 variantes genéticas en el pronóstico de pacientes con CECC con estadios I y II, no encuentran asociación del polimorfismo Arg399Gln de XRCC1, ni de la variante Thr241Met de XRCC3 con la SLE; sin embargo, sí encuentran que el alelo variante Gln del gen XPD se asocia, al límite de la significación estadística ( $p=0,05$ ) con una mejor SLE al compararlo con el homocigoto común (Lys/Lys). Como ellos mismos explican en la discusión, esto puede ser debido a que todos los pacientes del estudio fueron tratados con RT y, por lo tanto, al tener una deficiencia en la reparación del ADN, como consecuencia de la variante en XPD, podrían tener una mayor susceptibilidad al daño producido por la RT. También sería necesario valorar el papel que juega los suplementos de alfa-tocoferol/beta-caroteno en los resultados obtenidos, ya que los pacientes estudiados formaban parte de un ensayo de prevención secundaria con dichos suplementos; y aunque en material y métodos se comenta una estratificación en función del brazo de randomización (suplementos o placebo), en el resultado final no hacen referencia al brazo sobre el que se realiza el análisis<sup>(220)</sup>.

En un artículo publicado por S. Zhong et al.<sup>(221)</sup> estudian el efecto del polimorfismo de XPD Lys751Gln en pacientes con CECC estadios III y IV tratados con y sin RT. En este estudio encuentran en pacientes con estadios III y IV tratados con RT una peor supervivencia global con el genotipo homocigoto común (AA) respecto a los pacientes con al menos un alelo variante (C), así como una menor supervivencia específica de enfermedad y supervivencia libre de progresión, presentando como hipótesis más factible que los pacientes con alelos

## DISCUSIÓN

variantes responden mejor al tratamiento. Por el contrario, los pacientes con estadios III y IV no tratados con RT presentan una mejor supervivencia global los pacientes con el genotipo AA que aquellos con algún alelo variante. Estos resultados, asociando el alelo variante con mejor supervivencia en aquellos pacientes expuestos a tratamientos dañinos para el ADN, y peor supervivencia en aquellos no expuestos, concuerdan con un estudio publicado sobre pacientes con cáncer de esófago tratados y no tratados con cisplatino<sup>(222)</sup>.

Una explicación, sobre la influencia en el tratamiento, es que una reparación ineficaz del daño al ADN debido a polimorfismos germinales en los genes reparadores podría promover la muerte de las células tumorales al no ser capaz de reparar el daño al ADN producido por la radiación y, por lo tanto, hacer a estas células tumorales más sensibles a la radiación. Sin embargo, en ausencia de radiación, la reparación ineficaz podría promover la inestabilidad genética de las células tumorales y consecuentemente la progresión tumoral<sup>(221)</sup>.

Los resultados de nuestro estudio van en la misma dirección de lo expuesto, ya que la mayoría de los pacientes (91%) con enfermedad local (estadios I y II) fueron tratados exclusivamente con cirugía, encontrando un aumento en el riesgo de recaída al ser portador del alelo variante (OR=1,95), de una manera aditiva. Por el contrario, en el caso de la enfermedad localmente avanzada, la mayoría de ellos fueron tratados con QT±RT, y se ve una inversión del OR (0,84 para el homocigoto variante respecto al común). Disponemos de muy pocos pacientes con el genotipo homocigoto variante por lo que puede que no tengamos el suficiente poder estadístico para que sea estadísticamente significativo, pero la inversión del OR (de riesgo en los pacientes tratados con cirugía y de protección en los pacientes que reciben tratamientos dañinos para el ADN) nos puede estar indicando la influencia de los tratamientos en los pacientes portadores de este polimorfismo.

Por lo tanto, con estos resultados, podemos hacernos una idea de la importancia de la vía NER para este tipo de tumores. Es bien conocido, que esta vía del sistema de reparación es una de las más implicadas en la reparación de lesiones voluminosas del ADN, como las producidas por hidrocarburos aromáticos policíclicos contenidos en el tabaco. Por lo tanto, teniendo en cuenta la

importancia del tabaco como factor de riesgo para esta enfermedad no es de extrañar la importancia de esta vía a la hora de sufrir una recaída de la enfermedad. No se conoce el número de pacientes que continuaron fumando tras el diagnóstico, pero la mayoría de ellos eran fumadores importantes antes del desarrollo de la enfermedad.

### **2.2. ERCC1 codón 118:**

Al igual que sucede con el resto de polimorfismos estudiados, existen numerosos estudios que intentan conocer la posible asociación de este polimorfismo con el riesgo de cáncer, pero los resultados en los estudios individuales de este polimorfismo no han sido concluyentes. En un meta-análisis realizado por Yuanchun Li et al en 2007<sup>(223)</sup> no encuentran asociación entre este polimorfismo y el riesgo de cáncer. En otro meta-análisis recientemente publicado<sup>(224)</sup>, tampoco encuentran asociación con el riesgo global de cáncer. Sin embargo, en el análisis estratificado sí se observa asociación en población asiática con variantes homocigotas y controles hospitalarios y en la estratificación por tipos de cáncer se encuentra una asociación con el cáncer de pulmón, poniendo de manifiesto, una vez más, la importancia de la raza y la localización tumoral.

En nuestra serie, encontramos un aumento del riesgo de recaída en los pacientes con el genotipo heterocigoto (CT) y homocigoto variante (CC) respecto al homocigoto común (TT), así como una menor mediana de SLE, estadísticamente significativa, según el modelo dominante (CT+CC frente a TT) en los pacientes diagnosticados en estadio localizado. Así, se fortalece la idea de la posible importancia de la vía NER en esta enfermedad.

### **3-. VÍA DE REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA**

En nuestra serie, no hemos encontrado ninguna diferencia significativa en la frecuencia genotípica de XRCC3 Thr241Met para el riesgo de desarrollar la enfermedad, el pronóstico de la misma o la toxicidad secundaria al tratamiento. Sin embargo, sí hemos encontrado una relación estadísticamente significativa ( $p=0,032$ ) entre la variante Met/Met (genotipo TT) del gen XRCC3, con la obtención de respuesta clínica completa tras tratamiento con quimioterapia de



inducción; siguiendo un modelo de herencia recesivo, es decir, precisa tener los dos alelos variantes para obtener este resultado. Al tratarse de un estudio retrospectivo, la mayoría de los casos habían sido tratados con el esquema de cisplatino+ 5-fluorouracilo. En la actualidad, se han añadido taxanos y anti-EGFR, a este esquema de tratamiento, pero el fármaco base sigue siendo el cisplatino.

### **3.1 XRCC3 codón 241:**

Se han realizado múltiples estudios tratando de establecer una posible asociación entre XRCC3 Thr241Met y el riesgo de desarrollar cáncer, nuevamente sin resultados concluyentes, incluso en los metaanálisis publicados. En el que realizaron Manuguerra et al.<sup>(188)</sup> se incluyeron 28 estudios, la mayoría de ellos casos y controles, estadounidenses y europeos; no encontrando asociación entre este polimorfismo con el riesgo de cáncer. Sin embargo, en el realizado por Han et al.<sup>(225)</sup> se incluyeron 48 estudios de casos y controles en los que se analizaba XRCC3Thr241Met en relación con el riesgo de desarrollar diferentes neoplasias, analizándose un total de 24975 individuos con diferentes neoplasias y 34209 controles, encontrando que aquéllos que eran homocigotos para el alelo Met, tenían más riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer ( $p= 0.008$ ,  $OR=1.07$  IC95% 1.02-1.13).

En el metaanálisis de Flores-Obando et al.<sup>(191)</sup> incluyen 10 estudios que analizan este polimorfismo, con un total de 2235 casos y 3601 controles. No se encuentra asociación entre las variante heterocigota, homocigota o combinada de este polimorfismo con el riesgo de cavidad oral, faringe o laringe.

A pesar de la utilización cada vez mayor de las nuevas moléculas dirigidas contra diana, actualmente todavía es imprescindible el uso de fármacos quimioterápicos clásicos. De hecho el cisplatino sigue siendo la base del tratamiento quimioterápico de una gran variedad de tumores, entre ellos el CCC. La citotoxicidad producida por el cisplatino está mediada por la producción de aductos intracatenarios en el ADN y enlaces cruzados intercatenarios. Éstos últimos son particularmente dañinos para la célula porque un solo enlace intercatenario no reparado impide la transcripción y replicación del ADN<sup>(226)</sup>. De este modo, la eficacia del cisplatino puede verse limitada por la activación de los mecanismos de reparación del ADN, los cuales permiten la viabilidad celular al

## DISCUSIÓN

reparar el daño<sup>(227)</sup>. Para la reparación de los enlaces cruzados parece ser que se precisa de la acción combinada de la vía de reparación por escisión de nucleótidos en un primer lugar, seguida de la vía por recombinación homóloga<sup>(228)</sup>.

En nuestro estudio encontramos que los pacientes tratados con QT neoadyuvante basada en cisplatino que presentaban la variante XRCC3-241Met, tenían una mayor probabilidad de presentar respuesta clínica completa. Esta variante se asocia con un aumento significativo de los niveles de aductos en leucocitos de personas sanas<sup>(229)</sup>, lo que implica un déficit en la reparación de los aductos en el ADN, siendo ésta la principal vía de actuación del cisplatino. Por otra parte, diversos estudios realizados con líneas celulares epiteliales sugieren que el aumento de la reparación por recombinación homóloga se asocia con resistencia a fármacos que producen enlaces cruzados intercatenarios y en el estudio realizado por Zhi-Yuan Xu et al demostraron que la sobreexpresión de XRCC3 en células MCF-7 producía un aumento de la supervivencia celular tras el tratamiento con cisplatino con una disminución de la apoptosis inducida por cisplatino<sup>(226)</sup>. Por lo tanto, una disminución en la expresión o un déficit en la función de XRCC3 podrían producir el efecto contrario, es decir, un aumento de sensibilidad al tratamiento con cisplatino.

BRCA1 también está implicado en la vía de recombinación homóloga y actúa como un modulador diferencial de supervivencia en el tratamiento con cisplatino y los agentes antimicrotúbulos<sup>(230)</sup>. Así, BRCA1 produce resistencia a la apoptosis mediada por cisplatino y un aumento de sensibilidad a agentes antimicrotúbulo como el paclitaxel. La inhibición endógena de BRCA1 produce un aumento importante en la resistencia de células de cáncer de mama a la apoptosis inducida por paclitaxel, sugiriendo que los niveles de expresión de BRCA1 son críticos en la mediación de la apoptosis en respuesta a estos agentes quimioterápicos. Esto mismo podría estar sucediendo en nuestros pacientes ya que en nuestro estudio los dos pacientes que no responden a QT neoadyuvante del genotipo TT de XRCC3 son dos tratados con TPF, es decir, con un esquema de quimioterapia en el que se ha añadido un taxano al tratamiento, pudiendo indicar cierta resistencia al taxano de este genotipo.

## DISCUSIÓN

Por otra parte, en un ensayo fase I<sup>(231)</sup> de pacientes con cáncer esofagogástrico avanzado tratados con cisplatino (60 mg/m<sup>2</sup>) día uno, y escalada de dosis con CPT-11(50–70 mg/m<sup>2</sup>)+docetaxel (25–30 mg/m<sup>2</sup>), días 1 y 8, con valoración farmacogenética de varios polimorfismos, obtuvieron una mediana de progresión de 9,7 meses para pacientes con el genotipo Met241Met de XRCC3 versus 8,4 meses para pacientes con Thr241Met y 3,1 meses para aquellos con Thr241Thr (p=0.04), llegando también a la conclusión de que este polimorfismo podría ser un marcador de utilidad para predecir el pronóstico en pacientes tratados con quimioterapia basada en cisplatino. Aunque en este estudio también se incluye un taxano en el esquema de tratamiento, difiere la dosis y el tiempo entre dosis, pudiendo indicar diferente respuesta en función del tipo de planificación.

En un estudio llevado a cabo por M. Quintela-Fandino et al.<sup>(232)</sup>, se valora el papel de los polimorfismos en genes reparadores del ADN ( *ERCC1* (C8092A), Asp312Asn, Lys751Gln y *XRCC1* Arg399Gln) en pacientes diagnosticados de CCC estadio IV no metastásicos, tratados con QT de inducción basada en cisplatino, encontrando una probabilidad casi dos veces mayor de presentar respuesta completa en un paciente con 7 variantes polimórficas respecto a un paciente portador solamente de alelos comunes. En este estudio no se valora el efecto de polimorfismos de la vía de recombinación homóloga, pero nos hace pensar en la importancia de analizar la presencia de variantes genéticas de una manera conjunta.

En función de nuestro estudio no podemos llegar a sacar conclusiones teniendo en cuenta las limitaciones del estudio, fundamentalmente el escaso número de pacientes que no nos permite estratificar por variables importantes como la localización tumoral, el estadio o el esquema de tratamiento realizado. Sin embargo, sí podemos generar la hipótesis de que la vía de recombinación homóloga parece tener un papel importante en la respuesta al tratamiento quimioterápico, siendo necesarios estudios de validación que confirmen estos resultados.

#### 4º CONTROL DEL CICLO CELULAR: polimorfismo en el codón 72 de p53

*TP53* juega un importante papel en el control del ciclo celular, facilitando actividades de reparación del ADN en respuesta al daño. Por eso diversos estudios han evaluado el efecto del polimorfismo en el codón 72 sobre una amplia variedad de cánceres. Muchos de estos estudios han encontrado asociaciones "estadísticamente significativas". Sin embargo, la interpretación de estos estudios está rodeada de múltiples problemas: los principales son una combinación de pequeño tamaño muestral, sesgos de publicaciones y niveles de exigencia inadecuados para la significación estadística<sup>(233)</sup>.

Numerosos meta-análisis combinando datos de múltiples estudios han sido publicados sobre cáncer de mama<sup>(234)</sup>, cáncer gástrico<sup>(235)</sup> o de pulmón<sup>(236)</sup>, y éstos no apoyan el papel de este polimorfismo en el riesgo de desarrollar estos cánceres<sup>(237)</sup>.

En un estudio específico sobre la implicación de esta variable en el desarrollo del cáncer escamoso de cabeza y cuello<sup>(238)</sup>, se estudiaron un total de 304 pacientes de nuevo diagnóstico y 333 controles, todos ellos blancos no hispanos, no encontrando diferencias en la distribución de los genotipos del codón 72 de p53 entre los casos y los controles, al igual que en nuestro estudio. Sin embargo, sí observaron una asociación del alelo prolina con el desarrollo precoz de la enfermedad. Así, la mediana de edad de desarrollo de la enfermedad fue de 59, 56 y 53 años para los genotipos Arg/Arg, Arg/Pro y Pro/Pro, respectivamente ( $p=0.151$  entre los tres genotipos;  $p=0.057$  para Pro/Pro y Arg/Pro combinados vs. Arg/Arg). La mediana de edad para el desarrollo de cánceres de la cavidad oral fue 62, 57 y 51 años para Arg/Arg, Arg/Pro y Pro/Pro, respectivamente ( $p=0.091$  entre los tres genotipos;  $p=0.046$  para Pro/Pro vs. Arg/Arg;  $p=0.066$  para Pro/Pro y Arg/Pro combinados vs. Arg/Arg). En nuestro estudio no observamos una asociación con el desarrollo precoz de la enfermedad, aunque en nuestro caso la comparación se realizó entre pacientes mayores y menores de 50 años y el escaso número de pacientes no nos permitió estratificar por localizaciones, para valorar el riesgo concreto en los pacientes con cáncer de cavidad oral.

En cuanto a la relación de este polimorfismo con la respuesta al tratamiento, se ha observado una mayor tasa de respuestas y supervivencia tras tratamiento

## DISCUSIÓN

con quimioterapia y radioterapia en pacientes con cáncer de mama<sup>(239,240)</sup>, de pulmón<sup>(241)</sup> o de cáncer de cabeza y cuello con el genotipo Arg en el codón 72 de p53, como consecuencia de la inducción de una mayor actividad apoptótica<sup>(242)</sup>. Sin embargo, en un amplio estudio que valoraba la supervivencia global en 619 pacientes con cáncer de pulmón no se encontraron evidencias del efecto de este polimorfismo sobre el pronóstico<sup>(243)</sup>.

En nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la implicación de esta variable con el desarrollo de la enfermedad, la respuesta al tratamiento, pronóstico o toxicidad, pero podría ser como consecuencia del escaso número de pacientes, sobre todo con el genotipo Pro/Pro. A pesar de ello, sí observamos una diferencia cercana a la significación, con una menor mediana de SLE y un mayor riesgo de recaída, en los pacientes que presentan el homocigoto variante (codifica prolina), en los pacientes diagnosticados con enfermedad localizada. Esto podría ser como consecuencia de la menor capacidad apoptótica de esta variable (ver introducción).

En general, los estudios de supervivencia relacionados con polimorfismos de p53 se ven afectados por problemas similares a los descritos para los estudios de asociación con el riesgo de cáncer y no hay grandes estudios, con resultados estadísticamente robustos sobre asociaciones significativas<sup>(237)</sup>.

Como se ha ido comentando a lo largo de la discusión una de las principales limitaciones de nuestro estudio es el tamaño muestral (169 casos y 149 controles) que puede ser insuficiente para detectar algunas diferencias en las frecuencias de los alelos, entre los grupos de casos y controles, y nos dificulta realizar estratificaciones por subgrupos de casos con diferentes características, así como ajustar por un elevado número de variables. Sin embargo, una fortaleza del estudio es que nuestra muestra es homogénea en cuanto al grupo étnico y al sexo, ya que los individuos del estudio de casos y controles son varones de raza blanca. Además, el análisis se ajustó por consumo de tabaco, cosa que la mayoría de las publicaciones al respecto ni siquiera informan sobre el estado de fumador en los casos y controles<sup>(191)</sup>.

## DISCUSIÓN

Debido a que los SNPs son variantes de baja penetrancia, con asociaciones (OR) pequeñas se intentó conseguir los sujetos con las características más extremos, controles mayores y fumadores y casos jóvenes y no fumadores; sin embargo, dada la fuerte asociación de esta enfermedad con el consumo de tabaco prácticamente todos los casos eran fumadores, no pudiendo conseguir más casos de no fumadores para realizar la comparación entre fenotipos extremos.

En relación con el resto de análisis del estudio, vuelve a aparecer de nuevo el tamaño muestral como una de las principales limitaciones, sobre todo teniendo en cuenta la necesidad de hacer el análisis por subgrupos por ejemplo, en pacientes con estadios localizados o avanzados en el caso del pronóstico; o en función del tratamiento para valorar el posible papel predictivo de respuesta o toxicidad de los polimorfismos estudiados.

Por otra parte, al tratarse de un estudio retrospectivo, es más susceptible a la introducción de sesgos (tanto en la selección de los grupos como en la recogida de la información). El uso de casos prevalentes, en lugar de incidentes, puede dar lugar a un error sistemático de supervivencia selectiva, pudiendo no ser representativos de todos los casos. Del mismo modo, al incluir controles hospitalarios, puede que no sean representativos de la población general.

Además, no se conoce los pacientes que podrían tener la enfermedad como consecuencia de la infección por el VPH.

Respecto a la relación de los polimorfismos estudiados con la aparición de toxicidad secundaria al tratamiento en nuestro estudio no encontramos ningún resultado estadísticamente significativo, con ninguno de los genotipos analizados, en relación con la toxicidad. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, puede ser consecuencia del pequeño tamaño muestral, al ser necesario realizar el análisis por subgrupos de tratamiento homogéneos.

En este sentido, es importante tener en cuenta que la importancia de decidir el tratamiento de manera individualizada para estos pacientes no radica exclusivamente en la SLE o supervivencia global, sino que la morbilidad secundaria al tratamiento afecta de una manera importante a la calidad de vida de

## DISCUSIÓN

estos pacientes tanto desde un punto de vista del aspecto físico como funcional (disfonía, disfagia, xerostomía); siendo necesario aplicar el tratamiento más adecuado en cada caso, intentando conseguir la máxima eficacia con la menor toxicidad posible.

Existen pocos estudios que relacionen diferentes polimorfismos con la aparición de toxicidad, y ninguno de ellos en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Por lo tanto, sigue siendo necesaria la realización de estudios que permitan valorar estos aspectos.

## CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica de las diferentes variantes de los genes reparadores del ADN estudiados, ni en el codón 72 de p53, entre el grupo de casos y controles.
2. En nuestra serie, el genotipo AA de XRCC1 (rs25487) se asocia con el desarrollo de la enfermedad antes de los 51 años de edad, pudiendo sugerir cierta susceptibilidad genética para el desarrollo de la enfermedad a una edad temprana.
3. En este estudio, las variantes de XPD (rs13181) y de ERCC1 (rs11615) se asocian con una menor supervivencia libre de enfermedad de una manera significativa, lo que podría indicar la importancia de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) en este tipo de tumores.
4. En nuestra serie, el ser portador del genotipo TT de XRCC3 (rs861539) se asocia con una mayor probabilidad de respuesta completa tras el tratamiento con quimioterapia de inducción, lo que podría mostrar cierto papel de este polimorfismo en la respuesta al tratamiento quimioterápico basado en platinos.
5. En el presente trabajo, ninguno de los polimorfismos estudiados se ha asociado con el riesgo de sufrir interrupciones del tratamiento durante la quimioterapia neoadyuvante con cisplatino+5-fluorouracilo secundarias a toxicidad, ni con la aparición de mucositis o dermatitis producidas por el tratamiento radioterápico.



## REFERENCIAS

1. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours. 7ª ed. Blackwell Publishing Ltd; 2010.
2. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*. 15 de diciembre de 2010;127(12):2893-917.
3. Lopez-Abente,G, M Pollan, N Aragones, B Perez-Gomez, V Hernandez-Barrera, V Lope. La situación del cáncer en España. Madrid: Ministerio Sanidad y Consumo de España; 2005.
4. A. Cabanes, B. Pérez-Gómez, N. Aragonés, M. Pollán, G. López-Abente. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2009.
5. Regidor E, Gutiérrez-Fisac JL, de los Santos I, Chaso M, Fernández E. Trends in principal cancer risk factors in Spain. *Ann. Oncol.* mayo de 2010;21 Suppl 3:iii37-42.
6. Izarzugaza MI, Ardanaz E, Chirlaque MD, Font C, Ameijide A, Linares C. Tobacco-related tumours of the lung, bladder and larynx: changes in Spain. *Ann. Oncol.* mayo de 2010;21 Suppl 3:iii52-60.
7. SEOM. Boletín N°66. Reportaje: Cifras del Cáncer en España. 2010.
8. Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, López-Campos JL, Vigil E. Lung cancer mortality trends by geographical area in Spanish women, 1980-2005. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* abril de 2008;12(4):453-7.
9. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* abril de 2005;55(2):74-108.
10. Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin. Oncol.* diciembre de 2004;31(6):726-33.
11. Wynder EL, Bross IJ, Feldman RM. A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer.* diciembre de 1957;10(6):1300-23.
12. Hammond EC, Horn D. Smoking and death rates; report on forty-four months of follow-up of 187,783 men. II. Death rates by cause. *J Am Med Assoc.* 15 de marzo de 1958;166(11):1294-308.
13. Zhu K, Levine RS, Brann EA, Hall HI, Caplan LS, Gnepp DR. Case-control study evaluating the homogeneity and heterogeneity of risk factors between sinonasal and nasopharyngeal cancers. *Int. J. Cancer.* 1 de mayo de 2002;99(1):119-23.
14. Moore C, Catlin D. Anatomic origins and locations of oral cancer. *Am. J. Surg.* octubre de 1967;114(4):510-3.
15. Scully C, Bedi R. Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncol.* septiembre de 2000;1(1):37-42.
16. Chapman S. Australian bar worker wins payout in passive smoking case. *BMJ.* 12 de mayo de 2001;322(7295):1139.

## REFERENCIAS

17. Maier H, Sennewald E, Heller GF, Weidauer H. Chronic alcohol consumption--the key risk factor for pharyngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* febrero de 1994;110(2):168-73.
18. Gallegos-Hernández JF. El cáncer de cabeza y cuello. Factores de riesgo y prevención. *Cir Ciruj.* 2006;74:287-93.
19. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002;52:195-215.
20. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Barón AE, Negri E, Bidoli E, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res.* 15 de octubre de 1990;50(20):6502-7.
21. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 30 de enero de 2001;98(3):1218-23.
22. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, et al. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res.* 1 de enero de 1998;58(1):5-13.
23. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 20 de diciembre de 1989;8(13):4099-105.
24. Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope.* julio de 1998;108(7):1098-103.
25. Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, et al. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin. Cancer Res.* abril de 2002;8(4):1093-100.
26. 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.* julio de 2003;9(7):2620-6.
27. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 12 de abril de 2001;344(15):1125-31.
28. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J. Natl. Cancer Inst.* 4 de noviembre de 1998;90(21):1626-36.
29. Sinha P, Logan HL, Mendenhall WM. Human papillomavirus, smoking, and head and neck cancer. *Am J Otolaryngol.* febrero de 2012;33(1):130-6.
30. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer.* enero de 2011;11(1):9-22.
31. Walter MA, Menarguez-Palanca J, Peiper SC. Epstein-Barr virus detection in neck metastases by polymerase chain reaction. *Laryngoscope.* mayo de 1992;102(5):481-5.

## REFERENCIAS

32. Pavia M, Pileggi C, Nobile CGA, Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am. J. Clin. Nutr.* mayo de 2006;83(5):1126-34.
33. Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S, Monnier P. Food groups and risk of oral and pharyngeal cancer. *Int. J. Cancer.* 31 de agosto de 1998;77(5):705-9.
34. Schantz SP, Zhang ZF, Spitz MS, Sun M, Hsu TC. Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity. *Laryngoscope.* junio de 1997;107(6):765-81.
35. Shangina O, Brennan P, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabiánová E, Fletcher T, et al. Occupational exposure and laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and eastern Europe. *Am. J. Epidemiol.* 15 de agosto de 2006;164(4):367-75.
36. Ko JY, Chen CL, Lui LT, Hsu MM. Radiation-induced malignant fibrous histiocytoma in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* mayo de 1996;122(5):535-8.
37. Preston-Martin S, Thomas DC, White SC, Cohen D. Prior exposure to medical and dental x-rays related to tumors of the parotid gland. *J. Natl. Cancer Inst.* 17 de agosto de 1988;80(12):943-9.
38. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* febrero de 1995;121(2):157-60.
39. Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA. Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *BMJ.* 21 de septiembre de 1996;313(7059):716-21.
40. Jefferies S, Eeles R, Goldgar D, A'Hern R, Henk JM, Gore M. The role of genetic factors in predisposition to squamous cell cancer of the head and neck. *Br. J. Cancer.* febrero de 1999;79(5-6):865-7.
41. Li C, Wang L-E, Wei Q. DNA repair phenotype and cancer susceptibility--a mini review. *Int. J. Cancer.* 1 de marzo de 2009;124(5):999-1007.
42. David Sidransky. Cancer of Head and Neck. En DeVita, Hellman, and Rosenberg's. *Cancer: Principles & Practice of Oncology.* 8ª Ed. Philadelphia: Lippincott; 2008. p. 799-809.
43. Fonseca E. Factores de riesgo e historia natural del cancer de cabeza y cuello. En Diaz Rubio E. *Monografías de oncología médica.* Madrid: You & Us; 2005. p. 3-14.
44. El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am. J. Gastroenterol.* julio de 2001;96(7):2013-8.
45. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 7 de enero de 2000;100(1):57-70.
46. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.

## REFERENCIAS

47. 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.* 1 de junio de 1996;56(11):2488-92.
48. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* septiembre de 1953;6(5):963-8.
49. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer.* enero de 2011;11(1):9-22.
50. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin. Cancer Res.* junio de 2001;7(6):1523-32.
51. Tabor MP, Braakhuis BJM, van der Wal JE, van Diest PJ, Leemans CR, Brakenhoff RH, et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *J. Pathol.* marzo de 2003;199(3):354-60.
52. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Kummer JA, Leemans CR, Braakhuis BJM. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. *Clin. Cancer Res.* 1 de junio de 2004;10(11):3607-13.
53. Schaaij-Visser TBM, Graveland AP, Gauci S, Braakhuis BJM, Buijze M, Heck AJR, et al. Differential Proteomics Identifies Protein Biomarkers That Predict Local Relapse of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 15 de diciembre de 2009;15(24):7666-75.
54. Van Houten VMM, Tabor MP, van den Brekel MWM, Kummer JA, Denkers F, Dijkstra J, et al. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J. Pathol.* diciembre de 2002;198(4):476-86.
55. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Rigante M, Artuso A, et al. Multistep laryngeal carcinogenesis helps our understanding of the field cancerization phenomenon: a review. *Eur. J. Cancer.* noviembre de 2004;40(16):2383-8.
56. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Int.* 2007;7:2.
57. Poh CF, Zhang L, Anderson DW, Durham JS, Williams PM, Priddy RW, et al. Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 15 de noviembre de 2006;12(22):6716-22.
58. Roblyer D, Kurachi C, Stepanek V, Williams MD, El-Naggar AK, Lee JJ, et al. Objective detection and delineation of oral neoplasia using autofluorescence imaging. *Cancer Prev Res (Phila).* mayo de 2009;2(5):423-31.
59. Braakhuis BJM, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck.* febrero de 2002;24(2):198-206.

## REFERENCIAS

60. Cruz Hernández JJ, Rodríguez Sánchez CA, Fonseca Sánchez E, del Barco Morillo E. Diagnóstico de confirmación. En E. Díaz-Rubio. Cáncer de cabeza y cuello. Manuales prácticos. Madrid: Arán; 2007. p. 25-30.
61. Cruz Hernández JJ, Fonseca Sánchez E, Rodríguez Sánchez CA, del Barco Morillo E. Cáncer de cabeza y cuello: generalidades. En Hernán Cortés-Funes, Ramon Colomer Bosch. Tratado de Oncología Tomo II. 2ª ed. Barcelona: P. Permanyer; 2009. p. 155-67.
62. JJ. Cruz Hernández, Manuel de las Heras González. Cáncer de cabeza y cuello. Modelo de tratamiento interdisciplinario. En Eduardo Díaz-Rubio: Tumores de cabeza y cuello. Madrid: YOU & US, S.A.; 2009. p. 1-20.
63. Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G, Muwonge R, Thara S, Mathew B, et al. Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet*. 4 de junio de 2005;365(9475):1927-33.
64. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 17 de mayo de 2008;371(9625):1695-709.
65. E. del Barco Morillo, C.A. Rodríguez Sánchez. Cáncer de cabeza y cuello. En J.J. Cruz Hernández, C.A. Rodríguez Sánchez, E. del Barco Morillo. *Oncología Clínica*. 4ª ed. Madrid: Nova Sidonia; 2008. p. 391-418.
66. Javier Martínez Trufero. Hacia un tratamiento personalizado en carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. En Ricard Mesía Nin. Abordaje multidisciplinar del cáncer de cabeza y cuello. Una visión real para el siglo XXI. Madrid: YOU & US, S.A; 2010. p. 73-92.
67. Devaney KO, Ferlito A, Rinaldo A, El-Naggar AK, Barnes L. Verrucous carcinoma (carcinoma cuniculatum) of the head and neck: what do we know now that we did not know a decade ago? *Eur Arch Otorhinolaryngol*. abril de 2011;268(4):477-80.
68. Thariat J, Badoual C, Faure C, de Mones E, Butori C, Santini J, et al. [Basaloid squamous cell carcinomas of the head and neck]. *Bull Cancer*. octubre de 2009;96(10):989-1004.
69. Cosme Ereño Zárate. La nueva clasificación de la O.M.S. 2005. Lesiones precursoras y los tumores de la laringe, hipofaringe y tráquea. *Rev Esp Patol*. 2007;40(1):3-10.
70. Russell JO, Hoschar AP, Scharpf J. Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: a clinicopathologic series. *Am J Otolaryngol*. diciembre de 2011;32(6):557-63.
71. Stephen B. Edge, David R. Byrd, Carolyn C. Compton, April G. Fritz, Frederick L. Greene, Andy Trotti. Purposes and Principles of Cancer Staging. En American Joint Committee on Cancer. *Cancer Staging Handbook from the AJCC Cancer Staging Manual*. 7ª ed. Nueva York: Springer; 2010. p. 3-25.
72. Stephen B. Edge, David R. Byrd, Carolyn C. Compton, April G. Fritz, Frederick L. Greene, Andy Trotti. Head and Neck. En American Joint Committee on Cancer. *Cancer Staging Handbook from the AJCC Cancer Staging Manual*. 7ª ed. Nueva York: Springer; 2010. p. 39-126.
73. Derks W, de Leeuw JRJ, Hordijk GJ, Winnubst JAM. Reasons for non-standard treatment in elderly patients with advanced head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. enero de 2005;262(1):21-6.

## REFERENCIAS

74. Zigon G, Berrino F, Gatta G, Sánchez M-J, van Dijk B, Van Eycken E, et al. Prognoses for head and neck cancers in Europe diagnosed in 1995-1999: a population-based study. *Ann. Oncol.* enero de 2011;22(1):165-74.
75. Friedland PL, Bozic B, Dewar J, Kuan R, Meyer C, Phillips M. Impact of multidisciplinary team management in head and neck cancer patients. *Br. J. Cancer.* 12 de abril de 2011;104(8):1246-8.
76. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 21 de enero de 1993;328(3):184-94.
77. Calais G, Alfonsi M, Bardet E, Sire C, Germain T, Bergerot P, et al. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 15 de diciembre de 1999;91(24):2081-6.
78. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winkvist E, Gorbounova V, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 25 de octubre de 2007;357(17):1705-15.
79. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 25 de octubre de 2007;357(17):1695-704.
80. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 9 de febrero de 2006;354(6):567-78.
81. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 11 de septiembre de 2008;359(11):1116-27.
82. C. Guillén-Ponce, M.J. Molina Garrido, A. Carrato Mena. Cisplatino y análogos. En Eduardo Díaz-Rubio, Pedro Pérez-Segura. *Oncomecum 2011*. 4ª ed. Barcelona: P. Permanyer; 2011. p. 33-56.
83. C. Peña Sánchez. Toxicidad en el área de O.R.L. Tipos de toxicidad y escalas de valoración. *Oncología.* 2005;28(2):60-5.
84. Wayte N, Da Silva L, Chenevix-Trench G, Lakhani SR. What's in a cancer syndrome? Genes, phenotype and pathology. *Pathology.* abril de 2008;40(3):247-59.
85. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science.* 21 de diciembre de 1990;250(4988):1684-9.
86. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science.* 30 de septiembre de 1994;265(5181):2088-90.
87. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature.* 13 de agosto de 1987;328(6131):614-6.

## REFERENCIAS

88. Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat. Genet.* noviembre de 1993;5(3):279-82.
89. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science.* 7 de mayo de 1993;260(5109):810-2.
90. Ana Osorio Cabrero. Genes de baja penetrancia y cáncer. En *Cáncer hereditario II edición*. Madrid: Sociedad Española de Oncología Médica; 2010. p. 199-215.
91. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 15 de febrero de 2001;409(6822):860-921.
92. Reich DE, Gabriel SB, Altshuler D. Quality and completeness of SNP databases. *Nat. Genet.* abril de 2003;33(4):457-8.
93. Hayden EC. International genome project launched. *Nature.* 24 de enero de 2008;451(7177):378-9.
94. Ding C, Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping. *Methods Mol. Biol.* 2009;578:245-54.
95. Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, et al. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst.)*. 2 de noviembre de 2004;3(11):1389-407.
96. Hanawalt PC. Four decades of DNA repair: from early insights to current perspectives. *Biochimie.* noviembre de 2003;85(11):1043-52.
97. Sarasin A, Monier R. DNA repair pathways and associated human diseases. *Biochimie.* noviembre de 2003;85(11):1041.
98. Cleaver JE. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat. Rev. Cancer.* julio de 2005;5(7):564-73.
99. Krokan HE, Kavli B, Slupphaug G. Novel aspects of macromolecular repair and relationship to human disease. *J. Mol. Med.* mayo de 2004;82(5):280-97.
100. Ding J, Miao Z-H, Meng L-H, Geng M-Y. Emerging cancer therapeutic opportunities target DNA-repair systems. *Trends Pharmacol. Sci.* junio de 2006;27(6):338-44.
101. Z. Miao y J. Ding. Mecanismos de reparación del DNA y enfoques terapéuticos afines. En J. García-Foncillas. *Biología molecular en cáncer. Aproximación a las nuevas terapias*. Barcelona: Prous Science; 2009. p. 645-62.
102. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004;73:39-85.
103. McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol.* agosto de 2001;2(8):483-90.

## REFERENCIAS

104. Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie*. noviembre de 2003;85(11):1053-71.
105. Almeida KH, Sobol RW. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst.)*. 1 de junio de 2007;6(6):695-711.
106. Thompson LH, West MG. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat. Res*. 16 de febrero de 2000;459(1):1-18.
107. Fan J, Wilson DM 3rd. Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. *Free Radic. Biol. Med*. 1 de mayo de 2005;38(9):1121-38.
108. Ginsberg G, Angle K, Guyton K, Sonawane B. Polymorphism in the DNA repair enzyme XRCC1: utility of current database and implications for human health risk assessment. *Mutat. Res*. abril de 2011;727(1-2):1-15.
109. Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst.)*. 18 de septiembre de 2003;2(9):955-69.
110. Mortusewicz O, Leonhardt H. XRCC1 and PCNA are loading platforms with distinct kinetic properties and different capacities to respond to multiple DNA lesions. *BMC Mol. Biol*. 2007;8:81.
111. Horton JK, Watson M, Stefanick DF, Shaughnessy DT, Taylor JA, Wilson SH. XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Res*. enero de 2008;18(1):48-63.
112. Sterpone S, Cozzi R. Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids*. 2010;2010.
113. Tebbs RS, Flannery ML, Meneses JJ, Hartmann A, Tucker JD, Thompson LH, et al. Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev. Biol*. 15 de abril de 1999;208(2):513-29.
114. Shen MR, Zdzienicka MZ, Mohrenweiser H, Thompson LH, Thelen MP. Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair. *Nucleic Acids Res*. 15 de febrero de 1998;26(4):1032-7.
115. Walter CA, Lu J, Bhakta M, Zhou ZQ, Thompson LH, McCarrey JR. Testis and somatic Xrcc-1 DNA repair gene expression. *Somat. Cell Mol. Genet*. noviembre de 1994;20(6):451-61.
116. Monaco R, Rosal R, Dolan MA, Pincus MR, Brandt-Rauf PW. Conformational effects of a common codon 399 polymorphism on the BRCT1 domain of the XRCC1 protein. *Protein J*. diciembre de 2007;26(8):541-6.
117. Bhakat KK, Mantha AK, Mitra S. Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein. *Antioxid. Redox Signal*. marzo de 2009;11(3):621-38.



## REFERENCIAS

118. Tell G, Fantini D, Quadrifoglio F. Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* noviembre de 2010;67(21):3589-608.
119. Robson CN, Hochhauser D, Craig R, Rack K, Buckle VJ, Hickson ID. Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localisation to chromosome 14q 11.2-12. *Nucleic Acids Res.* 11 de septiembre de 1992;20(17):4417-21.
120. Xanthoudakis S, Smeyne RJ, Wallace JD, Curran T. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 20 de agosto de 1996;93(17):8919-23.
121. Xi T, Jones IM, Mohrenweiser HW. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. *Genomics.* junio de 2004;83(6):970-9.
122. Hadi MZ, Coleman MA, Fidelis K, Mohrenweiser HW, Wilson DM 3rd. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res.* 15 de octubre de 2000;28(20):3871-9.
123. Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ. Health Perspect.* noviembre de 2003;111(15):1843-50.
124. Costa RMA, Chiganças V, Galhardo R da S, Carvalho H, Menck CFM. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.* noviembre de 2003;85(11):1083-99.
125. Leibel D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. *J. Mol. Histol.* septiembre de 2006;37(5-7):225-38.
126. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004;73:39-85.
127. Leibel D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. *J. Mol. Histol.* septiembre de 2006;37(5-7):225-38.
128. Mellon I. Transcription-coupled repair: a complex affair. *Mutat. Res.* 4 de septiembre de 2005;577(1-2):155-61.
129. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 17 de mayo de 2001;411(6835):366-74.
130. Subba Rao K. Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* marzo de 2007;3(3):162-72.
131. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer.* octubre de 2001;1(1):22-33.
132. Reed SH. Nucleotide excision repair in chromatin: the shape of things to come. *DNA Repair (Amst.).* 28 de julio de 2005;4(8):909-18.
133. E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz, T. Ellenberger. *DNA Repair and Mutagenesis.* 2ª ed. Washintong, DC: ASM Press; 2006.

## REFERENCIAS

134. Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, et al. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J.* 15 de mayo de 1994;13(10):2388-92.
135. De Boer J, Donker I, de Wit J, Hoeijmakers JH, Weeda G. Disruption of the mouse xeroderma pigmentosum group D DNA repair/basal transcription gene results in preimplantation lethality. *Cancer Res.* 1 de enero de 1998;58(1):89-94.
136. Broughton BC, Steingrimsdottir H, Lehmann AR. Five polymorphisms in the coding sequence of the xeroderma pigmentosum group D gene. *Mutat. Res.* 15 de febrero de 1996;362(2):209-11.
137. Clarkson SG, Wood RD. Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal. *DNA Repair (Amst.).* 28 de septiembre de 2005;4(10):1068-74.
138. Monaco R, Rosal R, Dolan MA, Pincus MR, Freyer G, Brandt-Rauf PW. Conformational effects of a common codon 751 polymorphism on the C-terminal domain of the xeroderma pigmentosum D protein. *J Carcinog.* 2009;8:12.
139. Manuguerra M, Saletta F, Karagas MR, Berwick M, Veglia F, Vineis P, et al. XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 15 de agosto de 2006;164(4):297-302.
140. Wilson MD, Ruttan CC, Koop BF, Glickman BW. ERCC1: a comparative genomic perspective. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001;38(2-3):209-15.
141. Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, et al. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell.* 6 de septiembre de 1996;86(5):811-22.
142. Van Duin M, Koken MH, van den Tol J, ten Dijke P, Odijk H, Westerveld A, et al. Genomic characterization of the human DNA excision repair gene ERCC-1. *Nucleic Acids Res.* 25 de noviembre de 1987;15(22):9195-213.
143. Trask B, Fertitta A, Christensen M, Youngblom J, Bergmann A, Copeland A, et al. Fluorescence in situ hybridization mapping of human chromosome 19: cytogenetic band location of 540 cosmids and 70 genes or DNA markers. *Genomics.* enero de 1993;15(1):133-45.
144. Weeda G, Donker I, de Wit J, Morreau H, Janssens R, Vissers CJ, et al. Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr. Biol.* 1 de junio de 1997;7(6):427-39.
145. McWhir J, Selfridge J, Harrison DJ, Squires S, Melton DW. Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nat. Genet.* noviembre de 1993;5(3):217-24.
146. Cheng L, Spitz MR, Hong WK, Wei Q. Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis.* agosto de 2000;21(8):1527-30.

## REFERENCIAS

147. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Wei Q. Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 15 de enero de 2002;94(2):393-7.
148. Lin MF, Kheradpour P, Washietl S, Parker BJ, Pedersen JS, Kellis M. Locating protein-coding sequences under selection for additional, overlapping functions in 29 mammalian genomes. *Genome Res*. noviembre de 2011;21(11):1916-28.
149. Yu JJ, Lee KB, Mu C, Li Q, Abernathy TV, Bostick-Bruton F, et al. Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int. J. Oncol*. marzo de 2000;16(3):555-60.
150. Park DJ, Zhang W, Stoehlmacher J, Tsao-Wei D, Groshen S, Gil J, et al. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol*. marzo de 2003;1(3):162-6.
151. Karagiannis TC, El-Osta A. Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci*. septiembre de 2004;61(17):2137-47.
152. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem*. 2004;73:39-85.
153. Dudás A, Chovanec M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat. Res*. marzo de 2004;566(2):131-67.
154. Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst.)*. 1 de julio de 2007;6(7):923-35.
155. Hefferin ML, Tomkinson AE. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst.)*. 8 de junio de 2005;4(6):639-48.
156. Burma S, Chen BPC, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst.)*. 8 de septiembre de 2006;5(9-10):1042-8.
157. Pastwa E, Błasiak J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim. Pol*. 2003;50(4):891-908.
158. Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, Scheerer JB, Siciliano MJ, Hwang M, et al. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 3 de julio de 1995;92(14):6354-8.
159. Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, Schild D, Tucker JD, Shen MR, et al. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol. Cell*. mayo de 1998;1(6):783-93.
160. Brenneman MA, Weiss AE, Nickoloff JA, Chen DJ. XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat. Res*. 20 de marzo de 2000;459(2):89-97.

## REFERENCIAS

161. Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ. Health Perspect.* noviembre de 2003;111(15):1843-50.
162. Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis.* septiembre de 2001;22(9):1437-45.
163. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 16 de noviembre de 2000;408(6810):307-10.
164. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* abril de 2007;8(4):275-83.
165. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* agosto de 2004;10(8):789-99.
166. Malkin D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* abril de 1993;66(2):83-92.
167. Whibley C, Pharoah PDP, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat. Rev. Cancer.* febrero de 2009;9(2):95-107.
168. Puente XS, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Bertranpetit J, King M-C, López-Otín C. Comparative analysis of cancer genes in the human and chimpanzee genomes. *BMC Genomics.* 2006;7:15.
169. Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene.* 18 de agosto de 1997;15(8):887-98.
170. Toledo F, Lee CJ, Krummel KA, Rodewald L-W, Liu C-W, Wahl GM. Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Mol. Cell. Biol.* febrero de 2007;27(4):1425-32.
171. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 24 de diciembre de 1996;93(26):15335-40.
172. Roth J, Koch P, Contente A, Dobbelstein M. Tumor-derived mutations within the DNA-binding domain of p53 that phenotypically resemble the deletion of the proline-rich domain. *Oncogene.* 30 de marzo de 2000;19(14):1834-42.
173. Dumont P, Leu JI-J, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* marzo de 2003;33(3):357-65.
174. Grochola LF, Zeron-Medina J, Mériaux S, Bond GL. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* mayo de 2010;2(5):a001032.
175. Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP. A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene.* 30 de octubre de 1988;70(2):245-52.

## REFERENCIAS

176. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell. Biol.* febrero de 1999;19(2):1092-100.
177. Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene.* 22 de abril de 2004;23(19):3328-37.
178. Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int. J. Cancer.* 10 de enero de 2004;108(2):196-9.
179. Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breyssens H, Bisso A, et al. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat. Genet.* octubre de 2006;38(10):1133-41.
180. Rangel-López A, Piña-Sánchez P, Salcedo M. [Genetic variations of the tumor suppressor TP53: outstanding and strategies of analysis]. *Rev. Invest. Clin.* junio de 2006;58(3):254-64.
181. Tsigris C, Chatzitheofylaktou A, Xiromeritis C, Nikiteas N, Yannopoulos A. Genetic association studies in digestive system malignancies. *Anticancer Res.* octubre de 2007;27(5B):3577-87.
182. Wünsch Filho V, Zago MA. Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment. *Rev Saude Publica.* junio de 2005;39(3):490-7.
183. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* diciembre de 2002;11(12):1513-30.
184. Dumont P, Leu JI-J, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* marzo de 2003;33(3):357-65.
185. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. [Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gac Sanit.* agosto de 2005;19(4):333-41.
186. Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J.* 20 de febrero de 2008;27(4):589-605.
187. Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* julio de 2005;14(7):1810-8.
188. Manuguerra M, Saletta F, Karagas MR, Berwick M, Veglia F, Vineis P, et al. XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 15 de agosto de 2006;164(4):297-302.
189. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat. Rev. Genet.* febrero de 2001;2(2):91-9.
190. Li Y, Gu S, Wu Q, Li Y, Fu X, Mao Y, et al. No association of ERCC1 C8092A and T19007C polymorphisms to cancer risk: a meta-analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* septiembre de 2007;15(9):967-73.

## REFERENCIAS

191. Flores-Obando RE, Gollin SM, Ragin CC. Polymorphisms in DNA damage response genes and head and neck cancer risk. *Biomarkers*. agosto de 2010;15(5):379-99.
192. Hopkins J, Cescon DW, Tse D, Bradbury P, Xu W, Ma C, et al. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* marzo de 2008;17(3):490-9.
193. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* diciembre de 2002;11(12):1513-30.
194. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*. noviembre de 1999;20(11):2125-9.
195. Olshan AF, Watson MA, Weissler MC, Bell DA. XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Lett.* 25 de abril de 2002;178(2):181-6.
196. Li C, Hu Z, Lu J, Liu Z, Wang L-E, El-Naggar AK, et al. Genetic polymorphisms in DNA base-excision repair genes ADPRT, XRCC1, and APE1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 15 de agosto de 2007;110(4):867-75.
197. Gawecki W, Kostrzewska-Poczekaj M, Gajecka M, Milecki P, Szyfter K, Szyfter W. The role of genetic factor in etiopathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck in young adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* diciembre de 2007;264(12):1459-65.
198. Schantz SP, Liu FJ. An immunologic profile of young adults with head and neck cancer. *Cancer*. 15 de septiembre de 1989;64(6):1232-7.
199. Donald PJ. Marijuana smoking--possible cause of head and neck carcinoma in young patients. *Otolaryngol Head Neck Surg.* abril de 1986;94(4):517-21.
200. Lefèbvre JL, Vankemmel B, Adenis L, Buisset E, Demaille A. [Carcinomas of the upper aerodigestive tract before age 40 (excluding children). Apropos of 100 cases]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 1987;104(2):89-92.
201. Kostrzewska-Poczekaj M, Gawęcki W, Illmer J, Rydzanicz M, Gajecka M, Szyfter W, et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck in young adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* enero de 2013;270(1):271-6.
202. Kostrzewska-Poczekaj M, Gawęcki W, Illmer J, Rydzanicz M, Gajecka M, Szyfter W, et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck in young adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* enero de 2013;270(1):271-6.
203. Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res.* 1 de junio de 1999;59(11):2557-61.
204. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.* 16 de octubre de 2000;159(1):63-71.

## REFERENCIAS

205. Lei Y-C, Hwang S, Chang C-C, Kuo H-W, Luo J-C, Chang MJW, et al. Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mutat. Res.* 26 de agosto de 2002;519(1-2):93-101.
206. Zhou W, Liu G, Miller DP, Thurston SW, Xu LL, Wain JC, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* abril de 2003;12(4):359-65.
207. Ito H, Matsuo K, Hamajima N, Mitsudomi T, Sugiura T, Saito T, et al. Gene-environment interactions between the smoking habit and polymorphisms in the DNA repair genes, APE1 Asp148Glu and XRCC1 Arg399Gln, in Japanese lung cancer risk. *Carcinogenesis.* agosto de 2004;25(8):1395-401.
208. Li C, Liu Z, Wang L-E, Strom SS, Lee JE, Gershenwald JE, et al. Genetic variants of the ADPRT, XRCC1 and APE1 genes and risk of cutaneous melanoma. *Carcinogenesis.* septiembre de 2006;27(9):1894-901.
209. Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stangeland L, et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis.* marzo de 2006;27(3):560-7.
210. Terry PD, Umbach DM, Taylor JA. APE1 genotype and risk of bladder cancer: evidence for effect modification by smoking. *Int. J. Cancer.* 15 de junio de 2006;118(12):3170-3.
211. Chen L, Ambrosone CB, Lee J, Sellers TA, Pow-Sang J, Park JY. Association between polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and APE1, and the risk of prostate cancer in white and black Americans. *J. Urol.* enero de 2006;175(1):108-112; discussion 112.
212. Monaco R, Rosal R, Dolan MA, Pincus MR, Freyer G, Brandt-Rauf PW. Conformational effects of a common codon 751 polymorphism on the C-terminal domain of the xeroderma pigmentosum D protein. *J. Carcinog.* 2009;8:12.
213. Wolfe KJ, Wickliffe JK, Hill CE, Paolini M, Ammenheuser MM, Abdel-Rahman SZ. Single nucleotide polymorphisms of the DNA repair gene XPD/ERCC2 alter mRNA expression. *Pharmacogenet. Genomics.* noviembre de 2007;17(11):897-905.
214. Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CI, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res.* 15 de febrero de 2001;61(4):1354-7.
215. Benhamou S, Sarasin A. ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 1 de enero de 2005;161(1):1-14.
216. Vineis P, Manuguerra M, Kavvoura FK, Guarrera S, Allione A, Rosa F, et al. A field synopsis on low-penetrance variants in DNA repair genes and cancer susceptibility. *J. Natl. Cancer Inst.* 7 de enero de 2009;101(1):24-36.
217. Kiyohara C, Yoshimasu K. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int J Med Sci.* 2007;4(2):59-71.
218. Wang F, Chang D, Hu F, Sui H, Han B, Li D, et al. DNA repair gene XPD polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 56 case-control studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* marzo de 2008;17(3):507-17.

## REFERENCIAS

219. An J, Liu Z, Hu Z, Li G, Wang L-E, Sturgis EM, et al. Potentially functional single nucleotide polymorphisms in the core nucleotide excision repair genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* agosto de 2007;16(8):1633-8.
220. Azad AK, Bairati I, Samson E, Cheng D, Mirshams M, Qiu X, et al. Validation of genetic sequence variants as prognostic factors in early-stage head and neck squamous cell cancer survival. *Clin. Cancer Res.* 1 de enero de 2012;18(1):196-206.
221. Zhong S, Nukui T, Buch S, Diergaard B, Weissfeld LA, Grandis J, et al. Effects of ERCC2 Lys751Gln (A35931C) and CCND1 (G870A) polymorphism on outcome of advanced-stage squamous cell carcinoma of the head and neck are treatment dependent. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* noviembre de 2011;20(11):2429-37.
222. Bradbury PA, Kulke MH, Heist RS, Zhou W, Ma C, Xu W, et al. Cisplatin pharmacogenetics, DNA repair polymorphisms, and esophageal cancer outcomes. *Pharmacogenet. Genomics.* agosto de 2009;19(8):613-25.
223. Li Y, Gu S, Wu Q, Li Y, Fu X, Mao Y, et al. No association of ERCC1 C8092A and T19007C polymorphisms to cancer risk: a meta-analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* septiembre de 2007;15(9):967-73.
224. Zhang L, Wang J, Xu L, Zhou J, Guan X, Jiang F, et al. Nucleotide excision repair gene ERCC1 polymorphisms contribute to cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mutagenesis.* enero de 2012;27(1):67-76.
225. Han S, Zhang H-T, Wang Z, Xie Y, Tang R, Mao Y, et al. DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case-control studies. *Eur. J. Hum. Genet.* octubre de 2006;14(10):1136-44.
226. Xu Z-Y, Loignon M, Han F-Y, Panasci L, Aloyz R. Xrcc3 induces cisplatin resistance by stimulation of Rad51-related recombinational repair, S-phase checkpoint activation, and reduced apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* agosto de 2005;314(2):495-505.
227. Ding J, Miao Z-H, Meng L-H, Geng M-Y. Emerging cancer therapeutic opportunities target DNA-repair systems. *Trends Pharmacol. Sci.* junio de 2006;27(6):338-44.
228. McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol.* agosto de 2001;2(8):483-90.
229. Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis.* septiembre de 2001;22(9):1437-45.
230. Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1 de octubre de 2003;63(19):6221-8.
231. Font A, Salazar R, Maurel J, Taron M, Ramirez JL, Tabernero J, et al. Cisplatin plus weekly CPT-11/docetaxel in advanced esophagogastric cancer: a phase I study with



## REFERENCIAS

- pharmacogenetic assessment of XPD, XRCC3 and UGT1A1 polymorphisms. *Cancer Chemother. Pharmacol.* noviembre de 2008;62(6):1075-83.
232. Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, Gamarra S, Manso L, Cortes-Funes H, et al. DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 10 de septiembre de 2006;24(26):4333-9.
233. Pharoah PDP, Dunning AM, Ponder BAJ, Easton DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat. Rev. Cancer.* noviembre de 2004;4(11):850-60.
234. Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the Breast Cancer Association Consortium. *J. Natl. Cancer Inst.* 4 de octubre de 2006;98(19):1382-96.
235. Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu G-J, Wu T-X, Yao X, et al. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *Int. J. Cancer.* 1 de octubre de 2007;121(7):1481-6.
236. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. TP53 polymorphisms and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Mutagenesis.* julio de 2003;18(4):377-85.
237. Whibley C, Pharoah PDP, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat. Rev. Cancer.* febrero de 2009;9(2):95-107.
238. Shen H, Zheng Y, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett.* 26 de septiembre de 2002;183(2):123-30.
239. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M, Tallila J, et al. Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clin. Cancer Res.* 15 de julio de 2005;11(14):5098-103.
240. Xu Y, Yao L, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, et al. p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 15 de octubre de 2005;11(20):7328-33.
241. Nelson HH, Wilkojmen M, Marsit CJ, Kelsey KT. TP53 mutation, allelism and survival in non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis.* octubre de 2005;26(10):1770-3.
242. Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene.* 22 de abril de 2004;23(19):3328-37.
243. Matakidou A, El Galta R, Webb EL, Rudd MF, Bridle H, Eisen T, et al. Lack of evidence that p53 Arg72Pro influences lung cancer prognosis: an analysis of survival in 619 female patients. *Lung Cancer.* agosto de 2007;57(2):207-12.