

Microarrays de DNA en el cáncer oral

Eva Otero Rey ⁽¹⁾, Abel García García ⁽²⁾, Francisco Barros Angueira ⁽³⁾, María Torres Español ⁽³⁾, José Manuel Gándara Rey ⁽⁴⁾, Manuel Somoza Martín ⁽⁵⁾

(1) Odontóloga. Alumna del Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela

(2) Jefe de Sección, Departamento de Cirugía Maxilofacial, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago. Profesor Titular de Cirugía Oral y Maxilofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela

(3) Investigador. Unidad de Medicina Molecular – INGO. Universidad de Santiago de Compostela

(4) Catedrático de Medicina Oral y Maxilofacial. Universidad de Santiago de Compostela

(5) Odontólogo. Profesor Colaborador del Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. España

Correspondencia:

Dr. Abel García García

Facultad de Odontología

Calle Entrecerros s/n, 15705- Santiago de Compostela, España

Teléfono: 981563100 – Ext. 12357

Fax: 981562226

E-mail: ciabelgg@usc.es

Recibido: 15-09-2003 Aceptado: 31-01-2004

Indexed:

-Index Medicus / MEDLINE
-EMBASE, Excerpta Medica
-Indice Médico Español
-IBECs

Otero-Rey E , García-García A , Barros-Angueira F , Torres-Español M , Gándara-Rey JM , Somoza-Martín M. Microarrays de DNA en el cáncer oral. *Med Oral* 2004;9:288-92.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1137 - 2834

RESUMEN

Uno de los principales objetivos en la investigación sobre el cáncer en la actualidad es el estudio de marcadores que puedan predecir el pronóstico o la respuesta al tratamiento de forma individual. El número de genes implicados en los distintos pasos de la carcinogénesis oral aumenta a medida que se investiga sobre el tema. Los microarrays de DNA permiten el análisis simultáneo de la expresión de cientos de genes de un tejido en un solo experimento. El formato paralelo del ensayo permite el estudio de diferencias en la expresión genética entre células normales y enfermas, puesto que la actividad de cada gen en el microarray puede ser comparada en dos poblaciones celulares distintas. El objetivo de este trabajo es hacer una breve revisión de los estudios realizados por diversos autores que han intentado identificar genes relacionados con el cáncer oral, así como clasificarlo en subgrupos según los patrones de expresión genética; lo que permitirá una precoz detección, mejor diagnóstico y pronóstico del cáncer oral.

Palabras clave: *Microarrays de DNA, cáncer oral, expresión genética*

INTRODUCCION

El carcinoma epidermoide es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral, constituyendo un problema considerable de salud pública. Es la sexta neoplasia maligna diagnosticada con mayor frecuencia en el mundo, aumentando su incidencia desde el año 1970 (1). A pesar de los considerables avances en las

técnicas quirúrgicas junto con otras modalidades de tratamiento adyuvante añadidas, no ha mejorado el pronóstico global de los pacientes que sufren esta enfermedad en las últimas dos décadas (2). Se espera que un mejor conocimiento de los determinantes moleculares de la carcinogénesis oral mejore el diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad (3).

Su etiología es multifactorial, siendo los factores de riesgo más prevalentes el consumo de tabaco y alcohol. Ambos factores actúan sinérgicamente, aunque cada uno de ellos posee potenciales carcinogénicos independientes (4). La asociación de tabaco y alcohol está íntimamente relacionada no sólo con el desarrollo del cáncer oral, sino también con el curso de la enfermedad, estando ligada a un pobre pronóstico (5).

La aparición de tumores de la cavidad oral en pacientes jóvenes y en pacientes no fumadores sugiere el papel de la predisposición genética. En estos casos se han detectado mutaciones en genes supresores de tumores como p53.

Actualmente se acepta que la mayoría de los tumores sólidos resultan de un proceso de múltiples pasos de acumulación de alteraciones genéticas que implican la activación de varios oncogenes y la pérdida de dos o más genes supresores de cáncer (6,7). El número de genes implicados en los distintos pasos de la transformación neoplásica aumenta a medida que se investiga sobre el tema. Recientes estudios sobre la transformación experimental de células humanas indican que la alteración de un limitado número de vías reguladoras celulares es suficiente para que una amplia variedad de células normales adquieran un fenotipo tumoral (8).

Los resultados de la secuencia del genoma humano completa recientemente predicen que el número de genes es mucho menor de lo que se pensaba (aproximadamente 33.000 genes) (9). Esto implica que la gran complejidad de los mecanismos biológicos en los seres humanos reside en los efectos sinérgicos entre varios genes. Por tanto, para descifrar los secretos de la vida y encontrar la curación a muchas enfermedades humanas, los biólogos deben tratar con múltiples genes y su transcripción interactiva simultáneamente (10). Las biotecnologías de alto impacto, incluyendo los alcances de los arrays de DNA, jugarán un papel muy importante en estos estudios (11).

Los microarrays son pequeñas placas de cristal o membranas de nylon a las que se adhieren secuencias específicas de cientos de genes. Se utilizan dos tipos diferentes de secuencias de DNA diana: secuencias de DNA complementario (cDNA), preparadas mediante transcripción inversa de la secuencia de RNA mensajeros (mRNA) de los genes diana, o secuencias de oligonucleótidos que representan segmentos pequeños pero altamente específicos de los genes diana. Como muestras se utilizan cDNA o RNA complementario (cRNA) preparado a partir de RNA derivado del tejido tumoral y del control tisular apropiado. La hibridación simultánea de muestras del tumor y del control que se asocian a moléculas fluorescentes de color diferente da lugar a una coloración particular de cada "spot" representativo de un gen. Para cada gen la intensidad relativa de cada uno de los dos colores representa el nivel de expresión de los RNA procedentes del tumor y del control (12). (Fig 1). La tecnología microarray proporciona una expresión diferencial simultánea para más de mil genes, pudiendo rastrear decenas de miles de reacciones a la vez en un solo experimento (13). Esto contrasta con los métodos basados en la secuenciación, que requieren una colección seriada de datos para el análisis de la expresión (14). Entre las múltiples aplicaciones de los microarrays destacamos el diagnóstico precoz de la transformación de lesiones premalignas, la identificación de malignidad en una muestra de tejido tomada mediante biopsia, la subclasificación de tumores idénticos histológicamente, la identificación de biomarcadores y el descubrimiento de nuevos fármacos (3).

Existen diversas formas de utilizar los datos procedentes de los microarrays de DNA. En primer lugar, se pueden estudiar los genes individuales que pueden estar relacionados con el pronóstico o que pueden ser útiles como dianas terapéuticas. En segundo lugar, se puede estudiar la batería completa de genes expresados para clasificar tumores, esto es, se puede utilizar el microarray para estudiar el perfil de expresión genética. Estos perfiles de expresión genética pueden ser utilizados para clasificar tumores histológicamente similares en subtipos específicos (15). Alizadeh et al. (16) mostraron que dentro de los linfomas de células gigantes tipo B morfológicamente homogéneos, existen dos subtipos que pueden ser definidos por distintos patrones de expresión genética. Perou et al. (17) proponen que los tumores de mama podrían ser clasificados en distintos subtipos según los perfiles de expresión genética.

Además, el pensamiento actual se basa en que el comportamiento del tumor es dictado por la expresión de miles de genes, y que el análisis con microarrays permitiría que el comporta-

miento y las consecuencias clínicas fueran predecibles (18). Van de Vijver et al. (19) han seleccionado 70 genes mediante microarrays determinando un perfil pronóstico en un grupo de mujeres con cáncer de mama, demostrando que constituye un factor predictivo del pronóstico de la enfermedad más potente que los sistemas estándar basados en criterios clínicos e histológicos. De forma similar, van't Veer et al. (20) descubrieron que el perfil genético predijo eficazmente el pronóstico en las mujeres con cáncer de mama.

Puesto que el microarray proporciona una foto instantánea de la actividad genética para miles de genes, se pueden comparar los datos de muchos experimentos y así, agrupar genes que tengan patrones de actividad consecuentes. De esta forma, los genes que caracterizan un estado celular particular, como la malignidad, pueden ser identificados proporcionando así nueva información sobre la biología del estado celular (18).

ANALISIS DE LA EXPRESION GENETICA DEL CANCER ORAL MEDIANTE MICRO-ARRAYS DE DNA

Se ha intentado caracterizar y predecir la conducta tumoral de los carcinomas epidermoides de la cavidad oral poniendo gran énfasis en el estudio de pérdida de heterocigosidad o inestabilidad de microsatélites en una serie de *loci* genéticos que se cree están asociados con genes supresores de tumores. Así, existen modelos preliminares de progresión molecular de la carcinogénesis oral: alteraciones estructurales cromosómicas se han asociado con displasia, carcinoma in situ y carcinoma invasivo (21). A pesar de ello, los mecanismos moleculares más precisos siguen aún sin clarificarse (22).

Diversos autores han intentado identificar genes relacionados con el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello mediante la tecnología microarray de DNA. (23-25). Villaret et al. (23) han encontrado 13 genes independientes que aparecen sobre-expresados en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello en comparación con tejido normal. De ellos, 9 se conocían previamente y 4 no habían sido previamente identificados. Estos genes se desarrollarán como marcadores tumorales y candidatos de vacuna. Leethanakul (24), comparando el patrón de expresión de los genes relacionados con el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello y los correspondientes genes en el tejido normal de los mismos pacientes, ha encontrado 59 genes con una expresión diferencial en cáncer en relación con el tejido normal. Al Moustafa et al. (25) han encontrado cambios significativos en la expresión de 213 genes, con 91 genes sobre-regulados y 122 infra-regulados. Esta lista de genes incluye genes asociados con señales de transducción (factores de crecimiento), estructura celular, ciclo celular, transcripción, apoptosis y adhesión célula-célula.

Belbin et al. (26) han sugerido que los patrones globales de expresión genética pueden ser utilizados para clasificar en subgrupos los pacientes con cáncer. Utilizando un microarray de cDNA en el que se identifican 375 genes, dividen a los pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello en dos subgrupos clínicamente distintos basados en los patrones de expresión genética. Los resultados demuestran que el perfil de

ENGLISH

DNA microarrays in oral cancer

OTERO-REY E , GARCÍA-GARCÍA A , BARROS-ANGUEIRA F , TORRES-ESPAÑOL M , GÁNDARA-REY JM , SOMOZA-MARTÍN M. DNA MICROARRAYS IN ORAL CANCER. *MED ORAL* 2004;9:288-92.

SUMMARY

One of the principal aims of modern cancer research is to identify markers allowing individual prediction of prognosis or response to treatment. In this connection, the number of genes thought to be involved in the different stages of different types of oral cancer increases apace. DNA microarrays allow simultaneous evaluation of the expression of hundreds of genes in a single assay. The parallel format of microassay slides is designed to allow rapid comparison of gene expression between two samples, for example tumor cells and healthy cells. This article reviews studies that have aimed to identify genes related to oral cancer, and to classify these genes into groups that are commonly co-expressed. These studies suggest that DNA microarrays are set to become routine tools in the detection, diagnosis, characterization and treatment of oral cancers.

Key words: *DNA microarrays, oral cancer, gene expression.*

INTRODUCTION

Oral squamous cell carcinoma is the most frequent malignant neoplasm of the oral cavity, constituting a significant public health problem. It is the sixth most frequent malign neoplasm worldwide, and has shown a marked increase in incidence since 1970 (1). But despite the considerable advances in surgical technique and other treatment technologies over the last two decades, the prognosis for oral cancer patients has scarcely changed (2). It is widely hoped that improved understanding of the molecular basis of oral carcinogenesis will lead to improvements in diagnosis, treatment and control (3).

The etiology of oral cancer is multifactorial, with the most important risk factors being smoking and alcohol consumption. These two factors often act synergistically (4). Smoking and alcohol consumption not only increase the risk of tumorigenesis, but also worsen prognosis if these habits are maintained after tumorigenesis (5).

Oral cancer may also arise in young subjects and in non-smokers, suggesting possible genetic predisposition. In such cases mutations have been detected in tumour-suppressor genes such as p53.

It is currently accepted that most solid tumours result from multiple mutational steps, leading to the activation of various oncogenes and the loss of two or more tumour-suppressor genes (6,7). The number of genes suspected to be involved in the different transformational steps increases apace as research proceeds. Recent studies on the experimental transformation of human cells indicates that alteration of a limited number of regulatory pathways is sufficient to induce tumour phenotype in diverse cell types (8).

expresión genética puede ser usado como un factor predictivo del pronóstico de la enfermedad.

Hasta la fecha, se han publicado pocos estudios relevantes acerca de microarrays y su aplicación en el cáncer oral (27). Kuo et al. (28) hablan de la posibilidad de clasificar el carcinoma epidermoide de la cavidad oral según los patrones de expresión genética. Utilizando un microarray que analiza 4.324 genes han conseguido una lista de 210 genes posibles candidatos a estar relacionados con el cáncer oral. Los resultados han identificado diversos genes con una expresión alterada que no han sido previamente relacionados con el carcinoma epidermoide de la cavidad oral, pero sí se han relacionado a otros tipos de cáncer, tales como: *CKS1*, *TSPY*, *CBK*, *TLE4* y *BCHE*. También han elaborado una lista de genes cuya expresión se correlacionaba con factores clásicos de pronóstico como *p53*, *MST1*, *HLA-DQB1* y *UBA52*.

Méndez et al. (29) han encontrado 314 genes con expresión diferencial en el carcinoma epidermoide de la cavidad oral. De ellos, 239 estaban sobre-expresados y 75 eran infra-regulados en el carcinoma. Los carcinomas epidermoides de la cavidad oral son distinguibles del tejido oral normal basándose en los patrones de expresión transcripcional del genoma, sin embargo, no han encontrado diferencias de expresión genética entre estadios incipientes y estadios avanzados o entre tumores con metástasis y sin metástasis en carcinomas epidermoides de la cavidad oral.

Alevizos et al. (30) examinaron cinco casos de cáncer oral y los analizaron utilizando tres herramientas bioinformáticas distintas (software GeneChip, algoritmo GeneCluster y análisis Matlab). Colectivamente, las herramientas bioinformáticas revelaron que aproximadamente 600 genes están asociados con el cáncer oral. Estos genes incluyen oncogenes, genes supresores tumorales, factores de transcripción, enzimas xenobióticas, proteínas metastásicas, marcadores diferenciales y genes que no se habían implicado previamente con el cáncer oral. Los datos encontrados proporcionan un perfil global verificable de la expresión genética en la carcinogénesis oral, revelando el papel potencial de genes conocidos así como genes que no se habían implicado previamente.

A pesar de que actualmente la relación entre el perfil de expresión genética y el comportamiento celular humano es motivo de especulación, consideramos que la "huella dactilar molecular" es una promesa clínica de gran relevancia para el diagnóstico y terapéutica del cáncer oral.

En el futuro, seremos capaces de usar la información genética para obtener una única huella dactilar de cada tumor (31). Esto permitirá una precoz detección, mejor diagnóstico y pronóstico del cáncer, así como tratamientos individualizados en cada caso y desarrollo de novedosas intervenciones.

The recently completed sequencing of the human genome suggests that the total number of genes is much lower than was previously thought (about 33,000) (9). This implies that the great complexity of biological processes is attributable to synergistic interactions among genes. Accordingly, research aimed at improving treatment of genetically-influenced human diseases is often likely to require consideration of multiple genes expressed simultaneously (10). Research strategies of this type, involving parallel consideration of large numbers of genes, are greatly facilitated by DNA microarrays (11).

DNA microarrays are small rectangles of glass or nylon membrane to which hundreds or thousands of DNA targets are adhered in a regular grid pattern. These targets may be complementary DNA (cDNA) prepared by reverse transcription from mRNAs, or synthetic oligonucleotides representing highly diagnostic stretches of the target sequences. The sample is generally RNA reverse-transcribed to give cDNA; in the present context the researcher will typically test samples from both the tumour and an appropriate non-tumorous control tissue. The cDNA from the tumour is labeled with a fluorescent tag (e.g. red), and that from the control tissue with another fluorescent tag (e.g. green). The two samples are then mixed and incubated with the microarray. Hybridized cDNA is quantified on the basis of fluorescence, and the expression of each gene in the tumour is estimated on the basis of the relative intensities of red and green labelling (12). (Fig. 1)

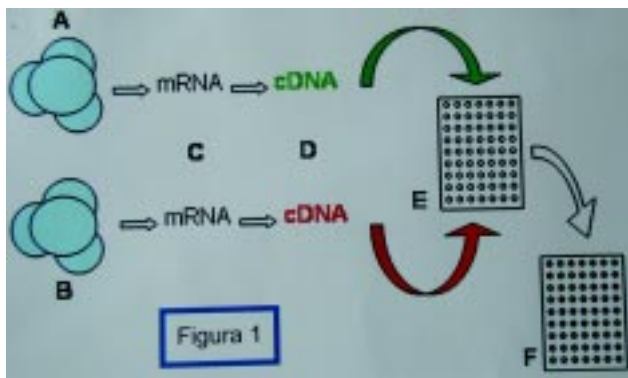


Fig. 1. Pasos para el análisis de la expresión genética diferencial mediante microarrays de DNA: Tejido normal (A), tejido tumoral (B). Se procede a la extracción del mRNA (C) y éste se transcribe a cDNA (D). Las moléculas de cDNA se marcan con un fluorocromo, se vierten sobre el microarray (E) y se produce la hibridación (F). El microarray es leído por un escáner y los datos se convierten en una impresión con un código de colores que permite cuantificar la expresión de cada gen.

Steps in the comparison of gene expression between a carcinoma-tissue sample (A) and a corresponding normal-tissue sample (B). mRNA is extracted (C) and reverse-transcribed by a labeling procedure to give cDNA (D) with one tag for the tumour sample and a different tag for the normal-tissue sample. [Note that between steps C and D there may be an additional mRNA/cDNA/EmRNA step for amplification.] The cDNAs are mixed and incubated with the microarray (E), allowing hybridization (F). The microarray is then read with an appropriate reader, and relative labeling intensities are compared for each gene, allowing identification of genes that are under- or over-expressed in the tumour with respect to normal tissue.

Microarrays thus facilitate simultaneous analysis of the expression of hundreds or thousands of genes in a tissue sample (13), by contrast with sequencing-based techniques which require individual analyses for each gene (14). Microarrays have diverse applications in cancer research and cancer medicine, including early diagnosis of the transformation of premalign lesions, identification of malignancy in tissue

biopsies, subclassification of histologically identified tumours, identification of biomarkers, and drug discovery (3).

When interpreting data obtained by DNA microarray approaches, we may focus on individual genes useful for assessing prognosis or as therapeutic targets. Alternatively, microarray data allow identification of multigene “expression profiles” for a given tumour. These expression profiles may be used to classify histologically similar tumours into subtypes (15). Alizadeh et al. (16) have demonstrated that within type-B giant-cell lymphomas, there are two subtypes that can be defined on the basis of different gene expression patterns. Perou et al. (17) proposes that breast tumours can be classified into two subtypes on the basis of gene expression profiles.

In addition, our current understanding of cancer is based on the view that tumour behaviour is dictated by the expression of thousands of genes, and thus microarray approaches should allow better prediction of tumour behaviour and clinical consequences (18).

Van de Vijver et al. (19) used microarray techniques to select 70 genes as a prognostic profile in women with breast cancer, showing that the profile was a more effective predictor of prognosis than conventional clinical or histological criteria. Similarly, van't Veer et al. (20) found that microarray profiles were effective predictors of prognosis in breast cancer patients. Since microarrays offer a “snapshot” of the activity of thousands of genes, it is easy to compare data from different times or different samples, and thus draw conclusions about co-expression patterns. This leads us to hope that microarray approaches will enable us to identify the genes characterizing the particular cellular state of malignancy (18).

DNA MICROARRAYS AND GENE EXPRESSION ANALYSIS

Efforts to characterize and predict the behaviour of oral squamous cell carcinomas have placed great emphasis on the study of heterozygosity loss and microsatellite instability. Structural alterations of the chromosome have been associated with dysplasia, *in situ* carcinoma and invasive carcinoma (21). However, the precise molecular mechanisms of these processes remain unknown (22).

Various authors have used DNA microarray approaches to try to identify genes related to squamous cell carcinoma of the head and neck (23-25). Villaret et al. (23) found 13 independent genes that were over-expressed in these carcinomas with respect to normal tissues. Of these genes, 9 had been identified previously, while 4 were unknown. These genes will be investigated as tumour markers and as potential sources of vaccines. Leethanakul (24) compared gene expression profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck and in equivalent normal tissues from the same patients, finding 59 genes with differential expression. Al Moustafa et al. (25) found significant changes in the expression of 213 genes, with 91 genes over-expressed and 122 under-expressed. The affected genes included genes for signal transduction proteins and growth factors, for proteins involved in cell-cycle control, transcription, and apoptosis, and for structural proteins and proteins involved in cell-cell adhesion.

Belbin et al. (26) have suggested that gene expression profiles may be used to classify cancer patients into subgroups. On the basis of data obtained with a 375-gene cDNA microarray, these authors divided patients with squamous cell carcinoma of the head and neck into two groups with well-differentiated clinical characteristics. This grouping was a useful predictor of tumour behaviour and prognosis.

To date, however, few studies have been published about microarrays and their application in oral cancer (27). Kuo et al. (28) suggest the possibility of classifying oral squamous cell carcinomas on the basis of gene expression patterns. Using a microarray of over 4000 genes, they identified 210 genes as possibly related to oral cancer. Many of these genes (e.g. CKS1, TSPY, CBK, TLE4 and BCHE) have previously been related to other types of cancer, but not to oral cancer. These authors also present a list of genes whose expression was correlated with other classic prognostic factors, such as p53, MST1, HLA-DBQ1 and UBA52.

Mendez et al. (29) identified 314 genes that were differentially expressed in oral squamous cell carcinomas. Of these, 239 were over-expressed and 75 under-expressed with respect to normal tissues. Expression profiles for carcinomas were readily distinguishable from those for normal tissues; however, no differences were detected between incipient stages and advanced stages, or between non-metastatic and metastatic tumours.

Alevizos et al. (30) examined DNA microarray data for 5 cases of oral cancer using three different software packages (GeneChip, GeneCluster and Matlab). Their analysis revealed that approximately 600 genes are associated with oral cancer, including oncogenes, tumour suppressor genes, transcription factors, xenobiotic enzymes, metastatic proteins, and differential markers. A number of the genes identified have not been implicated previously in oral cancer. These results provide a verifiable profile of gene expression in oral carcinogenesis.

At present, the vastly complex relationships between gene expression profiles and cell behaviour remain poorly understood. Despite this, it seems likely that it will soon become routine practice to use purpose-designed commercial DNA microarrays to obtain "gene expression fingerprints" for individual tumours, with the aim of improving prognosis, and of designing individualized treatment strategies. As noted, DNA microarray strategies are also likely to prove very useful for drug development (31). In short, DNA microarray technologies seem set to have major impacts on the management of oral cancer.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- Parkin DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 1988;41:184-97.
- Centers for Disease Control. *Cancers of the oral cavity and pharynx. A statistics review monograph 1973-1987*. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services; 1991. p. 50-4.
- Todd R, Wong DT. DNA hybridization arrays for gene expression analysis of human oral cancer. *J Dent Res* 2002;81:89-97.
- Sciuba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2001;2:239-51.
- Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994;30B:323-8.

- Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139-46.
- Scully C. Oncogenes, tumor suppressors genes and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993;22:337-47.
- Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002;347:1593-603.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-51.
- Lee JK. Analysis issues for gene expression array data. *Clinical Chem* 2001; 47:1350-2.
- Bittner M, Meltzer P, Trent J. Data analysis and integration: of steps and arrows. *Nat Genet* 1999;22:213-5.
- Sauter G, Simon R. Predictive molecular pathology. *N Engl J Med* 2002; 347:1995-6.
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10614-9.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270:484-7.
- Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. *J Pathol* 2001;195:41-52.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
- Berns A. Gene expression in diagnosis. *Nature* 2000;403:491-2.
- van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-92.
- Califano A, Stolovitzky G, Tu Y. Analysis of gene expression microarrays for phenotype classification. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2000;8:75-85.
- Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, et al. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* 2000;110:374-81.
- Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, Pallente M, Ensley JF, Koontongkaew S, et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene* 2000;19:3220-4.
- Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, et al. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21:2634-40.
- Belbin TJ, Singh B, Barber I, Socci N, Wenig B, Smith R, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Cancer Res* 2002;62:1184-90.
- Kuo WP, Whipple ME, Sonis ST, Ohno-Machado L, Jenssen TK. Gene expression profiling by DNA microarrays and its application to dental research. *Oral Oncol* 2002;38:650-6.
- Kuo WP, Hasuba R, Lingen MW. Classification of oral squamous cell carcinomas based on gene expression patterns. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 2002;93:415
- Mendez E, Cheng C, Farwell DG, Ricks S, Agoff SN, Futran ND, et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002;95:1482-94.
- Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohyama H, Kohno Y, Posner M, et al. Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 2001;20:6196-204.
- Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 2001;1:151-7.

Proyecto financiado por la Xunta de Galicia, España, PGIDT01PX120804PR.
Supported by a grant from the Xunta de Galicia, Spain, PGIDT01PX120804PR