



DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**“ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DEL LOCUS
CAPN10 Y LA PREDISPOSICIÓN A PADECER CÁNCER DE
LARINGE”**

TESIS DOCTORAL

Autor
Ramón Moreno Luna.

Directores de Tesis Doctoral
Dr. D. Francisco Esteban Ortega.
Profesor Titular de la Universidad de Sevilla.

Dr. D. Antonio Abrante Jimenez.
Profesor Asociado de la Universidad de
Sevilla.

Dr. D. Miguel Ángel González Molés
Profesor Titular de la Universidad de
Granada



DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

D. FRANCISCO ESTEBAN ORTEGA, PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

CERTIFICA:

Como co-director de la Tesis Doctoral elaborada por D. Ramón Moreno Luna, titulada *“Estudio de asociación entre la presencia del Locus Capn10 y la predisposición a padecer cáncer de laringe”*, certifico que la citada Tesis reúne todos los requisitos legales exigidos y exigibles para que pueda ser presentada, leída y defendida.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Sevilla a 22 de Diciembre de 2009.



DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

D. ANTONIO ABRANTE JIMENEZ, PROFESOR ASOCIADO DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

CERTIFICA:

Como co-director de la Tesis Doctoral elaborada por D. Ramón Moreno Luna, titulada *“Estudio de asociación entre la presencia del Locus Capn10 y la predisposición a padecer cáncer de laringe”*, certifico que la citada Tesis reúne todos los requisitos legales exigidos y exigibles para que pueda ser presentada, leída y defendida.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Sevilla a 22 de Diciembre de 2009.



D. MIGUEL ANGEL GONZALEZ MOLES, PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA

CERTIFICA:

Como co-director de la Tesis Doctoral elaborada por D. Ramón Moreno Luna, titulada *“Estudio de asociación entre la presencia del Locus Capn10 y la predisposición a padecer cáncer de laringe”*, certifico que la citada Tesis reúne todos los requisitos legales exigidos y exigibles para que pueda ser presentada, leída y defendida.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Sevilla a 22 de Diciembre de 2009.



PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL
Curso Académico 2009 / 2010

**SERVICIO DE DOCTORADO Y
MÁSTER OFICIAL**

El Departamento de Cirugía de la Universidad de Sevilla, utilizando el procedimiento acordado por su Consejo, previo informe del Director/es, así como del Tutor ⁽¹⁾, en su caso, ha acordadoAUTORIZAR..... ⁽²⁾ la presentación de la Tesis doctoral cuyos datos se citan a continuación:

APELLIDOS Moreno Luna	NOMBRE Ramón	
DENOMINACIÓN DEL PROGRAMA DE DOCTORADO/PROGRAMA OFICIAL DE POSGRADO CURSADO POR EL SOLICITANTE Avances en Especialidades Quirúrgicas		
DEPARTAMENTO RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO /CENTRO RESPONSABLE DEL PROGRAMA OFICIAL DE POSGRADO Departamento de Cirugía		
DEPARTAMENTO RESPONSABLE DEL PROYECTO DE TESIS Departamento de Cirugía		
DIRECTOR/ES DEL PROYECTO DE TESIS		
NOMBRE Y APELLIDOS	DEPARTAMENTO	D.N.I.
Dr. Francisco Esteban Ortega	Departamento de Cirugía. Universidad de Sevilla	24173551-E
Dr. Antonio Abrante Jiménez	Departamento de Cirugía. Universidad de Sevilla	28568185-T
Dr. Miguel Ángel González Moles	Departamento de Estomatología. Universidad de Granada	24.193.897-J
TUTOR DEL PROYECTO DE TESIS (en su caso) 		
DENOMINACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS "ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DEL LOCUS CAPN10 Y LA PREDISPOSICIÓN A PADECER CÁNCER DE LARINGE"		

Sevilla, a 8 de Enero de 2010

El Director/es de la Tesis,

El Tutor,

Fdo.:

Fdo.:

El Director del Departamento,

Fdo.:

¹ Este apartado se rellenará sólo cuando el Director de la tesis no sea profesor del Departamento responsable.

² Autorizar / no Autorizar.

EXCMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Esteban por darme la oportunidad de avanzar en mi formación a su lado y por ser ejemplo de dedicación y profesionalidad. Además, le agradezco los esfuerzos por enseñarme y ayudarme a transformar los objetivos cumplidos en nuevos puntos de partida.

También me gustaría agradecer al Dr. Abrante Jimenez y al Dr. González Molés, copromotores de este proyecto, por la implicación, dedicación y confianza a los largo de estos años.

Un afectuoso agradecimiento a todos los integrantes de Neocodex, y en especial a Reposo Ramírez Lorca y a Agustín Ruiz Laza, sin su ayuda constante, paciencia infinita y disponibilidad permanente, este proyecto no habría llegado a buen puerto.

Al Servicio de ORL, por soportar las tensiones y avatares diarios, por la ayuda y complicidad que han mostrado durante estos años.

A mi gran familia, mis padres, hermanos y consortes, por ser mi pasado y gran parte de mí presente. Por estar ahí siempre, en los fracasos y en las alegrías. Porque el triunfo de uno es el triunfo de todos. Querría agradecer a mi hermano Yiyo, el representar para mí un ejemplo permanente de superación y perseverancia. Admirado como profesional, se ha convertido en un estimulante e inesperado compañero de viaje.

A mis hijos, por ser el motor que hace que todo funcione, por generar una motivación permanente hacia todo lo que afronto. Por generar la felicidad que todo ser humano necesita para hacer las cosas con sinceridad y honestidad.

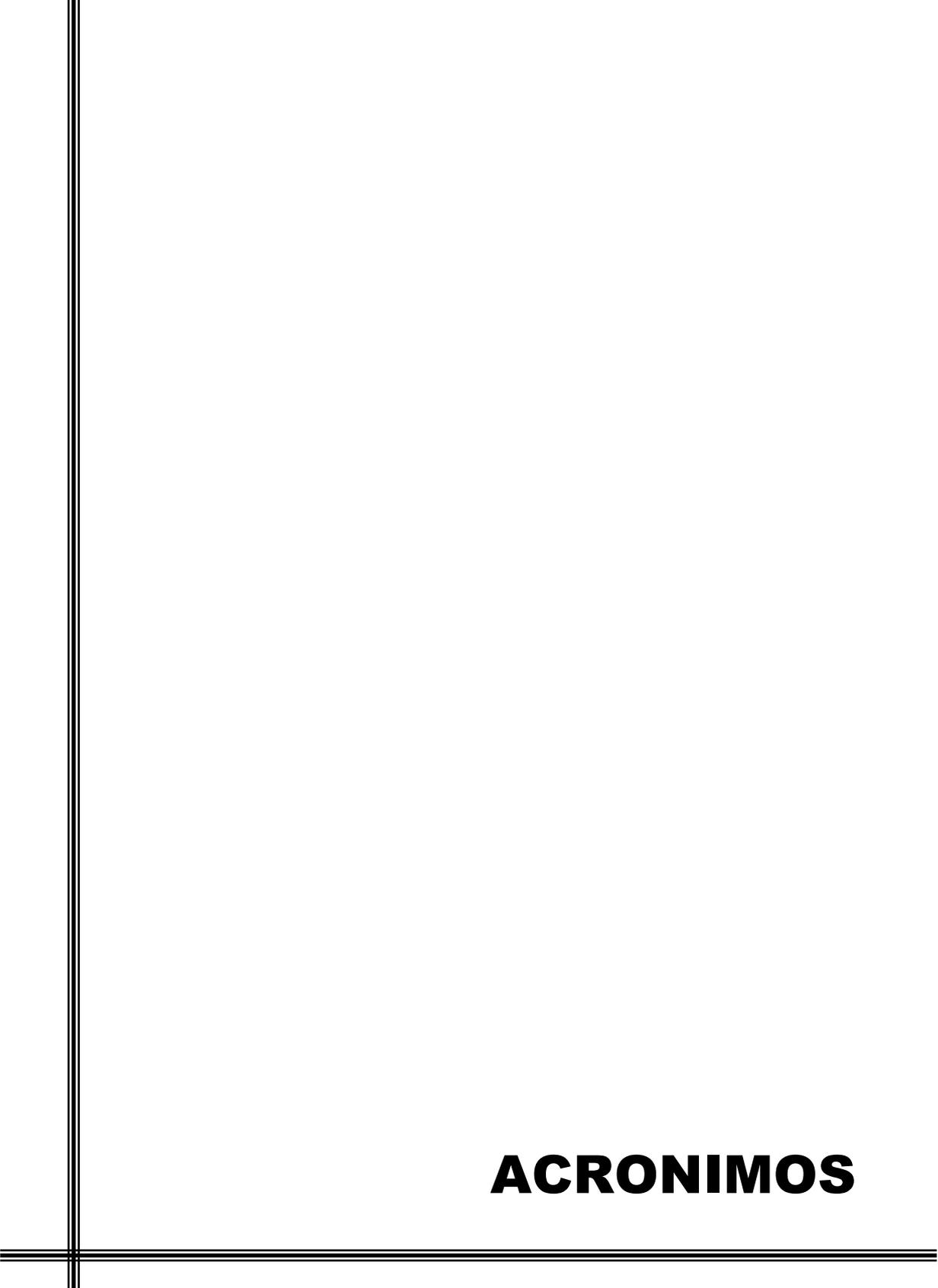
A Lola, eres el origen y el final, eres mi medida y mi equilibrio, lo eres todo. Te quiero.



INDICE

1. ACRONIMOS.....	19
2. INTRODUCCION :	23
• HISTORIA DEL CANCER DE LARINGE.....	25
• ANTECEDENTES. DATOS EPIDEMIOLOGICOS.....	27
• ETIOLOGIA Y PATOGENIA:	
a. FACTORES AMBIENTALES	
• Tabaco y Alcohol.....	30
• Radiaciones Ionizantes.....	33
• Papiloma-Virus Humano.....	34
b. FACTORES GENETICOS.	
• Modelo de Progresión Genética.	
a. Alteraciones en el Señal Mitógena.....	39
b. Alteraciones en el Control del Ciclo Celular.....	44
c. Alteraciones en el Control del Contacto Célula-Célula.....	47
d. Alteraciones en la Apoptosis.....	49
• Calpains	
a. μ-Calpaina y m-Calpaina	50
b. Calpastina.....	55
c. Moléculas similares a las Calpains.....	59
d. Calpains y enfermedades sistémicas.....	64
• Calpaina 10	70
a. Calpaina 10 y Diabetes Mellitus Tipo 2.....	73
b. Calpaina 10 y Síndrome de Ovario Poliquístico.....	76
c. Calpaina 10 y Cáncer Colorrectal.....	78
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	79
4. OBJETIVOS.....	83
5. MATERIAL Y METODOS.....	87
6. RESULTADOS.....	109
– Resultados del estudio descriptivo.....	111
– Análisis genéticos de casos y controles.....	117
• Distribución alélicas.....	117
• Distribución genotípica.....	119
• Análisis de los haplotipos.....	121
• Análisis de los haplotipo-genotipos.....	123
– Análisis de la supervivencia.....	124
7. DISCUSION.....	129

	Páginas
8. CONCLUSIONES.....	141
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	145
10.ANEXOS.....	169
11.PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....	185



ACRONIMOS

ACRONIMOS

A: Armstrong, 10 millonésimas partes de 1 mm.

A: Adenina

ADN: Acido desoxirribonucleico

AHH: Aarilhidroxicarbon-Hidroxilasa

AR: Amphiregulin

ARN: Acido Ribonucleico

ARN-m: ARN mensajero

ATP: adenosina trifosfato

C: Citosina

CAPN10: Gen de la Calpaina 10

CCR: Carcinoma Colorrectal

CRC: Colorrectal carcinoma

CECC: Carcinoma escamoso de cabeza y cuello

CI: Intervalo de confianza

DMNID: Diabetes Mellitus no Insulin Dependiente

dATP: Desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitidina trifosfato

dGTP: desoxiguanina trifosfato

dNTPs: desoxinucleótidos

dTTP: desoxitimidina trifosfato

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

G: Guanina

GRP: Péptido para la liberación de gastrina

GRPR: Receptor del péptido para la liberación de gastrina

Hep-2: Líneas celulares de carcinoma epidermoide.

HNSCC: Head and Neck squamous cell carcinoma. HPV: Papiloma virus Humano

HR: Hazard Ratio

ICAM-1: Moléculas de adhesión intercelular 1

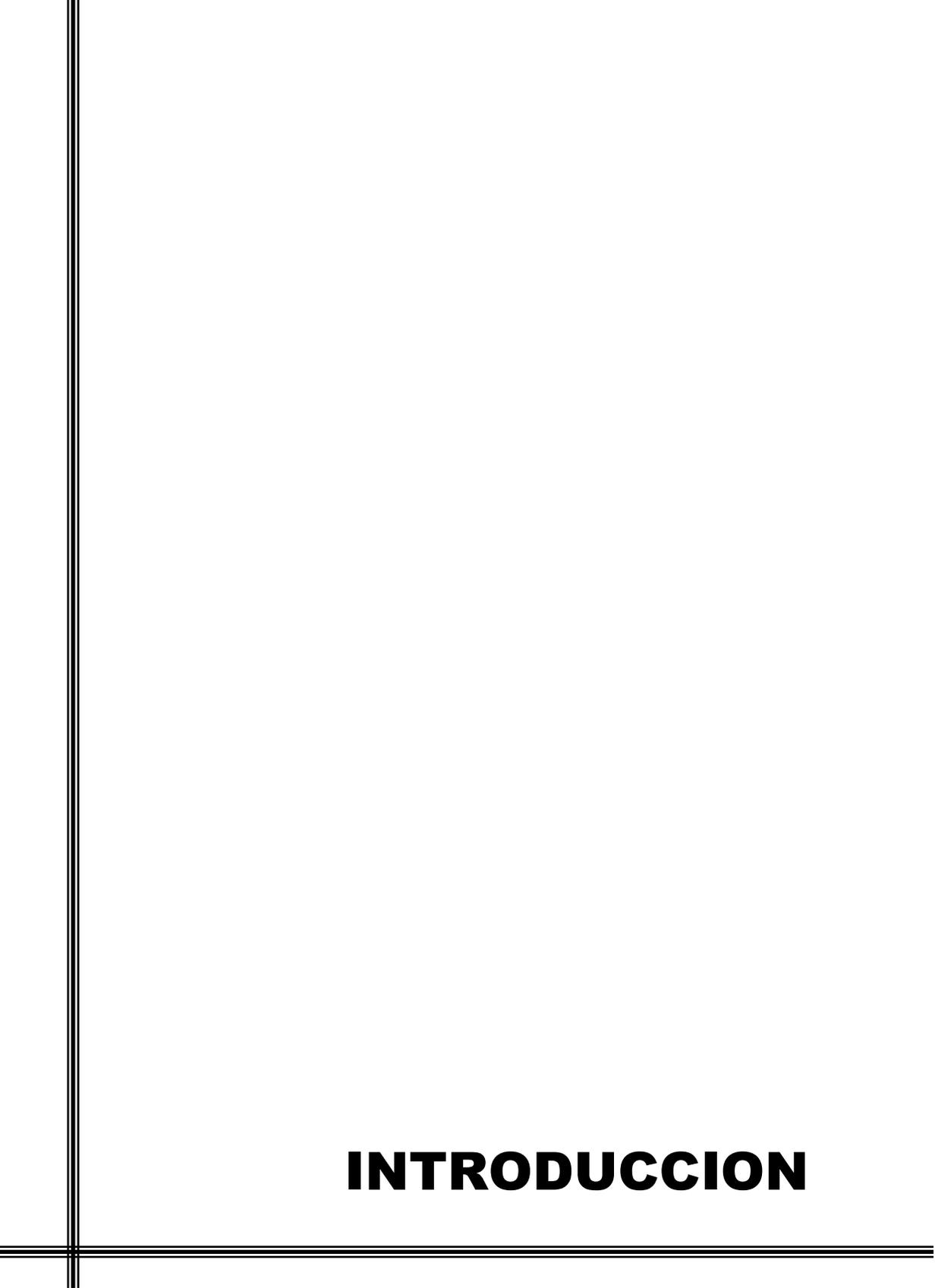
IGF 1: Insulin-like growth factor-1

KDa: Kilo Dalton

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LGMD2A: Distrofia Muscular de Cinturas Tipo 2a

LOH: pérdida de heterocigosidad
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinasas
NK1: Neurokinina 1
NK1R: Receptor de la neurokinina 1
NF-kB: Factor nuclear K activador de células B
OR: Odds Ratio
ORL: Otorrinolaringólogo
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PET: Tomografía por emisión de positrones
PKC: PROTEINA QUINASA C
QTL: Quantitative Trait Locus
RECIST: Response Evaluation Criteria In Solid Tumors. Evaluación de respuesta en tumores sólidos
RNM: Resonancia Nuclear Magnética
RR: Riesgo Relativo
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SOPQ Síndrome de Ovario Poliquístico
SP: Sustancia P
STAT: Signal transducer and activator of transcription
T: Timina
TAC: Tomografía Axial Computerizada
TGF-alpha: factor alfa (Transforming growth factor-alpha)
TNM: Tumor, Ganglios linfáticos y metástasis
VGEFR: Vascular endothelial growth factor receptor



INTRODUCCION

INTRODUCCION

HISTORIA DEL CANCER DE LARINGE

El especialista en otorrinolaringología surgió a principios del siglo XX, cuando se unieron el otólogo y el laringólogo. Previamente, la otología, practicada por cirujanos, y la laringología, practicada por médicos que además trataban las enfermedades de la nariz y del pecho, se desarrollaban por caminos separados. El origen de la laringología se podría remontar a septiembre de 1854 cuando un profesor de canto llamado Manuel García (1805-1906)¹ consiguió ver su propia laringe mediante un espejillo laríngeo, aunque fue mas tarde cuando Ludwig Türck (1810-1868) y Johan Czermak (1828-1873), basándose en el instrumento desarrollado por García, fundaron la disciplina de la laringología.

El espejillo laríngeo y las pinzas curvas era casi todo el material del que disponían los primeros laringólogos en su practica quirúrgica, que se limitaba a la extirpación de pequeñas lesiones laringofaríngeas. Cualquier lesión de mayor cuantía requeriría de la actuación de un cirujano general asociado. A principios del siglo XX, en la era preantibiótica y con técnicas anestésicas primitivas aparecieron las primeras tentativas de cirugía laríngea funcional. Las dos Guerras Mundiales estimularon el desarrollo tanto de los avances técnicos como quirúrgicos.

Las fuentes de luz y las fibras ópticas desarrolladas por Hopkins en 1954 ayudaron en la aparición de una nueva era en la endoscopia y la fibroendoscopia flexible, usándose para examinar las fosas nasales, la nasofaringe, la laringe y faringe en pacientes en los que el ingreso hospitalario ya no era necesario¹.

La primera laringectomía total por cáncer de laringe fue desarrollada por el profesor Billroth (1829-1894), cirujano general en Krankenhaus, Viena. El paciente sobrevivió a la operación y vivió un total de 7 meses². La principal complicación precoz de las laringectomías era la aspiración de alimentos. Fue en 1881 cuando Themistokles Gluck (1853-1942) resolvió este problema separando la laringe de la traquea y suturándola a la piel, lo cual dio grandes resultados en los años venideros.

La radioterapia se utilizaba como tratamiento hace ya más de un siglo. El primer informe de una curación por la radioterapia data de 1899, poco después de 1895 cuando Roentgen descubre los rayos X y al año de 1898 cuando Curie descubrió el radio. Es en 1922 cuando la Oncología se estableció como disciplina médica. Desde ese momento, la radioterapia, al igual que el resto de las técnicas utilizadas para tratar el cáncer, evolucionó de manera vertiginosa. La aparición en 1953 del acelerador lineal -un aparato que emite radiaciones-, y el uso del cobalto fueron dos de los grandes pasos que dió la ciencia en este

terreno. A partir de 1980, con la radioterapia conformada en tres dimensiones (**RT3D**), gracias a la ayuda de la TC y a los sistemas informáticos de cálculo dosimétrico, se obtuvieron imágenes virtuales de volúmenes de tratamiento. Desde de la década de 1990, otras técnicas de imagen como la RMN, ecografía y PET, se incorporaron a la planificación de la radioterapia, con las que se obtuvieron una delimitación más exacta del volumen tumoral para respetar a los tejidos sanos. El desarrollo en la dosificación, tamaño de campo, minimizaron el daño local (mucositis), lo cual difundió el uso de estas técnicas en las lesiones iniciales y también en lo tumores avanzados o recidivados¹.

La quimioterapia, mediante fármacos citostáticos o citotóxicos, también supuso grandes avances en el tratamiento del cáncer de laringe, aunque su relevancia siempre fue inferior a la del tratamiento radioterápico. En estos últimos años se ha potenciado el uso combinado de radioterapia y quimioterapia, llegando a constituir el **Gold-Standard** en el tratamiento del Cáncer de Laringe en algunos estadios.

Existen ya secciones dentro la propia especialidad de Otorrinolaringología donde se desarrolla por zonas bien delimitadas. En el caso del cirujano de cabeza y cuello, trata las lesiones cervicales en el más amplio concepto de la palabra y a menudo se beneficia de la colaboración de radioterapeutas, oncólogos médicos, neurocirujanos y cirujanos generales, cirujanos plásticos y cirujanos maxilofaciales. Las reconstrucciones plásticas de las cirugías radicales con colgajos miocutáneos, anastomosis microvasculares... han tenido gran éxito en la mejora de la calidad de vida de estos pacientes los cuales se veían sometidos a cirugías altamente mutilantes. La actitud terapéutica frente al cáncer de laringe esta alcanzando altas cotas quirúrgicas y mas si se asocian a un tratamiento coadyuvante con radioterapia y quimioterapia, pero existe un campo que constituye el futuro del progreso en el tratamiento del cáncer en general y del cáncer de laringe en particular que es la Biología Molecular. El conocimiento del origen genético del cáncer de laringe ayudaría no solo en la generación de un nuevo estadiaje del cáncer sino también en el desarrollo de sistemas útiles para la detección precoz del mismo en personas susceptibles o no.

ANTECEDENTES. DATOS EPIDEMIOLOGICOS

El cáncer de laringe constituye una enfermedad de gran relevancia socio-sanitaria. A nivel mundial supusieron 159.000 casos nuevos y 90.000 muertes en el año 2002³. Existen numerosos estudios sobre la incidencia del cáncer de laringe en diferentes regiones geográficas, en diversos grupos raciales y religiosos^{4,5,6,7,8,9}. Predomina en el sexo masculino con una frecuencia de 7:1 sobre el sexo femenino, aunque existe un incremento de la frecuencia de este último por la evolución en el hábito tabáquico y alcohólico. En hombres constituye un 2,1% de los casos nuevos de cáncer y un 2,1% de las muertes.

España junto a Francia e Italia (en la Europa Meridional) y algunos países sudamericanos como Uruguay y Argentina, entre otros registraron un riesgo superior al del resto de países en cuanto a la incidencia acumulada de cáncer de laringe, En comparación con otros países de la UE, podemos decir que España ocupa un lugar intermedio si se estudia la incidencia del conjunto de los tumores malignos. Sin embargo, en hombres, en algunas localizaciones tumorales particulares, como en el cáncer de laringe y desde hace pocos años el cáncer de vejiga, nuestro país presenta las tasas más altas de Europa¹⁰. La estimación de la incidencia anual del cáncer de laringe en España en el periodo 1997-2006 en conjunto es de 4557 casos (852 mujeres y 3705 hombres)¹⁰. Este tipo tumoral comprende el 1% de los caso nuevos de cáncer, y casi el 0.73% de todas las muertes por cáncer^{11,12}. Más del 90% de ellos corresponde a carcinomas epidermoides (CE) y conforma el 27% de todos los tumores de cabeza y cuello. La incidencia más alta ocurre en el sexto decenio de la vida.

Si se divide el país por regiones, se encuentra la incidencia más alta del mundo: 20,4 casos nuevos por 100.000 habitantes y año en el País Vasco en 1987. Sin embargo, el País Vasco no es una excepción; Asturias con 20, Granada con 18.6, Navarra con 17.8, Zaragoza con 17.1 y Murcia con 15.3 se sitúan en las posiciones *mundiales* 20, 30, 40,60 y 100 respectivamente¹³ (Registro del Cáncer de Granada, 1994). En Málaga, la incidencia es también muy alta, con un neto predominio por zonas costeras¹⁴.

Diversos estudios realizados en Japón, Finlandia, Polonia, Inglaterra, Estados Unidos y América del Sur, muestran que los habitantes de las zonas más industrializadas, tienen una incidencia de cáncer de laringe dos o tres veces más alta que las poblaciones rurales¹⁵. En Asia Occidental constituye 4,7% del cáncer en hombres.

El carcinoma de laringe afecta a todas las razas del mundo, incluso a los aborígenes tales como los "pura sangre" originales de Australia y Papúa Nueva Guinea que han tenido pequeños contactos con la civilización occidental¹⁶. Se dice que el carcinoma de laringe es raro en los indios del Norte de América, como lo son los tumores en general siendo casi

desconocidos en los indios del Sur de América¹⁷. En Ohio, la incidencia del cáncer de laringe en la raza blanca es de 6.69, siendo en los negros del 10.58¹⁸. En Singapur la incidencia del carcinoma de laringe varía ampliamente entre los grupos raciales individuales de origen Chino, Malayo e Indo-Pakistaní.

Las leyes religiosas que prohíben fumar y beber, aseguran una incidencia particularmente baja de cáncer de laringe en los Mormones⁹, los Adventistas del 7° día en California¹⁹ y los Parsi de Bombay, región donde por otro lado el carcinoma de laringe es especialmente común²⁰.

Hayes-Martin (1955), estudió la frecuencia del cáncer de laringe a nivel mundial encontrando que el número de intervenciones quirúrgicas se había quintuplicado respecto a las cifras hasta entonces conocidas. En nuestro país, los datos que se manejan son similares, siendo explicados por varios motivos como son la evolución social de la medicina, los avances en los medios diagnósticos y en las técnicas quirúrgicas, el aumento de la edad media de la vida y el aumento de las causas oncogénicas.

La localización anatómica de la lesión determina la presentación clínica y los patrones de diseminación del carcinoma. Los de origen glótico, que constituyen entre el 50-70% de los cánceres laríngeos, se vinculan con frecuencia a alteraciones de la calidad en la voz (disfonía) en etapas tempranas de la enfermedad, que se deben a alteraciones en el volumen, la forma y la movilidad de la cuerda afectada.. Por lo general los cánceres glóticos se descubren antes que los supraglóticos, en los que las molestias faríngeas inespecíficas constituyen una de las presentaciones clínicas predominantes en estadios iniciales. La obstrucción de la vía respiratoria y la disnea representan datos clínicos típicos en los carcinomas subglóticos ya en estadios avanzados, puesto que esta localización tumoral se caracteriza por no presentar síntomas inicialmente.

La supervivencia relativa de los pacientes con cáncer de la laringe varía entre el 60% y el 70% en Europa y Norteamérica, pero es más baja en países en vías de desarrollo. Depende en gran medida de la localización de la enfermedad. En países con consumición elevada del alcohol, el pronóstico es más pobre porque hay más tumores de localización supraglótica, que presentan una mayor tendencia a la recidiva y las metástasis. Los carcinomas de laringe e hipofaringe son con mucho los tumores malignos más frecuentes de cabeza y cuello, aunque en las dos últimas décadas los cánceres de orofaringe y cavidad oral han incrementado su frecuencia notablemente en muchos países. El aumento en la incidencia no es uniforme, variando de unas regiones geográficas a otras. Entre los países con una "alta" incidencia (excluyendo España) de carcinoma de laringe (casos nuevos por 100.000 habitantes y año) se encuentran Uruguay y Polonia con 5.5 a 7.8 en hombres y 0.3 a 0.8 en mujeres²¹, Croacia con 6.2, Ohio con 6.7 y Alemania con 6.4. Se encuentran incidencias más bajas en Japón (0.59), Singapur (1.9), Siria (2.0) y Australia (1.9-3.7)^{22,23}

La frecuencia del carcinoma de laringe en relación con el de hipofaringe está también sujeta a amplias variaciones geográficas. Así mismo, también varía la distribución de los carcinomas de hipofaringe. En un estudio realizado en Estados Unidos, aparecieron 152 carcinomas en seno piriforme, 8 en la región retrocricóidea y 17 en pared posterior faríngea²⁴. En Toronto 19 de 29 carcinomas hipofaríngeos aparecieron en seno piriforme, 7 en la región retrocricóidea y 3 fueron carcinomas multiregionales, no apareciendo carcinomas de pared posterior de faringe²⁵. El carcinoma retrocricóideo es muy raro siendo relativamente común en Inglaterra, Gales y la India, probablemente secundario al Síndrome de Plummer-Vinson²⁶. La frecuencia del carcinoma de cuerda vocal comparada con la del cáncer supraglótico también varía ampliamente en diferentes regiones geográficas²⁷. En Suecia sólo el 11% de los cánceres de laringe afectan a la región supraglótica, mientras que en Finlandia la proporción es del doble²⁸. En Alemania el número de carcinomas de cuerda vocal se ha mantenido constante, mientras que el número de carcinomas supraglóticos se ha triplicado. En Japón e Inglaterra la proporción de carcinomas de cuerda vocal y supraglóticos es similar¹⁵. Se han registrado altas incidencias de carcinoma supraglótico en Chile²⁹. Las mujeres desarrollan carcinoma supraglótico de forma más común que los hombres en términos relativos. En España, el hecho de que el cáncer supraglótico sea más frecuente que el glótico es una realidad.

ETIOLOGIA Y PATOGENIA

FACTORES AMBIENTALES:

El desarrollo del cáncer de laringe es un proceso multifásico en el que interactúan tanto factores genéticos como ambientales. Hay factores externos sobradamente demostrados entre los que se encuentran el tabaco, el alcohol, la infección por el Virus del papiloma humano (HPV)³⁰, y otros en los que se piensa más en un efecto potenciador de los agentes anteriores, como las radiaciones ionizantes, los estímulos mecánicos o térmicos y las toxinas orgánicas o químicas.

TABACO

El tabaco, ya sea fumado, mascado, el tabaco de pipa e incluso el fumador pasivo, al cual no se le ha dado importancia hasta hace relativamente poco tiempo, constituye uno de los factores desencadenantes de mayor relevancia conocida en gran cantidad de enfermedades, como los cánceres de vías aerodigestivas superiores y respiratorias bajas, páncreas, riñón y vejiga entre otros muchos.^{31,32,33} Ningún otro aspecto de la etiología de los tumores malignos ha sido tan ampliamente estudiado como esta relación que ahora se discute.

A final de la Primera Guerra Mundial se produjo un aumento acusado del consumo de cigarrillos, con un aumento correlativo de pacientes con cáncer de pulmón. La incidencia de cáncer de laringe no aumentó hasta finales de la Segunda Guerra Mundial. Ya la OMS y The United States Department of Health e investigaciones procedentes del Royal College of Physicians desarrollaron informes donde se eliminaba cualquier duda razonable sobre la conexión causal entre el uso del tabaco y muchos carcinomas de cavidad oral, faringe, laringe, pulmón, esófago y vejiga.

La nicotina del tabaco no posee ningún efecto carcinógeno. No obstante, la combustión del tabaco libera el alquitrán a partir del cual se han aislado al menos una docena de hidrocarburos aromáticos policíclicos, que sí son carcinógenos. Estas sustancias alcanzan la superficie celular del epitelio, bien con el humo o disueltas en la saliva. La descomposición de estos carcinógenos por la arilhidroxicarbon-hidroxilasa (AHH) produce los epóxidos carcinogénicos que se unen a las moléculas de RNA y DNA. El proceso del desarrollo del carcinoma está sometido a todo tipo de influencias; por ejemplo, el tipo de tabaco, el tiempo e intensidad de acción del carcinógeno, la temperatura y la velocidad de combustión, el tipo de vehículo, la inducción de la AHH genéticamente determinada, la

respuesta del epitelio (parálisis ciliar, producción de moco), la escasez de vitaminas y con seguridad otros muchos factores aun desconocidos. La nitrosamina en el tabaco de mascar puede jugar también un papel en la carcinogénesis³⁴.

El período y cantidad de consumo de tabaco están directamente relacionados con el riesgo de carcinoma de laringe³⁵. Cuanto antes comienza una persona a fumar y cuanta mas cantidad de tabaco fuma, mayor es el riesgo de desarrollar un cáncer y menor es el intervalo de latencia hasta que el tumor se hace clínicamente manifiesto.

Si un paciente deja de fumar, el riesgo de cáncer decrece de año en año³⁶. Los exfumadores, no obstante, pueden desarrollar también un cáncer de laringe, pero habitualmente más tarde que aquellos que siguen fumando; tan solo tienen el mismo riesgo de desarrollar cáncer que los no fumadores tras 10-12 años³⁷. El continuar fumando tras el tratamiento de un carcinoma de laringe es un factor pronóstico negativo para el control de la enfermedad localmente y en general ^{38,39,40}.

Entre el 88% y el 98% de los pacientes con cáncer de laringe son o han sido fumadores activos. Se ha comprobado que más de la mitad de los pacientes con cáncer de laringe fumaban más de 20 cigarrillos al día.

Todos estos estudios muestran que el carcinoma de laringe sería una enfermedad muy rara si la gente no fumara. Por tanto es, en la mayoría de los casos, una enfermedad que se puede prevenir.

La situación que se presenta en pacientes no fumadores ni bebedores es otra bien distinta, ya que la etiología del carcinoma epidermoide, en la localización que nos ocupa, tiene un origen común, aunque con diferencias significativas. Las deficiencias alimenticias, la infección por virus del papiloma humano, y la enfermedad por reflujo gastroesofágico, entre otras, son las bases etiopatogénicas fundamentales en el desarrollo carcinogénico del cáncer de laringe⁴¹ en estos casos.

El humo ambiental exhalado por los fumadores de cigarrillos, cigarrillos puros o pipas, también han adquirido relevancia en la etiología del carcinoma epidermoide de laringe, generando un paciente potencial conocido como *fumador pasivo*. Existen evidencias que relacionan el humo exhalado y el procedente de los propios cigarrillos con el cáncer de pulmón entre otros tipos de tumores⁴². Dadas las similitudes entre el origen carcinogénico de este tipo tumoral y el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, hace pensar en la relevancia que supone el tabaco para el fumador pasivo ⁴². Se han realizado estudios en los cuales queda patente, no solo la relación entre el carcinoma escamoso de laringe y los no fumadores, sino también la asociación de esta patología con un incremento en la incidencia de aparición de cáncer de boca, y mas concretamente el asentado sobre la lengua⁴³. También es relevante decir que el consumo de tabaco de manera pasiva, aumentaba drásticamente la aparición de este tipo de cáncer en mujeres no trabajadoras⁴³.

Existen otras sustancias, que también se consumen vía inhalatoria, sobre las cuales no se ha podido demostrar una relación estadísticamente significativa, como es la marihuana y el carcinoma escamoso de cabeza y cuello⁴⁴.

Los pacientes no fumadores suelen presentar lesiones de manera más precoz que los fumadores⁴⁵, puesto que la localización más frecuente de las lesiones son (en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello) la lengua y la mucosa bucal. Además está descrito que esta población, que ni bebe ni fuma, suele estar más atenta a su estado de salud⁴⁵. De cualquier manera se hace hincapié en múltiples artículos, de calado internacional, sobre la relevancia en la relación, como ya hemos comentado, que existe entre el cáncer de laringe en pacientes no fumadores y la enfermedad por reflujo gastroesofágico⁴⁵.

Cuando se abandona el hábito tabáquico, y transcurridos unos 10 años, el riesgo a padecer carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) se normaliza en términos generales^{37,45}.

Los pacientes no fumadores presentan con mayor probabilidad CECC en edades relativamente tempranas al igual que en edades relativamente tardías⁴⁵.

Existe una relación individual entre el consumo de alcohol y el riesgo a padecer carcinoma escamoso de laringe que consiste en un incremento del riesgo relativo (RR) a padecer cáncer de laringe de 5,5 en consumidores de más de 50 gramos de alcohol al día y de un incremento del RR: 33,8 en consumidores de más de 120 gramos de alcohol al día. Es importante remarcar la fuerte asociación que existe entre el tabaco y el alcohol en el origen de la carcinogénesis, ya que se incrementa hasta en 200 veces el RR a padecer cáncer de laringe cuando se combina el abuso de tabaco y el del alcohol, ya que este último se convierte en un potenciador del efecto carcinogénico que de por sí ya tiene el tabaco⁴⁶. Un consumo de alcohol de hasta 20 gramos diarios sin asociarse al consumo de tabaco, no implica un incremento significativo en el riesgo a padecer cáncer de laringe⁴⁶.

Entre los efectos histológicos del humo del cigarrillo en la laringe humana se encuentran la hiperplasia del epitelio escamoso, la metaplasia, el edema submucoso, el infiltrado inflamatorio, el aumento de la población de células en copa y la queratinización del epitelio escamoso¹⁵. No obstante, estos cambios son extremadamente inespecíficos y pueden ser también signos de laringitis crónica hiperplásica.

El examen histológico de numerosas laringes de cadáver, obtenidas principalmente de hombres que habían sido fumadores, mostró que las células con atipias nucleares se encontraban siempre en los fumadores⁴⁷. La atipia celular fue significativamente más frecuente en los fumadores de cigarrillos que en los fumadores de pipa, puro y ex-fumadores. Existía una clara y estrecha relación entre la cantidad fumada y la atipia: la

atipia se transformaba en carcinoma *in situ* e incluso en carcinoma microinvasor, y estas lesiones se pueden reproducir experimentalmente⁴⁷.

ALCOHOL

El alcohol es ingerido ocasionalmente por la población de forma generalizada, muchos de ellos lo hacen regularmente y algunos en exceso. El alcohol etílico puro no se ha demostrado que tenga un efecto carcinogénico, pero las bebidas alcohólicas están asociadas con una alta incidencia de cáncer⁴⁸. Dado que muchos alcohólicos también fuman, el efecto carcinogénico individual del alcohol es difícil de estimar. Todos los estudios realizados indican una interacción entre el alcohol y el tabaco dado que el consumo de ambos conlleva un riesgo aumentado de cáncer comparado con el consumo aislado de tabaco. Existe unanimidad sobre la consideración del alcohol como un carcinógeno o factor promotor⁴⁹, pero cómo actúa no está claro aún. Se piensa que potencia otros carcinógenos, daña el epitelio directamente, causa una deficiencia de riboflavina y altera la síntesis de IgA entre otros⁵⁰. De igual forma, la nutrición tan pobre secundaria al consumo del alcohol podría conllevar bajos niveles de albúmina sérica y deficiencias vitamínicas, o un efecto inmunosupresor del alcohol podría también favorecer la aceleración del proceso de inducción del cáncer. Los alcohólicos están más comúnmente representados que los no alcohólicos entre los pacientes con cáncer de boca, faringe e hipofaringe. Algunos estudios de mortalidad han mostrado que el carcinoma de laringe también es significativamente más común en alcohólicos que en abstemios.

El 50 % de todos los pacientes con carcinoma supraglótico son bebedores excesivos, el 75-92% de todos los pacientes con cáncer de laringe beben alcohol regularmente y de ellos, el 62% son bebedores importantes¹⁵.

RADIACIONES IONIZANTES

Después de un periodo en el que las radiaciones ionizantes se utilizaron en medicina con muy pocas precauciones, se entró en un periodo en el que el interés se ha focalizado en el riesgo potencial de los reactores nucleares. Incluso las dosis de radiación necesarias para simples procesos diagnósticos preocupan a la sociedad.

Multitud de estudios sobre carcinoma laríngeo inducido por radiaciones ionizantes se han publicado desde hace décadas^{51,52}. En los primeros años los casos eran relativamente inusuales y aparecieron tras irradiaciones “benignas” de cabeza y cuello. No obstante, ahora

se ratifica la evidencia que relaciona la aparición de segundos tumores en las irradiaciones empleadas en el cáncer de cabeza y cuello.

Las radiaciones externas de cabeza y cuello pueden causar cáncer de laringe. Aun así, han aparecido carcinomas de tiroides, hipofaringe y del espacio retrocricoideo, así como sarcomas de laringe tras la radiación de la glándula tiroides en el tratamiento de la tirotoxicosis. Así mismo, se han observado carcinomas de laringe y sarcomas tras la radiación de la piel del cuello en micosis y en el lupus eritematoso sistémico. La práctica denostada consistente en irradiar los ganglios linfáticos tuberculosos fue seguida en algunos casos de un carcinoma de hipofaringe y laringe. En una revisión de un gran número de casos de degeneración maligna de papiloma laríngeo juvenil en las publicaciones desde 1957, se demostró que la mayoría de las veces, la laringe fue radiada previamente. Desde entonces se han publicado numerosos casos similares. Por el contrario, la degeneración espontánea del papiloma juvenil a carcinoma de laringe es extremadamente rara. El intervalo de latencia hasta la aparición de la degeneración maligna está comprendido entre 3-44 años, con una media de 20 años. La fuente de radiación en estos casos casi siempre la constituyen radiaciones X¹⁵.

PAPILOMAVIRUS HUMANO

El tabaco fumado y masticado, además del consumo abundante de alcohol han quedado establecidas como factores de riesgo de radical importancia en la etiología del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. Desde hace unos 15 años, el papilomavirus, factor etiológico fundamental en el desarrollo del cáncer de cérvix, se ha relacionado con el origen de un subconjunto de este grupo tumoral⁵³.

De cualquier manera, la presencia de ADN viral en la muestra tumoral no es suficiente evidencia como para afirmar que el tumor pudiera ser debido a la infección del virus del papiloma humano (VPH). Algunos estudios de biología molecular han ayudado a demostrar e identificar serotipos de papiloma virus donde la relación causal tiene una mayor consistencia, como son algunos subtipos localizados en orofaringe⁵⁴, concretamente en las amígdalas palatinas^{55,56}. La relación casual entre el VPH y determinados carcinomas epidermoides de cabeza y cuello ha quedado demostrada en múltiples estudios en estos últimos años, donde el ADN del HPV ha sido identificado en términos generales hasta en un 15% de los casos de CECC⁵⁴.

El serotipo más frecuentemente detectado ha sido el VPH-16, hasta en 90-95% de los CECC- VPH positivos, seguido del VPH-18 y el VPH-33, entre otros. La prevalencia de cada subtipo de VPH varía en acuerdo con la localización tumoral. La localización mas

frecuente es el carcinoma epidermoide de orofaringe; donde es especialmente común los carcinomas localizados tanto en amígdalas linguales como en amígdalas palatinas, con un rango de prevalencia entre el 45% y el 67%^{57,58,59,60}. Con menor frecuencia ha sido localizado en el resto de la cavidad oral (12-18%), en lengua (12%), hipofaringe (13- 25%), o en laringe (3-7%)^{61,62}. (Figura 1)

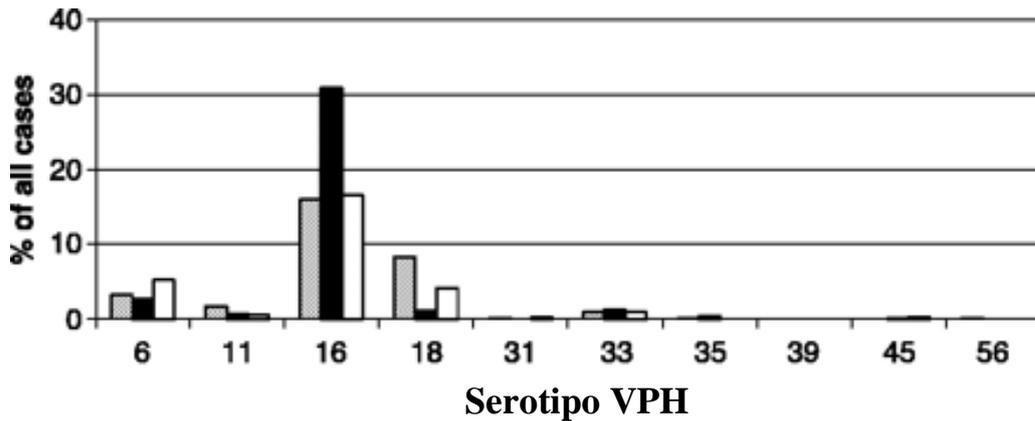


Figura 1: Serotipos de Virus del Papiloma Humano (VPH) relacionados con el carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

El mecanismo de acción, es a través de proteínas codificadas por estos virus oncogénicos (oncoproteínas E6 y E7), que actúan induciendo la degradación de la p53^{62,63}, como es el caso de la Oncoproteína E6⁶⁴. Por otra parte, la Oncoproteína E7 está relacionada con la supresión de la función de la pRb⁶⁵. Una expresión disminuida de la pRb que es un hallazgo muy común en el carcinoma epidermoide de origen amigdalario⁶⁶.

Todos estos datos conducen a una doble hipótesis sobre el origen carcinogénico en los tumores de cabeza y su posible relación con el VPH:

1. Una primera, en la que el origen se vería plasmado en la actividad supresora que provocan las proteínas oncogénicas E6 y E7 sobre la p53 y la pRb lo cual conllevaría una alteración en la regulación sobre el control del ciclo celular. Esta vía se relacionaría preferentemente con los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello que afectan a pacientes no fumadores⁶⁷.
2. Una segunda fundamentada en la carcinogénesis inducida por el tabaco y el alcohol, en términos generales.

Estas dos vías podrían desarrollarse conjuntamente o de manera independiente.

Existe otra relación que tendría una gran repercusión sobre el control del ciclo celular, que es la existente entre el VPH 16 y el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR)⁶⁸. Los niveles del receptor de factor de crecimiento epidérmico se encuentran en niveles muy altos en los queratinocitos humanos que se encuentran sobreinfectados por el VHP 16 (HKc/ VHP16). Pero actualmente se defiende la hipótesis de que este incremento precede a la infección del virus por lo que el aumento del número de estos receptores podría promover la sobreinfección y posterior carcinogénesis provocada por el VPH 16⁶⁸.

El carcinoma epidermoide que afecta a población más joven muestra una incidencia aumentada en la población femenina sin factores de riesgo reconocido, y ocurre más frecuentemente en la cavidad orofaríngea⁵⁴. La influencia que la edad ha supuesto en la supervivencia, nos plantea resultados contrapuestos con respecto a pacientes con edad avanzada donde la diferencia clinicopatológica más característica que se han expuesto, han sido, las diferencias moleculares en el comportamiento en población joven. La inestabilidad microsatélite constituye la diferencia de mayor relevancia entre población la población joven y el resto (88% y 36%). Se detecta con mayor frecuencia en la lengua (71%)⁵⁴. El mecanismo molecular de este factor es aún desconocido, y no han podido identificarse mutaciones o promotores que los identifiquen.

La **Anemia de Fanconi** es una enfermedad autonómica recesiva de la médula ósea presentando los pacientes cierta predisposición a desarrollar leucemia mieloide aguda y otros tipos de tumores sólidos, además de alteraciones congénitas. El incremento del riesgo relativo para padecer carcinomas epidermoides de cabeza y cuello que presentan los pacientes con anemia de Fanconi es de 700 veces más que en la población normal. La base molecular que justifica este incremento es desconocida⁶⁹, aunque se ha registrado un alto índice de infección por DNA de HPV 16 en pacientes afectados por esta patología⁶⁹. Además no suelen existir mutaciones de la P53 como ocurre en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello que acontecen en los tumores HPV positivos. Todo esto apoya la hipótesis que relaciona la Infección por HPV 16 con la posibilidad de desarrollar carcinomas de cabeza y cuello en el contexto de la anemia de Fanconi⁷⁰.

Varios agentes ambientales más se han implicado en la patogenia del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, y en la actualidad se acepta una hipótesis multifactorial sobre la carcinogénesis laríngea. Existen otros factores ambientales que también han sido relacionados, como la radiación y la exposición a los asbestos, al serrín, gas mostaza y a los productos de las refinerías...

FACTORES GENETICOS

Se han realizado gran número de estudios para examinar las alteraciones cromosómicas existentes en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC), estableciéndose modelos de carcinogénesis a nivel celular con las alteraciones cromosómicas detectadas en las distintas regiones genómicas. Mediante estudio de algunas de ellas se han podido identificar regiones con posibles genes candidatos, como la **9p21** (región del gen supresor de tumores p16)⁷¹, la **17p13** (lugar del gen supresor de tumores p53 y tal vez de otros genes supresores aún desconocidos), **3p** (donde se cree que residen hasta tres genes supresores)⁷¹ y **13q21** (donde residen un gen supresor de tumores desconocido aún, próximo al locus del retinoblastoma) entre otros.

MODELO DE PROGRESION GENETICA EN LA CARCINOGENESIS DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO

En múltiples estudios realizados con análisis microsatélite¹¹ en diversas series de lesiones hiperplásicas, lesiones displásicas, carcinomas in situ y carcinomas epidermoides invasivos, se examinaron estos y otros loci cromosómicos, generándose el “Modelo de Progresión Genética Secuencial en la Carcinogénesis de las Células Escamosas de Cabeza y Cuello”⁷². Dicho modelo se basa en que:

- Existían genes supresores, como el **p16**, **p21** y **p27** que codificaban proteínas trascendentales en el control del Ciclo Celular entre otras funciones. La alteración de la proteína **p16** codificada por el gen *P16* (localizado en 9p21), era un acontecimiento precoz que ocurriría en la transición de célula normal a metaplasia escamosa⁷¹. Esta alteración cromosómica aparecía también en otros tipos tumorales como el melanoma, y en algunos tipos de cáncer de pulmón, etc.
- La transición a *displasia* era seguida de la pérdida del **3p** y **17p** con pérdidas adicionales (11q, 13q, 14q)⁵⁴, que ocurrían más frecuentemente en *carcinoma in situ*, y otras (6p, 8q, 4q) en *células de carcinoma escamoso invasivo*⁷¹.
- La secuencia de la p53 indicaba que su pérdida de función ocurría en la transformación maligna de las células escamosas.

- Los tumores bien diferenciados demostraban una baja expresión de cromosomas 3p, 5q, y 9p, todos con sobreexpresión del 3q.
- Los tumores pobremente diferenciados compartirían estas aberraciones, presentando además otras anomalías como la delección de 4q, 6q, 8p, 11q, 13q, 18q, y 21q, y una sobreexpresión de 1p34-pter, 11q13⁷³, 19, y 22q.

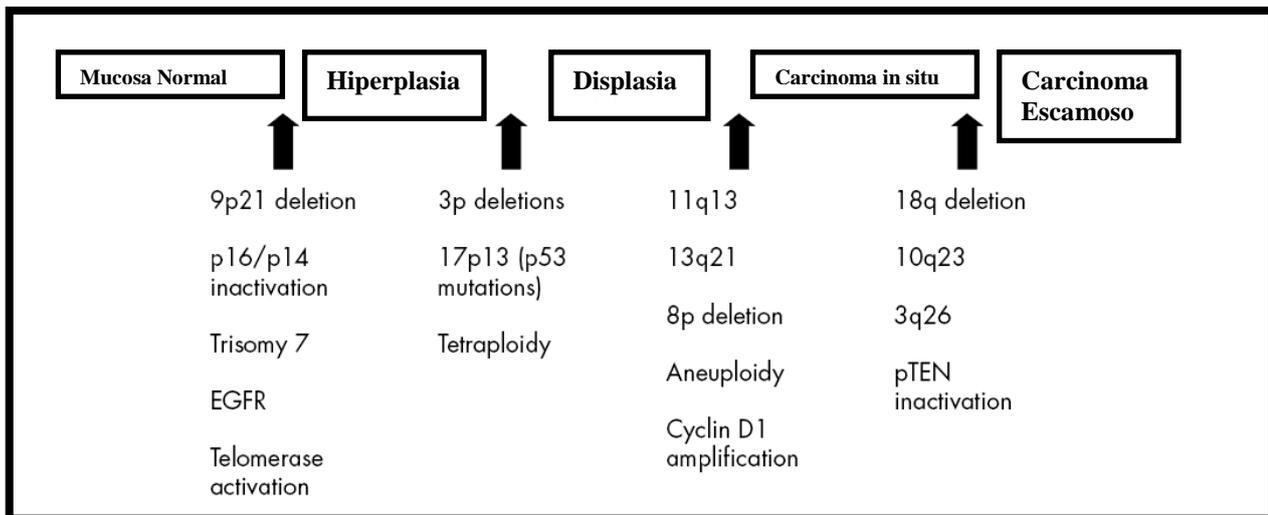


Figura 2: Modelo de progresión carcinogénica en el CECC (adaptado de Califano y cols⁷²)

El análisis pormenorizado de las repercusiones derivadas de las alteraciones genómicas en las distintas fases del ciclo celular, llevarán a un mejor entendimiento de la carcinogénesis en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. Se analizan entre otras alteraciones genómicas, las distintas disrupciones en las señales mitogénicas celulares, las alteraciones del control celular, los trastornos en la relación de contacto y diferenciación célula-célula, además de las alteraciones en la apoptosis celular.

ALTERACIONES EN EL PASO DE LA SEÑAL MITÓGENA

Se inicia a través de los receptores de la superficie celular, que están alterados en muchos tipos de neoplasias, como las correspondientes al carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Se hace referencia a dos receptores de membrana: El receptor del factor de crecimiento epidérmico (**c-erbB1**) y el relativo al receptor HER-2/neu (**c-erbB-2**). Ambos receptores tienen dominios citoplasmáticos con actividad tirosin-quinasa y activan vías de mensajeros secundarios intracelulares. Se profundizará además, en varias moléculas como el **STAT3**, **Peptido liberador de Gastrina**, **Neurokinina 1**..., que repercuten sobre dicha señalización.

- **El Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico:**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por epidermal growth factor receptor) pertenece a la familia ErbB/HER en la que se incluyen además: el Her2, Her3 y Her4, pertenecientes a la superfamilia de receptores localizados en la membrana plasmática celular con actividad tirosin-quinasa intrínseca. En humanos, el gen que codifica el EGFR (c-erbB1) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 (región p13-p12). Este gen está compuesto por 28 exones que ocupan un segmento de 75 kb, apareciendo de forma aberrante o amplificado en muchos tumores malignos, como por ejemplo en gliomas y glioblastomas^{74,75}, en diversos carcinomas^{76,77,78} y algunos sarcomas⁷⁹.

Se ha planteado la posibilidad de que existan receptores del factor de crecimiento epidérmico en otras localizaciones, lo cual tendría importantes implicaciones en la regulación de la carcinogénesis, pudiendo actuar como factor de transcripción debido a una posible localización nuclear⁸⁰.

Una gran cantidad de genes podrían ser activados directamente por el EGFR mediante una cascada de señales de transducción, en vez de una acción directa de este receptor activado directamente en la membrana celular. De manera similar, se ha postulado dicha presencia y función nuclear para los receptores ErbB2⁸¹ y ErbB3⁸².

Este factor, y su principal ligando, el **factor-alfa (TGF-alfa)**, al igual que otros ligandos como **Betacellulin**, **Heregulin**, **Amphiregulin (AR)**, entre otros, están sobrerregulados en las líneas celulares con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello estudiadas, constituyendo un circuito cerrado de activación autocrina. La TGF-alfa se sobreexpresa en la carcinogénesis temprana, siendo elevada en la displasia moderada, pero sin incrementos notables en la displasia grave o el carcinoma insitu^{83,84}. Por el contrario

el EGFR se incrementa paralelamente al grado de displasia, presentando un mayor sobrecrecimiento en estadios avanzados y en tumores pobremente diferenciados. También existe sobrerregulación en el epitelio normal próximo a los tumores, lo cual apoya la teoría del **Campo de Cancerización**⁸⁵. La sobreexpresión del receptor de crecimiento epidérmico y su ligando el TGF-alfa son prevalentes en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello; el ARN m concreto se encuentra sobreelevado respectivamente en un 92% y un 87%^{85, 86}.

El expresión de las proteínas que constituyen el EGFR encontrada en el cáncer de laringe, se encuentran sobreelevadas entre un 38 y un 47%, en comparación con la detectada en carcinomas localizados en faringe o cavidad oral⁸⁷.

Además del EGFR, otros miembros de familia ErbB sufren una sobreexpresión en cáncer de cabeza y cuello (ErbB2, el 3 % al 29 %; ErbB3, el 21%; ErbB4, el 26 %) ^{88, 89}.

- **Receptor HER-2/neu (c-erbB-2):**

El oncogen **ErbB-2/Neu** codifica el receptor de la **Herregulina/NDF** y también se encuentra amplificado en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. Un gran número de estudios sobre esta molécula han revelado una repercusión trascendental sobre la diferenciación en cuanto a motilidad y adhesión celular. La sobreexpresión de este receptor se ha relacionado con la aparición de tumores sólidos en otras localizaciones como en pulmón, ovario y estómago, entre otros. Se ha identificado como factor de mal pronóstico⁹⁰, aunque, por el contrario, han aparecido otros estudios donde no se encuentra correlación entre dichos parámetros clínicopatológicos⁹¹. Esta alteración acontece, aproximadamente, en el 50% de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, además, algunos trabajos apoyan la hipótesis de que la coexpresión de c-erbB1 y c-erbB2 se relaciona con un mayor potencial metastático a nivel linfático^{92,93}. De cualquier manera la sobreexpresión del c-erbB-2 podría ser utilizada como marcador de supervivencia en pacientes con carcinomas epidermoides de cabeza y cuello recurrentes, ya tratados con quimioterapia⁹⁴.

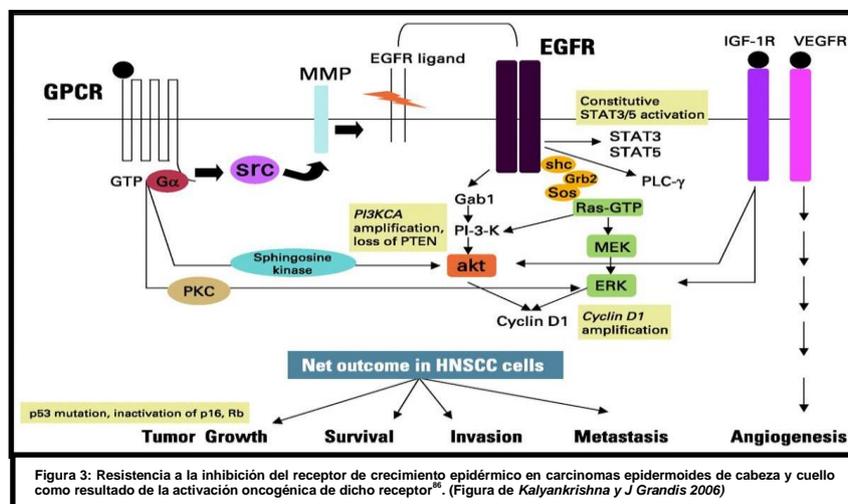
Péptido Liberador de Gastrina (GRP):

Es un potente agente mitogénico, que actúa tanto en tejido normal como neoplásico, afectando básicamente a la regulación del crecimiento celular. Los efectos de este péptido, la *Neuromidina-B*, u otros péptidos parecidos a la *Bombesina*, son mediados por receptores de proteínas G acopladas⁹⁵, incluido el receptor para el péptido liberador de Gastrina (*GRPR*) y el receptor para la *Neuromidina B*. El GRP está producido por células pulmonares

neuroendocrinas y se ha relacionado con el normal desarrollo pulmonar, con alteraciones pulmonares relacionadas con el tabaco, carcinoma pulmonar de células pequeñas y el adenocarcinoma de células grandes. Las señales derivadas del control del receptor del péptido para la liberación de gastrina (GRP) parecen mediar entre la agresión que genera la exposición continuada del tabaco y el crecimiento autocrino de los carcinomas pulmonares⁹⁵.

Se ha relacionado la regulación autocrina del GRPR y el desarrollo carcinogénico del carcinoma escamoso de cabeza y cuello⁹⁵. Se han publicado estudios apoyando esta hipótesis, analizando la expresión de RNA-m GRPR en tejidos de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, tejidos sin tumor y cultivos celulares con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello obtenidos mediante la técnica de la PRC. Tras la utilización de un anticuerpo monoclonal contra el receptor de GRP en los distintos tejidos, se concluyó que el GRP y el GRPR, participaban de en la regulación autocrina dentro de la carcinogénesis precoz en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello⁹⁶.

Pudo evidenciarse una inhibición de la proliferación celular tanto *in vivo* como *in vitro*, mediante la neutralización con anticuerpos monoclonales del GRP y el GRPR, lo cual arrojó resultados esperanzadores en el tratamiento futuro de este tipo tumoral. Se ha descrito una íntima asociación entre el GRP y el EGFR relacionada a través de **la familia de quinasas-Src**⁹⁷, las cuales producirían señales intracelulares encargadas de la regulación de la proliferación celular⁹⁷. El péptido liberador de Gastrina (GRP) podría inducir una fosforilación rápida del receptor del factor de crecimiento epidermico (EGFR), entre otras funciones, debida a la estimulación de la secreción del TGF-alfa y de la Amphiregulin (AR)⁹⁸, entre otros ligandos⁹⁷, provocando la activación de las quinasas-Src y éstas, a su vez, mediante una matriz de metaloproteasas, actuando sobre el EGFR. El bloqueo de las quinasas-Src, usando un inhibidor específico, disminuiría la fosforilación del EGFR inducida por la GRP. (Figura 3)



STAT3

El STAT3 (por *Signal transducer and activator of transcription*) es un transductor de señal y activador de la transcripción. Cuando el EGFR se estimula, activa a las proteínas STAT, que a su vez inducen la proliferación celular. Está descrito el aumento de expresión de STAT3 en la mucosa de los pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, y que el bloqueo de la expresión de EGFR, parece reducir la activación de STAT3⁹⁹. Aunque no se han publicado estudios que relacionen la actividad STAT y la supervivencia de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, parece que esta kinasa está fuertemente relacionada con los procesos de progresión tumoral¹⁰⁰. Curiosamente la distribución de STAT3 activado en la mucosa normal difiere entre los pacientes con cáncer y los individuos sanos. Mientras que la forma fosforilada de STAT3 se expresa normalmente en las capas basales de la mucosa de personas normales, en los pacientes con cáncer la expresión se detecta en todo el espesor de la misma, sugiriendo que el gen se altera tempranamente en la carcinogénesis⁹⁹. Por otro lado, en los tumores pobremente diferenciados se detecta una sobreexpresión del gen¹⁰¹.

Receptor de la Neurokinina 1

El Receptor de la Neuroquinina 1 es una proteína transmembrana que procede de la familia de las taquicinas, cuya activación por la **sustancia P (SP)**, induce mitogénesis en numerosas líneas celulares, como la del cáncer de laringe Hep-2¹⁰². Muy recientemente se ha descrito la presencia de este receptor en los cánceres de la cavidad oral¹⁰³, y laringe¹⁰⁴, sugiriéndose que la expresión en membrana del mismo sea responsable de una potente señal mitótica para las células tumorales¹⁰⁵.

Las acciones biológicas de la SP son llevadas a cabo mediante la activación del receptor de Neurokinina 1 por dicha sustancia. Entre las funciones biológicas con las que ha sido relacionada cabe destacar, la inflamación neurogénica, el dolor, la depresión, ansiedad, vómitos. Los antagonistas del receptor de la NK1 (NK1R) han sido probados como eficaces en tratamientos antieméticos, antidepresivos y analgésicos entre otros. Por otro lado, se ha podido constatar que la activación del NK1R induce mitosis en diversas células tumorales procedentes de diferentes líneas celulares de cáncer, además se han realizado estudios con inmunofluorescencia en los que se demuestra que los tejidos tumorales estudiados poseían una mayor cantidad de receptores NK1 que los tejidos adyacentes sanos.

Se piensa que la inhibición del crecimiento tumoral hallado, se debe a que el bloqueo del NK1R por su antagonista produce una inhibición tanto de la síntesis de DNA así como

de la proliferación celular mediada por la ruta de las Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK). Esteban et al. proponen¹⁰⁵ que el aumento de los NK1R en la membrana celular, sería el mecanismo por el cual la SP produciría sólo en estas células un aumento de las señales mitogénicas contrarrestando las diferentes señales apoptóticas y/o señales prosenescencia en la población de células neoplásicas.

La hipótesis que defiende esta investigación se fundamentaría en los estudios previos con otras líneas celulares de cáncer (tumores de mama, de pulmón, del sistema nervioso central, pancreáticos y retinoblastoma entre otros)^{106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127} de tal forma se defiende que, el receptor de la Neurokinina 1 está involucrado en la posible acción antitumoral del L-733,060 y del L-732,138 (antagonistas de dicho receptor) y en la posible acción mitogénica de la SP sobre la línea celular de cáncer laringe Hep-2.

Por otro lado, mediante inmunohistoquímica se ha podido evidenciar que el NK1R, se encuentra en la gran mayoría de los carcinomas e indicadores de inflamación crónica¹⁰⁴.

ALTERACIONES EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR

Existen factores que juegan un papel crítico en la regulación del ciclo celular, muchos de ellos se encuentran alterados en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

- **Sobreexpresión de la Ciclina D1:**

El Gen de la *CCND1* (*PRAD1*), localizado en la región cromosómica 11q13, codifica la Ciclina D1, una proteína que tiene un papel clave en la regulación del ciclo celular en la transición G1/S. La amplificación del gen *CCND1*, con la consiguiente sobreproducción de Ciclina D1, es una de las anomalías más frecuentemente encontrada en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello¹²⁸. Dicha amplificación se ha asociado a una mayor agresividad tumoral y un peor pronóstico. Es un suceso tardío en el desarrollo de la carcinogénesis, produciéndose más tarde que otros procesos como la inactivación de la *P53*¹²⁹.

Se han realizado muchos estudios donde se ha analizado la amplificación de la ciclina D1 hallándose una asociación con tumores mas agresivos y con una menor supervivencia^{130, 131}. También se han descrito algunas combinaciones de distintas alteraciones que marcan un pronóstico negativo con resultado significativo, como son las pérdidas alélicas del gen *P53* asociadas a la amplificación del gen *CCND1*¹²⁹.

- **Inactivación de gen supresor de tumores p16INK4a:**

La mutación que inactiva al gen supresor de tumores *p16INK4a*, delección del gen *p16* localizado en el 9p21, es una de las alteraciones genéticas más comunes que se han descrito en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

La *p16* interacciona con la Ciclina–D1-CDK4 regulando su actividad y previniendo la fosforilación del gen supresor del retinoblastoma, como consecuencia, provoca una regulación a la baja de la proliferación celular¹³². En las últimas publicaciones al respecto, se describió la amplificación de la Ciclina D1 de un 30% en los tumores estudiados¹³⁰, y una frecuencia de un 52% en el caso de la delección de la *p16*. En este mismo estudio se observó que la carencia en la expresión del gen *p16* se presentaba hasta en un 64% de los pacientes, existiendo una gran correlación entre la delección y el defecto en la expresión de la *p16* ($p=0.008$)¹³². La amplificación de la ciclina D1 se relaciona, de forma

estadísticamente significativa, con el aumento de resistencias, mayor frecuencia de metástasis a distancia¹³³, y con la supervivencia. En el caso del gen *P16* también se apreciaba una fuerte relación con el aumento de metástasis a distancia. Se demostró de manera significativa que existía una correlación entre la amplificación de la ciclina D1 y la delección en el gen p16, asociándose ambos cambios con la recurrencia, metástasis a distancia y la supervivencia, potenciándose entre sí para un peor pronóstico en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello^{130,133}.

Se han descrito efectos antitumorales al introducir este gen supresor de tumores en colonias de células cancerígenas¹³⁴.

No es sorprendente que la combinación de varias alteraciones genéticas tenga mayor valor pronóstico que cada una de ellas aisladamente, ya que este desarrollo es muy complejo y presenta alteraciones e interacciones entre productos de distintos genes.

- **Retinoblastoma**

El gen del retinoblastoma (Rb, localizado en el cromosoma 13q14) es un elemento clave en el control del ciclo celular¹³⁵. La proteína Rb cuando está hipofosforilada se liga e inactiva a un factor de transcripción responsable de la progresión del ciclo celular, EF1, por lo que la mutación del gen Rb o la inactivación del mismo, conllevan a un crecimiento celular incontrolado. Mediante inmunohistoquímica, se han detectado disminuciones en la expresión, en porcentajes variables, de tumores de cabeza y cuello, desde el 6 al 74%^{136,137,138,139}, mientras que el estudio de la pérdida de heterocigosidad (LOH) demuestra la pérdida de un alelo entre 14 y el 59% de los casos^{140,141}.

- **Oncogen *c-myc*:**

El Oncogen *c-myc*, descrito inicialmente en el linfoma de Burkitt, está íntimamente relacionado con el control de la transcripción celular, y reside en el brazo largo del cromosoma 8q. Está constituido por 3 exones que codifican una proteína nuclear de 62-KDa, que actúa como factor transcriptor nuclear con una vida media corta de sólo unos minutos. Parece jugar un papel fundamental tanto en el desarrollo normal como en la carcinogénesis celular¹⁴². El *c-myc* actúa, junto a otros genes, precipitando la apoptosis vía p53¹⁴³.

La amplificación del locus *c-myc* ocurre frecuentemente en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, y se ha relacionado con un peor pronóstico en cuanto a la supervivencia. Otros resultados han revelado una correlación negativa entre la sobreexpresión del oncogen y la capacidad metastásica a nivel ganglionar de los carcinomas

epidermoides de área otorrinolaringológica, aunque existen autores que no apoyan esta correlación negativa¹⁴⁴. Algunos estudios más recientes han descrito que no existe correlación entre la sobreexpresión de c-myc y parámetros clinicopatológicos como: sexo, edad, grado histológico, o tipo de cáncer¹⁴⁵. Lo que si se ha constatado, aunque sin una evidencia significativa, es que los niveles de la proteína codificada por el oncogen c-myc tendría niveles superiores en estadios tempranos de la carcinogénesis comparativamente con estadios tardíos. Esto sugeriría que la sobrerregulación del oncogen c-myc, correspondería a un acontecimiento temprano en la carcinogénesis laríngea¹⁴⁵.

- **Inactivación de la p53:**

La p53 es un factor antineoplásico fundamental que, mediante la inhibición del ciclo de crecimiento celular e inducción de apoptosis celular, actúa en la supresión de la proliferación celular aberrante¹⁴⁶.

Los primeros estudios que investigaron supuestas mutaciones de p53 en carcinomas de cabeza y cuello mediante inmunohistoquímica, dieron resultados contradictorios. Parece razonable suponer que la mutación de p53 fuera un paso necesario en la transformación maligna en tumores de cabeza y cuello, en este sentido las células normales no tendrían la p53 mutada. Existen estudios que demuestran que en una mitad de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, el gen de la p53 se encontraría inactivo^{146,147}. Por otro lado, podría tratarse de un acumulo de p53 normal en células continuamente expuestas a carcinógenos¹⁴⁸, o bien que la proteína E6 del HPV humano inactivase a la p53 al acelerar su degradación. Se han demostrado tasas altas de inclusión del genoma del VPH en leucoplasias y carcinomas de cabeza y cuello. En otros estudios se planteó que la mutación en la p53 parecía ser mucho más común en tumores HPV negativo, que en los positivos, apoyando también la idea de la inactivación de la p53 por medio de la interacción con la oncoproteína viral E6³⁰. Clínicamente se ha relacionado la p53 mutada con un incremento en el riesgo de recaídas a nivel locorregional^{149,150}.

ALTERACIONES DEL CONTROL DEL CONTACTO CELULA-CELULA

Dado que la adhesión intercelular es crítica en los procesos dinámicos necesarios para la morfogénesis tisular, así como para el mantenimiento de los tejidos diferenciados, en los últimos años se ha presentado mucha atención a los genes que regulan la expresión de estas moléculas, necesarias en las interacciones célula-célula o célula con la matriz extracelular. Por otro lado, se ha descubierto que algunas de estas moléculas, pueden iniciar señales intracelulares regulando diversos procesos tales como la división celular, la migración o la diferenciación. La expresión de estas moléculas está fuertemente regulada y se produce, en el epitelio de la vía aerodigestiva superior, de forma muy ordenada, controlándose así los mecanismos de proliferación, movilidad, diferenciación y, por ende, supervivencia. En los tumores malignos, la regulación de muchos de estos procesos se encuentra alterada, y se han relacionados distintas características del fenotipo maligno con la expresión, a su ausencia, de algunas de estas moléculas¹⁵¹. Dado que se descubren nuevas moléculas, la clasificación de las moléculas de adhesión intercelular se va haciendo cada vez más compleja. Procederemos a describir 4 familias como son las Integrinas, Cadherinas, Selectinas y las pertenecientes a la superfamilia de las Inmunoglobulinas. (Tabla 1).

- **E-cadherina**

La molécula específica de adhesión epitelial célula-célula (*E-cadherin*) realiza un complejo trabajo en el normal desarrollo de las relaciones de unión entre células próximas en el tejido epitelial¹⁵². Son glicoproteínas transmembrana que funcionan de forma Ca^{2+} -dependiente. Juegan un papel importante en los fenómenos de ordenación y reconocimiento celulares que tienen lugar durante el desarrollo, siendo consideradas como importantes reguladores de la morfogénesis¹⁵³. Se han descrito numerosas alteraciones de expresión, fundamentalmente pérdidas, de las caderinas en los tumores de cabeza y cuello^{154,155,156}. La pérdida de esta molécula se ha relacionado con el incremento de la capacidad invasiva de los tumores de extirpe epidermoide, concretamente los que se localizan en cabeza y cuello. También se ha asociado con un incremento en la probabilidad de extensión linfática¹⁵⁷.

- **Integrinas**

Las integrinas son una familia de glicoproteínas transmembrana que se encuentran en la práctica totalidad de las células, siendo con diferencia la mayor familia de receptores

de adhesión intercelular. Además de mediar la adhesión celular, participan en muchos procesos celulares tales como la proliferación, migración, supervivencia y diferenciación celular¹⁵⁸.

Como ocurre en otros carcinomas, la expresión de integrinas en los tumores de cabeza y cuello muestra heterogeneidad tanto intra como intertumoral¹⁵⁹ existiendo una tendencia a que los tumores menos diferenciados y más agresivos muestren alteraciones en su expresión¹⁶⁰.

- **Selectinas**

Las selectinas son una familia de proteínas transmembrana que se encuentran en plaquetas, leucocitos y células endoteliales¹⁶¹. Las selectinas median fundamentalmente la adherencia de los leucocitos a las células endoteliales, permitiendo el paso de los mismos a través de la pared. Las selectinas no se expresan normalmente por las células epiteliales, habiéndose descrito recientemente en diversos tumores de cabeza y cuello^{162,163}.

Tabla 1 Moléculas de adhesión célula-célula			
Familia	Moléculas	Ligandos	Funciones conocidas
integrinas	alfa2 beta1	Colageno , Laminina	Principales receptores de las interacciones intercelulares. Actúan en numerosas funciones de los queratinocitos , tales como la migración , diferenciación , adherencia a la membrana basal, producción de proteasas(entre otras)
	alfa2 beta1	laminina	
	alfa2 beta1	Fibronectina	
	alfa2 beta1	Tenascina	
	alfa2 beta1	Vitronectina	
Cadherinas	E-Cadherina	Homotípica	Relacionados con las funciones de mantenimiento del contacto intercelular y la arquitectura tisular
	P-cadherina	Homotípica	
	Desmogleinas I-3	Homotípica	
	Desmocollinas I-3	Homotípica	
Selectinas	E- Selectina	Carbohidratos tales como Slex, Slea	Posiblemente relacionadas con la respuesta inmune
	S-Lex en queratinocitos basales		
Superfamilia inmunoglobulinas	ICAM-1	B2integrinas en neutrofilos, monocitos y linfocitos.	Respuesta inmunológica: migración celular y adherencia en distintos cuadros inflamatorios. Como el líquen plano oral.
CD44	CD44s	Hialuronico	Posiblemente involucrado en migración y proliferación celulares, así como la capacidad metastásica

ALTERACIONES EN LA REGULACION DE LA MUERTE CELULAR

La apoptosis (o "**muerte celular programada**") es un proceso biológico ordenado y "silencioso", que no produce ningún tipo de reacción en los tejidos, pero que resulta necesario para evitar la sobreproducción celular. La alteración de la regulación de este proceso puede concluir en acontecimientos críticos y desencadenar el inicio de la carcinogénesis.

- **P53**

Uno de los reguladores más importante al efecto, es la **p53**, cuya alteración, como se ha descrito anteriormente, podría tener una gran repercusión en el desarrollo del carcinoma epidermoide en esta localización.

- **Familia Bcl-2**

La familia de las Bcl-2 constituye un conjunto de moléculas cuya función puede ser apoptótica o antiapoptótica. Aproximadamente el 70 % de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello presentan una regulación alterada de estas moléculas.

Se han realizado estudios en los que se han demostrado una asociación entre la sobreexpresión de las moléculas de la familia Bcl-2 y una mejor respuesta a la quimioterapia, al igual que un mejor control locorregional y mayor supervivencia¹⁶⁴.

CALPAINAS

Las calpainas son una familia de proteasas que están implicadas en la regulación de una gran variedad de funciones celulares como la señalización intracelular, proliferación, diferenciación, movilidad celular y apoptosis.

μ -Calpaina Y M-Calpaina

Se ha escrito mucho sobre el Sistema de las Calpainas desde que en 1976 se purificó una proteína Ca^{2+} dependiente, que posteriormente fue llamada *m-calpaina*. Originariamente este sistema abarcó tres moléculas: 2 proteasas Ca^{2+} dependientes, *μ -Calpaina* y *m-calpaina*, y un tercer polipéptido, *la calpastina*, de la que sólo se conocía la función de inhibir a las dos anteriores.

Los términos *μ -calpaina* y *m-calpaina* fueron usados por primera vez en 1989¹⁶⁵, para referirse a proteasas específicas dependientes de Ca^{2+} . En virtud de las concentraciones de Ca^{2+} necesarias para desarrollar su función, pasaron a llamarse *m-calpaina*, cuando los niveles de Ca^{2+} necesarios rondaban las concentraciones milimolares, o *μ -calpaina* en caso de los niveles necesarios fueran a concentraciones micromolares. Mayoritariamente han pasado a ser denominadas “**Calpainas Ubicuas**”, “**Típicas**” o “**Calpainas Convencionales**”.

La *μ -calpaina* y *m-Calpaina* son heterodímeros que contienen una **subunidad de 28-KDa** cada una, idénticas entre sí, codificadas por un único gen en el cromosoma 19 humano¹⁶⁶, con seis dominios de bases aminoacídicas: dominios **I, II, III, IV, V** o región NH_2 -Terminal y el dominio **VI** (COOH- Terminal) o Calciomodulin-like¹⁶⁷.

La *μ -calpaina* y *m-calpaina* también presentan una **subunidad de 80-KDa**, producto de genes distintos (cromosoma 11 y 1 respectivamente)¹⁶⁶, en la que se puede hallar una homología de entre el 55-65% de la secuencia aminoacídica¹⁶⁸. Dicha secuencia quedaría dividida, originariamente, en 4 dominios de bases¹⁶⁸. Recientemente se demostró, mediante estudios cristalográficos estructurales de la *m-calpaina*^{169, 170}, que la secuencia de aminoácidos de la subunidad de 80 KDa estaría conformada por 6 dominios (dominios típicos), dos de ellos no se considerarían como tal, ya que estarían compuestos por una cadena de tan sólo 17 aminoácidos (dominio linker) y otra de 18 aminoácidos (dominio NH_2 -Terminal).

El análisis cristalográfico no ha aclarado aún la disposición de los distintos dominios de la *μ -calpaina*, por lo que asumimos que existen 6 dominios como ocurre en la molécula de *m-calpain*. De esta manera el dominio NH_2 -terminal de 18 aminoácidos será referenciado

como dominio I. Los dominios en la *m-calpaina* se encuentran mejor definidos, al contrario que en la *μ-calpaina*, donde los dominios no son tan conocidos, puesto que los estudios cristalográficos referidos no son tan concluyentes.

Los dominios de la subunidad de 80-KDa que se describen a continuación, en función de la estructura aminoacídica, son aplicables a ambos complejos proteínicos, *μ-calpaina* y *m-calpaina*:

DOMINIO I

El dominio NH₂-terminal no tiene secuencias parecidas a otros polipéptidos ordenados hasta ahora. Pero entre las diferentes especies estudiadas pueden presentar un parecido de hasta un 72 y un 86% (humana, pollo, rata, cerdo, conejo).

DOMINIO II (dominio catalítico)

Presenta un residuo de cisteína en la posición 115 (*μ-calpaina*) o 105 (*m-calpaina*). Es el **sitio activo** de la cisteína, que junto con un residuo de histidina en la posición 272 (*μ-calpaina*) o 262 (*m-calpaina*) y un residuo de aspargina en la posición 296 (*μ-calpaina*) o 286 (*m-calpaina*); conforman la **Triada Catalítica**, típicas de las proteasas de cisteína al igual que la *papaina* o la *cathepsina B, L o S*. El sitio activo de la cisteína se encuentra en el dominio IIa, por otra parte el sitio para la aspargina y la histidina se encuentran en el dominio IIb. Mediante análisis cristalográficos se determinó que entre ambos dominios ligaban un átomo de Ca²⁺.

DOMINIO III

Este dominio no presenta secuencias parecidas a otros polipéptidos estudiados hasta entonces. Aunque, además de enlazar el dominio que se une al Ca²⁺ con el dominio catalítico (dominio II) de la calpaina, está relacionado con la unión a distintos fosfolípidos¹⁷¹. Por otra parte, regula la actividad de la calpaina a partir de su participación en distintas interacciones electrostáticas^{169, 172}. El análisis de la secuencia aminoacídica revela la presencia de dos posibles regiones de unión al Ca²⁺ (**EF-Hand-Ca²⁺**, regiones en forma de *mano*), uno en la frontera entre el dominio II/III y otro en la frontera entre el III/IV.

DOMINIO IV

Al igual que el dominio VI, la secuencia de este dominio es ligeramente similar a la *Calciomodulina* (*proteína transportadora de Ca^{2+}*), y contienen cuatro grupos de secuencias que predicen las regiones de unión al Ca^{2+} (***EF-Hand- Ca^{2+}***). El dominio IV de la subunidad de 80-KDa, de la *m-calpaina*, tiene cinco secuencias que codifican estas regiones, la quinta se encuentra envuelta en el proceso de la dimerización del las subunidades de 28 y de 80 KDa. (Figura 4)

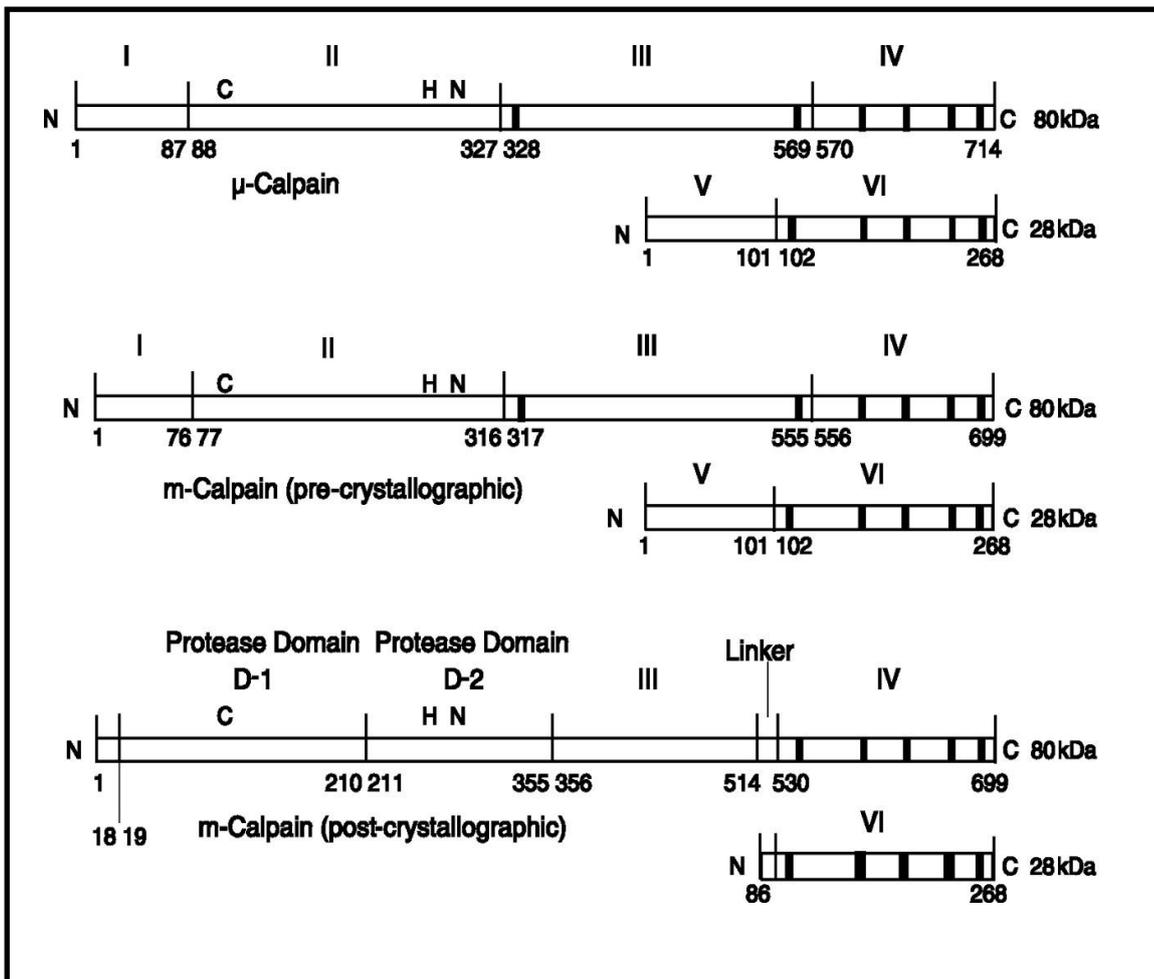


Figura 4: Diagrama en el que se muestran los distintos dominios de las secuencias μ - y m-calpaina. El estudio cristalográfico determina la secuencia aminoacídica de los distintos dominios, además de su estructura espacial. Las secuencias de las regiones de unión al Ca^{2+} , se muestran como rayas verticales en la subunidad 80K-Da (6 *EF-Hand*) y en la de 28 K-Da (5 *EF-Hand*). (Fig. de De Goll. *The Calpain System*. 2003¹⁷⁴)

El estudio estructural cristalográfico para el análisis de las distintas moléculas, aporta conclusiones de gran relevancia sobre los distintos patrones de difracción y de distribución que encontramos en las calpainas, aunque fundamentalmente se centran en la que presenta la *m-calpaina* en su forma libre de Ca^{2+} , dichas conclusiones son cuatro:

Es posible, por tanto, que el Ca^{2+} se una a múltiples sitios tanto en la *m-calpaina* como la *μ -calpaina*, no sólo en los dominios descritos (IV y VI)¹⁷³, puesto que la unión del Ca^{2+} a estos dominios genera cambios conformacionales mínimos. Esto indica que la unión del Ca^{2+} inicialmente incita a nuevas uniones en otros dominios, que al final provocaría el inicio de la actividad proteolítica de las calpainas¹⁷⁴.

En los últimos años, la relación que mantienen el Ca^{2+} y las calpainas, en cuanto a los cambios estructurales y la estimulación de la actividad proteolítica que éste provoca, ha sido ratificada en múltiples estudios¹⁷⁴, aunque el proceso de desarrollo de estos cambios presenta aún muchas incógnitas¹⁷⁴.

En 1981 se descubrió que en presencia de Ca^{2+} se producía una rápida autólisis de la *m-calpaina*^{175,176}. Actualmente se conoce que no sólo la *m-calpaina* sino también la *μ -calpaina* se autolisan si se incuban en presencia de Ca^{2+} ^{174,177,178,179,180,181}.

El concepto concerniente a la actividad proenzimática de las calpainas se aceptó en los años 90. En multitud de estudios se describió como la activación de las calpainas era sinónimo de autólisis. Posteriormente, se demostró como la *μ -calpaina*^{182,183,184} y la *m-calpaina*, eran proteasas activas¹⁸⁵. En otros análisis sobre cinética celular se demostró que la autólisis era precedida de una actividad proteolítica por parte de las calpainas^{174,186,187,188,189}.

CALPASTINA

Fue descubierta durante uno de los intentos de purificación de una *m-calpaina*¹⁹⁰, donde se determinó, la existencia de un inhibidor de su actividad en la muestra de tejido estudiada. Inicialmente se estableció que esa proteína era termoestable (a 100°C), y resistente a multitud de agentes desnaturizantes, como la urea, o el ácido tricloracético, etc^{191, 192}. El nombre de *calpastina*, fue propuesto por *Takashi Murachi* en 1979¹⁹³. Posteriormente se intentó purificar este inhibidor, determinando su peso molecular entre 34 y 280-300 KDa. Estos resultados fueron inconsistentes, como se demostró posteriormente a partir de los supuestos siguientes:

1.-La *Calpastina* era lábil a la degradación proteolítica^{194,195,196}. Era posible que en las tentativas iniciales de purificar la *calpastina*, existieran enzimas proteolíticas endógenas que modificaran el proceso y que soportaran las condiciones de proteólisis.

2.-Actualmente se sabe que la *calpastina* se constituye de forma arbitraria como un rollo, descrito mediante dicroísmo circular o Resonancia Magnética¹⁹⁷. De esta manera se produciría una sobreestimación del peso molecular de la estructura. Los estudios disponibles han reflejado que la *calpastina* es un monómero, en soluciones no desnaturizantes¹⁹⁶; y funciona como un monómero en las células, aunque no se hayan hecho aun estudios definitivos de sedimentación.

3.-Aunque solo exista un único gen en humanos que codifique la *calpastina* (Cromosoma 5)¹⁹⁸, múltiples estudios durante los últimos 10-11 años, han mostrado que, debido al uso de distintos **promotores**^{199,200,201}, o diferentes **splicing**^{202,203,204,205}, un gran número de isoformas de *calpastinas*, con rango de masa molecular entre 17,5 KDa²⁰¹ a 46,35 KDa²⁰⁰ o 84 KDa¹⁹⁹ podrían ser producidas a partir de un único gen.(Tabla 2)

ISOFORMAS DE CALPASTINA

NATURALEZA DE TRANSCRIPCION	PROPIEDADES PROTEICAS
TIPO I; contiene los exones 1xa, 1y, 1z, del dominio L y las cuatro repeticiones ; Polipéptido de 85-kDa	Regiones de expresión desconocida al igual que los tejidos; músculo esquelético porcino.
TIPO II; contiene los exones 1xb, 1y, 1z, dominio L y las cuatro repeticiones ; Polipéptido de 84-kDa	Emigra a 145 kDa en SDS-PAGE; El dominio XL contiene tres lugares de fosforilación de proteínas quinasas A en algunas especies; músculo cardíaco y otros tejidos
TIPO III; contiene exones del dominio L y las cuatro repeticiones; 77-78 kDa	Emigra a 135 kDa en SDS-PAGE; músculo esquelético de mamíferos.
Delección del exon 3 en el dominio L; contiene las cuatro repeticiones; 74-75 kDa	Emigra a 125 kDa en SDS-PAGE; músculo esquelético de mamíferos.
Delecciones de los exones 3 y 6 en el dominio L; 72-73 kDa	Migración desconocida en SDS-PAGE (110-115 kDa?)
carencia de dominios i y L; Polipéptido de 46-kDa	Migración a 70 kDa en SDS-PAGE; humano, cerdo, eritrocitos de conejo.
TIPO IV; I carencia de dominios i y L y parte del dominio II; ?? kDa	Migración desconocida en SDS-PAGE; transcritos encontrados solo en testículos
Carencia del dominio L y dominios I,II y III; 18.7 kDa	Migración desconocida en SDS-PAGE; encontrados solo en testículos

Tabla 2: Isoformas de calpastina

4.- La *calpastatina* migra anómalamente en las tiras SDS-PAGE^{206,207}, de tal forma que es difícil identificar las bandas de migración con sus correspondientes pesos moleculares, porque en algunos casos la migración se produce más lentamente, ya que son el resultado de una proteólisis descontrolada previa^{207, 208}.

La *calpastina* es la única proteína inhibidora conocida con actividad específica sobre las calpainas. Existen otras proteínas con carácter inhibitorio, como la **L y H-Kininogen** y la **Alfa2-macroglobulina**, cuya actividad es más inespecífica, actuando sobre otras proteasas²⁰⁹ además de las calpainas.

La *calpastina* no inhibe a ninguna otra proteasa junto a la que haya sido analizada (incluyendo proteasas de cisteína como la *papaina*, *cathepsina*, *bromelina*, etc). No se han descrito secuencias genéticas similares a la que codifica la calpastina en las calpainas ni en ninguna otra proteína con función similar en invertebrados (en la *Drosophila*, en el *Caenorhabditis elegans*, o *Saccharomyces cerevisiae*), por el contrario si lo han hecho en vertebrados, de ahí que su análisis pueda ser restringido solamente a estos últimos.

El ADN complementario que codifica la *calpastina* ha sido ya secuenciado²⁰⁶ en humanos²¹⁰, monos²¹¹, ratas²¹², cerdos²⁰⁷ y conejos²¹³. La homología hallada entre las distintas isoformas de *calpastina* es mucho menor de la que existe entre otras Calpainas²¹⁴. La secuencia aminoacídica de las *calpastinas* es única y no hay descritas homologías con

otros polipéptidos clonados hasta la fecha, incluidas las *CYSTATINS*, que son las proteínas inhibidoras de un gran número de proteasas cisteínas, pero no de las calpains²¹⁵.

Los estudios iniciales sobre el ADN complementario que codifica la *calpastina* porcina²⁰⁷, al igual que en el caso del ratón²¹², apuntaban que el polipéptido *calpastina* estaría formado por cuatro dominios, de unos 140 aminoácidos cada uno, parcialmente semejantes (del 23- 36%), repetidos; además de un dominio NH₂-Terminal (Dominio L) que variaban en tamaño dependiendo de los *splicing*^{216,217}. La masa molecular propuesta, dependiendo del Dominio L, variaría entre los 68 y 70 KDa²¹⁸. En el caso de las calpastinas procedentes de eritrocitos o hepatocitos humanos, el rango de masa molecular lo haría entre 107 - 172 KDa. (Figura 6)

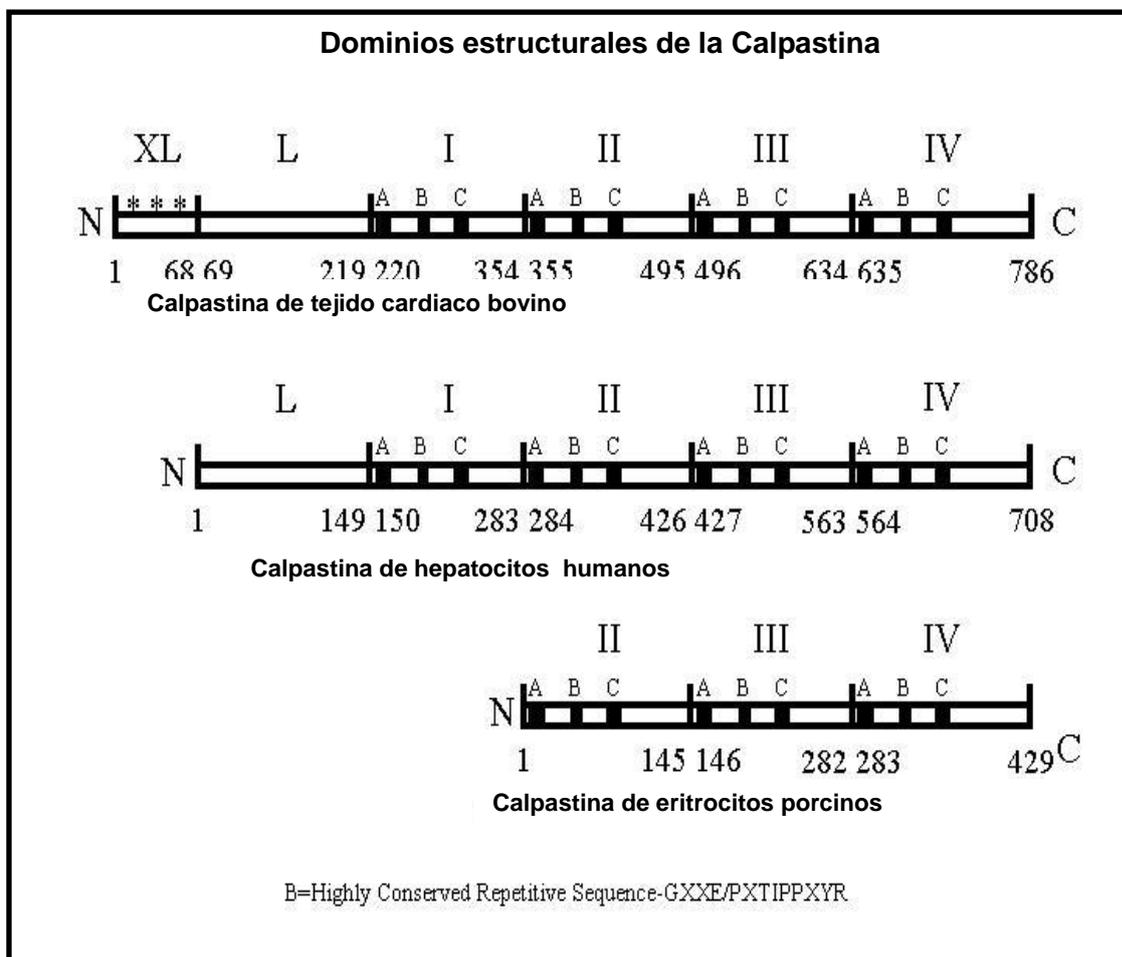


Figura 6: Estructura de los dominios de las distintas isoformas de la calpastina. Cada calpastina ha sido secuenciado desde cada tejido. A,B,C son los subdominios de cada dominio. (Fig. de De Goll. The Calpain System. 2003)

La *calpastina* necesita Ca^{2+} para poder inhibir a las distintas calpains^{219,220,221}, y su unión es reversible como se aprecia al ver que el Ca^{2+} puede ser liberado en presencia de *EDTA*^{221, 222}. No existe evidencia de que la *calpastina* transporte Ca^{2+} , por lo que el

necesario para la interacción calpastina-calpaina podría proceder, precisamente, de la molécula de calpaina.

Para analizar la actividad proteolítica de las calpainas se usa un sustrato proteínico, como la Caseína ²²³. Las proteínas del citoesqueleto, MAP-2, Tau, y la Espectrina, son también excelentes sustratos.

El análisis de la actividad de la calpastina requeriría calpaína, puesto que ésta no presenta actividad inhibitoria sobre otras proteasas, como ya ha sido explicado previamente.

MOLECULAS SIMILARES A LAS CALPAINAS

Durante los últimos 13 años, la clonación y secuenciación del ADN ha permitido la identificación de un gran número genes "**Calpain-Like**" en diferentes organismos y tejidos. Con sólo dos excepciones, las calpains procedentes de la *Drosophila*²²⁴,²²⁵ y del *Schistosoma mansoni*, gusano parásito que habita en la circulación protomesenterica de humanos²²⁶, las cuales, no han podido ser secuenciadas y por tanto aisladas de los tejidos. La función catalítica, en este caso, u otras propiedades asociadas, son del todo desconocidas. Actualmente se ha conseguido secuenciar el ADNc en un gran número de organismos como el *E. Coli*²²⁷, *S. Cerevisiae*²²⁸, *Drosophila*²²⁹ y en humanos²³⁰.

Se ha intentado desarrollar una correcta clasificación de las moléculas **Calpain-Like**, para lo que se ha planteado algunas posibles definiciones al efecto. Esto es especialmente importante para esas moléculas, que no hayan sido aisladas en la forma proteica y presentan, únicamente, una secuencia marginal homóloga o idéntica a las Calpains Ubicuas (μ -calpaina y m-calpaina).

El dominio I de μ -calpaina y m-calpaina es el dominio catalítico, pero aunque contenga los residuos característicos de las proteasas de cisteina (cisteina, histidina y aspargina), sólo presenta una secuencia marginal homóloga con otras proteasas de cisteina como la papaina. Si por el contrario se usa la homología del dominio II con respecto a las típicas (μ -calpaina y m-calpaina), deberían realizarse algunos cambios sobre cuál es el nivel de similitud necesario para identificar moléculas miembro de la familia de las Calpains. Algunos estudios sobre la materia como los desarrollados por Wilson et al²³¹, sugieren que el porcentaje de proteínas con la misma función decrece ostensiblemente cuando la secuencia idéntica u homóloga es inferior al 35 %. Usando el dominio II y una secuencia homóloga de > 20-25 % como criterios principales, fueron detectadas 14 genes Calpain-Like en mamíferos, 4 en drosophila, 12 en *C. elegans*, 2 en dos especies de hongos y levaduras, 5 en organismos unicelulares, y una calpaina transmembrana en una variedad de planta. Estos 38 genes **Calpain-Like** presentan muchas diferencias entre ellos cuando nos abstraemos de las similitudes encontradas en el dominio II, y se podrían agrupar en dos categorías:

1.- **Calpains Típicas:** aquellas calpains que presentan una subunidad de 80 KDa similar a la presentan las “Ubicuas”. Serían 8 en vertebrados y 3 en *Drosophila*. (Tabla 3)

Tabla 3: Distribución de las Calpains Típicas/Atípicas y su correlación con su gen y polipéptido correspondiente.

ESPECIE	GEN	POLIPEPTIDO	TIPICA/ATIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN1</i>	CALPAINA1	TIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN2</i>	CALPAINA2	TIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN3</i>	CALPAINA3a	TIPICA
		CALPAINA3b	
MAMIFEROS	<i>CAPN4</i>	28-Kda SUBUNIT	
MAMIFEROS	<i>CAPN5</i>	CALPAINA5	ATIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN6</i>	CALPAINA6	ATIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN7</i>	CALPAINA7	ATIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN8</i>	CALPAINA8	TIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN9</i>	CALPAINA9	TIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN10</i>	CALPAINA10,	ATIPICA
		10a,10b-10g	
MAMIFEROS	<i>CAPN11</i>	CALPAINA11	TIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN12</i>	CALPAINA12	TIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN13</i>	CALPAINA13	ATIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN14</i>	CALPAINA14	TIPICA
MAMIFEROS	<i>CAPN15</i>	CALPAINA15	ATIPICA
DROSOPHILA	<i>CALPA</i>	CALPA	TIPICA
DROSOPHILA	<i>CALPB</i>	CALPB	TIPICA
DROSOPHILA	<i>CALPC</i>	CALPC	TIPICA
DROSOPHILA	<i>SOL</i>	DCALPAINA15	ATIPICA
C.ELEGANS	<i>TRA3</i>	CeCALPAINA5	ATIPICA
C.ELEGANS	<i>CED6412CET</i>		ATIPICA
C.ELEGANS	<i>TO4A8.16</i>		ATIPICA
TRYPANOSOMA BRUCEI			ATIPICA
ARABIDOPSIS THALIANA	<i>F7A10.23</i>	PHYTOCALPAINA	ATIPICA
ASPERGILLIUS NIDULANS	<i>pa1B</i>	ACALPAINA7	ATIPICA

2.- **Calpains Atípicas:** que podrían ser subdivididas en seis subgrupos. No presentan secuencia para codificar el *calciomodulin-like* y uniones *EF-hand* en su dominio IV (algunas carecen de dominio IV), y además no está claro el por qué son Ca^{2+} dependiente. Estarían constituidas por 27 Calpains, tanto en vertebrados como en invertebrados. (Tabla 4)

Subgrupo de polipéptidos de la familia de las calpainas		
Subgrupo de Calpainas	Triada Catalítica	Dominio Calciomoduline-Like
Calpainas en mamíferos	Calpainas Típicas	
mu-Calpaina, m-calpaina calpains 3,8,9,11,12,14	C,H,D	si
Drosophila calpains (3) CALPA,CALPB Drosophila CG 3692	C, H, N R, I, D	si
	Calpainas Atípicas	
Grupo I (6) Calpaina 6 Trypanosoma brucei	K, H, N (h calpaina 6) K, Y, N (m calpaina 6) S, Y, N (T. brucei)	no
Grupo II (7) Calpains 10, 13 C. elegans	C, H, N	no
Grupo III (2) Calpaina 5 C. elegans TRA-3	C, H, N	no
Grupo IV (7) Calpaina 15 (SOLH) Drosophila SOL C. elegans	C, H, N	no
Grupo V (4) Calpaina 7 Aspergillus nidulans (fungus) C. elegans CE 01070 Saccharomyces cerevisiae	C, H, N	no
Grupo VI (1 familia) Arabidopsis thaliana (plant) Maize, otras plantas	C, H, N	no

Tabla 4: Distribución de las distintas calpainas: Típicas y Atípicas y relacion con triada catalítica

Moléculas Calpain-Like en vertebrados

En 1989 se publicaron los primeros artículos que hacían referencia a calpainas distintas a las Típicas, (*μ-calpaina*, *m-calpaina*, *calpastina*). Sorimachi y colaboradores²³², describieron la presencia de ARNm, en tejido muscular, que codificaba una molécula con un 50-54% de similitud proteica con la subunidad de 80-KDa de las calpainas conocidas hasta la fecha. Desde entonces, se han identificado en vertebrados, además de *μ-calpaina* y *m-calpaina* 12 ARNm o genes distintos, que codifican polipéptidos con secuencia homóloga al de las calpainas. El descubrimiento de más miembros de esta familia, al menos en

mamíferos, presentaba gran complejidad, y aunque dependía, exclusivamente, de criterios establecidos, se consideraba hartamente complicada. Sería necesario aislar la forma proteica de estas nuevas calpains y caracterizar sus propiedades catalíticas entre otros aspectos, antes de establecer una naturaleza definitiva dentro de esta numerosa Familia.

Cinco de las supuestas calpains que han sido identificadas desde 1989, parecían ser específicas de algunos tejidos, puesto que los ARNm originarios se localizaron principalmente en el músculo esquelético (Calpaina 3a²³²), músculo liso (Calpains 8a y 8b²³²), en la placenta (Calpaina 6)²³³, en ñps testículos (Calpaina 11^{234,235}), y en la piel durante los primeros 16 días del nacimiento y pulmón (Calpaina 13²³⁶). La distribución tisular es más amplia para otros tipos de Calpains como la Calpaina 5²³⁷, Calpaina 7²³⁸, Calpaina 9²³⁹, o Calpaina 10²⁴⁰.

La Calpaina 6 es la única en la que su secuencia de aminoácidos presentaba un residuo de Lys en lugar del de Cys en el sitio activo, por lo que se deducía que podría no presentar actividad proteolítica. La Calpaina 5 presentaba un homólogo en invertebrados denominado TRA3 (*C. elegans*). La Calpaina 7, por su parte, presentaba su homólogo en el *Aspergillus Nidulans* (PalB Calpain)²⁴¹. En el caso de la Calpaina 15 su análogo en invertebrados es la que encontraríamos en la *Drosophila* (SOL calpain).

De las 14 moléculas **Calpain-Like** que han sido identificadas en mamíferos, sólo tres han sido identificadas en su forma proteica: μ -calpaina, m-calpaina, y Lp82 (Calpain 3b).

La Calpaina 9 ha sido detectada expresada en un sistema *baculovirus* en su forma proteolítica activa²⁴². Fue necesario coexpresar la subunidad de 80-KDa y la subunidad de 28 KDa (subunidad pequeña) para obtener la forma proteolítica activa. El heterodímero Calpaina 9 requiere 125 μ M Ca^{2+} para alcanzar la mitad de la capacidad máxima proteolítica, dicha actividad podría ser inhibida por la *calpastatina* y la *E-64*. Su actividad proteolítica se correlacionaba con <5% de la actividad específica de la μ -calpaina o la m-calpaina²⁴². La expresión del gen que codifica la calpaina 9 en el estómago se encuentra suprimida en las células tumorales, por otra parte la deficiencia inducida de calpaina 9 en los fibroblastos de ratón (NIH3T3) induciría una transformación tumoral. Todo esto nos hace pensar que la Calpaina 9 podría tener propiedades antitumorales, pero la incapacidad para aislar la actividad catalítica de esta calpaina en su forma proteica hace casi imposible esclarecer el rol que juega en toda esta trama.

Lp82 (Calpaina 3b) es una variante del gen de la *Calpaina 3* producida por la delección de los exones 6, 15 y 16, que codifican las dos secuencias de inserción de la Calpaina 3a y usando un exon diferente (exon 1)²⁴³, resultando un dominio NH2 terminal distinto al de la calpaina 3a. La Calpaina 3b se aísla en el cristalino de algunos animales pero no en el de los humanos^{243,244}. La Lp82 (Calpaina 3b) parece ser un polipéptido de cadena única con actividad proteolítica, pero esto no se ha podido consensuar debido a la

imposibilidad de purificar la encima en su totalidad. La calpastina presenta un pobre efecto inhibitorio sobre la actividad catalítica de esta calpaina²⁴⁵, pero por otra parte, su actividad se encuentra casi totalmente mermada cuando entran en juego otros inhibidores de Cisterna Proteasas como la E-64, lo cual implica que el efecto inhibitorio de la calpastina sobre el resto de calpainas no es tan importante como el descrito sobre μ -calpaina o la m-calpaina.

CALPAINAS Y ENFERMEDADES SISTEMICAS

Un gran número de enfermedades han sido relacionadas con posibles alteraciones en el sistema de las calpainas. Como patologías más relevantes, se ha estudiado su relación con la Diabetes mellitus tipo II ²⁴⁰, con las cataratas²⁴⁶, la distrofia muscular de Duchenne²⁴⁷, la enfermedad de Alzheimer²⁴⁸, la isquemia^{249,250}, la hipertensión, algunos tipos de cáncer²⁵¹, la distrofia muscular de cinturas²⁵², la esclerosis múltiple²⁵³ y el trastorno obsesivo compulsivo²⁵⁴. (Tabla 5)

CALPAINAS Y ENFERMEDADES SISTEMICAS

Distrofia muscular de cinturas	Patología asociada al gen CAPN 3, por probable pérdida de su actividad proteolítica	Ono y Cols ²⁵²
Cáncer Gástrico	Este carcinoma se relaciona con regulación a la baja de la Capn 9	Yoshikawa y Cols ²⁵¹
Diabetes Mellitus Tipo II	Una mutación en el intrón 3 de la Capn 10 se asocia con la Diabetes Mellitus tipo II	Horikawa y Cols ²⁴⁰
Distrofia Muscular de Duchenne y Becker	Asociado a la ausencia o deficiencia de distrofina	Tindball and Spencer ²⁴⁷
Enfermedad de Alzheimer	Mayor cantidad de m-calpaina en el citosol, pero no en la fracción de membrana carebral y la maraña neurofibrilar cerebral	Nixon y Moha ²⁴⁸
Cataratas	Los fragmentos de cristalino se agregan para formar las cataratas	Shearer y Cols ²⁴⁶
Infarto de Miocardio	La homeostasis de Calcio esta perdida en áreas isquémicas	Papp y Cols ²⁴⁹
Esclerosis Múltiple	Los niveles de degradación de la Calpaina específica de 150 KD derivados de la alfa-Espectrina se incrementan en un 50% en las placas de esclerosis	Shields y Cols ²⁵³
Trastornos Obsesivo-Compulsivo	Los eritrocitos de los pacientes con esta alteración presentan niveles mas altos de calpaina que los controles	Mundo y Cols ²⁵⁴
Infarto Cerebral	Las calpainas participan en la apoptosis y necrosis en el tejido dañado en las áreas isquémicas	Blomgren y Cols ²⁵⁰

Tabla 5: Relación entre las distintas calpainas y las enfermedades sistémicas asociadas. De la revisión de De Goll y cols. The Calpain System. 2003¹⁷⁴

CALPAINA 3a (p94) y la Distrofia Muscular de Cinturas Tipo 2a (LGMD2A)

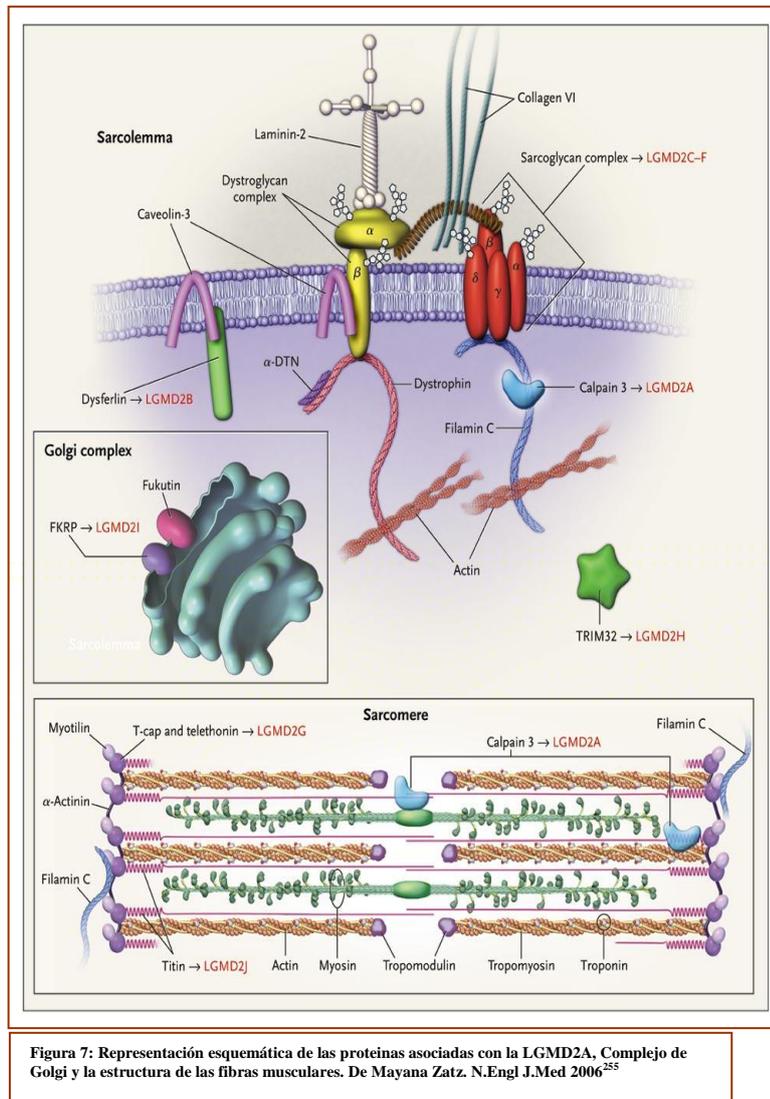
El locus de la LGMD2A fue inicialmente localizado en una población endogámica de la isla Reunión. Los enfermos presentaban una forma de distrofia de cinturas. El cuadro

clínico estaba marcado, al menos en su inicio, por una afectación muscular simétrica y selectiva, implicando la parte posterior de las nalgas y de los brazos, sin macroglosia, ni hipertrofia de pantorrillas. El espectro evolutivo era muy amplio, situándose la edad de inicio de los trastornos hacia la segunda década de vida y la edad de pérdida de la deambulación, por regla general, hacia los 30 años.

El estudio de los polimorfismos de las secuencias de ADN de esta población mostró la segregación de una mutación, mediante marcadores, en el brazo largo del cromosoma 15. Esta localización se confirmó posteriormente en familias de otras poblaciones diferentes. El genotipado de nuevos marcadores del cromosoma 15 permitió encuadrar el locus LGMD2A en el intervalo 15q15.1 y 15q21.1. El establecimiento de un mapa de transcritos de esta región, permitió detectar dos secuencias expresadas específicamente en el músculo esquelético codificando una de ellas a una proteasa intracelular: La Calpaina 3 (**CAPN3**). Una exploración sistemática puso en evidencia mutaciones en pacientes LGMD2A, validando así el gen de esta calpaina como responsable de la enfermedad²⁵⁵.

La LGMD2A está originada por la mutación del gen de la CAPN3 (también llamada *p94*). Este gen codifica la *Calpaina 3* que es, con mucho, el miembro más abundante, a nivel musculoesquelético, dentro de la familia de las calpainas. Se localiza específicamente en citosol y en el núcleo celular²⁵⁵, y requiere niveles extremadamente bajos de Ca^{2+} para su activación, la deficiencia del gen de la CAPN3 genera apoptosis mionuclear y posterior apoptosis de células musculares²⁵⁶. (Figura 7)

La Calpaina 3a se ha convertido en la Calpaina más estudiada dentro de las Calpainas de reciente descubrimiento. Los análisis Northern-Blot determinaron inicialmente que la Calpaina 3a se expresaba sólo en músculo esquelético²⁵⁷, posteriormente el uso de PCRs, con una mayor sensibilidad, han demostrado su presencia en músculo cardíaco e hígado²⁵⁸.



El ADNc de la Calpaina 3a codifica la formación de un polipéptido de 821 aminoácidos, que presenta una homología de un 54% y un 51%, referente a la subunidad de 80-KDa, con la μ -calpaina y la m-calpaina respectivamente²³². La masa molecular de la calpaina 3a es mayor que la subunidad grande, de 80 K-Da, de la μ -calpaina o la m-calpaina, debido a la existencia de una secuencia NH2-Terminal, que contiene 20 ó 30 aminoácidos adicionales, en el dominio I, el cual no se encuentra en las calpains ubicuas. Además también se aprecian diferencias en el número de aminoácidos que componen los dominios II (IS1) y III (IS2), aunque la función o repercusión de estas secuencias aminoacídicas, en la molécula de calpaina 3a, se desconoce aún.

Las propiedades de la Calpaina 3a son un enigma en la actualidad. Por una parte, la repercusión clínica que supone la supuesta mutación genética de un gen que codifica una proteína proteolítica sobre una patología con pérdida de masa muscular; por otra parte, la imposibilidad para separar la forma proteica de calpaina 3a desde el tejido muscular, además de la imposibilidad de aislar la actividad proteolítica desarrollada por esta calpaina a

partir de un homogeneizado de tejido muscular, hacen que la descripción de sus características no sean sino meras conjeturas.

Se ha publicado un intento de aislar la Calpaina 3a desde tejido musculoesquelético de conejo que produjo fragmentos de 60, 58, 55 y 31 KDa pero no polipéptidos de 94 KDa²⁵⁹, que es la forma de expresión proteica del gen de la Calpaina 3 a partir del tejido músculo-esquelético humano²³². Esto induce a pensar que los fragmentos hallados eran el producto de una rápida autólisis del polipéptido de 94 KDa.

Estudios posteriores demostraron que la delección de la subunidad IS2 daba como resultado un polipéptido estable²⁶⁰. Posteriormente, durante el desarrollo de estudios de purificación, se determinó que la degradación era a partir del dominio II (IS1), con la producción secuencial de los fragmentos de 60-, 58-, y finalmente 55-KDa.

Parece que las secuencias IS1 e IS2, estarían implicadas en la inestabilidad de la molécula de Calpaina 3a; la exclusión de estas secuencias daría lugar a una proteína estable²⁶¹, y a la Lp82 (calpain 3b).

Se ha sugerido que la pérdida de la actividad procesadora de la Calpaina 3, podría originar la LGMD2A. Otros estudios complementarios concluían diciendo que la deficiencia de la Calpaina 3 podría causar apoptosis mionuclear (muerte del núcleo de las células musculares), además de una profunda perturbación de factores nucleares, lo cual determinaba finalmente la apoptosis de la célula muscular²⁵⁵.

La Enfermedad de Alzheimer

Es una enfermedad neurodegenerativa, que se manifiesta con deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza, en su forma típica, por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales a medida que las células nerviosas mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian. La lesión cerebral típica de la enfermedad de Alzheimer consiste en el depósito patológico de las proteínas *beta-amiloide* y *tau* en tejido cerebral. Las Calpainas no se encuentran directamente relacionadas con la producción de proteínas Beta-amiloides²⁶², pero de cualquier manera, los niveles de Ca^{2+} y *m-calpaina* se encuentran elevados, y la autólisis de *μ-calpaina* a sus formas de 74 y 78 KD se encuentra incrementada en el tejido cerebral de estos pacientes²⁶³. La proteína reguladora p35, que ayuda en el desarrollo del tejido neuronal, es dividida por las calpainas en dicho tejido de pacientes con enfermedad de Alzheimer hacia su forma de 25-KD (p25), activando la ciclina dependiente de kinasa 5²⁶⁴. La p25 es responsable de la hiperfosforilación de la proteína tau en el interior de los ovillos neurofibrilares intracelulares²⁶⁵, y cuando se realiza dicha fosforilación de forma irreversible, las transforma en proteínas con alta resistencia a la degradación, comprometiendo su función normal, acarreado como consecuencia el daño neuronal. Por lo que las calpainas presentan un rol fundamental en el desarrollo del tejido neuronal necrótico que acompaña a la enfermedad de Alzheimer.

Cataratas

Los niveles altos de Ca^{2+} se ven implicados en más del 75% de los casos de cataratas. La activación de las calpainas se produce por estos niveles altos y se relaciona con esta alteración. Actualmente, se han detectado cinco tipos distintos de calpainas en el cristalino: La calpaina 1 (*μ -calpaina*), que se expresa a niveles bajos; Lp85, que no está bien caracterizada aún²⁶⁶; y las principales: *m-calpaina*, Calpaina 10, y Lp82²⁶⁷. El conocimiento del rol que desempeñan las calpainas en la formación de las cataratas de humanos, no se encuentra tan avanzado como los modelos desarrollados en ratas, donde la *m-calpaina* aparece como la enzima principal²⁶⁸.

CALPAINA 10

El gen de la calpaina 10 (*CAPN10*) se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 (2q37.3)²⁴⁰. Consta de 15 exones que abarcan 31 Kb. El análisis del ADNc humano ha mostrado múltiples posibles patrones de ajuste (splicing), generando proteínas de 672, 544, 517, 513, 444, 274, 139, y 138 aminoácidos²⁴⁰. (Figura 7)

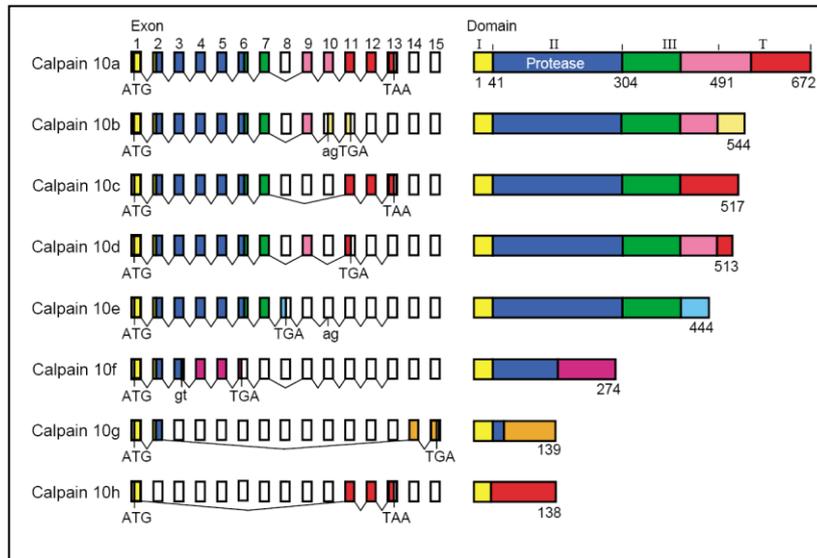


Figura 7: Isoformas de Calpaina 10

Se expresan 8 isoformas distintas de *CAPN10*, denominándose de la **a** a la **h** como: *Calpaina 10a*, *calpaina 10b*, *calpaina 10c*, *calpaina 10d*, *calpaina 10e*, *calpaina 10f*, *calpaina 10g*, *calpaina 10h*²⁴⁰. La isoforma de calpaina 10a es la más abundante y se expresa en el tejido cardíaco a niveles muy altos, en tejido nervioso, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, cristalino y retina^{240,269}. Los transcritos de la calpaina 10c y de la 10g, se detectan en una mayor variedad de tejidos, y los menos abundantes son las calpainas 10b, 10d, 10e y 10f. Los mecanismos de regulación de la expresión de las distintas isoformas de calpaina 10, además de sus diferentes propiedades, son en la actualidad aún desconocidos.

MODELOS DE EXPRESION DE LA CALPAINA 10 EN TEJIDO NORMAL

Un gran número de trabajos han demostrado la presencia de transcritos del gen de la Calpaina 10 a nivel tisular²⁷⁰, pero no pudieron demostrar la presencia de proteínas como resultado de la traducción de las mismas. No fue hasta la publicación de los resultados de Hong Ma y cols.²⁷¹, cuando se demostró la ubicuidad de la proteína derivada del gen de la Calpaina 10, representando además, la tercera calpaina, en frecuencia de expresión, tras μ -calpaina y m-calpaina, en los distintos tejidos analizados.

La expresión de la Calpaina 10 es muy variable en los distintos tejidos. En el cristalino inmaduro se expresan fundamentalmente dos tipos proteicos, mientras que en la retina son al menos cuatro las bandas proteicas que se pueden hallar. Horikawa y cols, por otra parte, describieron la posibilidad de que un polimorfismo en el gen de la *Calpaina 10* contribuyera al incremento de la susceptibilidad para presentar Diabetes Mellitus Tipo II en ciertos grupos humanos²⁴⁰. Todo esto desembocó en la necesidad de presentar posibles factores que repercutieran sobre el modelo de expresión de la Calpaina 10, para así conocer mejor su funcionamiento, en las distintas localizaciones donde han sido descritas.

Se han descrito cuatro factores que repercutían sobre el modelo de expresión, según Ma y cols²⁷¹.

1.- DEGRADACION PROTEICA Y AUTOLISIS:

La degradación de las calpainas típicas tras la activación por Ca^{2+} o por el envejecimiento es bien conocida. Actualmente se conoce también que las calpainas podrían llegar a ser incluso sustratos de otras, tras la activación de las mismas por el Ca^{2+} .

2.- ENVEJECIMIENTO:

El envejecimiento de las calpainas se asociaba con una gran disminución de los niveles proteicos. En el cristalino de los humanos maduros se han detectado pequeñas cantidades de calpaina 10, niveles que eran aún menores en el núcleo, la estructura más envejecida del cristalino. Por el contrario, en las regiones externas del cristalino, los niveles de calpaina 10 se veían aumentados, tal vez por la necesidad que genera la proteólisis durante la remodelación y diferenciación final de las células fibrilares. Estos resultados plantearon la posible asociación entre los niveles de Calpaina 10 y el desarrollo de las células del cristalino²⁷¹.

3.- PROCESAMIENTO DE ARN m:

Se han descrito ocho variantes del gen de la Calpaina 10 en humanos, y potencialmente, al menos cinco de ellos podrían ser reconocidos mediante la utilización de anticuerpos específicos. Múltiples formas de la calpaina 10 podrían ser el resultado de distintas combinaciones entre los distintos exones.

4.- INMUNOHISTOQUIMICA:

Las distintas isoformas de calpaina 10 deberían ser secuenciadas, con la ayuda de la inmunohistoquímica mediante el uso de anticuerpos monoclonales. De esta manera se podrán determinar las distintas asociaciones entre las calpainas y los procesos nosológicos.

Calpaina 10 Y Diabetes Mellitus Tipo II

La Diabetes Mellitus es una enfermedad que afecta a más de 135 millones de personas en el Mundo. Está constituida por un gran grupo de alteraciones metabólicas, caracterizadas por niveles altos de glucosa en sangre. Estas alteraciones desembocan, con el transcurso del tiempo, en patologías como: la ceguera, la patología cardiaca y renal, infartos, amputaciones de miembros, y en general una disminución en las expectativas y la calidad de vida.

Los factores genéticos presentan una gran relevancia en el desarrollo de la diabetes, incluso algunas formas de esta patología son producidas por la alteración de un sólo gen. En otras ocasiones el origen es multifactorial. Las formas monogénicas constituyen el 5% de los casos y son producidas por mutaciones que van, desde el gen que codifica la insulina²⁷², al receptor de insulina²⁷³, la encima glucokinasa²⁷⁴, los factores hepáticos nucleares de transcripción: factor-1 α (HNF-1 α), HNF-1 β , HNF-4 α , factor-1 promotor de insulina, el NeuroD1/BETA2. También la herencia de alteraciones mitocondriales pueden provocar diabetes, asociándose estas con frecuencias a pérdidas auditivas²⁷⁵.

La Diabetes Mellitus Tipo II o **Diabetes Mellitus no Insulin Dependiente (DMNID)**, es la forma clínica mas frecuente conformando el 90 % de los casos de diabetes, afectando entre el 10 y el 20 % de la población por encima de 45 años en los países desarrollados^{276,277}. Este tipo de diabetes está caracterizada por un defecto en la actividad de la insulina además de alteraciones en su secreción.

A lo largo de la historia reciente se han desarrollado diversos estudios de organización genómica para localizar los genes que originan el incremento en la susceptibilidad a padecer diabetes mellitus tipo II en múltiples poblaciones como, los mejicano-americanos²⁷⁸, la población sueca con residencia en la costa oeste de Finlandia²⁷⁹, y otras muchas más. En cada una de ellas, la susceptibilidad fue localizada en diferentes regiones del genoma, planteando la posibilidad de que diferentes combinaciones genéticas pudieran contribuir a desarrollar dicha patología²⁸⁰.

La búsqueda de la clave genética en la población de mejicano-americanos, ubicó dicho gen (**NIDDM1**) en la región **D2S125-D2S140**²⁷⁸. Este gen también podría verse implicado en la aparición de diabetes en otras poblaciones, como la germana, francesa, británica o japonesa, aunque con menor importancia que sobre la población de mejicano-americanos²⁷⁸.

Recientemente se han evidenciado relaciones existentes entre loci del cromosoma 2 (**NIDDM1**), y del cromosoma 15, que interactúan incrementando la susceptibilidad de la

población de mejicano-americanos para padecer DMNID²⁸¹. También se han descrito genes que interactúan con el ***NIDDM1*** asociándose con un incremento en la probabilidad para padecer DMNID. Uno de esos genes es el que codifica a una proteasa de cisteína (gen ***CAPN10***). La identificación del gen de la calpaina 10 como supuesto gen generador de Diabetes Mellitus no Insulin Dependiente (DMNID) generó la aparición de nuevas vías de investigación y profundización sobre el control metabólico de los niveles de glucosa en sangre.

Los primeros estudios, que relacionaban al gen que codificaba la calpaina 10, localizado en 2q37.3, y la Diabetes Mellitus Tipo 2, fueron desarrollados por Horikawa y cols.²⁸², donde se analizaban el incremento en la expresión de distintos genes relacionados con la Calpaina 10 en distintas poblaciones, induciendo alteraciones metabólicas subsiguientemente. (Figura 8)

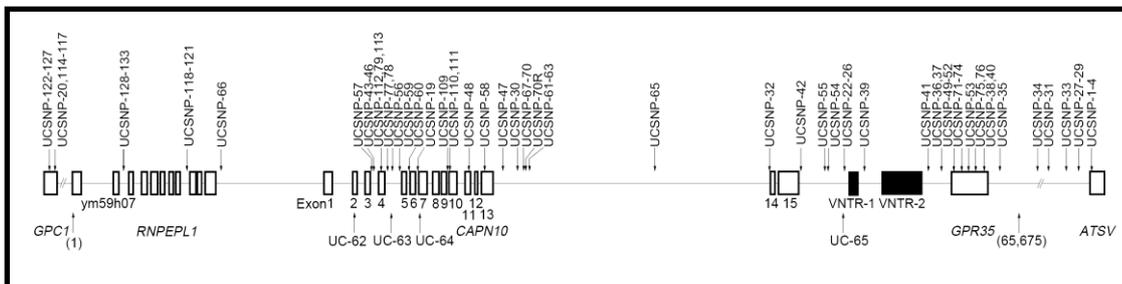


Figura 8: Organización genética de la región ***NIDDM1***: ***RNPEPL1***, ***CAPN10*** Y ***GPR35***

El interés sobre la Calpaina 10 se incrementó, cuando se halló que el polimorfismo G/A en el intrón 3 de la Calpaina 10 estaba asociada con la resistencia a la insulina que se presentaba en la Diabetes Mellitus Tipo 2^{240,283}. Un polimorfismo en dicho intrón afectaba a su transcrito de ARNm²⁸⁴; como consecuencia, se observaron niveles disminuidos de ARNm derivados de la Calpaina 10 en asociación con el Genotipo G/G, conduciendo a una sobrerregulación de la actividad de la Proteína Quinasa C. Debido a que la regulación a la baja de estas quinasas era fundamental para una apropiada fosforilación de los receptores de insulina²⁸⁴, este polimorfismo podría causar resistencia a la insulina. La presencia de ácidos grasos libres también se ha relacionado con algunas variantes de Calpaina 10²⁸⁵.

Los estudios de Horikawa et al²⁴⁰, proponían que eran las diferentes combinaciones del haplotipo compuesto por los polimorfismos (*SNP*) 43, 19, 63 (121/112) las que podrían estar asociadas con un incremento en el riesgo a padecer Diabetes Mellitus Tipo II, pero que cada polimorfismo individualmente no mostraban tal incremento de manera significativa o al menos no en todas las poblaciones analizadas. (Figura 9).

Polymorphism	43	19	63
Allele base (number)	G(1)	3R(2)	C(1)
<hr/>			
<hr/>			
	G(1)	2R(1)	T(2)

Figura 9: Haplotipo asociado a un mayor riesgo a padecer DMNID en mejicanos-americanos

Todos estos resultados contribuyeron a enfatizar la importancia de la Calpaina 10 en el control metabólico sistémico, además de evidenciar posibles implicaciones en la termogénesis²⁴⁰.

Calpaina 10 y el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOPQ)

La Calpaina 10 ha sido relacionada recientemente con otras patologías de estirpe hormonal, como el *Síndrome del Ovario Poliquístico (SOPQ)*, en sus distintas variantes fenotípicas, o el hirsutismo, etc.

El Síndrome del Ovario Poliquístico es una endocrinopatía común que se presenta hasta en un 5% de la población femenina en edad reproductiva. Concretamente en España, tiene una prevalencia del 6,5%. Se caracteriza por la presencia de ciclos anovulatorios, hiperandrogenismo y alteraciones metabólicas con o sin hallazgos ecográficos concordantes²⁸⁶.

Este hallazgo también se ha relacionado con la Diabetes Mellitus presentando, dependiendo de las series, hasta 7 veces más riesgo de padecer DMNID en pacientes con SOPQ²⁸⁷. Un gran número de publicaciones han evidenciado la presencia de factores etiológicos comunes entre estas dos patologías^{288, 289, 290}.

El análisis molecular ha evidenciado que el gen de la calpaina 10 juega un papel fundamental en el incremento de la susceptibilidad a padecer dicha enfermedad, o algunas de sus variantes fenotípicas, al igual que ocurre en otros procesos como el Hirsutismo Idiopático²⁹¹.

González y cols. analizaron la presencia de antecedentes familiares de cáncer en pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico²⁹². Esta asociación presentaba una distribución no arbitraria de haplotipos concretos de la CALPAINA 10 (Haplotipo 1111)²⁹². Además, considerando hasta parientes de segundo grado, la agregación familiar de pacientes con antecedentes familiares de cáncer, presentaba una relación estadísticamente significativa ($p:0,0005$)²⁹².(Figura10)

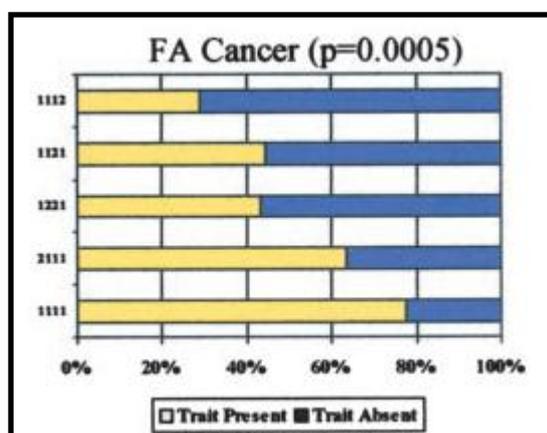


Figura 10: Comparación de las frecuencias de agregación familiares de cáncer, entre los distintos haplotipos de CAPN10 estudiados en González y cols.2003²⁹²

Los hallazgos iban más allá, indicando que el haplotipo 1111 de la calpaina 10, estaba asociado con los antecedentes familiares de cáncer sólo en mujeres con SOPQ que además presentaban hirsutismo. Más aún, en este estudio se hallaban también valores significativos de la p para historia familiar de acné y obesidad y de agregación familiar de cáncer, además de antecedentes familiares de cáncer²⁹². Los datos evidenciaban una sobreexpresión relevante del haplotipo 1111 en pacientes con SOPQ y la presencia de un incremento de la agregación familiar de cáncer (29%) sobre los que no expresaban dicha agregación (14%).

Esto sugeriría un incremento de la predisposición genética a padecer cáncer en las familias de pacientes con SOPQ que presentaban el haplotipo 1111, puesto que la incidencia de cáncer era mayor en estos pacientes, entre los que destacaba el cáncer de laringe.

Calpaina 10 Y Cáncer Colorrectal

El carcinoma colorrectal es el cuarto tipo de cáncer mas frecuente en los países desarrollados, con una tasa de 45 casos por cada 100.000 habitantes²⁹³. Tradicionalmente se había relacionado con niveles excesivamente altos de insulina en sangre por la estimulación de los receptores crecimiento insulin-like, lo cual promovía la carcinogénesis²⁹⁴.

Diversos estudios asociaban el carcinoma colorrectal (CCR) con los niveles altos de colesterol en sangre^{292,295}. Otros análisis valoraban también la relación entre el colesterol en sangre y variaciones genéticas en haplotipos concretos de la Calpaina 10. Relacionando sendos conceptos con los antecedentes familiares de cáncer en pacientes con síndrome de ovario poliquístico, se consideró interesante valorar la relación existente entre la Calpaina 10 y el riesgo de padecer carcinoma de colon²⁹⁶, donde el polimorfismo UCSNP-44 con su alelo 2, que define el haplotipo 2111, parecía ejercer un efecto protector frente al carcinoma colorrectal.

A decorative border consisting of two parallel lines forming an L-shape, starting from the top left and extending towards the bottom right, framing the page content.

HIPOTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Mediante el empleo de la correlación **genotipo-haplotipo-fenotipo** en mujeres con hiperandrogenemia y el gen *CAPN10*, se ha demostrado recientemente una asociación entre el haplotipo 1111 del gen *CAPN10* y la aparición de cáncer ($p=0.0005$, González y cols. 2003)²⁹². Sorprendentemente, analizando los diferentes tipos tumorales que aparecían en las familias portadoras de este haplotipo de riesgo, se identificó una alta prevalencia del carcinoma de laringe. Estos datos sugieren que el gen *CAPN10* podría estar relacionado con una mayor susceptibilidad a padecer cáncer de laringe o a la agregación familiar de cáncer de este tipo tumoral. A partir de aquí se decidió conformar un grupo de pacientes con cáncer de laringe para estudiar la distribución por alelos, genotipos y haplotipos, y compararlos con la distribución de un grupo control. Posteriormente se analizaría la posible repercusión de la distribución genotípica de los pacientes del grupo de casos sobre la supervivencia a los 5 años, porque de esta manera, su análisis podría proporcionar información relevante en el estudio, tratamiento y pronóstico del cáncer de laringe.

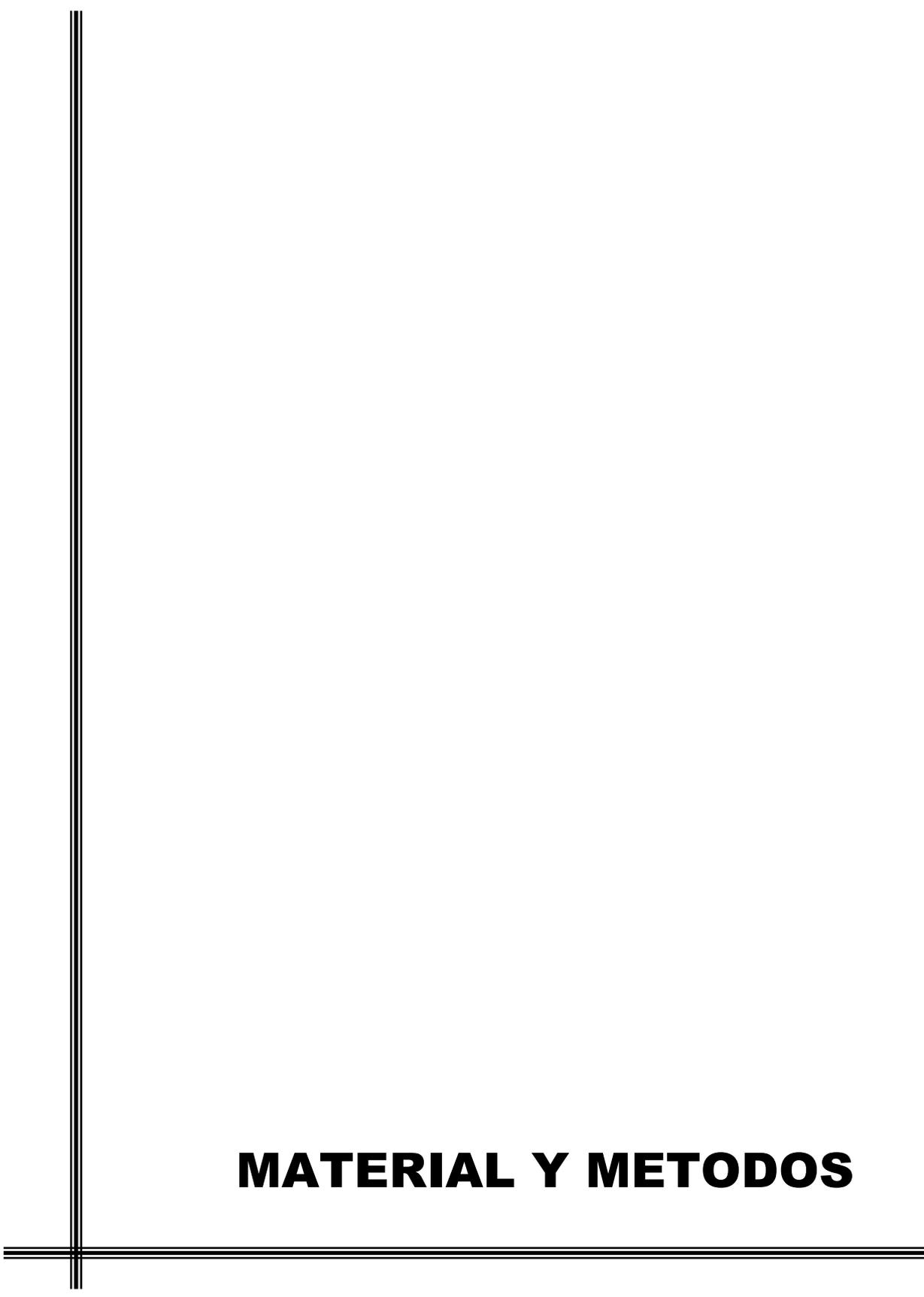
A decorative border consisting of two parallel lines forming an L-shape, starting from the left edge and extending down, then turning right to extend across the bottom of the page.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.- Realizar un análisis comparativo y efectuar un estudio de asociación entre los distintos polimorfismos (UCSNPs-44,-43,-19,-63) del gen CAPN10 y la existencia de cáncer de laringe en los grupos analizados.

2.-Llevar a cabo un análisis por genotipos del grupo de pacientes con cáncer de laringe e investigar una eventual asociación con la supervivencia.

A decorative border consisting of two parallel lines forming an L-shape, starting from the top left and extending towards the bottom right, framing the page content.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

Un total de 824 individuos fueron incluidos en este estudio, de los cuales 218 fueron analizados en nuestro Centro, con diagnóstico histopatológico de Carcinoma Epidermoide de laringe obtenido mediante biopsia, sin especificar estadiaje tumoral, y 606 controles (población general no seleccionada del mismo area geográfica).

Los pacientes incluidos en el grupo de “casos” fueron seleccionados, diagnosticados y evaluados en función del cumplimiento de los criterios RECIST²⁹⁷ (Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos, Material y Métodos: **Anexo 1**)

El grupo de pacientes elegidos para el estudio procedía del conjunto de enfermos diagnosticados de carcinoma epidermoide de laringe estudiados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Virgen del Rocío en este periodo de tiempo. A todos los pacientes incluidos se les realizó en nuestras consultas externas:

1.-Entrega de hoja de información sobre el estudio al que se les iba a someter (Hoja de información al paciente (Material y Métodos: **Anexo 2**).

2.-Un modelo de consentimiento informado (Material y Métodos: **Anexo 3**) y documentación remitida por el comité ético de investigación clínica, con informe favorable (Material y Métodos: **Anexo 4**).

3.-Ecuesta y exploración clínica. El modelo para la recogida de datos clínicos fue elaborado conjuntamente por el Centro de Biología Molecular NEOCODEX y el Servicio de Otorrinolaringología de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío.(Material y Métodos: **Anexo:5**).

4.-Extracción de sangre periférica.

DETERMINACIONES

DISTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS HAPLOTIPOS DE CALPAINA 10 Y EL CANCER DE LARINGE

Para comprobar la asociación entre la CAPN10 y el cáncer de laringe, se analizó un banco de ADN de pacientes afectados de cáncer de laringe. Se recogieron retrospectivamente 218 casos de pacientes con Carcinoma Epidermoide de Laringe, diagnosticados histopatológicamente mediante biopsia sin especificar estadiaje tumoral, almacenando sangre periférica, ADN y su fenotipo de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité Ético de la Institución.

Como controles se utilizaron 606 individuos no relacionados, sin preselección previa, elegidos al azar.

Todos los pacientes incluidos en este proyecto otorgaron su consentimiento informado por escrito.

- EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.

La extracción de ADN se realizó de forma automática a partir de 5 ml de sangre periférica congelada en un sistema MagNa Pure LC (Roche Diagnostics), utilizando el kit de extracción MagNa Pure LC DNA Isolation kit (Roche Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Sobre este material se efectuaron 3424 ensayos de genotipación empleando la PCR en tiempo real y la pirosecuenciación de los marcadores genéticos: UCSNPs-44, -43, -19, -63 del gen CAPN10.

- AMPLIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO MEDIANTE PCR.

La tecnología de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permite una amplificación selectiva de una secuencia específica de ADN. Para ello es necesario conocer las secuencias adyacentes a la región de interés. A partir de esta información, se construyen dos cebadores o **primers**: secuencias cortas de ADN (unas 15-30 bases) que son complementarias de las cadenas opuestas a cada extremo de la región que se quiere amplificar. Para que la reacción se realice, es necesario la presencia de los precursores del ADN (desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la actuación de una ADN polimerasa. Las cadenas de ADN que van siendo sintetizadas, se utilizan, a su vez, como

moldes en los siguientes ciclos. El número de copias crece exponencialmente alcanzándose, tras unos 30 ciclos, un número de copias de la región de interés de 10^6 o superior.

La reacción de PCR se desarrolla generalmente en tres pasos:

- Desnaturalización. Separación de las dos cadenas de ADN. Generalmente se realiza a 95°C para el ADN genómico humano.
- Hibridación o annealing. Unión de los cebadores al molde. La temperatura a la que se realiza generalmente oscila entre los 50 y los 70°C , dependiendo de la temperatura de fusión (T_m) del dúplex que forman. Usualmente la temperatura de hibridación (T_a) es unos 5°C inferior a la de fusión.
- Síntesis de ADN o extensión. Normalmente se realiza a 72°C .

Debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso de desnaturalización, la ADN polimerasa ha de ser termoestable. La enzima más utilizada es la Taq polimerasa, enzima procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*.

A continuación se describe una PCR tipo de las realizadas en el laboratorio de Neocodex. Las concentraciones de los distintos reactivos pueden sufrir ligeras modificaciones dependiendo del fragmento concreto a amplificar y de la técnica empleada para su análisis.

1) Reactivos utilizados en la PCR:

ADN molde (ADN genómico).....	5 ng
Desoxinucleótidos trifosfato.....	125 μM (total)
Cl_2Mg	1,5 mM
Primers.....	0.5 μM (cada uno)
Taq polimerasa	(5U/ μL , Roche)2 unidades
H_2O c.s.p.....	20 μl

2) Amplificación.

Las condiciones de amplificación de cada uno de los fragmentos aislados por PCR en el presente trabajo son muy variables. Las condiciones específicas de amplificación de cada fragmento se describen en el apartado correspondiente a cada uno de ellos

utilizando una modificación de la fórmula [(TaD-TiD) →(TaH-TiH) →(TaE-TiE)] x N (Ruiz y cols.,1997):

$$(Di) \rightarrow [TaD(TiD) \rightarrow TaH(TiH) \rightarrow TaE(TiE)] \times N \rightarrow (Ef)$$

DiCiclo de Desnaturalización inicial
 TaD.....Temperatura de Desnaturalización
 TiD.....Tiempo de Desnaturalización
 TaH.....Temperatura de Hibridación ("annealing")
 TiH.....Tiempo de Hibridación ("annealing")
 TaE.....Temperatura de Extensión
 TiE.....Tiempo de Extensión
 N.....Número de Ciclos
 Ef.....Ciclo de Extensión final de la PCR

Marcadores analizados.

Hemos analizado cuatro marcadores polimórficos o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) del gen de la *CAPN10*. Dos de los polimorfismos de este gen son del intrón 3, **UCSNP44 T>C (rs2975760)**, **UCSNP43 G>A (rs3792267)** y los otros dos son del intrón 6, **UCSNP19 delección/inserción 32 pb (rs3842570)** y **UCSNP63 C>T (rs5030952)**.

Todos los experimentos estaban basados en la reacción de PCR. Los cebadores empleados en la amplificación de la *CAPN10* fueron diseñadas en Neocodex mediante la utilización de los programas Oligo y GeneFisher (disponibles en <http://www.hgmp.mrc.ac.uk>).

Todos los cebadores no marcados se sintetizaron utilizando un sintetizador Beckman Oligo 1000 a escala 30nM o 200nM siguiendo las instrucciones del fabricante, mientras que la síntesis de los cebadores marcados con biotina ha sido realizada por Isogen Bioscience BV (Holanda).

A continuación se detallan las diferentes técnicas de análisis empleadas y las condiciones específicas para cada fragmento.

- GENOTIPACIÓN MEDIANTE EL SISTEMA PYROSEQUENCING™.

El sistema Pyrosequencing™ es un método de genotipación que permite la secuenciación en tiempo real de 96 muestras. La región de interés es amplificada previamente en un termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.) teniendo en cuenta en el

diseño de los cebadores que el tamaño óptimo para su análisis mediante este sistema no debe superar 200 -300 pb. Además, es necesario que uno de los cebadores esté marcado en 5' con biotina.

La dispensación de reactivos y ADN en placa para su amplificación por PCR se ha realizado empleando el sistema automático Biomek® 2000 (Beckman Coulter™, USA). Una vez finalizada la reacción de PCR, la placa que contiene los amplicones es incubada en agitación durante 10 min. con una mezcla que contiene 3 µl de sefarosa, 37 µl de tampón de inmovilización y 20 µl de agua por muestra.

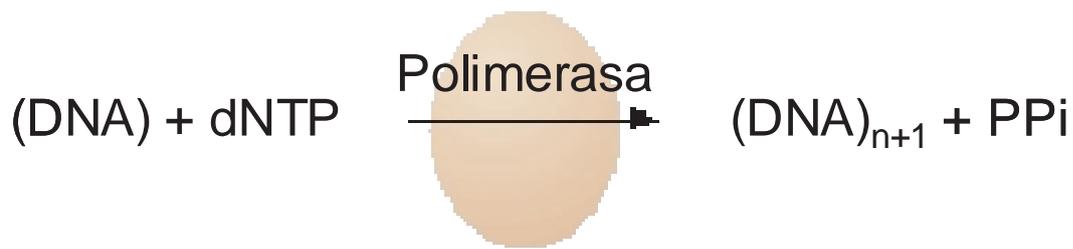
Finalizada la incubación y ayudados por una bomba de vacío, se captura el amplificado mediante un cepillo especial que retiene el complejo biotina-sefarosa. A continuación se realiza un pase por etanol al 70%, seguido por una solución de desnaturalización y, finalmente, un tampón de lavado. Como resultado, sólo la cadena marcada con biotina permanece unida al cepillo. Mediante la interrupción del suministro de vacío liberamos la cadena de ADN en una nueva microplaca de 96 pocillos que contiene, en cada uno, 2 µl del cebador de secuenciación a una concentración 10 mM y 38 µl de tampón de hibridación o unión del cebador. Esta placa se incuba durante 2 min a 80°C para posteriormente dejar enfriar a temperatura ambiente. Esta disminución gradual de la temperatura, permite la unión del cebador de secuenciación. La reacción de secuenciación sigue los siguientes pasos:

Paso 1

El primer de secuenciación se hibrida a la cadena de ADN sencilla producida por la desnaturalización del producto de PCR. Se realiza una incubación en presencia de 4 enzimas (DNA polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa) y dos sustratos, adenosina 5' fosfosulfato (APS) y luciferina.

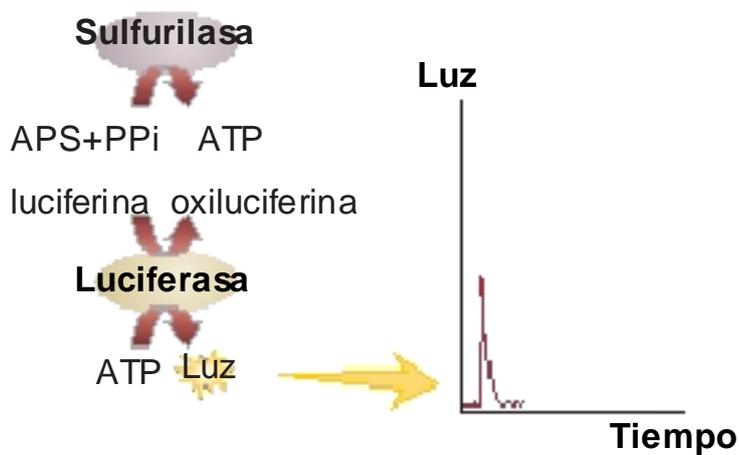
Paso 2

Se añade el primer desoxinucleótido trifosfato (dNTP) a la reacción. La ADN polimerasa cataliza la reacción de incorporación del dNTP a la cadena de ADN si este es complementario al existente en la cadena molde. Cada incorporación de un nucleótido libera un grupo pirofosfato (PPi) de forma equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado.



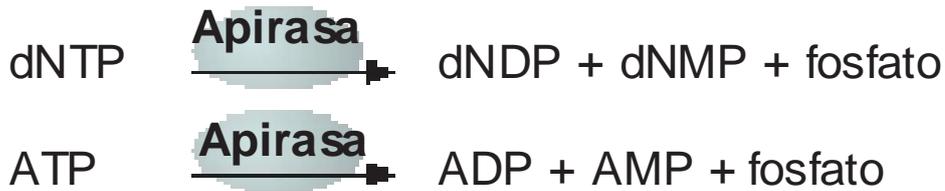
Paso 3

La enzima ATP sulfurilasa convierte el PPi en ATP en presencia del adenosín 5' fosfosulfato (APS). Este ATP es utilizado por la enzima luciferasa para convertir la luciferina en oxiluciferina, generándose luz visible en cantidad proporcional a la cantidad de ATP. La luz liberada en esta reacción es detectada por el sistema y mostrada en forma de pico en el Pirograma TM. La altura de cada pico (o intensidad de la señal luminosa) es proporcional al número de nucleótidos incorporados.



Paso 4

La enzima apirasa degrada de forma continua el ATP y los dNTPs no incorporados, regenerándose la solución de la reacción. Es entonces cuando se añade el siguiente nucleótido. A medida que estos se van incorporando, la cadena complementaria se va construyendo y la secuencia nucleotídica se muestra en forma de picos en el Pyrograma TM.



Para la reacción de secuenciación, el deoxiadenosín trifosfato (dATP) es sustituido por deoxiadenosín alfa-tio trifosfato (dATPaS) ya que el dATP no es reconocido por la luciferasa. Por esta razón, los picos de este nucleótido son algo más elevados que el resto.

Composición de las soluciones utilizadas.

Tampón de inmovilización (pH = 7.6).

Tris HCl 10mM-----	1,21 g
NaCl 2M-----	117 g
EDTA 1mM-----	0,292 g
TWEEN 20 0,1%-----	1 ml
Agua MilliQ c.s.p.-----	1 l

Tampón de anillamiento (pH = 7,6).

Tris-Acetato 20 mM-----	2,42 g
Acetato magnésico 2 mM-----	0,43 g
Agua MilliQ c.s.p.-----	1l

Solución de desnaturalización.

NaOH 0,2 M-----	8 g
Agua MilliQ c.s.p.-----	1l

Solución de lavado (pH=7,6).

Tris-Acetato 10 mM-----	1,21g
Agua MilliQ c.s.p.-----	1l

Fragmentos analizados.

Mediante esta técnica se analizaron los polimorfismos UCSNP19, UCSNP63, UCSNP44 y UCSNP43 de CAPN10.

Es importante que los cebadores de amplificación se agoten en la reacción de PCR, ya que podrían dimerizar originando la aparición de ruido y picos inespecíficos. Por esta razón, se utilizan concentraciones reducidas de cebadores (0.1-0.2 μM) y un alto número de ciclos de amplificación (45-55 ciclos). Todas las reacciones se realizaron a un volumen final de 20 μl con 30ng de ADN.

- GENOTIPACIÓN ESPECTRAL.

El sistema Light CyclerTM (Roche) es un método de genotipación que combina la tecnología fluorescente con un termociclador ultrarrápido en el que los tradicionales bloques térmicos han sido sustituidos por corrientes de aire; de esta forma se consigue que la velocidad de transición de la temperatura sea muy elevada comparada con un termociclador clásico (20°C por segundo frente a 1-1.4°C/seg alcanzados en la PTC-100TM de MJ Research). La reacción de PCR se realiza en capilares, con lo que aumenta considerablemente la relación superficie/volumen permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio entre la temperatura del aire y la de los componentes de la reacción. Este sistema permite además la monitorización en tiempo real de la reacción de PCR.

Hemos utilizado el sistema de detección que emplea sondas específicas. Está basado en el fenómeno **FRET** (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) o emisión de fluorescencia inducida mediante resonancia²⁹⁸. Además de los componentes habituales de la reacción de PCR, esta técnica emplea sondas específicas de la secuencia a analizar. La sonda en posición 5' (sonda de anclaje o donadora) se marca en su extremo 3' con fluoresceína y la sonda en posición 3' (sonda sensora o aceptora) se marca en 5' con los fluorocromos Cy5 o Rox; la sonda aceptora está fosforilada en 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR. El sistema emite un haz de luz azul (470 nm) que excita a la fluoresceína. Esta, a su vez, emite luz verde (525 nm) que excita al fluorocromo de la sonda aceptora. Como consecuencia de esta transferencia de energía, el fluorocromo de la sonda sensora emite una luz de longitud de onda específica (640 nm en el caso de CY5 y 705 nm en el de Rox) que es registrada por el sistema de detección del instrumento. Para que esta transferencia de energía sea efectiva, la distancia máxima entre los dos fluorocromos es de 5 nucleótidos.

Al posicionar una de las sondas sobre la variante a analizar, la temperatura de hibridación dependerá del nucleótido que se encuentre en esa posición. Como es necesario que ambas sondas estén hibridadas para que se produzca la transferencia de energía, es posible distinguir los productos por la temperatura de hibridación de la sonda, es decir, la temperatura a la que el fluorocromo de la sonda aceptora emite luz.

Para la reacción de PCR utilizamos un kit comercial (LightCycler-DNA Master Hybridization Probes, Roche). Los cebadores utilizados en este experimento se encuentran a una concentración de $1\mu\text{M}$ y las sondas de $0.04\mu\text{M}$. La reacción se realiza a un volumen final de $10\mu\text{l}$ con 5 ng de ADN, $1\mu\text{l}$ del reactivo LightCycler-DNA Master Hybridization Probes 10x (Roche; incluye la mezcla de dNTPs, el tampón de reacción y la Taq polimerasa) y un suplemento de Cl_2Mg (2.5 mM de concentración final).

Mediante esta técnica hemos analizado el marcador UCSNP63 de CAPN10.

Existen tres diferencias fundamentales respecto a una PCR clásica: menor tiempo de duración de los pasos de desnaturalización, hibridación y extensión, mayor número de ciclos y ausencia de un ciclo de extensión final. En cada ciclo, en el punto final del hibridación o *annealing*, se mide la fluorescencia emitida por las muestras; de esta forma podemos observar la cinética de la PCR en tiempo real.

Una vez completada la reacción de PCR, las muestras se someten a una desnaturalización rápida ($0''$ a 95°C). La temperatura desciende entonces de forma brusca (20°C por segundo) hasta una temperatura al menos $5\text{-}10^\circ\text{C}$ inferior a la temperatura de hibridación de las sondas. Finalmente, la temperatura asciende lentamente (0.1°C - $0.2^\circ\text{C}/\text{seg}$) hasta 95°C . Durante este proceso se mide constantemente la emisión de fluorescencia de las muestras, lo que permite elaborar curvas de *melting* o fusión (gráficas de la primera derivada negativa de la fluorescencia *versus* temperatura) para distinguir los productos de la PCR.

- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El polimorfismo UCSP19 (rs3842570) de CAPN10 consiste en la repetición de una secuencia de 32 pb ; esta puede aparecer dos (alelo 1, 152 pb) o tres veces (alelo 2, 184 pb). Esta diferencia de tamaño permite la discriminación de ambos alelos por simple electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR. Esta se realizó en un termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) utilizando cebadores no marcados (UCSNP19F:5'AGGCCAGTTTGGTTCTCTTC3'/UCSNP19R:5'GCAGGGTCTAAGCAGCA GCTAC 3') y condiciones estándar de amplificación a 66°C de temperatura de hibridación.

- SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE PRODUCTOS DE PCR.

La secuenciación de ADN se realiza a partir de productos obtenidos de la PCR, mediante una adaptación del método enzimático de Sanger y cols (1977). Este método se fundamenta en la síntesis interrumpida de una cadena de ADN, complementaria a la cadena sencilla que actúa como molde y cuya secuencia queremos analizar. La síntesis se inicia a partir de un cebador que se une específicamente a la región en que queremos iniciar la secuenciación. El cebador permite la incorporación de nucleótidos en dirección 5'-3' mediada por la ADN polimerasa. Pero esta acción se ve interrumpida por la incorporación de nucleótidos defectivos del grupo hidroxilo en el carbono 3' (2'-3' dideoxynucleótido 5' trifosfato: ddNTP) y por tanto, incapaces de enlazar con el nucleótido siguiente.

En el método automático, cada uno de los ddNTPs está marcado con un fluorocromo diferente y su incorporación, resultará en la síntesis de múltiples fragmentos incompletos de ADN, cuyas longitudes vendrán determinadas por la incorporación del nucleótido de terminación allí donde esté completo el ADN original.

La ventaja de este método radica en que la detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que los fragmentos de ADN de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel, permitiendo este sistema aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis y, por consiguiente, en cada secuenciación. Por último, si disponemos y comparamos por orden de tamaño los fragmentos resultantes de cada una de las cuatro síntesis interrumpidas, podremos conocer la posición relativa de cada uno de los nucleótidos, es decir, su secuencia.

Así, antes de iniciar la secuenciación, los productos de amplificación de la PCR son purificados mediante electroforesis de la muestra en gel de agarosa al 1%, corte de la banda que corresponde al amplicón de interés y purificación del ADN en la agarosa utilizando el kit de purificación "Nucleospin[®] Extract"(Macherey-Nagel), según las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de secuenciación se realizaron en un termociclador (MJ Research, Inc. Waltman, USA) usando el protocolo de CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) donde 20-100 fmol de los productos amplificados se secuencian bidireccionalmente en un volumen final de 10 µl, usando 2 µl del correspondiente cebador a 2 µM y 2 µl de DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

Las condiciones de las reacciones de secuenciación comienzan con un paso inicial de 96°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 96°C durante 20 segundos, 50°C durante 20 segundos y 60°C durante 4 minutos.

Para finalizar, dichas reacciones se precipitan con etanol antes de analizarse. Finalmente, resuspendemos la muestra en SLS (*Sample Loading Solution*). Las secuencias obtenidas se analizan con el sistema CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA).

Hemos empleado esta técnica para la comprobación de los productos de PCR de los diferentes fragmentos durante su puesta a punto y para la confirmación de algunos genotipos dudosos.

- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Una vez finalizado el proceso de genotipación de las muestras y obtenidos los datos crudos, se inicia el proceso de análisis estadístico que permitirá establecer o descartar asociaciones entre el gen en estudio y los fenotipos de interés.

1.-Determinación de las frecuencias alélicas, genotípicas y desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg.

En primer lugar, es necesario conocer las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos analizados en la población en estudio. En una población, las proporciones relativas de los diferentes genotipos se mantienen constantes de una generación a otra, asegurando así la diversidad. Esto se conoce como equilibrio de Hardy-Weinberg. Fue formulado de manera independiente por el matemático inglés G.H. Hardy y el médico alemán W. Weinberg en 1908, siendo uno de los principios más importantes de la genética humana. Para que esta ley se cumpla, son requisitos imprescindibles la panmixia (uniones al azar) y la ausencia de influencias externas, es decir, la ausencia de presión selectiva. Otros factores que pueden alterar el equilibrio de Hardy-Weinberg son la aparición de nuevas mutaciones, los movimientos migratorios o la deriva génica (enriquecimiento de la frecuencia de uno de los alelos debido a aislamiento de la población o bien, a una fluctuación estadística aleatoria en poblaciones pequeñas).

La determinación del cumplimiento de este principio se usa comúnmente como control de calidad de la genotipación en individuos no relacionados²⁹⁹. La manera más habitual de hacerlo es mediante un análisis de bondad de ajuste chi-cuadrado (*goodness-of-fit* χ^2). La hipótesis nula es que los alelos son elegidos al azar, cumpliéndose de esta manera las proporciones esperadas según este principio ($p^2+q^2+2pq = 1$). Este test tiene k

$(k-1)/2$ grados de libertad (g.l.) siendo k el número de alelos posibles en el locus en estudio. Puesto que todos los marcadores analizados en esta tesis doctoral son dialélicos, estos estudios presentan 1g.l. Para la realización de esta prueba, hemos utilizado las herramientas bioinformáticas del Instituto de Genética Humana de Munich, Alemania, programadas por los Dres. Tim M. Strom y Thomas F. Weinker (disponibles en <http://ihg.gsf.de>).

Es frecuente encontrar en la literatura el análisis de χ^2 con 2g.l. para evaluar las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias genotípicas observadas se enfrentan a las calculadas mediante la ecuación $p^2+q^2+2pq = 1$ en un análisis de tabla simple, aunque este análisis no es el adecuado para analizar desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. Para realizar este análisis hemos empleado el test de $\chi^2_{2g.l.}$ con la corrección por continuidad de Yates integrado en el software Statcalc .

2.-Análisis cualitativo.

El análisis cualitativo se emplea para comparar rasgos distribuidos en categorías, por ejemplo, comparar las frecuencias de un marcador polimórfico en individuos sanos y afectados (estudio caso-control). También podemos categorizar una variable cuantitativa mediante el establecimiento de intervalos mutuamente excluyentes basados generalmente en criterios clínicos (por ejemplo, obesidad = $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$).

Para la realización de estos estudios hemos utilizado los tests de χ^2 adaptados de Sasieni (1997)³⁰⁰ a través de la herramienta online del Instituto de Genética Humana de Munich anteriormente mencionada (<http://ihg.gsf.de>). Este paquete bioestadístico realiza simultáneamente cinco tipos de tests: de diferencia de frecuencia alélica, de homocigosidad, de heterocigosidad, de positividad alélica y el test de tendencia de Armitage. Todos los análisis tienen un grado de libertad, por lo que además del valor de χ^2 mas apropiado (exacta o con la corrección de continuidad de Pearson) y de significación estadística (p), el software ofrece los valores de *odds ratio* (OR) asociados a cada análisis. Aunque no existe una traducción consensuada de OR en español, en ocasiones se utilizan los términos “razón de ventajas” o “razón de probabilidades”. Matemáticamente se define como el cociente entre una probabilidad y la probabilidad complementaria, o sea $p / (1-p)$. En los estudios caso-control se define como la razón entre los cocientes del número de expuestos/no expuestos al factor de riesgo en estudio (en nuestro caso, los polimorfismos en estudio) en casos y controles. Sólo puede calcularse en tablas 2 x 2.

	Caso	Control	Total
Expuestos	a	b	a+b
No expuestos	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N

Para los análisis de χ^2 con más de un grado de libertad (distribuciones genotípicas, haplotípicas, haplogenotípicas o diplotípicas) hemos empleado los softwares Analyse-it (Ver.1.65, Analyse-it Software, Ltd., Leeds, UK) o SPSS (Ver. 11.0.0., LEAD Technologies, Inc).

3.-Análisis cuantitativo.

En el análisis cuantitativo o QTL (*Quantitative Trait Locus*) se compara una variable continua con una variable categórica (genotipos, haplotipos, haplogenotipos y diplotipos).

Antes de decantarnos por un método de análisis, es necesario conocer si los datos siguen una distribución normal. Los parámetros con distribución normal se asemejan a la distribución matemática ideal que supone la campana de Gauss, aunque pocos parámetros biológicos la siguen. Podemos evaluar la normalidad de nuestro parámetro mediante:

- Tests de normalidad: cuantifican la discrepancia entre la distribución real de las muestras y la distribución gaussiana. Se incluyen los test de Kolmogorov-Smirnov (KS), de Shapiro-Wilk y de Anderson-Darling. Hemos empleado el test KS integrado en los softwares Analyse-it (v.1.65) o SPSS (v.11).
- Histograma: los histogramas representan gráficamente la distribución de las muestras. De esta forma podemos visualizar la discrepancia con la distribución gaussiana, aunque esta puede cuantificarse mediante el cálculo de los coeficientes denominados *skewness* y *kurtosis*.
- Skewness (coeficiente de asimetría): es una medida de la simetría de la distribución. Una distribución normal es simétrica y por tanto, tendrá un coeficiente *skewness* igual a 0. Un valor negativo indica que la cola a la izquierda es mayor que a la derecha y un valor positivo, mayor cola a la derecha.
- Kurtosis (coeficiente de curtosis o aplastamiento): es una medida de la dispersión de las muestras en torno a un punto central. Es cero en una distribución normal. Un valor positivo indica mayor agrupamiento de las muestras y colas más largas (curva más alta), mientras que un valor negativo indica menor agrupamiento y colas más cortas (curva más plana).

Otros parámetros a tener en cuenta para completar la descripción de los datos son las medidas de posición o tendencia (media, mediana y moda) y las medidas de dispersión (desviación estándar y varianza).

- Media: media aritmética de los datos.
- Mediana: valor central de la serie.
- Moda: valor más frecuente en la serie.
- Varianza: se define por el sumatoria de la diferencia entre cada valor y el valor medio de la serie al cuadrado dividido por n-1, siendo n el número de determinaciones.

$$\sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{X})^2}{N-1}$$

- Desviación típica o estándar: raíz cuadrada de la varianza.

Una vez determinada la distribución de los datos, podemos emplear métodos paramétricos (basados en la premisa de normalidad) o no paramétricos (válidos para cualquier tipo de distribución). Hemos empleado el test de Anova como método paramétrico y su análogo no paramétrico, el test de Kruskal-Wallis.

En el test de Kruskal-Wallis la hipótesis nula es que la distribución de las poblaciones analizadas es idéntica. Utiliza el rango de datos más que los valores crudos, por lo que también se denomina análisis de varianza por rangos. Es menos potente que el test de Anova, puesto que no presupone ninguna distribución. Este tipo de test en los que no hay suposición acerca de la distribución se denomina test de tendencia central. El estadístico de este test se denomina H.

El test de Anova realiza un análisis de la varianza de una variable dependiente cuantitativa con respecto a un factor o variable dependiente (cualitativa). El test de Anova es relativamente resistente a las desviaciones de la normalidad, pero sí es necesario que los datos sean simétricos, es decir, que la varianza de los grupos sea homogénea. Por ello, para comprobar la validez de cada análisis, se ha realizado un test de homogeneidad de varianza de Levene. En los casos en los que este test fue significativo, se realizó una transformación matemática de los datos (logaritmo, raíz cuadrada, inversa de la raíz cuadrada) y eliminar valores extremos hasta homogenizar las varianzas.

Para la realización de los análisis ajustados por covariables, hemos utilizado el test de Anova integrado en el modelo GLM del software SPSS v.11. Este procedimiento proporciona análisis de varianza y regresión lineal, permitiendo investigar simultáneamente el efecto de varios factores y/o covariables (cuantitativas) sobre la variable dependiente. En todos los casos se realizó el test de homogeneidad de varianzas y las transformaciones matemáticas oportunas.

4.-Análisis multiloci.

Para la identificación de interacciones gen-gen hemos utilizado el software Sumstat (disponible en <http://linkage.rockefeller.edu/ott/sumstat.html>) (Hoh y cols., 2001). Este software permite el análisis simultáneo de marcadores en diferentes regiones del genoma. Realiza dos tipos de análisis para cada marcador:

- Asociación alélica (AA): sobrerrepresentación de un determinado alelo en el grupo de casos frente al de controles.
- Desequilibrio de Hardy-Weinberg (HWD): ya que pequeñas desviaciones del equilibrio de H-W indican asociación (Hoh y Ott, 2003). Puesto que grandes desviaciones pueden indicar problemas de genotipación, los que superan un cierto valor umbral son rechazados (proceso de "trimming").

El estadístico utilizado es el producto de ambos: $s = AA \times HWD$. Los SNPs se ordenan de mayor a menor "s" y se van sumando $S = s_1 + s_2 + \dots + s_i$. Si los SNPs están en genes de susceptibilidad, la suma S tendrá mayor poder estadístico que el valor "s" de cada SNP individual.

Para la determinación del nivel de significación, se realiza un test randomizado en el que las etiquetas "caso"/"control" se permutan aleatoriamente; de esta forma se controla la tasa de error tipo I o de falsos positivos obtenidos por azar. Los marcadores incluidos en la suma hasta obtener un valor de P inferior a 0.05 (P_{min}), se consideran asociados al fenotipo. Este valor mínimo es corregido de nuevo mediante permutaciones hasta obtener un valor final de P_{min} que es una estadística corregida única de todo el genoma.

En los casos en los que se obtuvo significación estadística, se analizaron las interacciones entre los distintos marcadores identificados por Sumstat utilizando el módulo GLM de SPSS v.11.

5.-Otras herramientas informáticas.

Además de los programas mencionados en apartados anteriores, durante el transcurso de esta tesis doctoral hemos empleado varios softwares genéticos y bases de datos online que a continuación describimos.

- a) Análisis del desequilibrio de ligamiento entre marcadores y construcción de haplotipos.

Con el término desequilibrio de ligamiento (LD) entre marcadores se alude a la tendencia de estos a transmitirse juntos como consecuencia de la distancia física a la que se encuentran en el mismo cromosoma. Aunque la distancia entre los *loci* es el principal factor determinante del grado de LD entre ellos, la tasa de recombinación en la región comprendida entre ambos puede modificar dicha relación. En ocasiones, marcadores muy alejados físicamente se transmiten juntos con mayor frecuencia de la esperada por la distancia entre ambos o, por el contrario, la existencia de puntos calientes o *hot-spots* de recombinación en el genoma puede determinar que marcadores muy próximos en el cromosoma se transmitan de manera independiente con una frecuencia elevada. El grado con el que dos marcadores tienden a transmitirse juntos se cuantifica mediante el parámetro D' , cuyos valores oscilan de -1 a +1. Un valor de $D' = \pm 1$ indica desequilibrio completo de ligamiento, es decir, siempre se transmiten juntos. El signo es positivo cuando se transmiten juntos los alelos menos frecuentes de cada polimorfismo y negativo, cuando se transmiten juntos el más frecuente de uno y el menos frecuente del otro³⁰¹. La existencia de desequilibrio de ligamiento entre los *loci* permite la construcción de haplotipos, que no es más que la disposición ordenada en dirección 5'-3' de los alelos de los marcadores analizados en cada una de las copias que poseemos de todos los genes autosómicos.

- b) Bases de datos públicas de acceso electrónico.

Para la realización de esta tesis doctoral fue necesario consultar numerosas bases de datos disponibles en Internet, entre las que destacamos:

- PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esta base de datos está disponible mediante un sistema de búsqueda y recuperación denominado *Entrez* desarrollado por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) en la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM, *National Library of Medicine*) de los Institutos Nacionales de Salud estadounidenses (NIH, *National Institutes of Health*). PubMed permite el acceso a

la información bibliográfica contenida en MEDLINE, la base de datos bibliográfica del NLM que abarca los campos de la medicina, enfermería, odontología, veterinaria, sistemas de salud y ciencias preclínicas. Contiene citas bibliográficas de más de 4800 publicaciones biomédicas de todo el mundo. Actualmente, contiene más de 12 millones de citas desde mediados de los 60 hasta la actualidad. Las publicaciones anteriores se recogen en OLDMEDLINE, actualmente en desarrollo por el NLM para informatizar estos registros y que ya cuenta con más de 2 millones de citas.

- dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El acceso también se realiza mediante el sistema *Entrez* del NCBI. Recoge la información disponible de los SNPs identificados en todo el genoma.
- UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>). Esta herramienta de la Universidad de Santa Cruz de California contiene las secuencias de referencias y los borradores de una larga colección de genomas. De esta base de datos se han extraído las secuencias de los genes analizados.
- HapMap (<http://www.hapmap.org/>). El proyecto internacional HapMap tiene como objetivo la creación de un recurso público que permita la identificación de genes de susceptibilidad a enfermedades mediante la identificación y catalogación de las similitudes y diferencias genéticas entre individuos y la creación de un mapa haplotípico de todo el genoma. Se recogen datos de tres fondos étnicos: africano, asiático y europeo. Puesto que los resultados iniciales de este proyecto no estuvieron disponibles hasta Marzo de 2005, únicamente hemos utilizado esta herramienta para la comparación de nuestros datos de LD de *CAPN5* con los obtenidos en este proyecto.
- WormBase (<http://www.wormbase.org/>). Se trata de un consorcio internacional realizado y mantenido por biólogos e informáticos con el objetivo de proporcionar a la comunidad científica información precisa y fácilmente accesible acerca de la genética, genómica y biología de *Caenorhabditis elegans* y nematodos relacionados. Hemos empleado esta base de datos para obtener las secuencias de *C.elegans* homólogas de los genes estudiados en esta tesis doctoral.
- Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). Base de datos genética y molecular de la familia *Drosophilidae*, especialmente su miembro más estudiado, *Drosophila melanogaster*. Fundada por el NIH americano y el Consejo de Investigación Médica de Londres (Medical Research Council) incluye biólogos e informáticos de las universidades de Harvard, Cambridge, Indiana, California, Berkley y del Instituto Bioinformático Europeo (EBI, *European Bioinformatics Institute*).

- *Swissprot*:(<http://us.expasy.org/sprot/>), *Interpro*(<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) *Pfam*(<http://www.psyplexus.com/oases/screenshots.htm>). Bases de datos de proteínas. Las hemos empleado para la determinación de dominios funcionales en las proteínas de interés

ANALISIS DE SUPERVIVENCIA

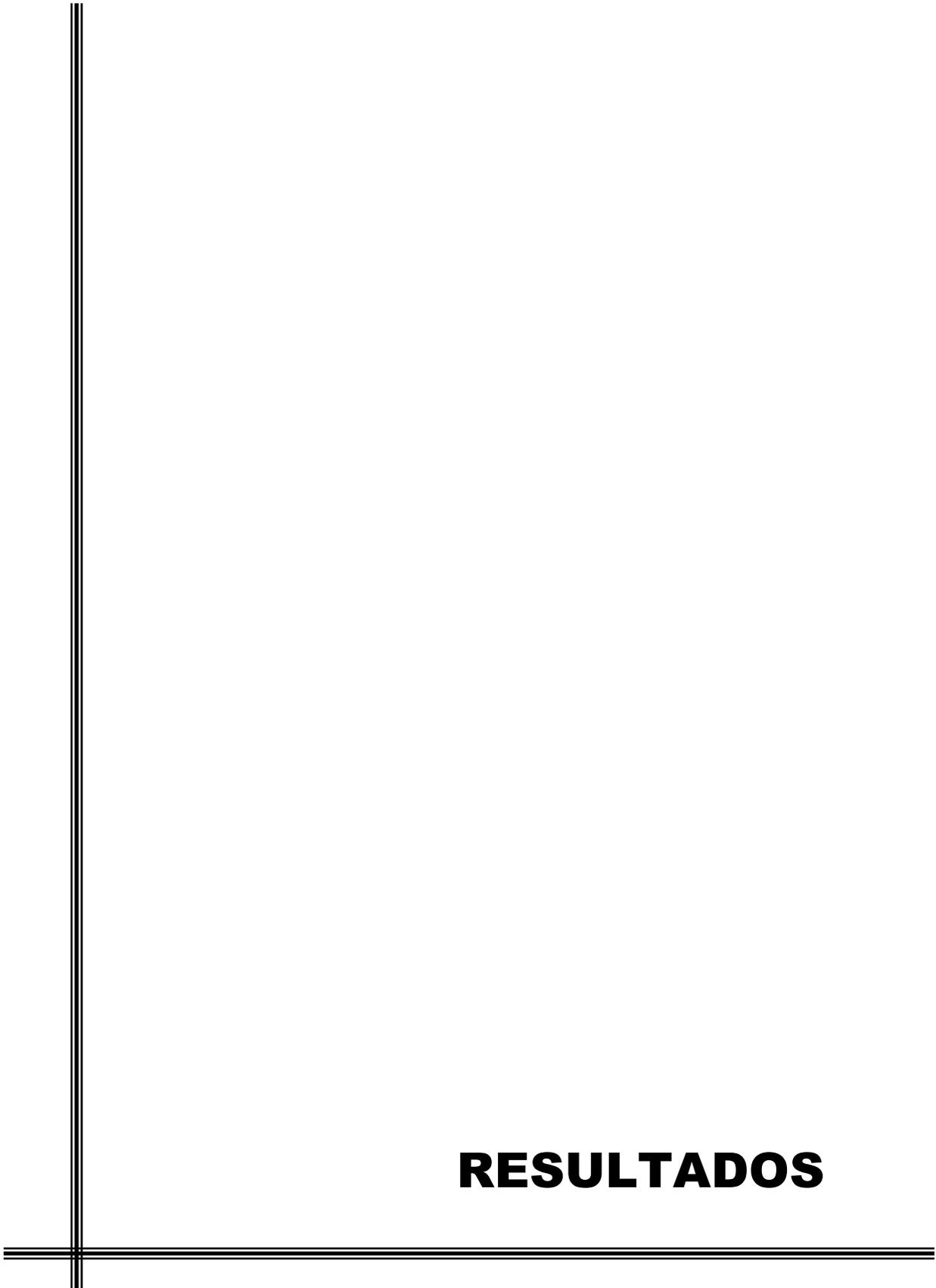
En los pacientes incluidos en el grupo de “Casos” , se prolongó el estudio clínico a lo largo de 4 años, resaltando la supervivencia como variable fundamental a estudio entre otras como la edad, el grado de diferenciación tumoral, la afectación linfática, edad y presencia de fistula en el postoperatorio. El estudio de supervivencia finalizó en diciembre de 2008.

En este estudio se analizaron 199 enfermos, de los 218 iniciales del grupo de casos, dado que 19 de ellos lo abandonaron a lo largo de estos cuatro años que duró. Los motivos fundamentales de abandono fueron por desplazamientos a otras comunidades autónomas, y/o pérdida de seguimiento (8 de ellos) y el resto (11 pacientes) reconsideró su inclusión en el estudio, ya fuera de motu propio o por falta de colaboración familiar, dicha pérdida de pacientes no repercutió estadísticamente sobre los resultados obtenidos al final del estudio.

1.-Análisis estadístico

La caracterización de los pacientes analizados relacionados con la CAPN10 fue desarrollada usando el test de alelos $c2$. Una vez que la variable era ordenada, entonces se aplicaba el análisis de tendencias. Para el análisis de las curvas de supervivencias (curva actuarial) libre de enfermedad y de supervivencia global, se utilizó el método Kaplan-Meier, de esta manera determinamos la variable de supervivencia en los pacientes que se habían ido incluyendo en el estudio en un periodo de tiempo (no en todos los pacientes se comenzó a contabilizar la supervivencia el mismo día). De esta manera se utilizó este método puesto que, a lo largo del tiempo, iban saliendo del estudio los pacientes que presentaban el suceso concreto (fallecimiento) o aquellos para los que finalizaba la observación por otros motivos (incompletos o abandonos). Las curvas de supervivencia fueron calculadas desde el momento de inclusión en el estudio hasta el momento de fallecimiento o finalización del estudio (Diciembre de 2008). El análisis multivariable fue realizado utilizando el test de regresión de Cox (método semiparamétrico que permite estudiar datos de supervivencia). El procedimiento para determinar las variables que fueron incluidas en el estudio multivariable fue descrita previamente por Sun y cols³⁰². En éste se incluyeron dos modelos por pasos, uno hacia delante y otro hacia atrás, permitiendo de esta manera incluir variables con una p

< 0,2 (Mickey-Greenland)³⁰³. Utilizando la información relativa a los modelos por pasos y una lista de factores de riesgo con repercusión en la supervivencia del cáncer de laringe, se desarrolló un modelo con variables relevantes. Utilizando una aproximación heurística, las variables que no modificaban el coeficiente de exposición mas de un 10% fueron descartadas (Maldonado-Greenland)³⁰⁴. De esta manera, en el estudio multivariable, se ajustó la supervivencia al estadio TNM, al grado de diferenciación celular, la edad (continuo), número de metástasis linfáticas y la presencia de fístula. Así, se comprobó la asunción de riesgo proporcional. Todos los cálculos estadísticos se realizaron usando el programa de análisis 8 STATA-SE (Stata Inc., Collage Station, Texas, EE.UU). El punto de corte para la significación estadística se asumió como $p < 0,05$.



RESULTADOS

RESULTADOS

1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DESCRIPTIVO

El grupo de estudio estaba constituido por 218 pacientes diagnosticados mediante laringoscopia directa y biopsia, de carcinoma epidermoide de laringe en diversos estadios evolutivos. Este grupo de pacientes (*grupo casos*) se reclutó en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Virgen del Rocío. La recopilación de datos se desarrolló tras la extracción de sangre y firma del consentimiento informado, en las instalaciones propias del complejo hospitalario destinados al efecto. El estudio comenzó en noviembre de 2003, y se consideró como punto de finalización el 15 de Diciembre de 2008. (Tabla 6)

Tabla 6
Características clínicas de los sujetos del estudio

	Controles	Casos
Edad (años)	55+/-12	64+/-10
Género (% hombres)	46	96
Fumadores (% total)	47	78
Grandes Bebedores (%)	2,18	17
Masa corporal medida (kg/m ²)	27+/-4	27+/-4,6
Antecedentes Ca. de Laringe (%)		8
Ca. de Laringe. Agregación familiar (%)		1
Antecedentes de Cáncer (%)		41
Antecedentes de Cáncer. Agregación f. (%)		13
Cáncer Nuclear (%)		37

Los 606 pacientes del *grupo control* fueron reclutados de una población del mismo área geográfica sin preselección previa.

EDAD

La edad de los pacientes oscilaba entre los 45 años del paciente más joven y los 93 del paciente más longevo, con una media de 64 años y una desviación de +/-10 años. (Figura 10)

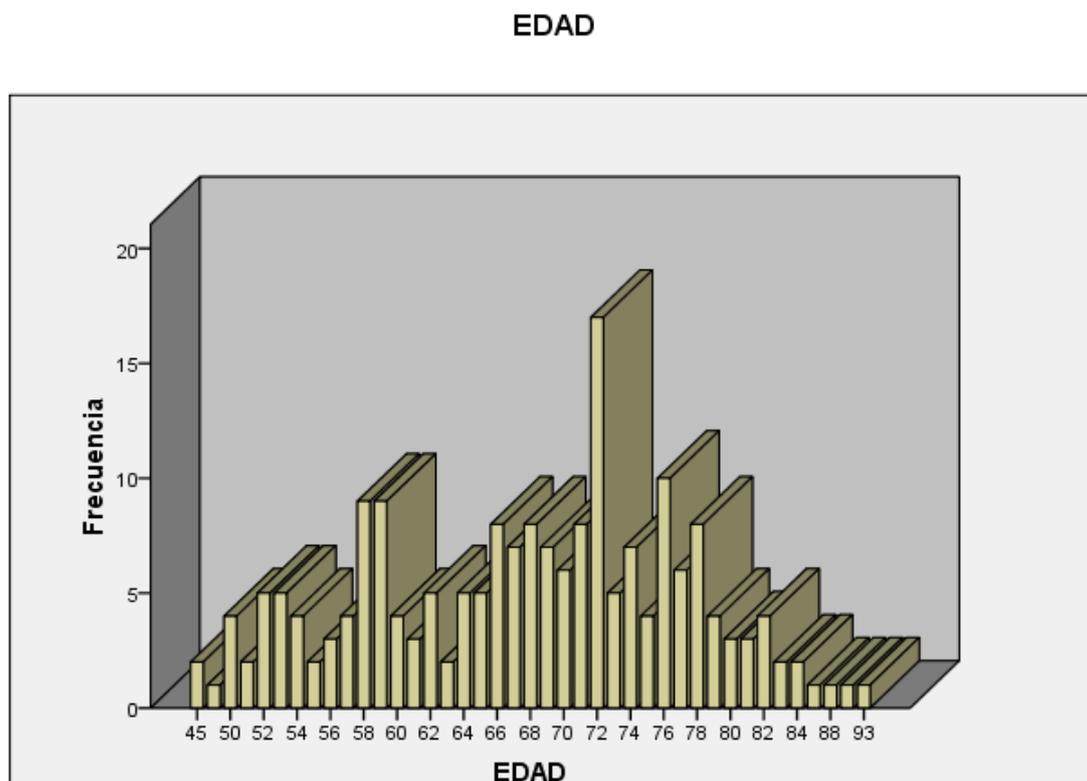


Figura 10: distribución porcentual de pacientes por edad

GENERO

De los pacientes incluidos en el grupo de “Casos”, más del 95 % correspondía a pacientes de sexo masculino, sólo el 4,35% correspondía a mujeres, similar a las proporciones de los estudios más relevantes publicados sobre el tema.

HABITOS TÓXICOS

El 78% de los pacientes son fumadores en el grupo de Casos, frecuencia mucho mayor que la presentada en el grupo de Controles donde la frecuencia de fumadores disminuía hasta el 46%.

La media de cigarrillos fumados al día era de 37,7 cig/día, con una desviación de +/-18,15 por lo que el 72,8% de los pacientes con cáncer de laringe, fumaban más de 20 cigarrillos al día. En 172 enfermos del grupo de casos se contabilizó el número de años como fumador, habiendo desarrollado cáncer de laringe con menos de 15 años como fumador, solo el 2,3% de los pacientes, incrementándose esta frecuencia hasta el 60% cuando los fumadores presentaban este hábito durante 35 años o más.

En relación con el hábito alcohólico, el 17% de los pacientes con cáncer de laringe eran considerados grandes bebedores.

PATOLOGIA CONCOMITANTE

Hasta un 12% del total de los pacientes con carcinoma de laringe a los que se les recogieron datos sobre patologías concomitantes, reconocieron presentar algún tipo de diabetes, porcentaje que aumentaba hasta casi el 20% en caso de pacientes con patología pulmonar obstructiva crónica (EPOC). El 50,9% de los encuestados respondían afirmativamente frente a la cuestión sobre la presencia de algún tipo de dislipemias (Hipercolesterolemia, Hipertensión, Obesidad, etc). Un 17% de los pacientes encuestados presentaban algún tipo de hepatopatía, que coincidía en gran medida con los pacientes que presentaban abuso de alcohol (hepatopatía alcohólica).

LOCALIZACION TUMORAL

Se han considerado las siguientes localizaciones: glotis, supraglotis y subglotis (según la definición de la UICC/AJC, Atlas TNM, Ed. 1992), transglóticos (cuando afectan a dos regiones contiguas, cruzando la glotis, sin poderse precisar su origen en una región concreta, siguiendo el concepto de Kirchner, Cornog y Holmes (1974) sobre esta entidad anatomoclínica).

Los carcinomas góticos constituyeron el 48,5% de los pacientes. En 49 enfermos se localizó el tumor en la supraglotis (23,6%), de manera exclusiva. Las formas de expresión puramente subglóticas sólo constituyeron el 0,5 % de los enfermos. Otras formas de expresión relevantes fueron los tumores transglóticos en sus distintas formas: Afectando a los tres niveles (supraglotis-glotis y subglotis) 6,2%;

Gloto-Supraglóticos el 15,9%; y Gloto-Subglóticos fueron en 2,4% de los pacientes analizados.

SITUACION GANGLIONAR

Dentro del sistema de estadiaje TNM, la demostración histológica de metástasis ganglionares -factor N- es el factor pronóstico más importante para el paciente. En el presente estudio, 177 fueron tipificados como estadio N0, 14 como N1, 22 pacientes conformaban el estadio N2 (comprendido por los estadios N2a, N2b, N2c), un único paciente fue diagnosticado en estadio N3, y en cuatro de ellos no fue recogido este dato en la historia clínica.

GRADO DE DIFERENCIACION TUMORAL

El 36% de los pacientes del estudio con cáncer de laringe, presentaban un tipo de carcinoma epidermoide bien diferenciado. El 34%, presentaban un grado moderado de diferenciación tumoral, por último un 16 % de los enfermos presentaba un grado poco diferenciado de diferenciación tumoral. En el 14% restante no se definió el grado de diferenciación tumoral en el estudio anatomopatológico.

FISTULAS FARINGOCUTANEAS

La presencia de fístulas faringocutáneas se presentó en un 17% de los casos. En nuestro estudio no se diferenció el grado de fistulización para las determinaciones alélicas, simplemente se relacionó cada alelo con la presencia o no de fístula faringocutánea.

ESTADIO TUMORAL

El 26,4% de los enfermos fueron diagnosticados en Estadío I y el 12,5% en Estadío II. El grupo más numeroso lo constituían los diagnosticados en Estadío III, que representaban el 34,1% (71 pacientes). El 23,6% fueron diagnosticados en Estadío IV. (Figura 11)

ESTADIO

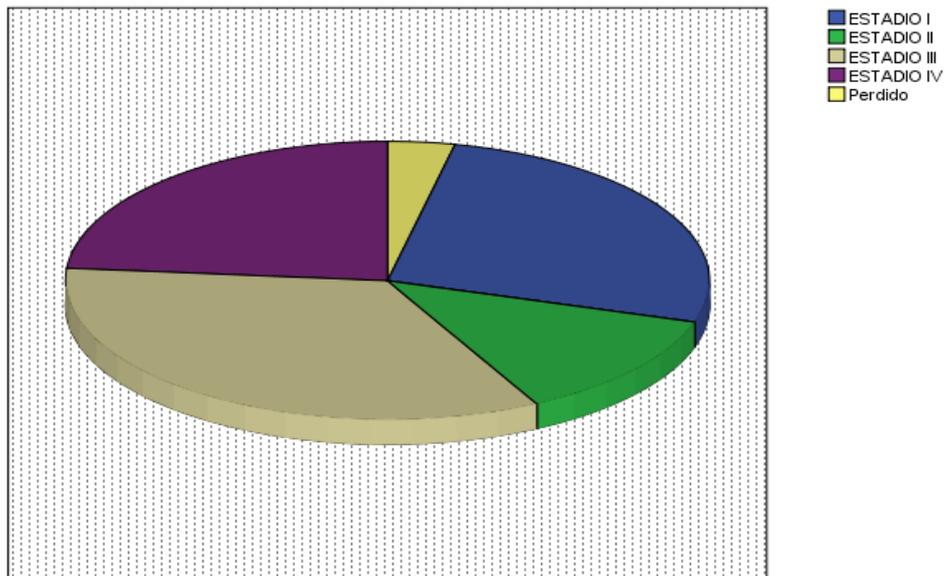


Figura 11: Distribución de los distintos estadios tumorales

TIPO DE INTERVENCION

La actitud sobre los pacientes del grupo “casos” se resumió en cuatro opciones, la más frecuente era la laringectomía total, a la que fue sometido un 37'4% de los enfermos (74 pacientes del grupo de casos). Las otras alternativas quirúrgicas se resumieron en dos grupos, Cordectomías (cirugía parcial mediante Láser CO2) a la que fueron sometidos el 31'3% de los enfermos, y las Laringectomías Parciales (cirugía parcial abierta) un 12,1%. Por último, un grupo de 38 enfermos (19,2%), fue sometido al tratamiento mediante Preservación de Órgano de inicio (Quimioterapia y Radioterapia concomitante). Posteriormente se les planteaban nuevas alternativas terapéuticas, en función de los resultados de la primera intervención. A 14 de los enfermos intervenidos mediante Cordectomía láser se les administró radioterapia posteriormente por diversos motivos, a los restantes 48 enfermos no se les realizó ningún tratamiento ulterior. Casi un 50% de los enfermos que se trataron inicialmente mediante laringectomía total, recibieron posteriormente radioterapia, pero sólo 9 de ellos recibió quimioterapia concomitante. A 8 de los 24 enfermos a los que se les sometió de entrada a laringectomía parcial utilizando técnicas abiertas, se les trató con radioterapia, posterior a la cirugía. (Figura 12)

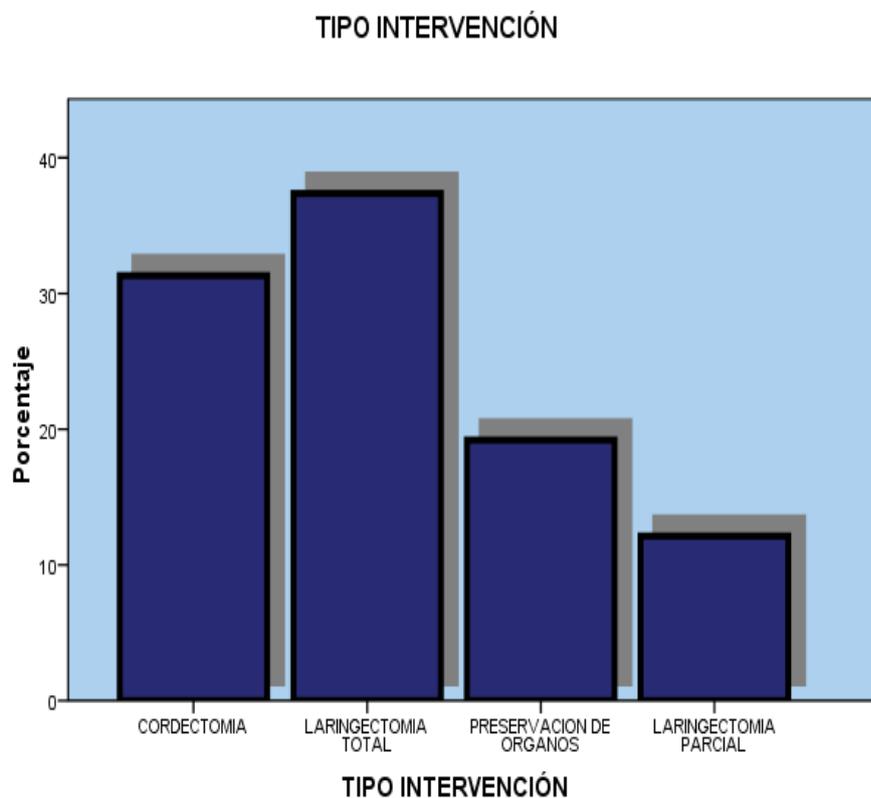


Figura 12: distintos tipos de intervención a los que fueron sometidos los pacientes del estudio

El seguimiento de los pacientes se realizaba en las consultas destinadas al efecto, donde se exploraba sistemáticamente orofaringe, se realizaba una palpación cervical y valoración de traqueostoma en caso de que lo presentaran, además de una fibrolaringoscopia flexible para valorar las uniones faringoesofágicas o la cicatrización de cuerdas vocales en caso de cirugías parciales mediante láser CO₂, o cirugías abiertas (laringectomía parcial horizontal supraglótica).

2. ANALISIS GENÉTICOS DE CASOS Y CONTROLES

Se analizó la distribución por alelos, genotipos, haplotipos y haplo-genotipos, referentes a los distintos polimorfismos estudiados (UCSNP-44, UCSNP-43, UCSNP-19, y UCSNP-63) de la *CAPN10*, en un total de 824 individuos (casos y controles).

DISTRIBUCIÓN ALELICA

Se analizó la frecuencia alélica de cada uno de los polimorfismos en nuestra población. Estos datos de frecuencia concordaban con los de la población Británica ya publicados con anterioridad³⁰⁵. Por otro lado se analizó el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para saber si existía alteración en distribución alélica de los polimorfismos analizados. De todos los resultados obtenidos, sólo presentaban significación, la alteración detectada en controles referente al polimorfismo UCSNP-63, y la referente al polimorfismo UCSNP-44, que en este caso era próxima a la significación ($p=0,06$). (Tabla 7)

Tabla 7: Equilibrio de Hardy Weinberg para los distintos genotipos

DISTRIBUCION GENOTIPICA EN CASOS Y CONTROLES					
VARIANTES CAPN10		GENOTIPO		HWE(p-value)	
		CONTROLES	CASOS	CONTROLES	CASOS
UCSNP-44	11	426	172	0,3	0,06
	12	160	40		
	22	20	6		
UCSNP-43	11	348	117	0,38	0,68
	12	217	87		
	22	41	14		
UCSNP-19	11	81	25	0,6	0,87
	12	290	96		
	22	235	97		
UCSNP-63	11	550	187	0,01	0,26
	12	51	31		
	22	5	0		

Al analizar la frecuencia del alelo menor, se observó que el alelo 2 (alelo C) del polimorfismo UCSNP-44 (T/C) tenía una representación a la baja en casos cuando se comparaba con controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (0,12 vs 0,17, OR: 0,69, p: 0.02). Se apreció que existía una distribución alterada del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en casos pero sin llegar a ser estadísticamente significativa (p=0.06). (Tabla 8).

Tabla 8: Distribución por alelos de los pacientes de ambos grupos. Frecuencia del alelo menor ajustado al valor de la p y la *Odds ratio*.

VARIANTES CAPN10	GENOTIPOS		FRECUENCIA DE ALELO MENOR		OR,CI95%CI,p_value
	Controles (n=606)	Casos (n=218)	CONTROLES	CASOS	
UCSNP-44	11	426	172	0,17	0,685[0,49-0,95] 0,02
	12	160	40	0,12	
	22	20	6		
UCSNP-43	11	348	117	0,25	1,09[0,85-1,4] 0,48
	12	217	87	0,26	
	22	41	14		
UCSNP-19	11	81	25	0,37	1,18[0,94-1,487] 0,16
	12	290	96	0,33	
	22	235	97		
UCSNP-63	11	550	187	0,05	1,44[0,92-2,25] 0,11
	12	51	31	0,07	
	22	5	-		

En el caso de UCSNP-63, realizamos el estudio por alelos sin detectar resultados significativos al comparar los alelos de menor frecuencia (alelo 2 o alelo C) con una OR: 1,44; CI 95%(0,92-2,25), y un valor de p=0.11, entre casos y controles.

No se hallaron, en el resto de polimorfismos, diferencias en las distribuciones alélicas dignas de ser mencionadas (Tabla 3).

DISTRIBUCION GENOTIPICA

En el análisis de genotipos del grupo control, se apreciaba que de los 606 pacientes: 426 presentaban un UCSNP-44 con genotipo 11, 160 eran UCSNP-44 (12), y el menos frecuente era el UCSNP-44 (22) que lo portaban 20 pacientes. Con respecto al polimorfismo UCSNP-43: 348 eran genotipo 11, 217 eran genotipo 12 y 41 eran genotipo 22. Por parte del UCSNP-19, 235 pacientes tenían el genotipo 22, 290 el genotipo 12 y 81 el genotipo 11. En el caso del UCSNP-63, 550 pacientes portaban el genotipo 11, 51 eran portadores del genotipo 12 y finalmente 5 lo eran del genotipo 22, genotipo que no se expresaba en el grupo de casos.

En el análisis de genotipos en el grupo casos, el genotipo 11 del polimorfismo UCSNP-44, se expresaba en 178 pacientes, mucho mayor que la representada por el genotipo 12 (40 pacientes) y el 22 (6 pacientes). El polimorfismo UCSNP-43 presentaba un incremento en la frecuencia de genotipo 12 (87), a expensas del genotipo 11 (117). En el polimorfismo UCSNP-19 presentaba un incremento del genotipo 12 (96) y el 22 (97) a expensas del 11 (25). La variante, a la postre, más significativa, se producía en el polimorfismo UCSNP-63, en el que el genotipo 22 carecía de expresión en el grupo de pacientes estudiado (grupo de casos). A diferencia del grupo control donde si se expresaba este polimorfismo, esto se constató al analizar el equilibrio de Hardy-Weinberg. Al apreciar esta desviación en el UCSNP-63 (22) en controles, se realizaron nuevos genotipados de la muestra de sangre mediante distintas técnicas, obteniendo idénticos resultados, en todas las ocasiones, determinado que este hallazgo no se encontraba relacionado con un error de la genotipación³⁰⁶. El genotipo 11 con 187 pacientes y el 12 con 3 pacientes, completaban el total de la expresión. (Figura 13)

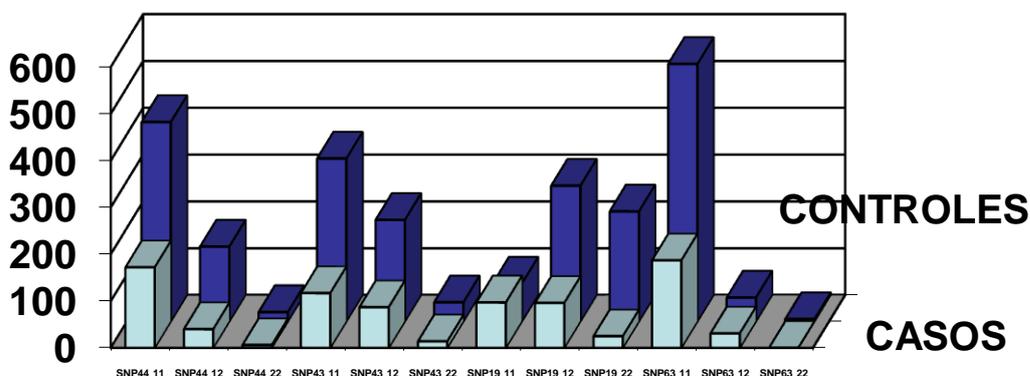


Figura 13: Distribución de las variantes genotípicas de cada polimorfismo comparando casos y controles

En el polimorfismo UCSNP-44 se detectó una relación estadísticamente significativa ($p=0,01$) entre dicho polimorfismo y el cáncer de laringe en el grupo de casos, comportándose el genotipo 12 (UCSNP44 T/C), como factor de protección (OR: 0.59).

En el caso de UCSNP-63, recogimos dos resultados relevantes. El primero fue la detección de una desviación del EHW en el grupo control, donde se apreció una alteración en la distribución en los distintos genotipos del UCSNP-63 ($p=0,01$). (Tabla 9)

Tabla 9: Estudios de asociación de marcadores genéticos del gen *CAPN10* en Carcinoma de laringe.

Polimorfismo	Alelos	Casos (n=218) %	Controles (n=606) %	Análisis Estadístico
UCSNP-44	TT	78.9	70.3	p=0.01* OR=0.59
	TC	18.3	26.4	
	CC	2.8	3.3	
UCSNP-43	GG	53.7	57.4	p=0.28 OR=1.92
	GA	39.9	35.8	
	AA	6.4	6.8	
UCSNP-19	Del/Del	11.5	13.4	p=0.78 OR=1.07
	Del/Ins	44.0	47.8	
	Ins/Ins	44.5	38.8	
UCSNP-63	CC	85.8	90.8	p=0.01* OR=1.78
	CT	14.2	8.4	
	TT	0	0.8	

*Test heterozygous adaptado de Sasieni

En segundo lugar, en el estudio por genotipos, el 12 (C/T) del UCSNP-63, presentaba una diferencia en su distribución entre casos y controles, que resultaba estadísticamente significativa ($p=0.01$, OR=1.78), estando asociado con el riesgo a padecer cáncer de laringe.

El resto de polimorfismos analizados (UCSNP-43, UCSNP-19), no presentaban diferencias en la distribución genotípica que resultaran estadísticamente significativas, al ser comparados ambos grupos, por lo que carecían de relevancia.

Un 8% de los pacientes presentaban una historia familiar de cáncer de laringe. En la mayoría de los casos (7%), eran formas nucleares de la enfermedad (>1 caso en

familiares de primer grado), mientras 2 pacientes de 218 (1%) presentaban una forma de cáncer de laringe con agregación familiar (>3 casos en familiares de primer o segundo grado). Cuando estos datos se analizaron junto a las distintas distribuciones genotípicas no se detectó ninguna relación estadísticamente significativa.

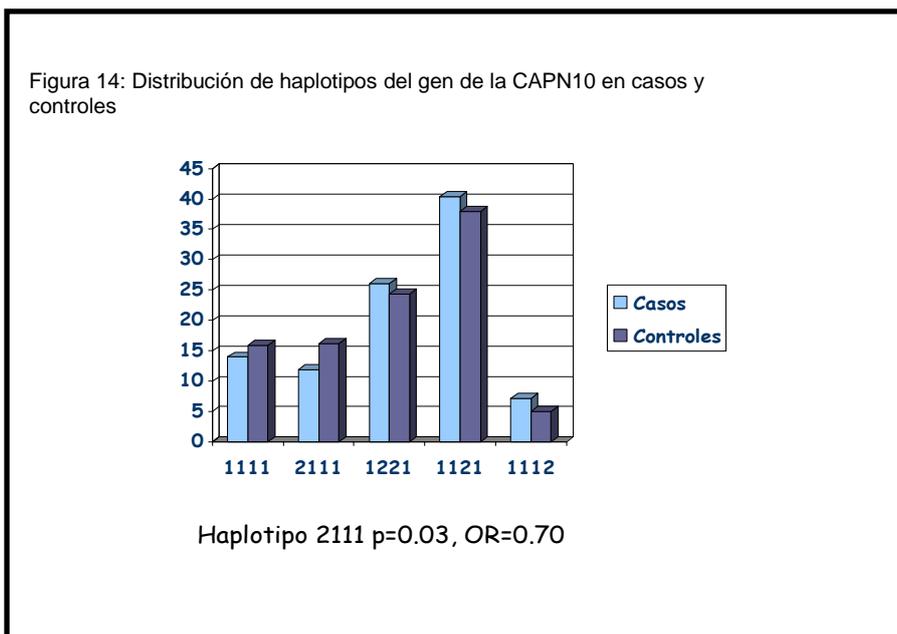
ANALISIS DE LOS HAPLOTIPOS

La construcción de los haplotipos, compuestos por la combinación de los 4 polimorfismos del gen *CAPN10* (*UCSNP-44*, *UCSNP-43*, *UCSNP-19*, y *UCSNP-63*), y el análisis de asociación basados en la frecuencias de los haplotipos en casos y controles, se realizaron usando el programa estadístico *Thesias software*. Los haplotipos con una prevalencia menor del 5% no fueron incluidos en los estudios estadísticos. La frecuencia obtenida era similar a la obtenidas en otras poblaciones europeas^{307, 308}. Se analizaron finalmente cinco haplotipos: Haplotipo 2111, Haplotipo 1111, Haplotipo 1112, Haplotipo 1221, Haplotipo 1121.(Tabla10)

Haplotipo	% Controles	% Casos	P value	OR [CI 95 %]
1111	0.16	0.14	0.31	0.84 [0.59-1.17]
2111	0.16	0.12	0.03	0.70 [0.51-0.99]
1112	0.05	0.07	0.28	1.29 [0.81-1.04]
1221	0.24	0.26	0.95	1.01 [0.76-1.22]
1121	0.38	0.40	Referencia	1.00

TABLA 10: Distribución de haplotipos en casos y controles. Valor de la p, Odds Ratio.

Cuando comparamos la distribución haplotípica global entre casos y controles usando *SEM algorithm*, observamos que esta distribución era distinta entre los dos grupos, con una tendencia a la significación pero sin llegar a ser estadísticamente significativa ($p=0.09$, $\chi^2 = 7.82$, 4 grados de libertad) (Figura 14)



Mediante el análisis de los haplotipos, se detectó que la frecuencia del haplotipo 2111, observado en casos y controles, difería significativamente, $p=0.03$, siendo la *odds ratio* menor de 1 [OR: 0.70; CI 95%(0.51-0.99) $p=0.03$], por lo que la presencia de este Haplotipo (2111) del gen *CAPN10*, constituía un factor de protección frente al cáncer de laringe. Curiosamente era el alelo 2 del UCSNP-44 el que definía dicho haplotipo (2111).

En los estudios intracohorte se nos sugería que los pacientes que mostraban antecedentes familiares de cáncer, tenían un modesto incremento, aunque no estadísticamente significativo, de la frecuencia del haplotipo 1111. (Tabla 11)

Haplotype	UCSNP44	UCSNP43	UCSNP19	UCSNP63
1111	--	--	--	--
2111	+	--	--	--
1221	--	+	+	--
1121	--	--	+	--
1112	--	--	--	+

Tabla 11: Correlación de los distintos genotipos con los Haplotipos más frecuentes

El resto de los haplotipos no presentaban diferencias de distribución entre los casos y controles.

ANALISIS DE HAPLOTIPO-GENOTIPOS

En el análisis por haplotipo-genotipo en casos y controles, se detectaron 15 posibles combinaciones genóticas, siendo imposible su análisis (algunos grupos presentaban un numero insuficiente de casos) ya que se carecía de poder estadístico para obtener resultados relevantes. (Fig 15)

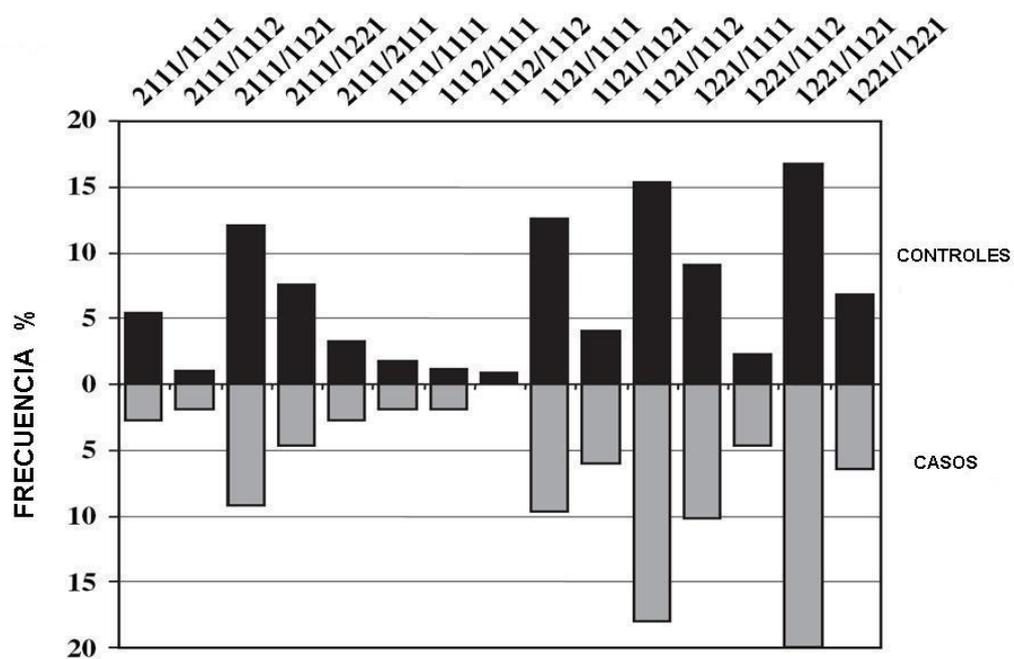


FIGURA 15: análisis de haplotipo-genotipo. Variantes de mayor frecuencia

3. ANALISIS DE LA SUPERVIVENCIA

En este estudio se analizaron 199 enfermos, de los 218 iniciales del grupo de casos, dado que 19 de ellos lo abandonaron a lo largo de estos cuatro años que duró. Los motivos fundamentales de abandono del estudio fue por desplazamientos a otras comunidades autónomas, y/o pérdida de seguimiento (8 de ellos) y el resto (11 pacientes) reconsideró su inclusión en el estudio, ya fuera de motu propio o por falta de colaboración familiar; dicha pérdida de pacientes no repercutió estadísticamente sobre los resultados obtenidos al final del estudio.

De los 199 pacientes restantes y analizados en el estudio de supervivencia, 190 eran hombres (95,48%) y 9 mujeres. La media de edad era de 67,6 años con una desviación estándar de 9.6. De ellos, 185 eran fumadores (92,96%) y 7 no fumadores, y en otros 7 no se disponían de tales datos. Un 55,28% de los pacientes reconoció ser bebedor importante, mientras que el 38,19% de los pacientes no admitió consumir alcohol de manera excesiva. En 13 casos, este dato no se encontraba registrado. Un 27,64% de los pacientes se encontraba en estadio I (58 pacientes) en el inicio del estudio, 26 enfermos se encontraban en estadio II, 70 en estadio III, y por último 45 en estadio IV, en cuatro de ellos no se determinó ese dato clínico en la historia. El seguimiento medio (meses) fue de 55 meses, con un rango intercuartílico de 42-60. La fecha de finalización del estudio se fijó en diciembre de 2008, contabilizándose el seguimiento, no con una fecha de inicio y de final, sino con meses de supervivencia en los que el paciente había estado incluido en el estudio, o meses hasta el momento del *exitus*. El número de fallecimientos al final del estudio constituía un 27,1% del total (54 enfermos). Los datos clínicos se recogen en la Tabla 12

Tabla 12. Características clínicas del estudio

Parámetros	
Edad (media, Desviación estándar)	67,6 (9.6)
Sexo (masculino, %)	190, (95,48)
Estadio (N, %)	
Estadio I	55, (27,64)
Estadio II	26, (13,08)
Estadio III	70, (35,18)
Estadio IV	45, (22,61)
Seguimiento (en meses; Rango intercuartílico)	55; 42-60
Fallecimientos (N, %)	54; 27,1%

Análisis de Polimorfismos

Se analizó la distribución genotípica de los polimorfismos *UCSNP-44*, *UCSNP-43*, *UCSNP-19*, y *UCSNP-63* de la *CAPN10* en 199 pacientes con cáncer de laringe. Se distinguió entre las distintas posibles combinaciones alélicas de cada polimorfismo (11, 12, 22), estudiando la frecuencia de expresión de cada una en el grupo de pacientes.

Se analizaron los mismos datos clínicos del estudio previo, haciendo hincapié en la supervivencia. Los resultados están reflejados en la tabla 13.

CAPN 10		CASOS (199)	%
UCSNP-44	11	156	78,34
	12	38	19,1
	22	5	2,51
UCSNP-43	11	107	53,77
	12	82	41,21
	22	10	5,03
UCSNP-19	11	22	11,06
	12	92	46,23
	22	85	42,71
UCSNP-63	11	170	85,43
	12	29	14,57
	22	0	0

Tabla 13. Análisis de Polimorfismos

Supervivencia

Es interesante poder plantear no sólo la relación entre la tasa de supervivencia y el tiempo (*estudio univariable*), sino también la posible relación con diferentes variables pronóstico registradas para cada sujeto (*estudio multivariable*). La *regresión de Cox* es un método de estudio semiparamétrico que permite estudiar datos de supervivencia en relación con distintas covariables del individuo. Este método de análisis multivariable ya fue descrito por Sun et al³⁰². Con este procedimiento en el análisis multivariable, los distintos alelos fueron ajustados para variables que repercutían sobre la supervivencia, como: estadio TNM, grado de diferenciación tumoral, edad, metástasis linfáticas y presencia de fístula.

El resultado del análisis de supervivencia está recogido en la tabla 14, donde se apreciaba la relación de entre los distintos polimorfismos analizados y el total de fallecimientos, además de realizar posteriormente una inferencia estadística, ajustando la supervivencia al estadio TNM, el grado de diferenciación tumoral, la edad, la afectación ganglionar y la presencia de fístulas faringocutáneas. (Tabla 14)

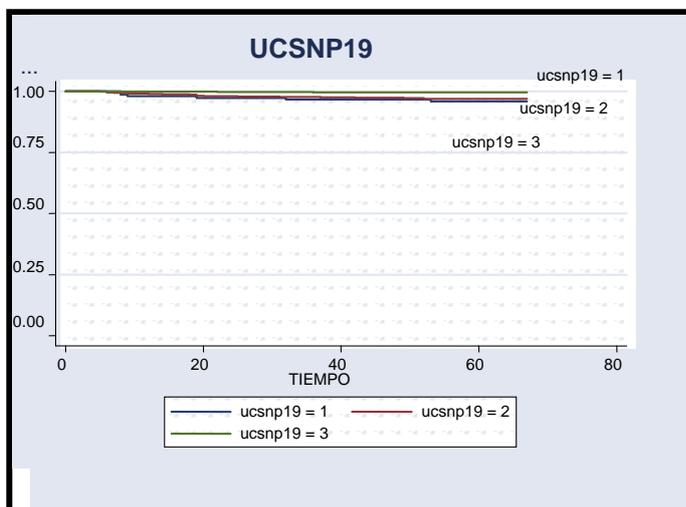
Tabla 14. Análisis de supervivencia de los distintos polimorfismos de CAPN10

CAPN10	Total	Fallecimientos (%)	HR (95% CI)*	HR (95% CI)**
UCSNP44				
11	156	45 (28.9)	1 (reference)	1 (reference)
12	38	8 (21.1)	0.71 (0.33-1.50)	0.71 (0.32-1.58)
22	5	1 (20.0)	0.69 (0.10-5.00)	1.67(0.21-13.33)
UCSNP43				
11	107	29 (27.1)	1 (reference)	1 (reference)
12	82	20 (24.4)	0.86 (0.49-1.52)	0.67 (0.36-1.25)
22	10	5 (50.0)	2.03 (0.78-5.24)	1.00 (0.33-3.01)
UCSNP19				
11	22	7 (31.8)	1 (reference)	1 (reference)
12	92	23 (25.0)	0.76 (0.32-1.76)	1.01 (0.40-2.56)
22	85	24 (28.2)	0.87 (0.38-2.03)	0.79 (0.32-1.98)
UCSNP63				
11	170	44 (25.9)	1 (reference)	1 (reference)
12	29	10 (34.5)	1.40 (0.71-2.79)	2.73 (1.21-6.20)

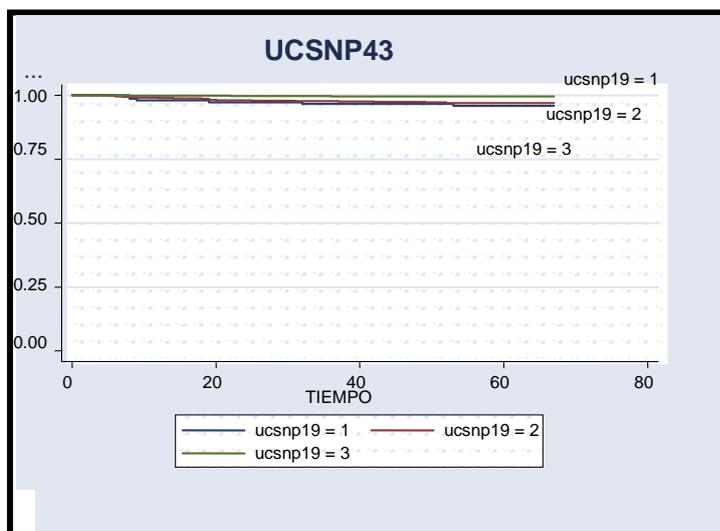
* Regresión de Cox. Estudio univariable.

**Regresión de Cox. Estudio multivariable: ajustada al estadio TNM, grado de diferenciación, edad, afectación ganglionar y fístula faringo-cutánea.

Los polimorfismos UCSNP19, UCSNP43, y UCSNP44 no presentaban una diferencia estadísticamente significativa en relación con la supervivencia en el estudio univariable en ninguna de sus variantes alélicas, tampoco en el estudio multivariable. (Figuras 17 y 18)



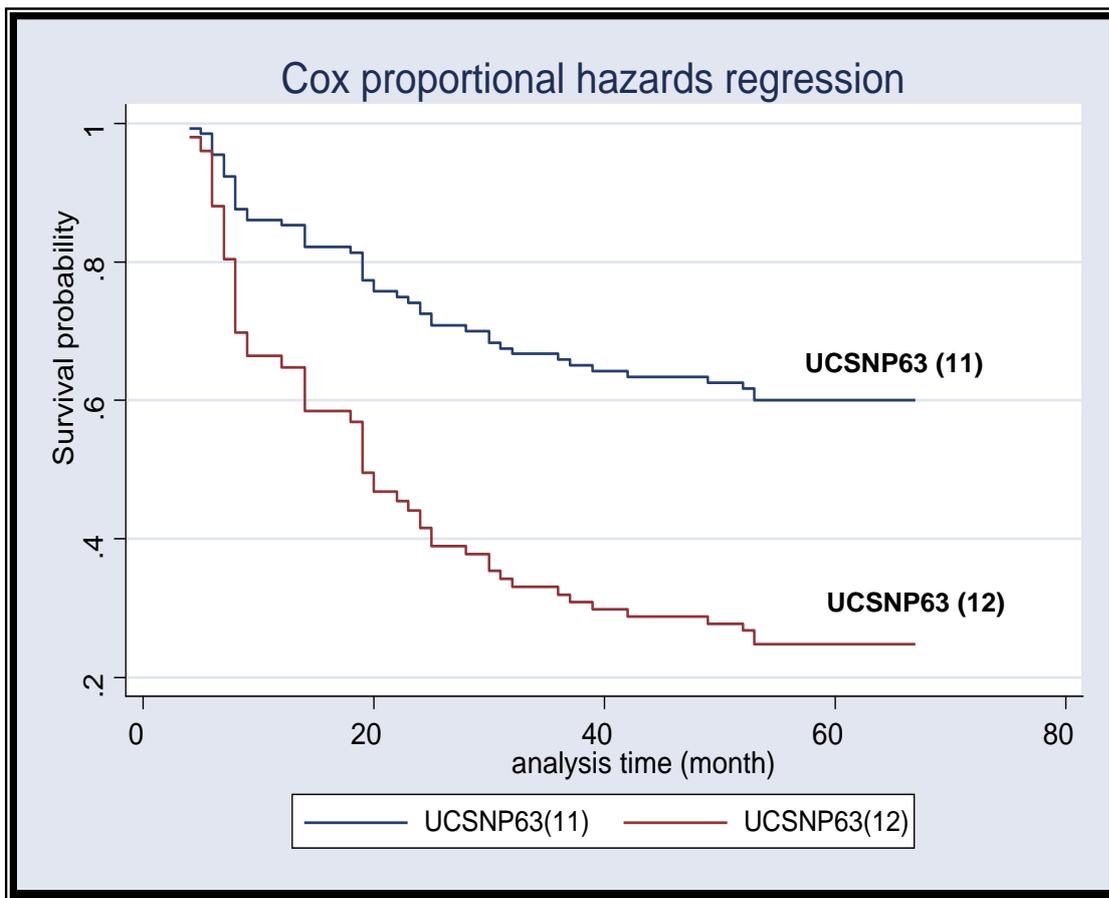
Figuras 17 y 18: resto de polimorfismos sin diferencias significativas



El polimorfismo UCSNP63 sí que presentaba una relación estadísticamente significativa en el estudio multivariable, ajustado al estado TNM, grado de diferenciación celular, edad, metástasis linfáticas y presencia de fístula durante el postoperatorio (HR = 2.73, 95% CI: 1.21-6.20); relación que no se expresaba en el estudio univariable.

La curva de Supervivencia para este genotipo (UCSNP-63) esta representada en la figura 19 (Cox multivariable), donde se aprecia un incremento de la mortalidad, a lo largo del tiempo, en los pacientes con la variante UCSNP63:12, de la CAPN10. (Figura 19). Los pacientes con la variante polimórfica UCSNP63:11 presentaba una mortalidad similar a la detectada con el resto de polimorfismos analizados.

Figura 19. UCSNP 63=1:11; UCSNP 63=2:12. Análisis multivariable tras su ajuste a Estadio TNM, grado de diferenciación celular, edad, metástasis linfáticas y presencia de fístula.



DISCUSSION

DISCUSION

La probabilidad de padecer cáncer de laringe se ha incrementado de forma notable en las últimas décadas, sobre todo en los países desarrollados. Por este y otros motivos, han prosperado multitud de investigaciones con la intención de obtener información sobre la aparición y el desarrollo de dicho tumor.

Una gran cantidad de estudios han relacionado el consumo de tabaco y alcohol con el riesgo de padecer cáncer de laringe^{309,310}, aun así, existen muchos pacientes expuestos a estos carcinógenos que no llegan a desarrollar este tipo de tumor, por lo que se apuesta por la existencia de una relación de causalidad entre el entorno ambiental al que están expuestos los pacientes y la susceptibilidad genética, ya sea individual o colectiva, para padecer dicho cáncer de laringe^{311,312,313}.

El tabaco, ya sea fumado o masticado, además del consumo intenso de alcohol, han quedado establecidas como factores de riesgo de una importancia radical en la etiología del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC). Desde hace unos 15 años, el papilomavirus humano, factor etiológico fundamental en el desarrollo del cáncer de cérvix, ha sido relacionado con el origen de un subconjunto de CECC⁵³.

Algunos estudios de biología molecular han ayudado a demostrar e identificar serotipos de papilomavirus, donde existe una relación causal de gran consistencia, como son algunos subtipos localizados en orofaringe⁵⁴ o laringe. El ADN del HPV ha sido identificado hasta en un 55% de los casos de CECC⁵³, siendo el HPV-16, el subtipo mas frecuentemente detectado, hasta en 90-95% de los CECC-HPV positivos, seguido del HPV-18 y el HPV-33, entre otros.

En la actualidad se acepta una hipótesis multifactorial sobre la carcinogénesis en CECC y más específicamente en la carcinogénesis laríngea, describiéndose otros factores ambientales como la radiación y la exposición a los asbestos, al serrín, gas mostaza y a diversos productos de las refinerías, como posibles factores predisponentes³¹⁴.

Todos los posibles factores etiológicos se relacionan entre sí, e interaccionan con el normal desarrollo y control del ciclo celular a nivel molecular. Esta relación nos lleva a desarrollar distintos modelos de carcinogénesis laríngea donde se aprecian algunas anormalidades cromosómicas, en distintas regiones genómicas coherentemente observadas, entre las que se encuentran: *la 9p21*, *la 17p13* (lugar del gen supresor de tumores *p53*), *3p* y *13q21*, y a su vez en distintos momentos del ciclo celular. A otro nivel del ciclo celular existen diversas alteraciones en el paso de la señal mitógena, donde se ven implicados tanto el factor de crecimiento epidérmico

(EGFR), como el receptor HER-2/neu (c-erbB-2), los cuales, repercuten en la transmisión de señales intracelulares a partir de dominios tirosina-quinasa. Estos factores se encuentran sobrerregulados en las líneas celulares con crecimiento tumoral. El exceso de expresión de los distintos receptores varían en función de la localización de los distintos tumores estudiados en cabeza y cuello⁸⁷.

También se han podido describir receptores transmembrana, cuya activación induciría un incremento de la mitogénesis en líneas celulares del cáncer de laringe Hep-2, este es el caso del receptor de la *Neuroquinina1*¹⁰⁵. Recientemente se ha descrito la presencia de este receptor en los cánceres de la cavidad oral¹⁰³, y larínge¹⁰⁴, sugiriéndose que la expresión en la membrana celular del mismo fuera responsable de una potente señal mitógena para las células tumorales¹⁰⁵.

Otros factores podrían jugar un papel crítico en la regulación del ciclo celular. Muchos de ellos se encuentran alterados en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, como es la sobreexpresión de la *Ciclina D1*, que es una proteína que tiene un papel clave en la regulación del ciclo celular en la transición G1/S, y su sobreexpresión se ha asociado a una mayor agresividad tumoral y un peor pronóstico¹²⁹. También la inactivación del gen supresor de tumores *p16INK4A*, (delección del gen p16 localizado en el 9p21), es una de las alteraciones genéticas más comunes que se han descrito en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. Se pudo demostrar de manera significativa, que existía una correlación entre la amplificación de la *Ciclina D1* y la delección en el gen *p16*, asociándose ambos cambios con la recurrencia, metástasis a distancia y la supervivencia, potenciándose entre sí para un peor pronóstico en CECC¹³⁰.

También hay descritos distintos oncogenes como el *c-myc*, íntimamente relacionado con el control de la transcripción celular, que además parece jugar un papel fundamental tanto en el desarrollo normal como en la carcinogénesis celular¹⁴². El *c-myc* actúa, junto a otros genes, precipitando la apoptosis vía *p53*¹⁴³.

La *p53* es un factor antineoplásico fundamental que mediante la inhibición del ciclo de crecimiento celular e inducción de apoptosis celular, actúa en la supresión de la proliferación celular aberrante.

En otra etapa del ciclo, la adhesión celular parece crítica en los procesos dinámicos necesarios para la morfogénesis tisular, así como para el mantenimiento de los tejidos diferenciados. Se han descrito multitud de genes que codifican moléculas para la regulación de señales intracelulares, controlando diversos procesos tales como la división, la migración o la diferenciación celular. La expresión de estas moléculas estaría fuertemente regulada y en algunos casos su pérdida se ha asociado al incremento de la capacidad invasiva de los tumores de extirpe epidermoide (e-

cadherin)^{154,155,156}. En el caso de las *integrinas* mostrarían una mayor heterogeneidad y una tendencia al desarrollo de tumores menos diferenciados y más agresivos cuando estas se sobreexpresaban^{158,159}.

Como último paso en el control celular, *la Apoptosis*, que es por medio de la cual se establece un control biológico ordenado y "silencioso". También el desajuste de esta etapa podría desencadenar la carcinogénesis. Uno de los reguladores más importante al efecto, es la *p53*. Otro regulador de la apoptosis es la *familia Bcl-2*, que constituyen un conjunto de moléculas cuya función podría ser apoptótica o antiapoptóticas.

Las calpainas son una familia de proteasas que están implicadas en la regulación de una gran variedad de funciones celulares, como la señalización intracelular, proliferación, diferenciación, movilidad celular y apoptosis. Han sido relacionadas con un cúmulo de enfermedades sistémicas, como la *distrofia muscular de cinturas*²⁵², donde se encuentra relación con el gen de la *CAPN3*, por la probable pérdida de capacidad proteolítica; o en el caso de la *enfermedad de Alzheimer*²⁴⁸, donde se detecta una mayor cantidad de m-calpaina en el citosol celular; o en la *Esclerosis Múltiple*²⁵³, incluso el *Trastorno Obsesivo-Compulsivo*²⁵⁴ o *las Cataratas*²⁴⁶, siendo en ocasiones piedra angular del desarrollo patogénico, y en otras simplemente un escalón más en la evolución nosológica, muchas veces indispensable.

Es fácil pensar que las Calpainas, que también se han relacionado con algunos tipos de cancer como en el caso de la calpaina 9 y el carcinoma gástrico²⁵¹, pudieran influir y repercutir en gran cantidad de procesos nosológicos, o en el desarrollo de la carcinogénesis en multitud de tumores.

Existen multitud de publicaciones como las de *Carragher y cols*^{315,316} donde se demuestra que la actividad de las calpainas potencian la transformación inducida por distintos oncogenes y protooncogenes como los *v-Src*, *v-Jun*, *v-Myc*, *k-Ras* y *v-Fos*. Además, la actividad aumentada de las calpainas, promueve nuevos modelos de adherencia focal, transformaciones morfológicas y migración celular en función de la activación de las distintas oncoproteínas.

Otros estudios, como los realizados por *Frances y cols*²⁹⁶, analizaron distintos polimorfismos de la calpaina 10, como el *UCSNP-44*, que definían haplotipos, que en situación homocigótica (2111/2111), se asociaban a un efecto protector contra el carcinoma colrectal CRC (OR = 0.166, *P* = 0.006, 95% CI [0.018–0.691])²⁹⁶. En ese estudio se mostraba una susceptibilidad genética bien definida a la hiperinsulinemia, que se asociaba con un bajo riesgo a padecer cáncer de laringe, no siendo ésta, la primera evidencia que relacionaba el cáncer de laringe con los niveles de insulina³¹⁷.

En el análisis transversal que se llevó a cabo en nuestro estudio, se apreció, como hallazgo destacable, una disminución en la frecuencia de expresión del alelo C del polimorfismo UCSNP-44 T/C en el grupo de casos comparado con el grupo de controles, siendo esta disminución estadísticamente significativa, ($p=0.01$). La *odds ratio* era menor de 1, ($OR=0.59$), indicando que la presencia del alelo C conferiría protección frente al cáncer de laringe. Además se demostraron otras asociaciones que, aunque no de manera taxativa, evidenciarían a posteriori, una relación existente entre éste y otros polimorfismos de la calpaina 10 (UCSNP-44, 63, haplotipo 2111), afectando estos, al desarrollo y la agresividad del cáncer de laringe, repercutiendo tanto en la probabilidad de padecerlo, como en la supervivencia a lo largo del tiempo, como plantearemos en el análisis multivariable.

1.-ANALISIS DE CASOS Y CONTROLES

La distribución genotípica de la población analizada estaba en concordancia con las presentadas en los estudios previos realizados sobre poblaciones como la británica y la irlandesa³⁰⁵.

El origen de la línea de investigación de nuestro estudio se basó en unos trabajos previos, publicados por *González y cols*, sobre el gen *CAPN10* y el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOPQ)^{290,292}, donde se demostraba una inesperada asociación entre los distintos haplotipos de la *CAPN10* y la agregación familiar de cáncer, además de un aumento en la frecuencia de los antecedentes familiares de distintos tipos de cáncer y en distintas localizaciones, sobresaliendo el cáncer de laringe, con una frecuencia destacada entre familiares de primer grado (padres, hermanos o hijos). Estos indicios, apoyados por el evidente rol jugado por las calpainas en la señalización intercelular y la apoptosis, nos empujaron a analizar y profundizar en esta evidencia sobre una serie de pacientes con cáncer de laringe,

Al analizar los resultados de la genotipación de las muestras obtenidas, se detectaron diferencias en la distribución del polimorfismo UCSNP-44 por alelos. Se observó que el alelo 2 (alelo C) tenía una menor representación en casos comparado con controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (**0,12 vs 0,17; p: 0.02**), la *odds ratio* marcaba el comportamiento de éste, como factor de protección (**OR: 0,69**). La alteración en el Equilibrio de Hardy-Weinberg podría hacer dudar de los resultados en tanto se reflejaban en el grupo de casos, pero al no presentar una p significativa ($p=0,06$) la conclusión se dirigió a la necesidad de un aumento del tamaño muestral para obtener un resultado más concluyente. Además, el polimorfismo UCSNP-44 con el alelo 2, que definía el haplotipo (2111), parecía ejercer un efecto protector contra el cáncer de laringe. Curiosamente el mismo efecto protector de este polimorfismo fue demostrado en la serie de pacientes con cáncer colorrectal descrito previamente en el estudio de P. Frances²⁹⁶. En el caso del UCSNP-63, al igual que en el resto polimorfismos, no se detectaron alteraciones significativas en el estudio por alelos.

En el análisis transversal llevado a cabo, el polimorfismo UCSNP-44 con genotipo T/C se determinó con una frecuencia menor en el grupo de casos comparado con el grupo de controles, siendo esta disminución estadísticamente significativa, (**p=0.01**). La *odds ratio* era menor de 1 (**OR=0.59**), indicando que la presencia de dicho genotipo (T/C) se comportaría como un factor de protección frente al cáncer de laringe. Este hallazgo se podría correlacionar con la significación protectora del alelo 2

(alelo C), del polimorfismo UCSNP-44 (T/C) y como posteriormente veremos, también con el haplotipo 2111.

Sin embargo, en esos estudios, el efecto del UCSNP-44 parecía seguir un modelo recesivo, aunque no podríamos excluir la posibilidad de que el mismo alelo ejerciera un efecto diferente dependiendo del contexto fisiológico, debiendo ser profundamente estudiado, puesto que no podemos rechazar la casualidad como posibilidad.

Además se demostró, al analizar la distribución del genotipo UCSNP-63 (C/T) comparando casos y controles, que existía una alteración para dicho polimorfismo, presentando una diferencia en casos cuando se comparaba con controles, y que ésta era estadísticamente significativa (**p=0.01, OR=1.78**), por lo que este hallazgo, estaría asociado con un incremento en el riesgo a padecer cáncer de laringe en los individuos que presentaban esta variante, o insinuaba una asociación aún poco definida, con la agresividad tumoral.

No se encontró una relación estadística clara, entre el UCSNP-63 y las formas familiares de cáncer de laringe, de manera que se permitiera postular sobre la repercusión de este polimorfismo en la herencia de cáncer de laringe. Posteriormente, el UCSNP-63, nos sorprendería en el estudio de la supervivencia, donde si presentó una importante repercusión estadísticamente significativa.

Esta distribución de los polimorfismos UCSNP-44 y UCSNP-63, que parecería contradictoria inicialmente, se corroboraría en los análisis de supervivencia intracohorte posteriores, donde se constataría que efectivamente, el papel desempeñado por la presencia de estos dos polimorfismos podrían ser totalmente antagónicos, pero no simultáneos, expresándose cada uno de ellos en distintas fases de la carcinogénesis laríngea.

Otro interesante resultado encontrado radica en la alteración en la distribución genotípica del polimorfismo UCSNP-63 (22) hallada en los controles, donde se apreciaba un exceso de individuos con este genotipo, dato que no se refrendaba en el grupo de casos. Esta desviación del Equilibrio de Hardy-Weimberg (EHW) en el grupo control, presentaba una importante significación estadística (**p=0,01**), por lo que se reanalizaron los datos con nuevas genotipaciones de las muestras obteniendo idénticos resultados. Esta no ha sido la primera evidencia de polimorfismos perteneciente al gen *CAPN10* con alteraciones del EHW no asociados a errores en la genotipación³⁰⁶. Otros estudios realizados con posterioridad explicaban estos hallazgos motivados por el tipo más frecuente de *Selección Natural*³⁰⁸, la selección estabilizadora o purificadora, en la que la diversidad genética decaería según un valor particular del carácter estudiado. De esta manera, observaríamos como un genotipo

concreto, que en principio no estaría asociado con la probabilidad de presentar o no cáncer de laringe, se expresa con más frecuencia en el grupo control que en el grupo de pacientes con cáncer, sin tener necesariamente relación con el resto de genotipos. De esta manera, hallaríamos alteraciones en las frecuencias alélicas que no repercutirían sobre las proporciones de Hardy-Weimberg, justificando el desajuste en dicha región del gen *CAPN10*. En estos casos, es importante revalidar los resultados en estudios posteriores intentando siempre incrementar el tamaño muestral.

En el análisis por Haplotipos, sólo resultó significativo el 2111, que como ya comentamos, estaba definido por la variante 2 del polimorfismo UCSNP-44, que marcaba este rasgo como factor de protección [**OR: 0.70; CI 95%(0.51-0.99) p=0,03**].

Los estudios de *Evans y cols.* proponían que el haplotipo 2111, en la población británica estudiada, incrementaba el riesgo de padecer Diabetes Mellitus³⁰⁵. Por otra parte, *Horikawa y cols.*²⁴⁰ describieron el mismo riesgo usando un marcador mucho más específico: *UCSNP-43*. Su grupo realizó estudios funcionales para determinar el efecto del *UCSNP-43* sobre los niveles de expresión de calpaina 10, demostrando su control. El *polimorfismo UCSNP-43* y el *44* se encuentran justo a 10 bp uno de otro, por lo que no se podría descartar un posible efecto del *UCSNP-44* sobre los niveles de calpaina 10 en otros tejidos, teniendo también en cuenta el carácter ubicuo de algunas calpainas. En ese estudio se mostraba una susceptibilidad genética bien definida para la hiperinsulinemia, que se asociaba con un bajo riesgo a padecer cáncer de laringe, no siendo ésta, la primera evidencia que relacionaba el cáncer de laringe con los niveles de insulina³¹⁷. Por otra parte, niveles bajos de IGF-1 han sido hallados recientemente en pacientes con carcinoma de laringe, hallazgos que involucraban las vías de metabolismo insulínico, de alguna manera poco definida aún, con la posibilidad de desarrollar carcinoma de laringe^{296,317}.

El papel de la calpaina 10 en la fisiología celular es virtualmente desconocido. Sólo podemos suponer cómo interactúan en función del conocimiento sobre otras calpainas. Tras la activación por Ca²⁺, se cree que las calpainas se someten a una proteólisis, dando lugar a una serie de productos con destino a distintos objetivos celulares, como la membrana citoesquelética, receptores de membrana, y algunos factores de transcripción como NF-κB, actuando así a muchos niveles del ciclo celular.

Existen muchas cuestiones que permanecen sin ser contestadas; primero, el objetivo fundamental de las calpainas dentro de la actividad proteolítica, en caso de que no hubiera más de uno; segundo, determinar el control sobre la expresión de las calpainas que ejercen los distintos tejidos; finalmente, profundizar en la repercusión de la asociación del haplotipo 2111 de la calpaina10 y su asociación con el cáncer de

laringe, al igual que los polimorfismos UCSNP-44 y -63, ya fuera por mecanismos de actuación de manera independiente o por medio de interacciones entre ellos y/o con otros factores.

2.- ASOCIACIÓN ENTRE DIVERSOS POLIMORFISMOS DE LA CALPAINA 10 Y LA SUPERVIVENCIA EN EL CÁNCER DE LARINGE.

El cáncer de laringe es un tipo tumoral típico de países mediterráneos. Muchos estudios han descrito la asociación entre el consumo de tabaco o alcohol y los tumores de cabeza y cuello^{318,319}. Paradójicamente, estos datos han contrastado con los de aquellas poblaciones que, estando expuestas a los mismos carcinógenos, no han desarrollado, con la misma frecuencia, este tipo tumoral (cáncer de laringe). Muchos autores usan el cáncer de laringe como ejemplo paradigmático de interacción ambiental y de repercusión genética en el desarrollo de tumores^{311, 320, 321}. La distribución genotípica de nuestra población estaba en concordancia con las de distintas poblaciones británicas e irlandesas estudiadas previamente, como ya se mencionó en el apartado anterior³⁰⁵.

En el estudio de supervivencia se ha analizado una serie de pacientes con cáncer de laringe sobre los que ya se publicaron resultados preliminares³²². En dichos estudios, se determinó la asociación entre varios polimorfismos del gen de la *CAPN10* (UCSNP-44 y UCSNP63) y la probabilidad de padecer cáncer de laringe³²², planteándose la necesidad de evaluar una posible repercusión, de dichos polimorfismos, sobre la supervivencia a los cinco años.

Se tomaron los individuos pertenecientes al grupo de casos, revisando la supervivencia en el momento de finalización del estudio (Diciembre de 2008), cuando ya se dio por finalizado. Dado que no todos los pacientes comenzaron el estudio en el mismo momento (intervalo de tiempo en el que se fueron reclutando los pacientes y completando los cuestionarios), se contabilizó la duración, en meses, de su inclusión en el estudio. La diferencia del número de enfermos que se incluyeron en el estudio de supervivencia (199 pacientes) con respecto al estudio previo (218 pacientes) fue debido a que por un lado, la mayoría de los pacientes procedían de fuera de nuestra Comunidad Autónoma, lo cual dificultaba su seguimiento, y por otro, a que algunos decidieron no seguir perteneciendo al estudio una vez preguntados, ya fuera por motivos personales del paciente o de los familiares.

Al realizar el análisis de inferencia (***Cox's proportional risk model***) en nuestro estudio, se observó una relación estadísticamente significativa cuando se ajustó la supervivencia, al estadio tumoral, grado de diferenciación celular, edad, metástasis linfáticas y presencia de fístula, con una **HR = 2.73, 95% CI: 1.21-6.20**. El polimorfismo ***UCSNP-63 (11)***, parecía mantener una supervivencia similar al resto de polimorfismos (***UCSNP-44 43,19***) a lo largo de los meses, en el estudio multivariante (***Cox's proportional risk model***), pero la presencia de la variante *heterocigótica* (***UCSNP-***

63:12) conferiría una disminución de la supervivencia drástica a lo largo del tiempo en el mismo estudio de inferencia, por lo que parecía existir una asociación clara entre la presencia de esta variable genotípica (**UCSNP-63:12**) y una disminución de la supervivencia.

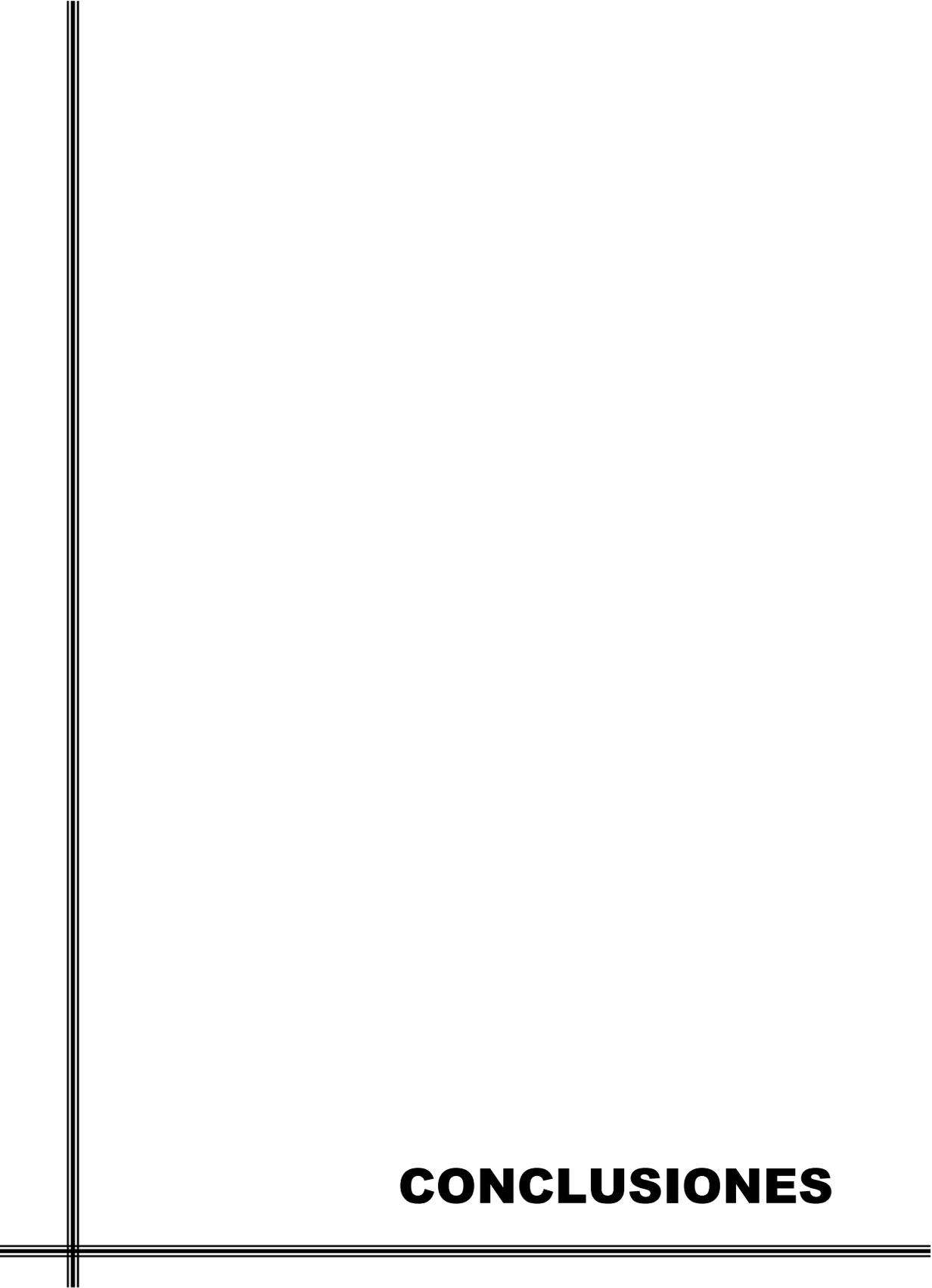
Estos hallazgos reforzarían la relación detectada entre la calpaina 10 y el cáncer de laringe en relación con el polimorfismo UCSNP-63, cuya asociación se apuntaba en el estudio previo (estudio de casos y controles, Esteban et al, 2008)³²².

En este caso el **UCSNP-63:12**, podría comportarse como un factor asociado a la agresividad tumoral³²³, de esa manera, la supervivencia en los pacientes que expresaban este alelo (12) se vería comprometida en relación al genotipo 11 y al resto de polimorfismos analizados (como se puede ver en la figura 19).

Realizando el mismo análisis de inferencia estadística (**Cox's proportional risk model**), con el resto de polimorfismos estudiados (**UCSNP-19, UCSNP-43, UCSNP-44**), no se detectaron alteraciones significativas en la supervivencia, como ya hemos apuntado, por lo que, en cierto modo, estos datos contrastarían especialmente con los hallazgos expuestos en el análisis previo (estudio de casos y controles, Esteban et al, 2008)³²², sobre la **UCSNP-44**, donde se evidenciaba la asociación entre la presencia del alelo C con la probabilidad de padecer cáncer de laringe, de esta manera, dicho alelo se comportaría como factor de protección frente al cáncer en este estudio³²². En el análisis de supervivencia no se apreciaron diferencias significativas, por lo que este alelo (**alelo C, UCSNP-44**) podría influir en la probabilidad de adquirir o desarrollar el tumor, es decir se comportaría como factor de riesgo, pero no repercutiría en la supervivencia del mismo a lo largo del tiempo.

En el estudio por haplotipos no se detectaron diferencias significativas, lo cual dio mas valor al hallazgo puntual sobre la variante alélica en cuestión (UCSNP-63:12), y nos plantea la necesidad futura de profundizar en el estudio aumentando del tamaño muestral, para definir la repercusión individual y la relación entre éste y del colectivo genómico analizado.

“...Las dificultades que implican tanto el estudio de líneas celulares de calpainas, como el uso de modelos animales, conllevan la necesidad de un abordaje molecular del problema, y así intentar dilucidar las incógnitas sobre las funciones de las diferentes variantes genéticas y su repercusión sobre las distintas entidades nosológicas analizadas...”



CONCLUSIONES

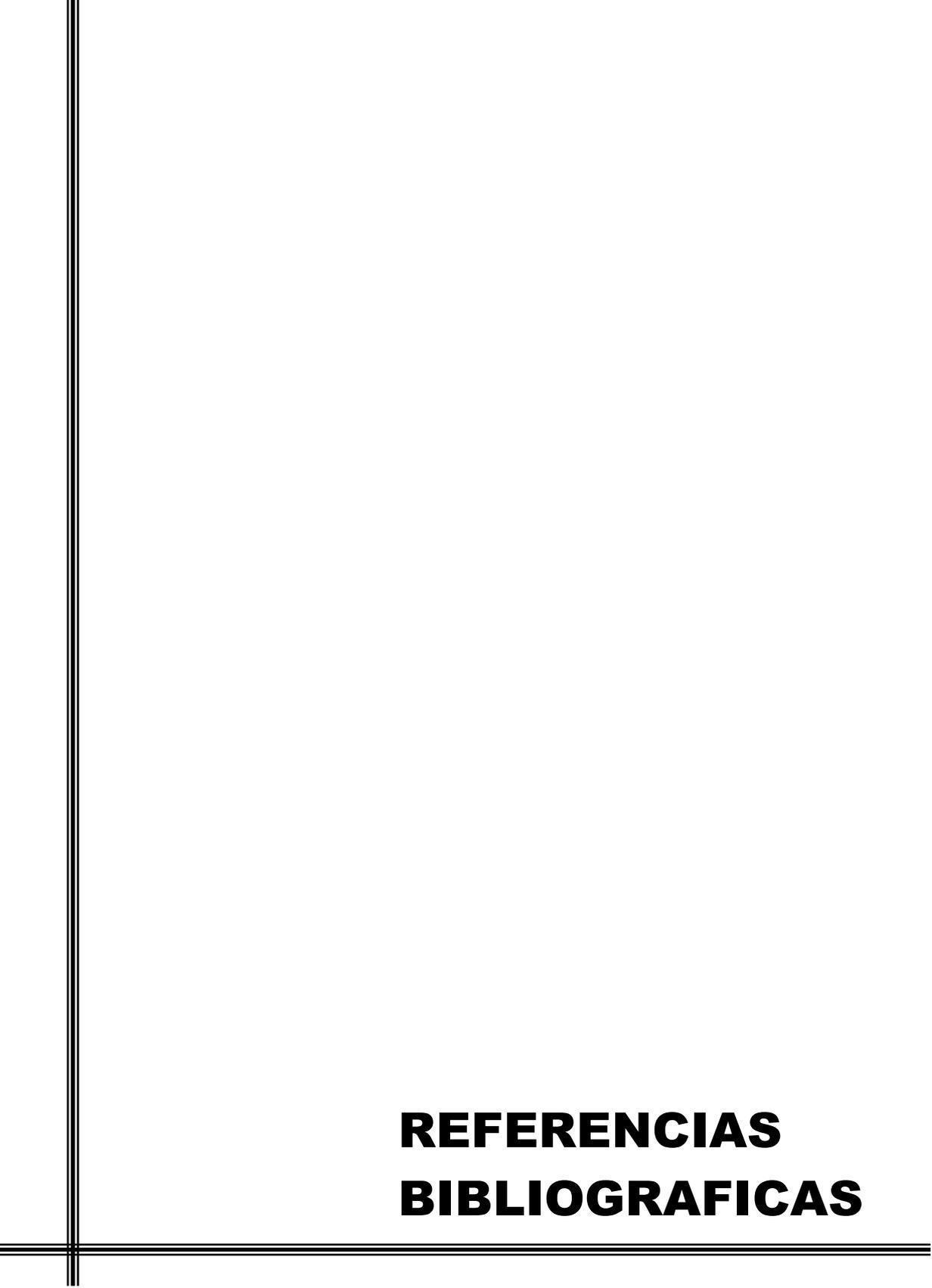
CONCLUSIONES

1.- La distribución de los distintos polimorfismos del gen *CAPN10* se ajustan al Equilibrio de Hardy-Weinberg y al analizarlos en un grupo de pacientes y en la población normal, hemos podido comprobar que:

- El alelo C del polimorfismo UCSNP-44 T/C tiene una frecuencia menor en casos cuando se compara con controles, y que esta disminución es estadísticamente significativa, indicando que la presencia de dicho alelo, ya sea en el estudio por alelos, por genotipos o definiendo al haplotipo 2111, confiere protección frente al cáncer de laringe.

- Por otro lado, el polimorfismo UCSNP-63 C/T, que se expresa de manera opuesta, siendo también significativo, se asocia a un incremento del riesgo a padecer cáncer de laringe.

2.- Hemos podido determinar que la presencia del genotipo UCSNP-63 C/T se asocia a una disminución de la supervivencia a los 4 años, y de esta manera, se comportaría como factor de mal pronóstico en el cáncer de laringe.



**REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS**

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ¹ Neil Weir. History of Medicine: Otorhinolaryngology. Postgrad Med J 2000;76:65-69 (February).
- ² Milton Rizzi. Historia de la Laringectomia Total. Rev Med Uruguay 2005; 214-14.
- ³ D. Max Parkin, MD, Freddie Bray, J. Ferlay and Paola Pisani, PhD. Global Cancer Statistics, 2002 CA Cancer J Clin 2005; 55:74-108© 2005 American Cancer Society
- ⁴ Silverberg E, Holleb AI. Cancer statistics, 1974--worldwide epidemiology. CA Cancer J Clin. 1974 Jan-Feb; 24(1):2-21.
- ⁵ Atkinson L. Some features of the epidemiology of cancer of the larynx in Australia and Papua, New Guinea. Laryngoscope. 1975 Jul; 85(7):1173-84.
- ⁶ Iwamoto H. An epidemiological study of laryngeal cancer in Japan. Laryngoscope. 1975 Jul;85(7):1162-72.
- ⁷ Terracini B, Anglesio E, Panero M, Vineis P. Descriptive epidemiology of cancer of the larynx in the province of Torino, Italy. Tumori. 1978 Oct 31;64(5):445-56.
- ⁸ Mancuso TF, Sterling TD. Relation of place of birth and migration in cancer mortality in the U.S.--a study of Ohio residents (1959-1967). J Chronic Dis. 1974 Nov;27(9-10):459-74.
- ⁹ Enstrom JE. Cancer and total mortality among active Mormons. Cancer. 1978 Oct;42(4):1943-51
- ¹⁰ Lopez-Abente G, Pollan M, Aragonés N, Pérez Gómez B, Hernández Barrera V, Lope V, Suárez B. State of cancer in Spain: incidence. [Article in Spanish]. An Sist Sanit Navar. 2004 May-Aug;27(2):165-73
- ¹¹ Rothman KJ, Cann CI, Flanders W, et al. Epidemiology of laryngeal cancer. Epidemiol. Rev. 1980; 2:195-209.
- ¹² Gloeckler Reis LA, Miller BA, Hankey BF, et al. SEER Cancer Statics Review, 1993-1991. Surveillance program. Division of Cancer Prevention and Control, Washington, DC: National Center Institute. 1992.
- ¹³ Lopez-Abente G, Pollan M, Jimenez M. Female mortality trends in Spain due to tumors associated with tobacco smoking. Cancer Causes Control. 1993 Nov; 4(6):539-45.
- ¹⁴ De la PLATA, M. Tesis. Universidad de Málaga, 1992.
- ¹⁵ Kleinsasser O, Tumors of the larynx and hypoparhrynx. Giorg Thieme Verlag. New York, 1988. ISBN 3-12-712001-2
- ¹⁶ Atkinson L. Some features of the epidemiology of cancer of the larynx in Australia and Papua, New Guinea. Laryngoscope. 1975 Jul;85(7):1173-84.
- ¹⁷ Creagan ET, Fraumeni JF Jr. Cancer mortality among American Indians, 1950-67. J Natl Cancer Inst. 1972 Oct;49(4):959-67.
- ¹⁸ Mancuso TF, Sterling TD. Relation of place of birth and migration in cancer mortality in the U.S.--a study of Ohio residents (1959-1967). J Chronic Dis. 1974 Nov;27(9-10):459-74.
- ¹⁹ LEMON FR, WALDEN RT, WOODS RW. CANCER OF THE LUNG AND MOUTH IN SEVENTH-DAY ADVENTISTS. PRELIMINARY REPORT ON A POPULATION STUDY. .Cancer. 1964 Apr;17:486-97.

-
- ²⁰ Jussawalla DJ, Deshpande VA, Pai AM. Indian Histological typing of cancer in Greater Bombay: an analysis of its utility in developing countries. *J Cancer*. 1970 Mar; 7(1):1-13.
- ²¹ De Stéfani E, Carzoglio J, Cendán M, Deneo H, Olivera L, Oreggia F. Laryngeal cancer in Uruguay (1958-1981). An epidemiologic study. *Cancer*. 1985 Jan 1; 55(1):214-6.
- ²² Atkinson L. Some features of the epidemiology of cancer of the larynx in Australia and Papua, New Guinea. *Laryngoscope*. 1975 Jul;85(7):1173-84
- ²³ Iwamoto H. An epidemiological study of laryngeal cancer in Japan. *Laryngoscope*. 1975 Jul; 85(7):1162-72.
- ²⁴ Kirchner JA. Pyriform sinus cancer: a clinical and laboratory study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1975 Nov-Dec;84(6):793-803.
- ²⁵ Olofsson J, van Nostrand AW. Growth and spread of laryngeal and hypopharyngeal carcinoma with reflections on the effect of preoperative irradiation. 139 cases studied by whole organ serial sectioning. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1973;308:1-84.
- ²⁶ Ramanjaneyulu P. Postcricoid cancer. *J Med Liban*. 1974; 27(3):299-304.
- ²⁷ De Stéfani E, Carzoglio J, Cendán M, Deneo H, Olivera L, Oreggia F. Laryngeal cancer in Uruguay (1958-1981). An epidemiologic study. *Cancer*. 1985 Jan 1;55(1):214-6.
- ²⁸ Mårtensson B. Epidemiological aspects on laryngeal carcinoma in Scandinavia. *Laryngoscope*. 1975 Jul; 85(7):1185-9.
- ²⁹ Mercado R. Current and emerging health needs. *Newsette*. 1972 Dec;12(4):10-4.
- ³⁰ McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck*. 1998 May; 20(3):250-65.
- ³¹ David H. Phillips. DNA Adducts in Human Tissues: Biomarkers of Exposure to Carcinogens in Tobacco Smoke. *Environ Health Perspect*. 1996 May;104 Suppl 3:453-8
- ³² Bartecci CE, MacKenzie TD, Schrier RW. The global tobacco epidemic. *Sci Am* 272:44-51 (1995)
- ³³ IARC. Tobacco Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol 38. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1986.
- ³⁴ Hoffmann D, Hecht SS, Ornat RM, Wynder EL, Tso TC. Chemical studies on tobacco smoke. XLII. Nitrosonornicotine: presence in tobacco, formation and carcinogenicity. *IARC Sci Publ*. 1976;(14):307-20.
- ³⁵ Rothman KJ, Cann CI, Flanders D, Fried MP. Epidemiology of laryngeal cancer. *Epidemiol Rev*. 1980; 2:195-209. Review.
- ³⁶ Hammond EC. The epidemiological approach to the etiology of cancer. *Cancer*. 1975 Mar; 35(3):652-4.
- ³⁷ Patricia Roberts Harris U.S. Dept. of Health, 1980 August 3, 1979 - January 20, 1981
- ³⁸ Pera E, Moreno A, Galindo L. Prognostic factors in laryngeal carcinoma. A multifactorial study of 416 cases. *Cancer*. 1986 Aug 15;58(4):928-34.
- ³⁹ Henderson BE, Ross RK, Pike MC. Toward the primary prevention of cancer. *Science*. 1991 Nov 22; 254(5035):1131-8. Review.

-
- ⁴⁰ Gavilán J, Gavilán C, Mañós-Pujol M, Herranz J. Discriminant analysis in predicting survival of patients with cancer of the larynx or hypopharynx. *Int J Otolaryngol Allied Sci*. 1987 Oct;12(5):331-5.
- ⁴¹ Sam M. Wiseman, MD, FRCS(C), Helen Swede, PhD, Daniel L. Stoler, PhD, Garth R. Anderson, PhD, Nestor R. Rigual, MD, Wesley L. Hicks, Jr, DDS, MD, Wade G. Douglas, MD, Dongfeng Tan, MD and Thom R. Loree, MD. Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck in Nonsmokers and Nondrinkers: An Analysis of Clinicopathologic Characteristics and Treatment Outcomes. *Annals of Surgical Oncology* 10:551-557 (2003).
- ⁴² Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, Tashkin DP, Yu GP, Hsu TC, Schantz SP. Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Oct;9(10):1043-9.
- ⁴³ Tan EH, Adelstein DJ, Droughton ML, Van Kirk MA, Lavertu P. Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol*. 1997 Apr;20(2):146-50.
- ⁴⁴ Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, Tashkin DP, Yu GP, Marshall JR, Hsu TC, Schantz SP. Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Dec;8(12):1071-8.
- ⁴⁵ Koch, Wayne M. MD; Lango, Miriam MD; Sewell, Duane MD; Zahurak, Marianna MA; Sidransky, David MD. Head and Neck Cancer in CNon-smokers: A Distinct Clinical and Molecular Entity. *The Laryngoscope*. Volume 109(10), October 1999, pp 1544-1551
- ⁴⁶ Freddi Lewin, M.D., Staffan E. Norell, M.D., Hemming Johansson, B.Sc. , Per Gustavsson, M.D. , Johan Wennerberg, M.D. , Anders Biörklund, M.D. , Lars Erik Rutqvist, M.D. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck A population-based case-referent study in Sweden
- ⁴⁷ Mueller KM, Krohn BR. Smoking habits and their relationship to precancerous lesions of the larynx. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1980;96(2): 211-7.
- ⁴⁸ Lowry WS Alcoholism in cancer of head and neck. *Laryngoscope*. 1975 Aug; 85(8): 1275-80
- ⁴⁹ Flanders WD, Rothman KJ. Interaction of alcohol and tobacco in laryngeal cancer. *Am J Epidemiol*. 1982 Mar; 115(3): 371-9
- ⁵⁰ Wynder EL. Etiological aspect of squamous cancers of the head and neck. *JAMA* 1971 Jan 18;215(3): 452-3.
- ⁵¹ Eicken, C. Larynxcarcinom nach alter Rontgenschadigung. *Zbl Hals- Nas Ohrenheilk*. 1934; 21-71.
- ⁵² Sorensen, J. Diskussion. *Zbl. Hals-, Nas.-u. Ohrenheilk*. 1934;21:71
- ⁵³ Franceschi S, Munoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:567-75.
- ⁵⁴ B Perez-Ordóñez, M Beauchemin and R C K Jordan Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Pathology* 2006; 59:445-453.
- ⁵⁵ Van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93:232-5

-
- ⁵⁶ Braakhuis BJM, Snijders PJF, Keune WJ, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:998–1006.
- ⁵⁷ Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709–20.
- ⁵⁸ Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, et al. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002;8:3187–92.
- ⁵⁹ Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, et al. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2003;192:129–32.
- ⁶⁰ Strome SE, Savva A, Brissett AE, et al. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* 2002;8:1093–100
- ⁶¹ Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, et al. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997;79:595–604.
- ⁶² Mork J; Lie AK; Glatre E; Hallmans G; Jellum E; Koskela P; Moller B; Pukkala E; Schiller JT; Youngman L; Lehtinen M; Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001 Apr 12;344(15):1125-31.
- ⁶³ Storey A; Thomas M; Kalita A; Harwood C; Gardiol D; Mantovani F; Breuer J; Leigh IM; Matlashewski G; Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998 May 21;393(6682):229-34.
- ⁶⁴ Hengstermann A., Linares L. K., Ciechanover A., Whitaker N. J., Scheffner M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 1218-1223, 2001
- ⁶⁵ Andl T., Kahn T., Pfuhl A., Nicola T., Erber R., Conradt C., Klein W., Helbig M., Dietz A., Weidauer H., Bosch F. X. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res.*, 58: 5-13, 1998
- ⁶⁶ Munger K., Werness B. A., Dyson N., Phelps W., Harlow E., Howley P. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.*, 8: 4099-4105, 1989.
- ⁶⁷ Kristina R. Dahlstrom, Karen Adler-Storthz, Carol J. Etzel, Zhensheng Liu, Laura Dillon, Adel K. El-Naggar, Margaret R. Spitz, John T. Schiller, Qingyi Wei and Erich M. Sturgis. Human Papillomavirus Type 16 Infection and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck in Never-Smokers. *Clinical Cancer Research* Vol. 9, 2620-2626, July 2003.
- ⁶⁸ Gregory S. Akerman, William H. Tolleson, Kim L. Brown, Li Li Zyzak, Elena Mourateva, Timur S. W. Engin, Anamaria Basaraba, Ann L. Coker, Kim E. Creek and Lucia Pirisi. Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Cooperate to Increase Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mRNA Levels, Overcoming Mechanisms by which Excessive EGFR Signaling Shortens the Life Span of Normal Human Keratinocytes. *Cancer Research* 61, 3837-3843, May 1, 2001
- ⁶⁹ Kutler DI, Wreesmann VB, Goberdhan A, et al. Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1718–21.
- ⁷⁰ Devaraj K, Gillison ML, Wu TC. Development of HPV vaccines for HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:345–62

-
- ⁷¹ Woo Jeong Yoo, Seung Ho Cho, Youn Soo Lee, Gyeong Sin Park, Min Sik Kim, Byung Kee Kim, Won Sang Park, Jung Yong Lee, Chang Suk Kang. Loss of Heterozygosity on Chromosomes 3p,8p,9p and 17p in the Progression of Squamous Cell Carcinoma of the Larynx. *Korean Med Sci.* 2004 Jun;19(3):345-351
- ⁷² Califano J, van der RP, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488–92.
- ⁷³ Schuurung E; Verhoeven E; Mooi WJ; Michalides RJ. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene* 1992 Feb; 7(2):355-61
- ⁷⁴ Wong AJ; Ruppert JM; Bigner SH; Grzeschik CH; Humphrey PA; Bigner DS; Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992 Apr, 89 (7): 2965-9
- ⁷⁵ Ekstrand AJ; Longo N; Hamid ML; Olson JJ; Liu L; Collins VP; James CD. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene*, 1994 Aug, 9 (8): 2313-20.
- ⁷⁶ Merlino GT; Xu YH; Ishii S; Clark AJ; Semba K; Toyoshima K; Yamamoto T; Pastan I. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science*, 1984 Apr, 224 (4647): 417-9.
- ⁷⁷ Ullrich A; Coussens L; Hayflick JS; Dull TJ; Gray A; Tam AW; Lee J; Yarden Y; Libermann TA; Schlessinger J; Downward J; Mayes ELV; Whittle N; Waterfield MD; Seeburg PH. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 1984 May-Jun, 309 (5967): 418-25.
- ⁷⁸ Nishikawa R; Ji XD; Harmon RC; Lazar CS; Gill GN; Cavenee WK; Huang HJ. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994 Aug, 91 (16): 7727-31.
- ⁷⁹ Pelley RJ; Maihle NJ; Boerkoel C; Shu HK; Carter TH; Moscovici C; Kung HJ. Disease tropism of c-erbB: effects of carboxyl-terminal tyrosine and internal mutations on tissue-specific transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989 Sep, 86 (18): 7164-8.
- ⁸⁰ Lin SY, Makino K, Xia W, et al: Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3:802-808, 2001
- ⁸¹ Wang SC, Lien HC, Xia W, et al: Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell* 6:251-261, 2004.
- ⁸² Carpenter G: Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol* 15:143-148, 2003
- ⁸³ Eisbruch A; Blick M; Lee JS; Sacks PG; Gutterman J. Analysis of the epidermal growth factor receptor gene in fresh human head and neck tumors. *Cancer Res* 1987 Jul 1; 47(13):3603-5.
- ⁸⁴ Grandis JR; Tweardy DJ; Melhem MF. Asynchronous modulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998 Jan; 4(1):13-20.

-
- ⁸⁵ Grandis JR, Tweardy DJ: Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53:3579-3584, 1993
- ⁸⁶ Shailaja Kalyankrishna, Jennifer R. Grandis. Epidermal Growth Factor Receptor Biology in Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 24, No 17 (June 10), 2006: pp. 2666-2672
- ⁸⁷ Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurung E, et al: Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res* 18:4793-4800, 1998
- ⁸⁸ Bei R, Budillon A, Masuelli L, et al: Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients. *J Pathol* 204:317-325, 2004.
- ⁸⁹ Schartinger VH, Kacani L, Andrie J, et al: Pharmacodiagnostic value of the HER family in head and neck squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 66:21-26, 2004.
- ⁹⁰ Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H, Pezeshki AM, Ghaderi A. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett.* 2002 Oct 28;184(2):223-30.
- ⁹¹ Ozdek A, Sarac S, Akyol MU, Sungur A, Yilmaz T. c-myc and bcl-2 Expression in supraglottic squamous cell carcinoma of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004 Jul;131(1):77-83.
- ⁹² Craven JM; Pavelic ZP; Stambrook PJ; Pavelic L; Gapany M; Kelley DJ; Gapany S; Gluckman JL. Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma. *Anticancer Res* 1992 Nov-Dec;12(6B):2273-6.
- ⁹³ Field JK; Spandidos DA; Yiagnisis M; Gosney JR; Papadimitriou K; Stell PM. C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1992 May-Jun;12(3):613-9.
- ⁹⁴ Hideaki Shiga, MD , Audrey A. Rasmussen, MS , Patrick G. Johnston, MD , Miles Langmacher, MD, Alfred Baylor, MD , Michele Lee , Kevin J. Cullen, MD Prognostic value of c-erbB2 and other markers in patients treated with chemotherapy for recurrent head and neck cancer. *Head Neck.* 2000 Sep;22(6):599-608.
- ⁹⁵ Lango MN; Dyer KF; Lui VW; Gooding WE; Gubish C; Siegfried JM; Grandis JR. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst* 2002 Mar 6; 94(5):375-83.
- ⁹⁶ Qing Zhang, Sufi M. Thomas, Vivian Wai Yan Lui, Sichuan Xi, Jill M. Siegfried, Huizhou Fan, Thomas E. Smithgall, Gordon B. Mills, and Jennifer Rubin Grandis Phosphorylation of TNF- α converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. May 2, 2006; 103: 6901-6906.
- ⁹⁷ Qing Zhang, Sufi M. Thomas, Sichuan Xi, Thomas E. Smithgall, Jill M. Siegfried, Joanne Kamens, William E. Gooding and Jennifer Rubin Grandis. Src Family Kinases Mediate Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Cleavage, Proliferation, and Invasion of Head and Neck Cancer Cells. *Cancer Research* 64, 6166-6173, September 1, 2004.
- ⁹⁸ Lui VW, Thomas SM, Zhang Q, et al: Mitogenic effects of gastrin-releasing peptide in head and neck squamous cancer cells are mediated by activation of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 22:6183-6193, 2003.

-
- ⁹⁹ Song JL, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer, *Oncogene* 2000; 19:2489-2495.
- ¹⁰⁰ Kijima T, Niwa H, Steinman RA et al. STAT- activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo. *Cell Growth Differ* 2003; 13:355-362
- ¹⁰¹ Arany I, Chen SH, Megyesi JK, et al. Differentiation-dependent expression of signal transducer and activators of transcriptions (STATs) might modify responses to growth factor in the cancers of the head and neck. *Cancer Lett* 2003; 199:83-89
- ¹⁰² Miguel Muñoz, Marisa Rosso, Francisco J Aguilar, Miguel A González-Moles, Maximino Redondo, Francisco Esteban. NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEP-2. *Invest New Drugs*. 2007 Sep 29; [Epub ahead of print]
- ¹⁰³ Gonzalez Moles MA, Esteban F, Ruiz Avila, Rosso M, Muñoz M. Expresión of Substance P and Neurokinin-1-receptor in oral cancer and adjacent Non Tumoral Mucosa: Linking Chronic inflammation to cancer progresión. (Sometido)
- ¹⁰⁴ Esteban F, Gonzalez-Moles MA, Castro D, Martin-Jaen Mdel M, Redondo M, Ruiz-Avila I, Muñoz M. Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology*. 2009 Jan;54(2):258-60
- ¹⁰⁵ Esteban F, Muñoz M, González-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Mar; 25(1):137-45.
- ¹⁰⁶ Rollandy I, Dreux C, Imhoff V, Rossignol B: Importance of the presence of the N-terminal tripeptide of substance P for the stimulation of phosphatidylinositol metabolism in rat parotid gland: a possible activation of phospholipases C and D. *Neuropeptides* 13: 175–185, 1989
- ¹⁰⁷ Luo W, Sharif TR, Sharif M: Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res* 56:4983–4991, 1996
- ¹⁰⁸ Muñoz M, Pérez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R: Antitumoural action of NK1 receptor antagonist L-733,060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 14:183–188, 2004.
- ¹⁰⁹ Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Wang L, Lieb K, Korc M, Palma C, Zimmermann A, Reubi JC, Buchler MW: Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest* 83:731–742, 2003
- ¹¹⁰ Palma C, Nardelli F, Manzini S, Maggi CA: Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cells line bearing tachykinin NK1 receptors. *Br J Cancer* 79:236–243, 1999
- ¹¹¹ Muñoz M, Pérez A, Coveñas R, Rosso M, Castro E: Antitumoural action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch Ital Biol* 142:105–112, 2004.
- ¹¹² Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascon P, Maloof PB, Mosenthal A, Rameshwar P: Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 388–393, 2000
- ¹¹³ Sitohy B, El Salhy M: Changes in the colonic enteric nervous system in rats with chemically induced colon dysplasia and carcinoma. *Acta Oncol* 41:543–549, 2002

-
- ¹¹⁴ Muñoz M, Rosso M, Pérez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarrigo C, Piruat JI: The NK1 receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides* 39(4): 427–32, 2005.
- ¹¹⁵ Muñoz M, Rosso M, Pérez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarrigo C, Soult JA, Montero I. Antitumoural action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2567–2570, 2005.
- ¹¹⁶ Fowler CJ, Brannstrom G: Substance P enhances forskolin-stimulated cyclic AMP production in human UC11MG astrocytoma cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 16:21–28, 1994
- ¹¹⁷ Lee CM, Kum W, Cockram CS, Teoh R, Young JD: Functional substance P receptors on a human astrocytoma cell line (U-373 MG). *Brain Res* 488:328–331, 1989
- ¹¹⁸ Eistetter HR, Mills A, Brewster R, Alouani S, Rambosson C, Kawashima E: Functional characterization of neurokinin-1 receptors on human U373MG astrocytoma cells. *Glia* 6:89–95, 1992
- ¹¹⁹ Muñoz M, Rosso M, Coveñas R, Soult JA. Antitumoural action of neurokinin-1 receptor antagonists on human brain cancer cell lines. In: *Brain Cancer: Therapy and Surgical Interventions 2006* (in press)
- ¹²⁰ Lang K, Drell TL, Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, Entschladen F: Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer* 112:231–238, 2004
- ¹²¹ Langdon S, Sethi T, Richie A, Muir M, Smyth J, Rozengurt E: Broad spectrum neuropeptide antagonists inhibit the growth of small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res* 52:4554–4557, 1992
- ¹²² Reeve JG, Bleehen NM: Substance P induces apoptosis in lung cancer cell lines in vitro. *Biochem Bioph Res Com* 199:1313–1319, 1994
- ¹²³ Seckl MJ, Higgins T, Wildmer F, Rozengurt E: Substance P: a novel potent inhibitor of signal transduction and growth in vitro and in vivo in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 57:51–54, 1997
- ¹²⁴ Palma C, Bigioni M, Irrissuto C, Nardelli F, Maggi CA, Manzini S: Anti-tumour activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer* 82:480–487, 2000
- ¹²⁵ Woll PJ, Rozengurt E. Substance P, a potent bombesin antagonist in murine Swiss 3T3 cells, inhibits the growth of human small cell lung cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 35:1859–1863, 1998
- ¹²⁶ Role of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs*. 2005 Nov;16(10):1083-9.
- ¹²⁷ Substance P increases in vitro lymphokine-activated-killer (LAK) cell cytotoxicity against fresh colorectal cancer cells. *J Surg Res*. 1992 Nov;53(5):445-9.
- ¹²⁸ Callender T, El-Naggar AK, LeeMS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1)/Cy-clin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994; 74:152-158.
- ¹²⁹ J.P.Rodrigo Tapia, M.V.Gonzalez Meana, L.A.Garcia Gonzalez. E.Coto,C.Suarez Nieto. INACTIVACIÓN DE p53 Y AMPLIFICACIÓN DE LA CICLINA D1 EN LOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEZA Y CUELLO. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002; 53: 225-232.

-
- ¹³⁰ Akervall JA, Michalides RJAM, Mineta H, et al. Amplification of cy-clin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* 1997; 79: 380-389
- ¹³¹ Nogueira CP, Dolan RW, Gooey J, et al. Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1998;108:345-350
- ¹³² Namazie, Ali MD; Alavi, Sassan MD; Olopade, Olufunmilayo I. MD; Pauletti, Giovanni PhD; Aghamohammadi, Neema DO; Aghamohammadi, M.; Gornbein, Jeffrey A. PhD; Calcaterra, Thomas C. MD; Slamon, Dennis J. MD, PhD; Wang, Marilene B. MD; Srivatsan, Eri S. PhD. Cyclin D1 Amplification and p16(MTS1/CDK4I) Deletion Correlate With Poor Prognosis in Head and Neck Tumors. *Laryngoscope*. Volume 112(3), March 2002, pp 472-481
- ¹³³ Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Over expression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1995; 55: 975-978.
- ¹³⁴ Reed AL; Califano J; Cairns P; Westra WH; Jones RM; Koch W; Ahrendt S; Eby Y; Sewell D; Nawroz H; Bartek J; Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996 Aug 15; 56(16):3630-3.
- ¹³⁵ Buchkovich K, Dufy L, et al. The Retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of cell cycle. *Cell* 1989; 58:1097-1105
- ¹³⁶ Volavsek M, Bracko M, Gale N. Distribution and prognosis significance of cell cycle proteins in squamous carcinoma of the larynx, hypopharynx and adjacent epithelial hyperplastic lesions. *J Laryngol Otol*. 2003; 117 (4): 286-93
- ¹³⁷ Ioachim E, Assimakopoulos D, Agnantis NJ, Peschos D, Zissi A, Skevas A. Altered patterns of retinoblastoma gene product expression in benign, premalignant and malignant epithelium of the larynx: an immunohistochemical study including correlation with p53, bcl-2 and proliferating indices. *Anticancer Res*. 1999 Jan-Feb; 19(1A):541-5.
- ¹³⁸ Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*. 2000 Nov 10;160(1):3-8.
- ¹³⁹ Dokiya F, Ueno K, Ma S, Eizuru Y, Furuta S, Ohyama M. Retinoblastoma protein expression and prognosis in laryngeal cancer. *Acta Otolaryngol*. 1998 Sep;118(5):759-62
- ¹⁴⁰ Scholnick SB, Sun PC, Shaw ME, Haughey BH, el-Mofty SK. Frequent loss of heterozygosity for Rb, TP53, and chromosome arm 3p, but not NME1 in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx. *Cancer*. 1994 May 15;73(10):2472-80.
- ¹⁴¹ Yokoyama J, Shiga K, Sasano H, Suzuki M, Takasaka T. Abnormalities and the implication of retinoblastoma locus and its protein product in head and neck cancers. *Anticancer Res*. 1996 Mar-Apr;16(2):641-4.
- ¹⁴² Cole MD. The myc oncogene, its role in transformation and differentiation. *Ann Rev Genet* 1986; 20:361-84
- ¹⁴³ Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS. Induction of apoptosis in fibroblast by c.myc protein. *Cell* 1992; 69: 119-28
- ¹⁴⁴ Gapany M, Pavelic ZP, Kelley DJ, et al. Immunohistochemical detection of c-myc protein in head and neck tumors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120: 255-50.

-
- ¹⁴⁵ Tomasz Krecicki, Marcin Fraczek, Michal Jelen , et al. Expression of c.myc Oncoprotein in laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 634-637.
- ¹⁴⁶ Shin DM; Kim J; Ro JY; Hittelman J; Roth JA; Hong WK; Hittelman WN. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994 Jan 15; 54(2):321-6.
- ¹⁴⁷ Liggett WH Jr; Sewell DA; Rocco J; Ahrendt SA; Koch W; Sidransky D. P16 and p16 beta are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 1996 Sep 15;56(18):4119-23
- ¹⁴⁸ Brennan JA; Boyle JO; Koch WM; Goodman SN; Hruban RH; Eby YJ; Couch MJ; Forastiere AA; Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995 Mar 16; 332(11):712-7.
- ¹⁴⁹ Chung KY; Mukhopadhyay T; Kim J; Casson A; Ro JY; Goepfert H; Hong WK; Roth JA. Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Res* 1993 Apr 1; 53(7):1676-83.
- ¹⁵⁰ Koch WM; Brennan JA; Zahurak M; Goodman SN; Westra WH; Schwab D; Yoo GH; Lee DJ; Forastiere AA; Sidransky D. P53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996 Nov 6; 88(21):1580-6.
- ¹⁵¹ Cell adhesion molecules and oral cancer. Thomas GJ, Speight PM. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001; 12(6):479-98. Review.
- ¹⁵² Lo Muzio L, Campisi G, Farina A, Rubini C, Pannone G, Serpico R, Laino G, De Lillo A, Carinci F. P-cadherin expression and survival rate in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer*. 2005 Jun 21; 5:63.
- ¹⁵³ Rodrigo Tapia JP, Domínguez Iglesias F, Alvarez Marcos C, González Meana MV, García Pedrero J, Suárez Nieto C. Epidermal growth factor receptor gene amplification and E-cadherin expression in head and neck carcinomas. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2004 Dec; 55(10):482-7. Spanish.
- ¹⁵⁴ Eriksen JG, Steiniche T, Søgaaard H, Overgaard J. Expression of integrins and E-cadherin in squamous cell carcinomas of the head and neck. *APMIS*. 2004 Sep; 112(9):560-8.
- ¹⁵⁵ Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin, CD44s, and CD44v6 in laryngeal and pharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol*. 2003 Nov-Dec; 24(6):384-9.
- ¹⁵⁶ Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, Sato S, Miyauchi M, Takata T. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 15;10(16):5455-63.
- ¹⁵⁷ Frixen UH; Behrens J; Sachs M; Eberle G; Voss B; Warda A; Lochner D; Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991 Apr; 113(1):173-85.
- ¹⁵⁸ Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):11-25. Review.
- ¹⁵⁹ Ricci E, Cavalot AL, Sanvito F, Bussi M, Albera R, Staffieri A, Cortesina G, Marchisio PC. Differential expression and topography of adhesion molecules in laryngeal and oropharyngeal carcinomas. *Acta Otolaryngol*. 2002 Mar;122(2):234-40

-
- ¹⁶⁰ Charalabopoulos K, Mittari E, Karakosta A, Golias C, Batistatou A. Integrins adhesion molecules and some of their ligands in laryngeal cancer. *Exp Oncol*. 2005 Jun; 27(2):86-90. Review.
- ¹⁶¹ Wenzel CT, Scher RL, Richtsmeier WJ. Adhesion of head and neck squamous cell carcinoma to endothelial cells. The missing links. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Nov; 121(11):1279-86.
- ¹⁶² Mäkitie A, Paavonen T, Renkonen R. Sialyl-Lewis(x/a)-decorated selectin ligands in head and neck tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1999 Oct; 125(10):569-76.
- ¹⁶³ Prior TG, Wood KJ, Werner JA. The relevance of adhesion molecules in the classification of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec; 25(6B):4141-7.
- ¹⁶⁴ Trask, DK, Wolf, GT, Bradford, CR, et al. Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation. *Laryngoscope* 2002; 112:638.
- ¹⁶⁵ CONG JY, GOLL DE, PETERSON AM, AND KAPPRELL HP. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J Biol Chem* 264: 10096–10103, 1989.
- ¹⁶⁶ OHNO S, MINOSHIMA S, KUDOH J, FUKUYAMA R, SHIMUZU Y, OHMI-IMAJOH S, SHIMIZU N, AND SUZUKI K. Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 33:225–229, 1990.
- ¹⁶⁷ CROALL DE AND DEMARTINO GN. Calcium-activated neutral protease (calpain) systems structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 71: 813–847, 1991.
- ¹⁶⁸ SUZUKI K. The structure of the calpains and the calpain gene. In: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*, edited by Mellgren RL and Murachi T. Boca Raton, FL: CRC, 1990, p. 25–35.
- ¹⁶⁹ HOSFIELD CM, ELCE JS, DAVIES PL, AND JIA Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J* 18: 6880–6889, 1999.
- ¹⁷⁰ STROBL S, FERNANDEZ-CATALAN C, BRAUN M, HUBER R, ASUMOTO H, NAKAGAWA K, IRIE A, SORIMACHI H, BOURENKOW G, BARTUNIK H, SUZUKI K, AND BODE W. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 588–592, 2000.
- ¹⁷¹ TOMPA P, EMORI Y, SORIMACHI H, SUZUKI K, AND FRIEDRICH P. Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1333–1339, 2001
- ¹⁷² Reverter D et al. Flexibility analysis and structure comparison of two crystal forms of calcium-free human m-calpain. *Biol Chem*. 2002 Sep; 383 (9): 1415-22
- ¹⁷³ REVERTER D, SORIMACHI H, AND BODE W. The structure of calciumfree human m-calpain. Implications for calcium activation and function. *Trends Cardiovasc Med* 11: 222–229, 2001.
- ¹⁷⁴ DARREL E. GOLL, VALERY F. THOMPSON, HONGQI LI, WEI WEI, AND JINYANG CONG. The Calpain System *Physiol Rev* 83: 731–801, 2003; 10.1152/physrev.00029.2002.
- ¹⁷⁵ SUZUKI K, TSUJI S, ISHIURA S, KIMURA Y, KUBOTA S, AND IMAHORI K. Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle. *J Biochem* 90: 1787–1793, 1981

-
- ¹⁷⁶ SUZUKI K, TSUJI S, KUBOTA S, KIMURA Y, AND IMAHORI K. Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J Biochem* 90: 275–278, 1982
- ¹⁷⁷ CONG JY, GOLL DE, PETERSON AM, AND KAPPRELL HP. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J Biol Chem* 264: 10096–10103, 1989
- ¹⁷⁸ DAYTON WR. Comparison of low- and high-calcium-requiring forms of the calcium-activated protease with their autocatalytic breakdown products. *Biochim Biophys Acta* 709: 166–172, 1982.
- ¹⁷⁹ EDMUNDS T, NAGAINIS PA, SATHE SK, THOMPSON VF, AND GOLL DE. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1077: 197–208, 1991
- ¹⁸⁰ SAIDO TC, MIZUNO K, AND SUZUKI K. Proteolysis of protein kinase C by calpain: effect of acidic phospholipids. *Biomed Biochim Acta* 50: 485–487, 1991.
- ¹⁸¹ SAIDO TC, SHIBATA M, TAKENAWA T, MUROFUSHI H, AND SUZUKI K. Positive regulation of μ -calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 267: 24585–24590, 1992.
- ¹⁸² CONG JY, GOLL DE, PETERSON AM, AND KAPPRELL HP. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J Biol Chem* 264: 10096–10103, 1989.
- ¹⁸³ GOLL DE, THOMPSON VF, TAYLOR RG, AND ZALEWSKA T. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays* 14: 549–556, 1992.
- ¹⁸⁴ MOLINARI M, ANAGLI J, AND CARAFOLI E. Ca²⁺-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J Biol Chem* 269: 27992–27995, 1994.
- ¹⁸⁵ CONG JY, THOMPSON VF, AND GOLL DE. Effect of monoclonal antibodies specific for the 28-kDa subunit on catalytic properties of the calpains. *J Biol Chem* 268: 25740–25747, 1993
- ¹⁸⁶ BAKI A, TOMPA P, MOLNÁR O, AND FRIEDRICH P. Autolysis parallels activation of μ -calpain. *Biochem J* 318: 897–901, 1995.
- ¹⁸⁷ COTTIN P, POUSSARD S, DESMAZES JP, GEORGESCAULD D, AND DUCASTAING A. Free calcium and calpain I activity. *Biochim Biophys Acta* 1079: 139–145, 1991.
- ¹⁸⁸ HAYASHI M, SAITO Y, AND KAWASHIMA S. Calpain activation is essential for membrane fusion of erythrocytes in the presence of exogenous Ca²⁺. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 939–946, 1992.
- ¹⁸⁹ KUBOKI M, ISHII H, AND KAZAMA M. Procalpain is activated on the plasma membrane and the calpain acts on the membrane. *Biochim Biophys Acta* 929: 164–172, 1987.
- ¹⁹⁰ DAYTON WR, GOLL DE, ZEECE MG, ROBSON RM, AND REVILLE WJ. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 15: 2150–2158, 1976
- ¹⁹¹ GEESINK GH, NONNEMAN D, AND KOOHMARAIE M. An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing. *Arch Biochem Biophys* 356: 19–24, 1998.
- ¹⁹² GOLL DE, THOMPSON VF, TAYLOR RG, EDMUNDS T, AND CONG J. Properties and biological regulation of the calpain system. In: *Expression of Tissue Proteinases and Regulation*

of *Protein Degradation*, edited by Ouali A, Demeyer DI, and Smulders F. Utrecht, The Netherlands: EC\CE/AMST, 1995, p. 47–68.

¹⁹³ MURACHI T. Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem Int* 18: 263–294, 1989.

¹⁹⁴ MELLGREN RL AND CARR TC. The protein inhibitor of calcium-dependent proteases: purification from bovine heart and possible mechanisms of regulation. *Arch Biochem Biophys* 225: 779–786, 1983.

¹⁹⁵ MELLGREN RL, MERICLE MJ, AND LANE RD. Proteolysis of the calcium-dependent protease inhibitor by myocardial calcium-dependent protease. *Arch Biochem Biophys* 246: 233–239, 1986.

¹⁹⁶ OTSUKA Y AND GOLL DE. Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-dependent proteinase. *J Biol Chem* 262: 5839–5851, 1987

¹⁹⁷ KONNO T, TANAKA N, KATAOKA M, TAKANO E, AND MAKI M. A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I. *Biochim Biophys Acta* 1342: 73–82, 1997.

¹⁹⁸ INAZAWA J, NAKAGAWA H, MISAWA S, ABE T, MINOSHIMA S, FUKUYAMA R, MAKI M, MURACHI T, HATANAKA M, AND SHIZIZU N. Assignment of the human calpastatin gene (CAST) to chromosome 5 at region q14–q22. *Cytogenet Cell Genet* 54: 156–158, 1990.

¹⁹⁹ CONG M, THOMPSON VF, GOLL DE, AND ANTIN P. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP dependent protein kinase activity. *J Biol Chem* 273: 660–666, 1998

²⁰⁰ IMAJOH S, KAWASAKI H, EMORI Y, AND SUZUKI K. Calcium-activated neutral protease inhibitor from rabbit erythrocytes lacks the N-terminal region of the liver inhibitor but retains three inhibitory units. *Biochem Biophys Res Commun* 146: 630–632, 1987.

²⁰¹ WANG LF, WEI SG, MIAO SY, LIU QY, AND KOIDE SS. Calpastatin gene in human testis. *Biochem Mol Biol Int* 33: 245–252, 1994.

²⁰² LEE WJ, HATANAKA M, AND MAKI M. Multiple forms of rat calpastatin cDNA in the coding region of functionally unknown amino terminal domain. *Biochim Biophys Acta* 1129: 251–253, 1992

²⁰³ LEE WJ, MA H, TAKANO E, YANG HQ, HATANAKA M, AND MAKI M. Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *J Biol Chem* 267: 8437–8442, 1992.

²⁰⁴ PARR T, SENSKY PL, BARDSLEY RG, AND BUTTERY PJ. Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure. *Arch Biochem Biophys* 395: 1–13, 2001.

²⁰⁵ TAKANO J, WATANABE M, HITOMI K, AND MAKI M. Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are identified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. *J Biochem* 128: 83–92, 2000.

²⁰⁶ MAKI M, HATANAKA M, TAKANO E, AND MURACHI T. Structure-function relationship of the calpastatins. In: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*, edited by Mellgren RL and Murachi T. Boca Raton, FL: CRC, 1990, p 37–51

-
- ²⁰⁷ TAKANO E, MAKI M, MORI H, HATANAKA M, MARTI T, TITANI K, KANNAGI R, OOI T, AND MURACHI T. Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 27: 1964–1972, 1988
- ²⁰⁸ EMORI Y, KAWASAKI H, IMAJOH S, MINAMI Y, AND SUZUKI K. All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. *J Biol Chem* 263: 2364–2370, 1988.
- ²⁰⁹ CRAWFORD C. Protein and peptide inhibitors of calpains. In: *Intra-cellular Calcium-Dependent Proteolysis*. Boca Raton, FL: CRC, 1990, p. 75–89.
- ²¹⁰ ASADA K, ISHINO Y, SHIMADO M, SHIMOJO T, ENDO M, KIMIZUKA F, KATO I, MAKI M, HATANAKA M, AND MURACHI T. cDNA cloning of human calpastatin: sequence homology among human, pig, and rabbit calpastatins. *J Enzyme Inhib* 3: 49–56, 1989.
- ²¹¹ TAKANO J, KAWAMURA T, MURASE M, HITOMI K, AND MAKI M. Structure of mouse calpastatin isoforms: implications of species-common and species-specific alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 339–345, 1999.
- ²¹² ISHIDA S, EMORI Y, AND SUZUKI K. Rat calpastatin has diverged primary sequence from other mammalian calpastatins but retains functionally important sequences. *Biochim Biophys Acta* 1088: 436–438, 1991
- ²¹³ EMORI Y, KAWASAKI H, IMAJOH S, IMAHORI K, AND SUZUKI K. Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3590–3594, 1987
- ²¹⁴ ISHIDA S, EMORI Y, AND SUZUKI K. Rat calpastatin has diverged primary sequence from other mammalian calpastatins but retains functionally important sequences. *Biochim Biophys Acta* 1088: 436–438, 1991
- ²¹⁵ CRAWFORD C. Protein and peptide inhibitors of calpains. In: *Intra-cellular Calcium-Dependent Proteolysis*. Boca Raton, FL: CRC, 1990, p. 75–89.
- ²¹⁶ LEE WJ, HATANAKA M, AND MAKI M. Multiple forms of rat calpastatin cDNA in the coding region of functionally unknown amino terminal domain. *Biochim Biophys Acta* 1129: 251–253, 1992.
- ²¹⁷ KUSAKAWA G-I, SAITO T, ONUKI R, ISHIGURO K, KISHIMOTO T, AND HISANAGA S-I. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase activator to p25. *J Biol Chem* 275: 17166–17172, 2000
- ²¹⁸ IMAJOH S, KAWASAKI H, KISARAGI M, MUKAI M, SUGITA H, AND SUZUKI K. A 107-kDa inhibitor for calcium-activated neutral protease (CANP): purification from the human liver. *Biomed Res* 5: 481–488, 1984
- ²¹⁹ COTTIN P, VIDALENC PL, AND DUCASTAING A. Ca²⁺-dependent association between a Ca²⁺-activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor. *FEBS Lett* 136: 221–224, 1981
- ²²⁰ IMAJOH S AND SUZUKI K. Reversible interaction between Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor. *FEBS Lett* 187: 47–50, 1985
- ²²¹ OTSUKA Y AND GOLL DE. Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-dependent proteinase. *J Biol Chem* 262: 5839–5851, 1987
- ²²² KAPPRELL H-P AND GOLL DE. Effect of Ca²⁺ on binding of the calpains to calpastatin. *J Biol Chem* 264: 17888–17896, 1989

-
- ²²³ DAYTON WR, GOLL DE, ZEECE MG, ROBSON RM, AND REVILLE WJ. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 15: 2150–2158, 1976
- ²²⁴ PINTÉR M AND FRIEDRICH P. The calcium dependent proteolytic system calpain-calpastatin in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J* 253: 467–473, 1988.
- ²²⁵ PINTÉR M, STIERANDOVA A, AND FRIEDRICH P. Purification and characterization of a Ca²⁺-activated thiol protease from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* 31: 8201–8206, 1992.
- ²²⁶ SIDDIQUI AA, ZHOU Y, PODESTA RB, KARCZ SB, TOGNON CE, STREJAN GH, DEKABAN GA, AND CLARKE MW. Characterization of Ca²⁺-dependent neutral protease (calpain) from human blood flukes, *Schistosoma mansoni*. *Biochim Biophys Acta* 1181: 37–44, 1993
- ²²⁷ BLATTNER FR, PLUNKETT G III, BLOCK CA, PERNA NT, BURLAND V, RILEY M, COLLADO-VIDES J, GLASNER JD, RODE CK, MAYHEW GF, GREGOR J, DAVIS NW, KIRKPATRICK HA, GOEDEN MA, ROSE DJ, MACE B, AND SHAO Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1474, 1997
- ²²⁸ CLAYTON RA, WHITE O, KETCHUM KA, AND VENTER JC. The first genome from the third domain of life. *Nature* 387: 459–462, 1997
- ²²⁹ ADAMS MD, et Cols. The genomic sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195, 2000.
- ²³⁰ INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921, 2001
- ²³¹ WILSON CA, KREYCHMAN J, AND GERSTEIN M. Assessing annotation transfer for genomics: quantifying the relations between protein sequence, structure and function through traditional and probabilistic scores. *J Mol Biol* 297: 233–249, 2000
- ²³² SORIMACHI H, IMAJOH-OHMI S, EMORI Y, KAWASAKI H, OHNO S, MINAMI Y, AND SUZUKI K. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ -types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 264: 20106–20111, 1989
- ²³³ DEAR TN, MATENA K, VINGRON M, AND BOEHM T. A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics* 45: 175–184, 1997.
- ²³⁴ DEAR TN AND BOEHM T. Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes Capn5, Capn6, and Capn 11 during development. *Mech Dev* 89: 201–209, 1999
- ²³⁵ DEAR TN, MÖLLER A, AND BOEHM T. CAPN11: a calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. *Genomics* 59: 243–247, 2000
- ²³⁶ DEAR TN AND BOEHM T. Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes. *Gene* 274: 245–252, 2001
- ²³⁷ MATENA K, BOEHM T, AND DEAR TN. Genomic organization of mouse CAPN5 and CAPN6 genes confirms that they are a distinct calpain family. *Genomics* 48: 117–120, 1998
- ²³⁸ FUTAI E, KUBO T, SORIMACHI H, SUZUKI K, AND MAEDA T. Molecular cloning of PalB, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. *Biochim Biophys Acta* 1517: 316–319, 2001.

-
- ²³⁹ LEE H-J, TOMIOKA S, KINBARA K, MASUMOTO H, JEONG S-Y, SORIMACHI H, ISHIURA S, AND SUZUKI K. Characterization of a human digestive tract-specific calpain, nCL-4, expressed in the baculovirus system. *Arch Biochem Biophys* 362: 22–31, 1999
- ²⁴⁰ HORIKAWA Y, ODA N, COX NJ, LI X, ORHO-MELANDER M, HARA M, HINORI Y, LINDER TH, MASHIMA H, SCHWARZ PEH, DEL BOSQUE-PLATA L, HORIKAWA Y, ODA Y, YOSHIUCHI I, COLILLA S, POLONSKY KS, WEI S, CONCANNON P, IWASAKI N, SCHULZE J, BAIER LJ, BOGARDUS C, GROOP L, BOERWINKLE E, HANIS CL, AND BELL GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet* 26: 163–175, 2000
- ²⁴¹ FRANTZ T, VINGRON M, BOEHM T, AND DEAR TN. Capn7: a highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain. *Mamm Genome* 10: 318–321, 1999.
- ²⁴² LEE H-J, TOMIOKA S, KINBARA K, MASUMOTO H, JEONG S-Y, SORIMACHI H, ISHIURA S, AND SUZUKI K. Characterization of a human digestive tract-specific calpain, nCL-4, expressed in the baculovirus system. *Arch Biochem Biophys* 362: 22–31, 1999
- ²⁴³ MA H, FUKIAGE C, AZUMA M, AND SHEARER TR. Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 454–461, 1998
- ²⁴⁴ NAKAMURA Y, FUKIAGE C, SHIH M, MA H, DAVID LL, AZUMA M, AND SHEARER TR. Contribution of calpain Lp82-induced proteolysis to experimental cataractogenesis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1460–1466, 2000
- ²⁴⁵ NAKAMURA Y, FUKIAGE C, MA H, SHIH M, AZUMA M, AND SHEARER TR. Decreased sensitivity of lens-specific calpain Lp82 to calpastatin inhibitor. *Exp Eye Res* 69: 155–162, 1999.
- ²⁴⁶ Shearer TR, Ma H, Shih M, Fukiage C, Azuma M. Calpains in the lens and cataractogenesis. *Methods Mol Biol* 2000;144:277- 85.
- ²⁴⁷ Tidball JG, Spencer MJ. Calpains and muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:1-5.
- ²⁴⁸ Nixon RA, Mohan P. Calpains in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In: Wang KKW, Yuen P-W, eds. *Calpain: pharmacology and toxicology of calcium-dependent protease*. Philadelphia: Taylor & Francis, 1999:267-91.
- ²⁴⁹ Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ. Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. *Cardiovasc Res* 2000;45:981-93.
- ²⁵⁰ Blomgren K, Zhu C, Wang X, et al. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* 2001;276:10191-8.
- ²⁵¹ Yoshikawa Y, Mukai H, Hino F, Asada K, Kato I. Isolation of two novel genes, downregulated in gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91:459-63.
- ²⁵² Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, et al. Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type2A. *J Biol Chem* 1998; 273:17073-8.
- ²⁵³ Shields DC, Schaecher KE, Saido TC, Banik NL. A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11486-91.

-
- ²⁵⁴ Mundo E, Soldati L, Bellodi L, Bianchi G. The calpain-calpastatin system in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 1997;42:228-9.
- ²⁵⁵ Mayana Zatz, Ph.D., and Alessandra Starling, Ph.D. Calpains and Disease. *N Engl J Med*. 2005 Jun 9; 352(23):2413-23. Review.
- ²⁵⁶ Baghdiguian S, Martin M, Richard I, et al. Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 1999;5:503-11.
- ²⁵⁷ SORIMACHI H, ISHIURA S, AND SUZUKI K. A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca²-binding domain. *J Biol Chem* 268: 19476–19482, 1993.
- ²⁵⁸ POUSSARD S, DUVERT M, BALCERZAK D, RAMASSAMY S, BRUSTIS JJ, COTTIN P, AND DUCASTAING A. Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity. *Cell Growth Differ* 7: 1416–1469, 1996.
- ²⁵⁹ KINBARA K, ISHIURA S, TOMIOKA S, SORIMACHI H, JEONG S-Y, AMANO S, KAWASAKI H, KOLMERER B, KIMURA S, LABELT S, AND SUZUKI K. Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem J* 335: 589–596, 1998
- ²⁶⁰ SORIMACHI H, TOYAMA-SORIMACHI N, SAIDO TC, KAWASAKI N, SUGITA H, MIYASAKA M, ARAHATA K, ISHIURA S, AND SUZUKI K. Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem* 268: 10593–10605, 1993.
- ²⁶¹ HERASSE M, ONO Y, FOUGEROUSSE F, KIMURA EI, STOCKHOLM D, BELEY C, MONTARRAS D, PINST C, SORIMACHI H, SUZUKI K, BECKMANN JS, AND RICHARD I. Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol Cell Biol* 19: 4047–4055, 1999.
- ²⁶² Figueiredo-Pereira ME, Efthimiopoulos S, Tezapsidis N, et al. Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively. *J Neurochem* 1999;72:1417-22.
- ²⁶³ Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 1; 90(7):2628-32.
- ²⁶⁴ Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclindependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* 2000;275:17166-72
- ²⁶⁵ Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81: 741-66.
- ²⁶⁶ Reed NA, Castellini MA, Ma H, Shearer TR, Duncan MK. Protein expression patterns for ubiquitous and tissue specific calpains in the developing mouse lens. *Exp Eye Res* 2003;76:433-43.
- ²⁶⁷ Ma H, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR. Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39: 454-61.
- ²⁶⁸ Biswas S, Harris F, Dennison S, Singh J, Phoenix DA. Calpains: targets of cataract prevention? *Trends Mol Med* 2004; 10:78-84.
- ²⁶⁹ MA H, FUKIAGE C, KIM YH, DUNCAN MK, REED NA, SHIH M, AZUMA M, AND SHEARER TR. Characterization and expression of calpain 10, a novel, ubiquitous calpain with nuclear localization. *J Biol Chem* 276: 28525–28531, 2001.

-
- ²⁷⁰ Permutt, Bernal-Mizrachi. Calpain 10 : the first positional cloning of a gene for type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2000 October 1; 106(7):819-821.
- ²⁷¹ Ma H, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR. Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39: 454-61.
- ²⁷² Steiner, D.F., Tager, H.S., Nanjo, K., Chan, S.J. & Rubenstein, A.H. Familial syndromes of hyperproinsulinemia and hyperinsulinemia with mild diabetes. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (eds Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.) 897–904 (McGraw-Hill, New York, 1995).
- ²⁷³ Taylor, S.I. Diabetes mellitus. in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (eds Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.) 843–896 (McGraw- Hill, New York, 1995).
- ²⁷⁴ Vionnet, N. *et al.* Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356, 721–722 (1992).
- ²⁷⁵ Maassen, J.A. & Kadowaki, T. Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype. *Diabetologia* 39, 375–382 (1996).
- ²⁷⁶ The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20, 1183–1197 (1997).
- ²⁷⁷ King, H., Aubert, R.E. & Herman, W.H. Global burden of diabetes, 1995–2025. *Diabetes Care* 21, 1414–1431 (1998).
- ²⁷⁸ Hanis, C.L. *et al.* A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature Genet.* 13, 161–166 (1996).
- ²⁷⁹ Mahtani, M.M. *et al.* Mapping of a gene for type 2 diabetes associated with an insulin secretion defect by a genome scan in Finnish families. *Nature Genet.* 14, 90–94 (1996).
- ²⁸⁰ YANG X, PRATLEY RE, BAIER LJ, HORIKAWA Y, BELL GI, BOGARDUS C, AND PERMANA PA. Reduced skeletal muscle calpain-10 transcript is due to a cumulative decrease in major isoforms. *Mol Genet Metab* 73: 111–113, 2001
- ²⁸¹ Cox, N.J. *et al.* Loci on chromosomes 2 (*NIDDM1*) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in Mexican Americans. *Nature Genet.* 21, 213–215 (1999).
- ²⁸² Horikawa, Y. *et al.* Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 gene (*TCF2*) associated with MODY. *Nature Genet.* 17, 384–385 (1997).
- ²⁸³ YANG X, PRATLEY RE, BAIER LJ, HORIKAWA Y, BELL GI, BOGARDUS C, AND PERMANA PA. Reduced skeletal muscle calpain-10 transcript is due to a cumulative decrease in major isoforms. *Mol Genet Metab* 73: 111–113, 2001
- ²⁸⁴ Baier, L.J. *et al.* A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, R69–R73 (2000).
- ²⁸⁵ Ortho-Melender M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstrale M, Lidgren CM, Groop L. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid level. *Diabetes* 2002;51:2658- 64. [Erratum, *Diabetes* 2003;52:1306.]
- ²⁸⁶ Homburg R. What is polycystic ovarian syndrome? A proposal for a consensus on the definition and diagnosis of polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 17:2495–2499. 2002

-
- ²⁸⁷ Colilla S, Cox NJ, Ehrmann DA. Heritability of insulin secretion and insulin action in women with polycystic ovary syndrome and their first degree relatives. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2027–2031. 2001
- ²⁸⁸ McKeigue P, Wild S. Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 349:1771–1772. 1997
- ²⁸⁹ Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N, McCarthy MI, Hague S, Batty S, Conway GS, White D, Todd JA, Franks S, Williamson R. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 349:986–990. 1997
- ²⁹⁰ ALEJANDRO GONZALEZ, EDUARDO ABRIL, ALFREDO ROCA, MARIA JOSE´ ARAGO´ N, MARIA JOSE´ FIGUEROA, PILAR VELARDE, ROCÍO RUIZ, OMAR FAYEZ, JOSE´ JORGE GALA´ N, JOSE´ ANTONIO HERREROS, LUIS MIGUEL REAL, AND AGUSTÍN RUIZ. Specific *CAPN10* Gene Haplotypes Influence the Clinical Profile of Polycystic Ovary Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* . 88(11):5529–5536. 2003.
- ²⁹¹ Escobar-Morreale HF, Peral B, Villuendas G, Calvo RM, Sancho J, San Millan JL 2002 Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism. *Fertil Steril* 77:581–587
- ²⁹² Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Royo JL, Real LM, Ruiz A. *CAPN10* alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*;87:3971–3976. 2002.
- ²⁹³ Organización Mundial de gastroenterología. Guías Prácticas de la alianza Internacional para el Cáncer Digestivo: Tamizaje del cancer colorrectal; 2007 (citado el 19 de febrero de 2009). [Hppt:// wordgastroenterology.org](http://wordgastroenterology.org).
- ²⁹⁴ Hu FB, Manson JE, Liu S *et al*. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91: 542–7.
- ²⁹⁵ Daimon M, Oizumi T, Saitoh T *et al*. Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2002; 56: 147–52.
- ²⁹⁶ Carmen P Frances, Manuel C Conde, Maria E Saez, et al. Identification of a protective haplogenotype within *CAPN10* gene influencing colorectal cancer susceptibility. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22 (2007) 2298–2302 © 2007
- ²⁹⁷ Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Feb 2;92(3):205-16.
- ²⁹⁸ Selvin PR. Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol.* 1995;246:300-34.
- ²⁹⁹ Gomes I, Collins A, Lonjou C, et al. Hardy-Weinberg quality control. *Ann Hum Genet.* 1999 Nov;63(Pt 6):535-8.
- ³⁰⁰ Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 1997;53:1253–61.
- ³⁰¹ Lewontin RC, Caspari EW. Developmental Selection of Mutations. *Science.* 1960 Dec 2;132(3440):1688-1692.

-
- ³⁰² Sun G-W, Shook TL, Kay GL. Inappropriate use of bivariable analysis to screen risk factors for use in multivariate analysis. *J Clin Epidemiol* 1996; 49:907-16.
- ³⁰³ Mickey RM, Greenland S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am J Epidemiol* 1989; 129:125-37.
- ³⁰⁴ Maldonado G, Greenland S. Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol* 1993; 138:923-36.
- ³⁰⁵ Evans JC, Frayling TM, Cassell PG, et al. Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am J Hum Genet* 2001; 69:544–52.
- ³⁰⁶ Akey JM, Zhang G, Zhang K, Jin L, Shriver MD. Interrogating a highdensity SNP map for signatures of natural selection. *Genome Res* 2002;12:1805–14.
- ³⁰⁷ Jozkow P, Medras M, Krecicki T, Zaleska-Krecicka M. Hormonal markers of aging in men with laryngeal carcinoma. *Head Neck* 2005;27:243–7.
- ³⁰⁸ Fullerton SM, Bartoszewicz A, Ybazeta G, et al. Geographic and haplotype structure of candidate type 2 diabetes susceptibility variants at the calpain-10 locus. *Am J Hum Genet* 2002;70:1096–106.
- ³⁰⁹ Cascorbi I, Henning S, Brockmoller J, et al. Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant-463A of the myeloperoxidase gene. *Cancer Res* 2000;60:644–9.
- ³¹⁰ Elahi A, Zheng Z, Park J, Eyring K, McCaffrey T, Lazarus P. The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;23:1229–34.
- ³¹¹ Zheng Z, Park JY, Guillemette C, Schantz SP, Lazarus P. Tobacco carcinogen- detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1411–8.
- ³¹² Bardakci F, Canbay E, Degerli N, Coban L, Canbay EI. Relationship of tobacco smoking with GSTM1 gene polymorphism in laryngeal cancer. *J Cell Mol Med* 2003;7:307–12.
- ³¹³ Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Liu DD, et al. Cyclin D1 genotype, response to biochemoprevention, and progression rate to upper aerodigestive tract cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:198–205.
- ³¹⁴ Wight R, Paleri V, Arullendran P. Current theories for the development of nonsmoking and nondrinking laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Apr;11(2):73-7. Review.
- ³¹⁵ Carragher NO, Fonseca BD, Frame MC. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions. *Neoplasia*. 2004 Jan-Feb;6(1):53-73
- ³¹⁶ Carragher NO. Assaying calpain activity. *Methods Mol Biol.* 2007; 370:109-20.
- ³¹⁷ Balkau B, Kahn HS, Courbon D, Eschwege E, Ducimetiere P. Paris Prospective Study. Hyperinsulinemia predicts fatal liver cancer but is inversely associated with fatal cancer at some other sites: the Paris Prospective Study. *Diabetes Care* 2001;24:843–9.
- ³¹⁸ Cascorbi I, Henning S, Brockmoller J, et al. Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant-463A of the myeloperoxidase gene. *Cancer Res* 2000;60:644–9.

³¹⁹ Elahi A, Zheng Z, Park J, Eyring K, McCaffrey T, Lazarus P. The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;23:1229–34.

³²⁰ Bardakci F, Canbay E, Degerli N, Coban L, Canbay EI. Relationship of tobacco smoking with GSTM1 gene polymorphism in laryngeal cancer. *J Cell Mol Med* 2003;7:307–12.

³²¹ Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Liu DD, et al. Cyclin D1 genotype, response to biochemoprevention, and progression rate to upper aerodigestive tract cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:198–205.

³²² Esteban F, Royo JL, González-Moles MA, Gonzalez-Perez A, Redondo M, Moreno-Luna R, Rodríguez-Sola M, Gonzalez A, Real LM, Ruiz A, Ramírez-Lorca R. CAPN10 alleles modify laryngeal cancer risk in the Spanish population. *Eur J Surg Oncol*. 2008 Jan;34(1):94-9.

³²³ Moreno-Luna R PhD, Abrante A PhD, Esteban F PhD, González-Moles MA PhD, Delgado-Rodríguez M PhD, Saez ME PhD, Gonzalez-Perez A MSc, Ramírez-Lorca R PhD, Real LM PhD, Ruiz A MD PhD. CAPN10 GENE AND LARYNGEAL CANCER: A SURVIVAL ANALYSIS. *Head and Neck* 2010, en prensa.

