



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO  
BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

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

**MIGUEL ANGEL PAVÓN RIBAS  
2009**



**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

**GRUP D'ONCOGÈNESIS Y ANTITUMORALES DE L'INSTITUT  
DE RECERCA DE L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT  
PAU**

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOMEDICINA  
BIENIO 2004-2006**

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

Memoria presentada por **Miguel Angel Pavón Ribas** para optar al título  
de Doctor en Biología por la universidad de Barcelona

**Codirectores:** Ramón Mangues Bafalluy  
Matilde Parreño Gómez

**Doctorando:** Miguel Angel Pavón Ribas

**Tutor:** Albert Tauler Girona

**Ramón Mangues Bafalluy**

**Matilde Parreño Gómez**

**Albert Tauler Girona**

**Miguel Angel Pavón Ribas**

**MIGUEL ANGEL PAVÓN RIBAS.  
2009**



## AGRADECIMIENTOS

La verdad es que aunque parecía que este momento no iba llegar, ya han pasado unos cuantos años desde que empecé con este proyecto de tesis y quisiera aprovechar este pequeño rincón para agradecer el apoyo recibido por todas aquellas personas que de una manera directa o indirecta me han ayudado a llevar a cabo este trabajo.

Empezando por el principio quisiera agradecer al Dr. Antonio Villaverde haberme dado la posibilidad de tomar contacto con el mundo de la investigación realizando un periodo de prácticas en el grupo de Hepatitis del Hospital Clínico.

Quisiera dar las gracias a todo el grupo de Hepatitis del Hospital Clínico por acogerme desde el primer día. Al Dr. Juan Carlos Saiz por integrarme en el grupo como uno más y buscar una línea de trabajo en la que pudiese aprender a manejarme en el laboratorio. A Carolina por dejar que, mis al principio, torpes manos empezasen a trabajar en su proyecto con toda la confianza del mundo y por tenerme en cuenta al momento de obtener resultados. A Anna, Ivanna y Eugeni por las largas charlas en la terraza, por el pulpo a lo croata, por enseñarme a no perderme por el hospital, por los tiquets del comedor, por solucionar mis pequeños desastres con los geles de agarosa, por su paciencia a la hora de enseñar. De verdad gracias, porque conseguisteis que la ciencia me gustase y quisiera continuar en este mundillo.

Bien, llegamos al hospital de Sant Pau, concretamente al “Grupo d’ Oncogènesis i Antitumorals” donde parece que fue ayer cuando llegué.

Durante todos estos años son muchos los que me habéis acompañado en este largo camino. Gracias a los primeros integrantes con los que me encontré en el GOA (Carlos, Mónica, Isolda, Virtudes, Matilde, y Ramón) por acogerme tan bien desde un principio y con los que he ido compartiendo todos estos años. A aquellos que estuvieron y que emprendieron otros caminos (Silvia, Mireia, Judith, Natalia, Maria e Israel). También gracias a todos aquellos que poquito a poco os habéis ido incorporando al grupo (Rosa, Patricia, M<sup>a</sup> Carmen “Esteve”, Marta, M<sup>a</sup> Carmen “Sant Pau”, Montse, Àngels y Rebeca). Gracias por aguantar mis buenos y malos humores, mis locuras, por compartir los momentos de trabajo y los de los cafetitos. Gracias por aguantar mis “rollitos” sobre los microarrays, por enseñarme un poquito más del complejo mundo de la mente

“femenina”, por ponerme al día de todos los estilos musicales posibles, por alguna que otra cervecita en la Avenida Gaudí y por alguna que otra salida nocturna.

Especialmente agradecer su ayuda a Carlos, el que más ha sufrido dentro del laboratorio mi neurótica obsesión con el RNA. Gracias por el interés demostrado por el proyecto y por aprender nuevas técnicas aunque no haya sido siempre fácil. Pero sobre todo gracias por tu apoyo, no sólo profesional, sino también personal. Por las charlas de baloncesto, por confiar en mis inventos “McGyber” y por estar ahí en los momentos de bajón y en los de buen rollito.

Agradecer desde aquí la confianza y el apoyo recibido por mis codirectores de Tesis, el Dr. Ramón Manges y la Dra. Matilde Parreño. Gracias a ambos por brindarme la posibilidad de realizar un doctorado y demostrar que lo más importante no es la nota de corte. También gracias por haberme guiado en la realización de este proyecto de tesis, en la redacción de este trabajo y en todos los que ha ido generando este proyecto. Gracias por inculcarme un espíritu científico tanto crítico como de superación.

También quisiera agradecer a todas aquellas personas de los departamentos de Otorrinolaringología, Oncología médica, Anatomía patológica y Farmacia del Hospital de Sant Pau que de un modo u otro han colaborado en este proyecto. Quisiera dar las gracias al Dr. Agustí Barnadas por el interés mostrado por este proyecto de tesis. Al Dr. Francesc J. Sancho por sus clases magistrales sobre la histología de los tumores de cabeza y cuello y especialmente al Dr. Xavier León por su ayuda en la recogida de muestras, en el análisis de datos y por tener la paciencia suficiente para enseñar a un “biólogo” los aspectos clínicos de los tumores de cabeza y cuello.

También agradecer desde aquí a todos aquellos pacientes que con consentimiento informado, han formado parte de este estudio y sin los cuales hubiese sido imposible la realización del mismo.

Y la familia. ¡Que se puede decir de los padres!

Seguro que sin vosotros no hubiese llegado hasta aquí. Gracias por animarme a que empezase el doctorado. Vosotros me habéis enseñado que con sacrificio nada es imposible y que en la vida siempre hay que mirar para adelante nunca hacia atrás. Gracias a vosotros, soy como soy. Y también a mi hermano J. Ramón que cuando lo necesitas siempre está.

Y los amigos

Sería imposible nombrar aquí a toda aquella gente con la que he compartido estos años.

Amigos de la infancia, de la facultad, de la “Vila”, del trabajo,.....

Des de aquí gracias a todos.

Finalmente y no por última menos especial, agradecer todo su apoyo incondicional a Marta, la persona con la que hace más de ocho años comparto la vida y la que ha sufrido más mis dolores de cabeza con la tesis. Gracias por ser como eres. Gracias por tu paciencia, en especial estos últimos meses en los que la tesis me ha absorbido por completo. Gracias por estar ahí siempre que lo necesito, tanto cuando necesito reír como cuando necesito llorar. Parecía que no llegaba pero al final acabo la tesis. Espero que esto te anime a conseguir tu proyecto más inmediato. Y cuando acabes, ya sabes que tenemos algo pendiente.

Conocerte sin duda es lo mejor que me a pasado en la vida!

Gracias.





## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>I INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1. EL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO .....	13
1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON EL CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO.....	13
1.2. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DEL CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO .....	14
1.2.1. Clínica y diagnóstico.....	14
1.2.2. Clasificación TNM.....	15
1.3. PATOLOGÍA DEL CECC .....	17
1.4. TRATAMIENTO DEL CECC.....	20
1.4.1. Tratamiento de los estadios iniciales (I y II) .....	20
1.4.2. Tratamiento de los estadios avanzados (III y IV).....	20
2. BASES MOLECULARES DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO .....	23
2.1. MODELO DE PATOGÉNESIS.....	23
2.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA RADIOTERAPIA Y LA QUIMIOTERAPIA.....	28
2.2.1. Radioterapia .....	28
2.2.2. 5-Fluorouracilo (5-FU) .....	28
2.2.3. Cisplatino (CDDP).....	29
2.2.4. Taxanos (docetaxel y paclitaxel).....	29
2.2.5. Inhibidores de EGFR .....	30
2.3. SISTEMAS DE REPARACIÓN DEL DNA.....	31
2.4. REGULACIÓN DE LOS PUNTOS DE CONTROL INTERFÁSICOS (“CHECKPOINTS”) .....	35
2.5. INESTABILIDAD GENÓMICA.....	37
2.6. MUERTE CELULAR INDUCIDA POR DAÑO AL DNA .....	38
3. FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS EN EL CECC .....	40
3.1. FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS CLÍNICOS.....	41
3.2. FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS MOLECULARES .....	42
4. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL CECC (HALLAZGOS PREVIOS) .....	43
<b>II HIPÓTESIS PRELIMINARES Y OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>49</b>
<b>III OBJETIVOS</b> .....	<b>55</b>

<b>IV MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES, RÉGIMEN DE TRATAMIENTO, EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL, SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (SLRL), SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) Y BENEFICIO CLÍNICO .....	61
1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES .....	61
1.2. RÉGIMEN DE TRATAMIENTO.....	61
1.3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL, SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (SLRL), SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) Y BENEFICIO CLÍNICO .....	63
2. RECOGIDA DE BIOPSIAS DE TEJIDO FRESCO, EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS CDNA .....	64
2.1 RECOGIDA DE BIOPSIAS DE TEJIDO FRESCO.....	64
2.2 EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS CDNA .....	64
3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE KU70, KU80 Y DNA-PKCS POR PCR CUANTITATIVA.....	67
3.1 PRIMERS Y SONDAS.....	68
3.2 ANÁLISIS POR PCR CUANTITATIVA .....	69
4. INMUNOHISTOQUÍMICA .....	70
4.1. PROTOCOLO DE TINCIÓN.....	70
4.2 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO .....	71
5. MICROARRAYS.....	72
5.1 MARCAJE, HIBRIDACIÓN, REVELADO Y ESCANEADO .....	73
5.2 RESULTADOS BRUTOS / CONTROL DE CALIDAD .....	80
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	81
6.1. ESTUDIO DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL SISTEMA DE REPARACIÓN NHEJ EN BIOPSIAS PRE-TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO.....	81
6.2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR MICROARRAYS EN CECC DE ESTADIOS LOCALMENTE AVANZADOS.....	83
6.2.1 Pre-procesado de los experimentos de microarrays .....	83
6.2.2 Análisis no supervisado ( “Clustering” ).....	84
6.2.3. Análisis de supervivencia libre de recidiva local (SLRL) y supervivencia global (SG) entre subtipos tumorales .....	85
6.2.4. Análisis de expresión diferencial .....	85
6.2.5. Análisis de anotaciones funcionales.....	86
<b>V RESULTADOS .....</b>	<b>87</b>
1. EXPRESIÓN DE GENES DEL SISTEMA DE REPARACIÓN NHEJ EN BIOPSIAS PRE-TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN SEGUIDA DE RT/QRT O CIRUGÍA.....	89

1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN LOS ESTUDIO PROSPECTIVO Y RETROSPECTIVO.....	89
1.2. EXPRESIÓN DE MRNA DE KU70, KU80 Y DNA-PKcs EN FUNCIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL AL TRATAMIENTO DE QTI (ESTUDIO PROSPECTIVO).....	90
1.3. NIVELES DE EXPRESIÓN DE KU70, KU80 O DNA-PKcs Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (ESTUDIO PROSPECTIVO) .....	92
1.4. NIVELES DE EXPRESIÓN DE KU70, KU80 O DNA-PKcs Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL EN PACIENTES QUE SIGUIERON UN TRATAMIENTO GENOTÓXICO CONSERVADOR (ESTUDIO PROSPECTIVO).....	94
1.5. NIVELES DE MRNA DEL COMPLEJO DNA-PK (KU70, KU80 Y DNA-PKcs) Y SUPERVIVENCIA GLOBAL (ESTUDIO PROSPECTIVO).....	96
1.6. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS KU70 Y KU80, Y RESPUESTA TUMORAL (ESTUDIO RETROSPECTIVO).....	97
1.7. PORCENTAJE DE CÉLULAS TUMORALES POSITIVAS PARA KU70 Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (ESTUDIO RETROSPECTIVO).....	100
1.8. PORCENTAJE DE CÉLULAS TUMORALES POSITIVAS PARA KU70 Y SUPERVIVENCIA GLOBAL (ESTUDIO RETROSPECTIVO).....	102
2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR MICROARRAYS EN BIOPSIAS PRE-TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CECC EN ESTADIOS LOCALMENTE AVANZADOS.....	103
2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	103
2.2. ANÁLISIS NO SUPERVISADO (“CLUSTERING”) EN TUMORES Y MUCOSAS NORMALES .....	104
2.3. IDENTIFICACIÓN DE SUBTIPOS TUMORALES RELACIONADOS CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL (SLRL) Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) DE LOS PACIENTES TRAS SU TRATAMIENTO.....	105
2.4. GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE ENTRE LOS TUMORES DEL CLUSTER 1 Y LOS TUMORES DE LOS CLUSTERS 2 Y 3 AGRUPADOS .....	109
2.5. GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE ENTRE LOS TUMORES DEL CLUSTER 3 Y LOS TUMORES DE LOS CLUSTERS 1 Y 2 AGRUPADOS .....	112
2.6. GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE ENTRE LOS TUMORES DEL CLUSTER 2 Y LOS TUMORES DE LOS CLUSTERS 1 Y 3 AGRUPADOS .....	114
2.7. GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN EL CLUSTER 1 Y EN EL CLUSTER 3 RELACIONADOS CON LA RECIDIVA LOCAL A 2 AÑOS .....	116
2.8. GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN EL CLUSTER 1 Ó EN EL CLUSTER 3 RELACIONADOS CON LA MUERTE DEL PACIENTE A LOS 3 AÑOS.....	118
2.9. GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN FUNCIÓN DE LA RECIDIVA LOCAL A LOS 2 AÑOS.....	119
2.10. GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN TUMORES EN FUNCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA A 3 AÑOS.....	121
2.11. GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN FUNCIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL A LA QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN .....	123

2.12. EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE TUMOR Y MUCOSA NORMAL.....	123
<b>VI DISCUSIÓN .....</b>	<b>127</b>
1. ESTUDIO DE LOS NIVELES EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL SISTEMA DE REPARACIÓN NHEJ EN BIOPSIAS PRE-TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN SEGUIDA DE RT/QRT O CIRUGÍA .....	129
1.1. LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL COMPLEJO DNA-PK PREDICE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA.....	129
1.2. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO DNA-PK CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL PACIENTE SOMETIDO A TRATAMIENTO GENOTÓXICO EN DIFERENTES TIPOS TUMORALES .....	130
1.3. NHEJ PARTICIPA EN LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS TUMORALES AL DAÑO GENOTÓXICO DE UN MODO DEPENDIENTE DEL TIPO CELULAR.....	131
1.4. IMPLICACIÓN DE PROTEÍNAS DISTINTAS A LAS QUE PARTICIPAN EN NHEJ EN LA RESPUESTA CELULAR AL TRATAMIENTO GENOTÓXICO .....	134
1.5. POSIBLE UTILIDAD CLÍNICA DE KU70 COMO MARCADOR PREDICTIVO .....	135
2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR MICROARRAYS EN BIOPSIAS PRE-TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CECC LOCALMENTE AVANZADO .....	137
2.1. IDENTIFICACIÓN DE TRES SUBTIPOS DE CECC RELACIONADOS CON SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL Y SUPERVIVENCIA GLOBAL.....	137
2.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS TRES SUBTIPOS DE CECC IDENTIFICADOS .....	138
2.2.1. Los tumores del cluster 1 se asocian con una evolución clínica desfavorable.....	138
2.2.2. Los tumores del cluster 3 se asocian con una evolución clínica favorable.....	142
2.2.3. Los tumores del cluster 2 se asocian con una evolución clínica intermedia.....	144
2.3. MARCADORES PREDICTIVOS DE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON CECC TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN, SEGUIDA DE RT/QRT O QUIMIORADIOTERAPIA CONCOMITANTE.....	147
2.4. GENES PREDICTORES DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL, DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y DE LA RESPUESTA TUMORAL A LA QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN, SEGUIDA DE RT/QRT O CIRUGÍA.....	147
2.5. PROCESOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS CON LA PATOGÉNESIS DEL CECC .....	148
2.6. COMPARACIÓN DE NUESTROS HALLAZGOS CON ESTUDIOS PREVIOS DE MICROARRAYS EN CECC.....	150
2.7. UTILIDAD CLÍNICA DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO.....	151
<b>VII CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
<b>VIII BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>157</b>
<b>IX ANEXOS.....</b>	<b>179</b>

### ABREVIATURAS

**5-FU:** 5-Fluorouracilo  
**AUC:** Área Bajo la Curva  
**VER:** Reparación por Excisión de Bases  
**CDDP:** Cisplatino ; cis-diamminedichloroplatino  
**CE:** Carcinoma escamoso  
**CECC:** Carcinoma escamoso de cabeza y cuello  
**CIN:** Inestabilidad Cromosómica  
**CT:** Ciclo Umbral (Cycle threshold)  
**DAB:** 3,3'-diaminobenzidina  
**DMEM:** Medio de Cultivo Dulbecco Modificado de Eagle  
**DR:** Reparación Directa  
**dsDNA:** DNA de doble cadena  
**dTMP:** Deoxitimidina monofosfato  
**dTTP:** Deoxitimidina trifosfato  
**dUMP:** Deoxiuridina monofosfato  
**FBS:** Suero Bovino Fetal  
**FdUMP:** Fluorodeoxiuridina monofosfato  
**GO:** “Gene Ontology”  
**H&E:** Hematoxilina-eosina  
**HNPCC:** Cancer colorrectal hereditario no polipósico  
**HR:** Recombinación Homóloga  
**HSI:** Intensidad / Saturación / HUE  
**IC:** Intervalo de confianza  
**IHQ:** Inmunohistoquímica  
**KEGG:** “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”  
**LOH:** Pérdida de heterocigotidad  
**MIN:** Inestabilidad de Microsatélites  
**MMR:** Reparación de apareamientos de bases erróneos  
**N+:** Afectación ganglionar positiva  
**N0:** Afectación ganglionar negativa  
**NER:** Reparación por excisión de nucleótidos  
**NHEJ:** Reparación no homologa por unión de extremos  
**NSCLC:** Carcinoma de pulmón no microcítico  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**QRT:** Quimioradioterapia  
**QTI:** Quimioterapia de inducción  
**RDC:** Rotura doble cadena  
**Resp<50%:** Respuesta inferior al 50%  
**Resp>50%:** Respuesta superior al 50%  
**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear  
**ROC:** “Receiver operating characteristics”  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**RT:** Radioterapia  
**SCLC:** Carcinoma de pulmón de célula pequeña (microcítico)  
**SG:** Supervivencia global  
**SLRL:** Supervivencia libre de recidiva local  
**ssDNA:** DNA de cadena sencilla  
**TC:** Tomografía computerizada  
**TEM:** Transición epitelio-mesénquima.  
**TNM:** Tumor /Gánglio / Metástasis  
**TR:** Tasa Riesgo  
**TS:** Timidilato sintasa  
**VPH:** Virus del papiloma humano  
**VPH+:** Positivo para el virus del papiloma humano  
**VPH-:** Negativo para el virus del papiloma humano



ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Estadaje del CECC. Definición de la extensión y del tamaño tumoral (T), de la afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y de la presencia de metástasis a distancia (M) siguiendo la clasificación TNM.....16

**Tabla 2.** Agrupación de los CECC en estadios, siguiendo el sistema de clasificación TNM.....17

**Tabla 3.** Estudios de microarrays realizados en muestras obtenidas de pacientes con CECC.....44

**Tabla 4.** Descripción de las regiones de amplificación e hibridación de las sondas para el análisis de los niveles de expresión de mRNA por PCR cuantitativa.....68

**Tabla 5.** Paquetes informáticos de Bioconductor utilizados en el análisis de datos de los experimentos de microarrays.....83

**Tabla 6.** Características de los pacientes incluidos en los estudios prospectivo y retrospectivo.....90

**Tabla 7.** Mediana y rango de expresión de mRNA de Ku70, Ku80 y DNA-PKcs en biopsias tumorales pre-tratamiento de pacientes candidatos a recibir QTI.....90

**Tabla 8.** Sensibilidad, especificidad e índice de exactitud de los niveles de mRNA en la predicción de la respuesta a la QTI utilizando los umbrales de expresión fijados para cada gen.....92

**Tabla 9.** Tasas de riesgo (TR) para la supervivencia libre de recidiva local (SLRL).....94

**Tabla 10.** Tasas de riesgo (TR) para la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) en el estudio retrospectivo.....101

**Tabla 11.** Tasas de riesgo (TR) para la supervivencia global (SG) (estudio retrospectivo).....102

**Tabla 12.** Características de los pacientes incluidos en el estudio de microarrays de expresión en CECC.....103

**Tabla 13.** Tasa de riesgo (TR) de supervivencia libre de recidiva local (SLRL) para los pacientes con CECC en función del cluster en el que se clasifican sus tumores.....106

**Tabla 14.** Tasas de riesgo (TR) de supervivencia global (SG) de los pacientes con CECC en función de la clasificación de sus tumores mediante cluster jerárquico.....108

**Tabla 15.** Genes expresados diferencialmente al comparar los tumores del cluster 1 con los tumores de los cluster 2 y 3 agrupados ( $p$  ajustada  $<0,05$ ).....110

**Tabla 16.** Términos biológicos sobre-representados en los tumores del cluster 1 respecto a los tumores de los cluster 2 y 3 agrupados.....111

**Tabla 17.** Genes sobre-expresados en los tumores del cluster 3 respecto a los de los clusters 1 y 2 agrupados( $p$  ajustada  $< 0,05$  ).....112

**Tabla 18.** Términos biológicos sobre-representados en los tumores del cluster 3 respecto a los tumores de los clusters 1 y 2 agrupados.....114

**Tabla 19.** Genes expresados diferencialmente en los tumores del cluster 2 respecto a los de los clusters 1 y 3 agrupados( $p$  ajustada  $< 0,05$  ).....115

**Tabla 20.** Términos biológicos sobre-representados en los tumores del cluster 2 respecto a los tumores del cluster 1 y 3 agrupados.....116

**Tabla 21.** Genes expresados diferencialmente al comparar los tumores de pacientes que sufrieron una recidiva tumoral con los tumores de pacientes libres de recidiva a los 2 años ( $p<0,001$ ).....120

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 22.</b> Genes sobre-expresados al comparar los tumores de pacientes fallecidos con los tumores de pacientes vivos a los 3 años de seguimiento ( $p < 0,001$ ).....	121
<b>Tabla 23.</b> Genes expresados diferencialmente en función de la respuesta a la quimioterapia de inducción ( $p < 0,001$ ).....	123
<b>Tabla 24.</b> Genes expresados diferencialmente tras comparar los niveles de expresión en tumores respecto a mucosas normales con una $p$ ajustada $< 0,05$ .....	124
<b>Tabla 25.</b> Términos biológicos sobre-representados obtenidos por la comparación de los tumores con las mucosas normales.....	125
<b>Tabla 26.</b> Características biológicas de los CECC de los clusters 1, 2 y 3.....	146



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Incidencia del carcinoma de cabeza y cuello en la población mundial en el año 2002.....	13
<b>Figura 2.</b> Incidencia del carcinoma de cabeza y cuello dependiendo del área geográfica.....	14
<b>Figura 3.</b> Examen clínico y radiológico de un tumor de laringe. ....	15
<b>Figura 4.</b> Histología de una biopsia tumoral de CECC teñida con hematoxilina eosina. ....	18
<b>Figura 5.</b> Histología de dos biopsias de CECC con diferente grado de diferenciación ....	18
<b>Figura 6.</b> Histología de las diferentes etapas de progresión de un CECC (Tinción H&E).....	19
<b>Figura 7.</b> Protocolo de tratamiento utilizado en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	22
<b>Figura 8.</b> Modelo de patogénesis del CECC.....	23
<b>Figura 9.</b> Cancerización por campos (“Field cancerization”).....	26
<b>Figura 10.</b> Estructura química de los fármacos utilizados en el tratamiento del CECC.....	30
<b>Figura 11.</b> Sistema de reparación de roturas de doble cadena (RDC) por recombinación homóloga (HR).....	33
<b>Figura 12.</b> Sistema de reparación de roturas de doble cadena (RDC) no homóloga por unión de extremos (NHEJ).....	34
<b>Figura 13.</b> Respuesta al daño al DNA. ....	39
<b>Figura 14.</b> Protocolo de tratamiento utilizado en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello en estadio localmente avanzado.....	62
<b>Figura 15.</b> Análisis de la integridad del RNA con el “Bionalyser”.....	66
<b>Figura 16.</b> Reacción de la PCR cuantitativa.....	67
<b>Figura 17.</b> Esquema del proceso de elaboración de los chips de Affymetrix, utilizando el kit de marcaje “GeneChip One-Cycle Target Labelling” ....	74
<b>Figura 18.</b> Control de calidad del cRNA marcado.....	77
<b>Figura 19.</b> Pseudoimágenes obtenidas con el paquete informático "AffyPLM". A) Imagen de escaneado. B)“weight”. C) "resids" D) "sign-resids". En este chip no observamos ningún artefacto en la imagen. La hibridación es homogénea.....	80
<b>Figura 20.</b> Gráficos de intensidad y degradación del RNA.....	81
<b>Figura 21.</b> Box plot de los niveles de intensidad de todas las sondas presentes en cada uno de los experimentos de microarrays. Antes de realizar el pre-procesado de los microarrays (A) o bien, una vez finalizado el preprocesado RMA (B).....	84
<b>Figura 22.</b> Diferencias significativas en los niveles de mRNA de Ku70 (A), Ku80 (B) y DNA-PKcs (C) en biopsias pre-tratamiento entre los tumores con una respuesta a la quimioterapia de inducción superior al 50% (Resp >50 %) y los tumores con una respuesta inferior al 50% (Resp<50%) (Test U de Mann-Whitney). D) Curvas obtenidas mediante análisis ROC (Receiver-Operating-Characteristics) para Ku70, Ku80 y DNA-PKcs.....	91
<b>Figura 23.</b> Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) en pacientes tratados con QTI seguida de RT/QRT o cirugía.....	93

## Índice de figuras

---

<b>Figura 24.</b> Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) en pacientes que recibieron tratamiento genotóxico conservador (QRT o RT) una vez finalizada la QTI.....	95
<b>Figura 25.</b> Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global (SG) de los pacientes tratados con QTI, seguida de RT/QRT o cirugía.....	96
<b>Figura 26.</b> Cuantificación inmunohistoquímica de Ku70 a partir de imágenes tomadas a 100X. ....	97
<b>Figura 27.</b> Diferencias en la tinción inmunohistoquímica de la proteína Ku70 en tumores representativos del grupo respondedor y del grupo no-respondedor. ....	98
<b>Figura 28.</b> A) Diferencias significativas en el porcentaje de células tumorales positivas para la proteína Ku70 en función de la respuesta a la quimioterapia de inducción. B) Curva ROC para Ku70.....	99
<b>Figura 29.</b> Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) de los pacientes en función de si sus tumores presentaban un porcentaje de células tumorales positivas para la proteína Ku70 mayor o menor que el 74 %. ....	100
<b>Figura 30.</b> Cluster no supervisado realizado con las 68 muestras (63 biopsias tumorales y 5 biopsias de mucosa normal) y los 814 genes seleccionados. ....	104
<b>Figura 31.</b> Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) en pacientes con CECC en función de su clasificación en clusters según su patrón de expresión .....	105
<b>Figura 32.</b> Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global (SG) en pacientes con CECC en función de su clasificación en clusters según su patrón de expresión .....	107
<b>Figura 33.</b> Genes cuya expresión está directamente relacionada con la recidiva tumoral. Mayores niveles de expresión de estos genes aumentan la probabilidad de padecer una recidiva tumoral durante un período de dos años. ....	117
<b>Figura 34.</b> Genes cuya expresión está inversamente relacionada con la recidiva tumoral. Mayores niveles de expresión de estos genes disminuyen la probabilidad de padecer una recidiva tumoral durante un período de dos años.....	117
<b>Figura 35.</b> Genes cuya expresión se asocia con la muerte del paciente. Mayores niveles de expresión aumentan la probabilidad de que el paciente muera durante un período de seguimiento de 3 años.....	118
<b>Figura 36.</b> Genes cuya expresión está inversamente relacionada con la muerte del paciente. Mayores niveles de expresión disminuyen la probabilidad de que el paciente muera durante un período de seguimiento de 3 años. 1-E: 1-Especificidad. Se: Sensibilidad.....	119