



ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis de la inestabilidad de microsatélites en el carcinoma escamoso de laringe

Jorge García Martínez*, Jhudit Pérez-Escuredo, Dario García-Carracedo, Marta Alonso-Guervós, Carlos Suárez-Nieto, José Luis Llorente-Pendás, César Álvarez-Marcos y Mario Hermsen

Departamento de Otorrinolaringología, IUOPA, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, España

Recibido el 19 de julio de 2011; aceptado el 29 de julio de 2011

Disponible en Internet el 17 de noviembre de 2011

PALABRAS CLAVE

Carcinoma de células escamosas de laringe;
Inestabilidad de microsatélites;
Quimioterapia

Resumen

Introducción y objetivos: La literatura sobre la participación de la inestabilidad de microsatélites en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello muestra una gran variabilidad, probablemente debido a las diferencias en la metodología de las pruebas. Utilizando un sistema de detección consensuado, nos planteamos como objetivo llegar a una estimación fiable de la prevalencia de la inestabilidad de microsatélites en un subconjunto de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello.

Métodos: Se analizó el estado de inestabilidad de microsatélites en 43 pacientes no tratados previamente y diagnosticados de un carcinoma primario de células escamosas de laringe mediante una prueba de PCR múltiple, incluyendo 5 marcadores repetidos de mononucleótidos.

Resultados: En 36 casos se observó un fenotipo estable o microsatélites estables (83,7%), y en 7 casos (16,3%) se mostró un fenotipo positivo de inestabilidad de microsatélites. Uno de los casos mostró inestabilidad en 3 de los 5 marcadores, otro mostró inestabilidad en 2 marcadores y 5 casos en un marcador. Entre los casos de inestabilidad de microsatélites positiva y los casos estables no hubo diferencias con respecto a la edad, el estadio del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos o las metástasis a distancia.

Conclusiones: Nuestros datos muestran que una parte de los carcinomas de células escamosas de laringe presentan inestabilidad de microsatélites. El conocimiento sobre el estado de inestabilidad de microsatélites de los pacientes permitirá el ajuste de la terapia anti-cancerígena a nivel individual.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: xurde_garcia@hotmail.com (J. García Martínez).

KEYWORDS

Laryngeal squamous cell carcinoma;
 Microsatellite instability;
 Chemotherapy

Analysis of microsatellite instability in laryngeal squamous cell carcinoma**Abstract**

Introduction and objectives: The literature on the involvement of microsatellite instability in head and neck squamous cell carcinoma shows great variability, probably due to differences in the testing methods. Using a consensus detection system, we aimed to reach a reliable estimate of microsatellite instability prevalence in a subset of head and neck squamous cell carcinoma cases.

Methods: The microsatellite instability status of 43 patients with previously untreated primary laryngeal squamous cell carcinomas was analyzed by a multiplex polymerase chain reaction assay including 5 mononucleotide repeat markers.

Results: Thirty-six cases showed a stable phenotype or a microsatellite stable phenotype (83.7%) and 7 cases (16.3%) showed an microsatellite instability-positive phenotype. One case showed instability in 3 of 5 markers, 1 case in 2 markers and 5 cases in 1 marker. The microsatellite instability-positive and stable cases did not differ with respect to age, tumour stage, lymph node or distant metastases.

Conclusions: Our data showed that a proportion of laryngeal squamous cell carcinomas are microsatellite instability positive. Knowledge of microsatellite instability patient status will allow adjusting anticancer therapy at an individual level.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El cáncer se desarrolla como un proceso de múltiples pasos en el que se acumulan los cambios genéticos. Uno de dichos pasos puede producir daños a los genes implicados en el mantenimiento de la integridad del ADN, tales como la reparación de errores de emparejamiento que, cuando es defectuosa, origina mutaciones o inestabilidad de las secuencias repetitivas de ADN, conocida como inestabilidad de microsatélites. Dicha inestabilidad de microsatélites viene caracterizada por las supresiones o expansiones en pequeñas secuencias repetitivas (1-5 nucleótidos repetidos de 5 a 100 veces). La mayoría de estas secuencias se producen en el ADN no codificante, aunque también se originan en genes importantes tales como TGF- β RII, BAX, IGF2R¹. La inestabilidad de microsatélites fue inicialmente descrita en el cáncer colorrectal de poliposis no hereditaria, así como en el cáncer de colon esporádico, presente en aproximadamente un 15% de los casos².

En el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello la inestabilidad de microsatélites se ha detectado en la literatura en frecuencias variables, que oscilan entre el 1% e incluso el 100%³⁻⁵. El motivo de estos resultados incongruentes es probablemente la diferencia de las metodologías aplicadas y, posiblemente, debido a las distintas sub-localizaciones de dicho carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (lengua, laringe, cavidad oral, vías nasales) se agruparon conjuntamente. El conocimiento del estado de inestabilidad de microsatélites de los tumores es clínicamente importante, puesto que afecta al procesamiento de los daños en el ADN inducidos por los medicamentos quimioterapéuticos utilizados en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello tales como cisplatino, carboplatino y 5-fluorouracilo.

La inestabilidad de microsatélites es importante en ciertos tumores, y los carcinomas de células escamosas de laringe podrían constituir uno de ellos. La inestabilidad de microsatélites es probablemente importante en las

lesiones laríngeas pre-malignas⁶, habiéndose hallado con elevada frecuencia en pacientes jóvenes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello⁷, por lo que es importante saber la prevalencia real y las consecuencias de la inestabilidad de microsatélites positivos en el carcinoma de células escamosas de laringe.

En este documento trataremos de explorar la prevalencia de la inestabilidad de microsatélites mediante el uso de un kit de detección con fiabilidad consensuada en el carcinoma de células escamosas de laringe, relacionar los hallazgos con los parámetros clínico-patológicos y realizar un seguimiento de la información.

Métodos**Muestras tumorales**

Se obtuvo un muestreo de carcinomas de células escamosas de laringe de 43 pacientes, mediante especímenes de resección quirúrgica evitando las áreas necróticas, que fueron almacenados en nitrógeno líquido. Se logró el consentimiento informado de todos los pacientes, siendo aprobado el estudio por el comité ético de nuestro instituto. Todos los pacientes fueron sometidos a una cirugía radical, y en todos los casos los márgenes de la resección se hallaban libres de tumores. Cuatro pacientes recibieron radioterapia previa. La edad media fue de 60 años (rango 43-80 años). Diez tumores eran de estadio I, 13 de estadio II, 13 de estadio III y 7 de estadio IV. Dieciséis tumores estaban bien diferenciados, 14 moderadamente diferenciados y 11 débilmente diferenciados. La información de seguimiento estuvo disponible al cabo de un periodo medio de 46 meses (rango 0-100). Un paciente desarrolló un tumor primario secundario, 11 tuvieron recurrencia loco-regional y 2 padecieron metástasis a distancia. El listado completo de los datos clínicos se presenta en la [tabla 1](#).

Tabla 1 Características clínicas y resultados de la inestabilidad de microsatélites de 43 carcinomas de células escamosas de laringe (LSCC)

Caso	MSI	Edad	Estadio T	Nódulos	Estadio	Recurrencias	Diferenciación	Seguimiento	Resultado
LSCC1	Sí		3	No	III	No	DE	0	0
LSCC2	Sí		3	No	III	No	DE	55	0
LSCC3	No		2	No	II	No	BI	0	
LSCC4	No		3	No	III	No	BI	59	0
LSCC5	No		3	Sí	III	Local	BI	57	0
LSCC6	No		4	Sí	IV	2ª primaria	MO	6	1
LSCC7	No		2	No	II	Regional	BI	24	1
LSCC8	No		3	Sí	III	Local	BI	46	0
LSCC9	No		3	No	III	Regional	BI	41	1
LSCC10	No		3	Sí	III	No	BI	48	0
LSCC11	Sí		4	Sí	IV	Regional	DE	20	1
LSCC12	No		3	Sí	III	No	BI	42	0
LSCC13	No		4	Sí	IV	No	MO	41	0
LSCC14	Sí		3	No	III	No	MO	51	0
LSCC15	No		2	No	II	No	BI	47	0
LSCC16	No		2	Sí	III	Local	DE	18	1
LSCC17	No		1	No	I	No	BI	57	0
LSCC18	No		4	No	IV	No	BI	48	0
LSCC19	No		1	No	I	No	BI	48	0
LSCC20	No		3	Sí	IV	No	MO	50	0
LSCC21	Sí		1	No	I	Metástasis	BI	26	1
LSCC22	No		2	No	II	No	DE	51	0
LSCC23	No		2	No	II	No	MO	69	0
LSCC24	No		1	No	I	Local	DE	85	1
LSCC25	No		2	Sí	III	Local	MO	19	1
LSCC26	No		3	Sí	III	Metástasis	MO	13	2
LSCC27	Sí		2	No	II	No	BI	100	0
LSCC28	No		2	No	II	No	DE	72	0
LSCC29	No		1	No	I	No	MO	66	0
LSCC30	No		2	No	II	No	DE	96	0
LSCC31	No		2	No	II	No	DE	70	0
LSCC32	No		1	No	I	No	DE	45	0
LSCC33	No		1	No	I	No	DE	87	0
LSCC34	No		2	No	II	Local	MO	13	1
LSCC35	No		3	No	III	Local	MO	18	1
LSCC36	No		1	No	I	No	MO	79	0
LSCC37	No		2	No	II	No	BI	0	0
LSCC38	No		1	No	I	No	DE	76	0
LSCC39	No		1	No	I	No	MO	66	0
LSCC40	No		3	Sí	IV	Local	MO	14	1
LSCC41	No		4	No	IV	No	MO	58	0
LSCC42	Sí		2	No	II	No	DE	71	0
LSCC43	No		2	No	II	Local	BI	20	1

LSCC: carcinomas de células escamosas de laringe.

Seguimiento expresado en meses; resultados 0: =vivo; 1: fallecido por la enfermedad; 2: fallecido por otras causas. Diferenciación: DE: débil; MO: moderado; BI: bien.

Análisis de la inestabilidad de microsatélites

El ADN tumoral se extrajo utilizando kits de extracción Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Se ampliaron aproximadamente 2 ng de ADN tumoral de acuerdo con las recomendaciones del fabricante mediante una PCR múltiple, utilizando un kit de análisis de inestabilidad de microsatélites (Promega Biotech Ibérica, Barcelona, España), consistente en 2 imprimaciones para 5 marcadores

de mononucleótidos casi monomórficos: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, y MONO-27 (tabla 2). La mezcla reactiva de PCR contenía 17 µl de agua libre de nucleasa; 2,5 µl de Búfer GoldST_R 10X; 2,5 µl de 10x de mezcla de imprimación multiplex; 0,5 µl de AmpliTaq Gold de ADN Polimerasa a 5 Unidades/µl y 2,5 µl de ADN a 0,8 ng/µl, produciéndose la amplificación al utilizar el siguiente perfil de ciclo: 1 ciclo a 95 °C durante 11 min; 1 ciclo a 96 °C durante 1 min; 10 ciclos a 94 °C durante 30 s, elevación durante 68 s a 56 °C,

Tabla 2 Datos de los 5 marcadores de mononucleótidos utilizados para el análisis de la inestabilidad de microsatélites

Nombre de locus	Gen	Rango de tamaño (bp)	Motivo de repetición
NR-21	SLC7A8	98-100	(A)21
BAT-26	MSH2	112-114	(A)26
BAT-25	c-Kit	120-123	(A)25
NR-24	ZNF-2	130-131	(A)24
MONO-27	MAP4K3	149-151	(A)27

mantenimiento durante 30 s, elevación durante 50 s a 70 °C, mantenimiento durante 45 s; 20 ciclos a 90 °C durante 30 s, elevación durante 60 s a 56 °C, mantenimiento durante 30 s, elevación durante 50 s a 70 °C, mantenimiento durante 45 s; 60 °C durante 30 min. de extensión final; mantenimiento a 4 °C. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis capilar utilizando un analizador genético ABI 3100 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). El análisis de los datos se realizó utilizando el software GeneScan (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). El cambio del tamaño de los alelos de 3 o más pares de bases o de uno o más de los 5 marcadores se puntuó como inestabilidad de microsatélites positiva, y el cambio del tamaño del alelo de 2 pares de bases o menos se puntuó como estabilidad de microsatélites. Se aportó una muestra negativa de ADN de control al kit Promega, y realizamos un experimento de control positivo utilizando el ADN del paciente de cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélites positiva que había reflejado un cambio en los 5 marcadores de mononucleótidos.

Análisis estadístico

Las posibles correlaciones entre el estado de la inestabilidad de microsatélites y los parámetros clínicos se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS 12.0 para Windows (SPSS® Inc., IL, EE.UU.), usando la prueba de la *t* de Student y las estadísticas de la χ^2 exacta de Fisher. Se realizó el análisis de Kaplan-Meier para estimar la supervivencia, comparando las distribuciones de dicha supervivencia por medio de la prueba del rango logarítmico (log-rank test). Los valores *p* inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

Resultados

Todos los tumores aportaron unos productos interpretables a la PCR, incluyéndose sus tamaños en el rango indicado por el fabricante. En 36 casos el análisis de estabilidad de microsatélites mostró un fenotipo estable (83,7%), mientras que 7 de los casos (16,3%) evidenciaron un fenotipo de inestabilidad de microsatélites positiva. LSCC1 mostró inestabilidad de microsatélites en 3 de los 5 marcadores de los loci BAT-25, BAT-26 y MONO27, LSCC21 en BAT-25 y MONO27, LSCC2 en BAT-26, LSCC11 y LSCC27 en BAT-25, y LSCC14 y LSCC42 en NR-21 (tabla 1). Presentamos dos ejemplos en la figura 1.

Utilizando la prueba *t* de Student, y las estadísticas χ^2 y de Kaplan-Meier para contrastar los casos de estabilidad e inestabilidad de microsatélites, no se hallaron diferencias en cuanto a edad de los pacientes en el momento del

diagnóstico, estadio del tumor, nódulo linfático o metástasis a distancia (tabla 3). Se observó una tendencia en los casos de inestabilidad de microsatélites, que muestran una diferenciación histopatológica más débil que los casos de microsatélites estables, del 57 y 25% respectivamente, aunque este hecho no fue significativo.

Discusión

Desde su descubrimiento a principios de los años noventa del siglo xx, se han utilizado diversas técnicas para el seguimiento de la inestabilidad de microsatélites. En un intento de estandarizar el método, un curso práctico del NCI (National Cancer Institute) en 1997 recomendaba un panel de 5 marcadores de microsatélites, conocido como el panel de Bethesda. Sin embargo, dicho panel creaba problemas, especialmente debido a la inclusión de marcadores repetidos de dinucleótidos. Dichas limitaciones se discutieron durante un curso práctico del NCI en 2002, que revisó las recomendaciones para las pruebas sobre inestabilidad de microsatélites⁸. El kit Promega, utilizado en este estudio, se basa en las recomendaciones consensuadas y contiene únicamente marcadores repetidos de mononucleótidos. Bacher et al.¹ han mostrado que este panel es más sensible y más específico que el de Bethesda; esta metodología fue utilizada por Yalniz et al.⁹ para elaborar el consenso de los marcadores de inestabilidad de microsatélites en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y nosotros obtuvimos un resultado similar para los carcinomas de laringe. Gran parte de la literatura sobre la inestabilidad de microsatélites en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello ha utilizado metodologías que incluían marcadores de dinucleótidos e incluso de trinucleótidos, que suelen tender a producir falsos resultados positivos. Por este motivo, es muy difícil comparar nuestros datos con los de los estudios anteriores. El porcentaje del 16,3% de casos positivos en nuestras series podría sugerir que este mecanismo desempeña un papel en un sub-grupo de tumores. No hallamos diferencias significativas entre los casos de estabilidad e inestabilidad de microsatélites con respecto al estadio del tumor, nódulo linfático, metástasis a distancia o resultados clínicos, lo que podría sugerir que la inestabilidad de microsatélites se produce durante un estadio muy temprano del desarrollo del tumor. Esto concuerda con los hallazgos de inestabilidad de microsatélites en las lesiones laríngeas premalignas⁶, y con una frecuencia muy elevada en pacientes jóvenes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello⁷. En nuestro estudio, los casos de inestabilidad de microsatélites mostraron una frecuencia de débil diferenciación histopatológica relativamente superior a los tumores con microsatélites estables, con porcentajes del 57 y 25% respectivamente. Dichos resultados son similares a los hallados por Nash et al. para el cáncer de colon, en los que la inestabilidad de microsatélites se asociaba a los cánceres débilmente diferenciados¹⁰.

Aunque no está claramente establecido, los factores ambientales tales como los radicales del oxígeno, el consumo de tabaco o la dieta pueden desempeñar también un papel en el desarrollo de la inestabilidad de microsatélites^{11,12}. En el cáncer de colon esporádico^{13,14}, en el epitelio bronquial y en el cáncer de pulmón¹², la

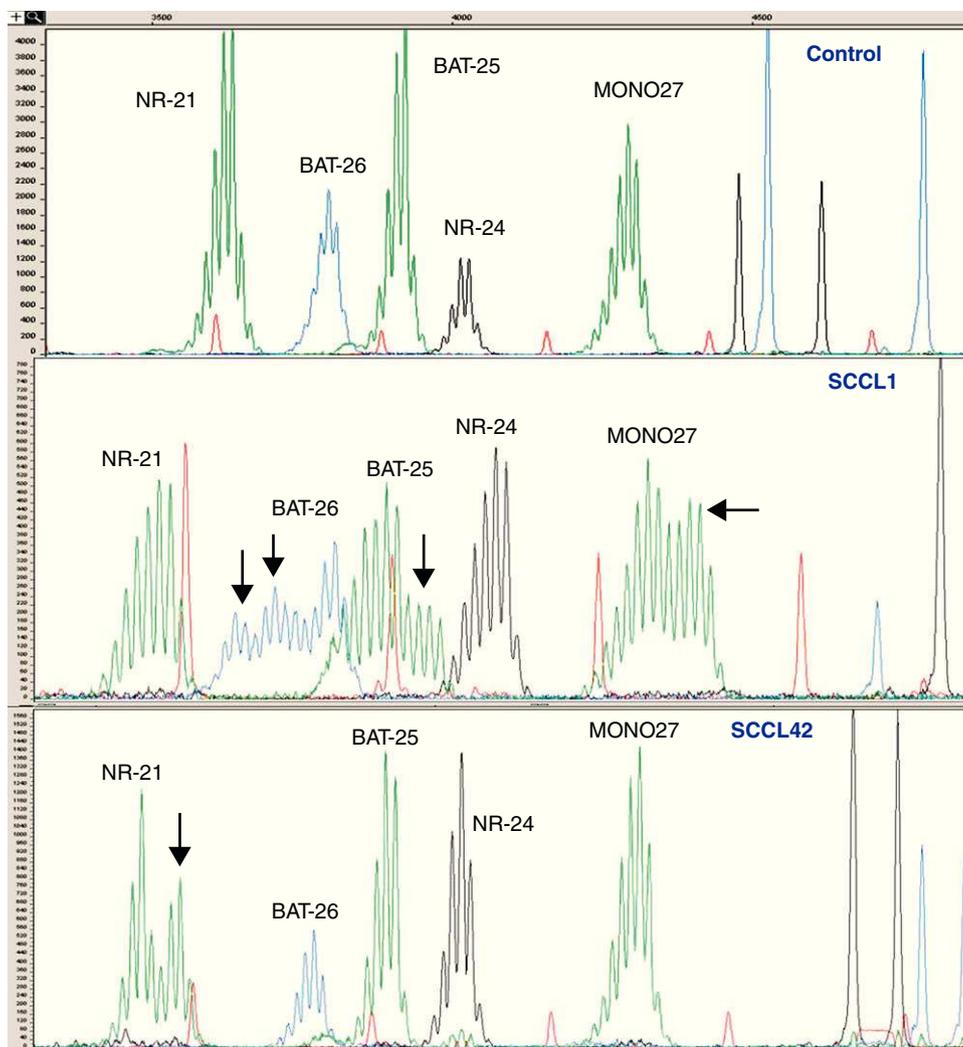


Figura 1 Ejemplo de control sin inestabilidad de microsatélites y casos positivos. Las flechas indican picos extra que indicaban alteraciones en loci específicos de las secuencias de repetición de ADN.

inestabilidad de microsatélites se ha asociado a la metilación de islas CpG y al consumo de tabaco. Se ha demostrado que el gen *MLH1* de reparación de errores de emparejamiento se ve frecuentemente silenciado por la metilación promotora¹³. Puede especularse que también existe esta asociación en el cáncer de células escamosas de laringe, donde la mayoría de los pacientes son fumadores, definiendo a un sub-grupo específico de pacientes.

La función correcta de las rutas de reparación del ADN es importante para la elección de la terapia anti-cancerígena. La reparación de errores de emparejamiento se incluye en el procesamiento del daño del ADN que implica el uso de diversos tipos de medicamentos quimioterapéuticos,

tales como alquilantes monofuncionales, alquilantes bifuncionales (cisplatino y carboplatino); antimetabolitos y fluoropirimidinas (5-fluorouracilo y fluorodeoxiuridina)¹⁰, comúnmente utilizados en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, junto con la cirugía, como la micro-cirugía por láser CO₂ para la preservación de órganos en el tratamiento de carcinomas avanzados de laringe¹⁵. En los experimentos *in vitro*, las células con microsatélites estables demostraron ser de 2 a 100 veces más sensibles a dichos medicamentos en comparación con las células con inestabilidad de microsatélites, y de hecho los estudios animales sobre diferentes tipos de tumores sugieren que las células con inestabilidad de microsatélites

Tabla 3 Diferencias entre estabilidad e inestabilidad de microsatélites con los mismo parámetros clínicos

	Edad media	Recurrencias	Afectación nodular	Metástasis	Fallecidos por la enfermedad
MSI (n = 7)	56,3	28,57% (2 de 7)	14,29% (1 de 7)	14,29% (1 de 7)	28,57% (2 de 7)
MSS (n = 36)	61,2	36,11% (13 de 36)	30,56% (11 de 36)	2,78% (1 de 36)	27,78% (10 de 36)

MSI: inestabilidad de microsatélites; MSS: estabilidad de microsatélites.

tienen una respuesta más débil al cisplatino, carboplatino y agentes metilantes¹⁰. Por el contrario, se están desarrollando nuevos documentos que aprovechan el fenotipo de inestabilidad de microsatélites de los tumores. Uno de estos medicamentos es la iododesoxiuridina (IUdR), que en células de tumores colorrectales y endometriales con inestabilidad de microsatélites positiva mostraron de modo persistente unos mayores niveles, dado que las disparidades G:LU no fueron reparadas. Como la IUdR es un medicamento radio-sensible, puede combinarse con la radioterapia para identificar los cánceres humanos con inestabilidad de microsatélites¹⁶. Dicha terapia podría ser también útil en el cáncer laríngeo con inestabilidad de microsatélites positiva. La comprensión de los problemas y ventajas del estado de inestabilidad de microsatélites de los tumores es asimismo importante en términos económicos. La evaluación genética del estado de inestabilidad de microsatélites del tumor tiene un coste relativamente bajo y es fácil de realizar, lo cual puede ahorrar el coste de un tratamiento erróneo.

Conclusión

Llegamos a la conclusión de que una parte de los carcinomas de células escamosas de laringe tiene estabilidad de microsatélites positiva. El conocimiento del estado de inestabilidad de microsatélites de los pacientes permitirá el ajuste de la terapia anti-cancerígena a nivel individual. Las pruebas de inestabilidad de microsatélites pueden ser clínica y económicamente útiles para el carcinoma de células escamosas de laringe.

Financiación

El presente estudio ha sido financiado mediante las subvenciones IB05-115 de la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), PI05-1387 y EMER07-048 de los Fondos de Investigación Sanitaria (FIS), y RD06/0020/0034 de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), España.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL, Nassif NA, Burgart LJ, Halberg RB, et al. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis Markers*. 2004;20:237-50.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993;363:558-61.
- De Schutter H, Spaepen M, Mc Bride WH, Nuyts S. The clinical relevance of microsatellite alterations in head and neck squamous cell carcinoma: a critical review. *Eur J Hum Genet*. 2007;15:734-41.
- Martínez JG, Pérez-Escuredo J, López F, Suárez C, Alvarez-Marcos C, Llorente JL, et al. Microsatellite instability analysis of sinonasal carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;140:55-60.
- Karatzanis AD, Tzortzaki E, Samara KD, Neofytou E, Zenk J, Iro H, et al. Microsatellite DNA instability in nasal polyposis. *Laryngoscope*. 2009;119:751-6.
- Sardi I, Franchi A, De Campora L, Passali GC, Gallo O. Microsatellite instability as an indicator of malignant progression in laryngeal premalignancy. *Head Neck*. 2006;28:730-9.
- Wang Y, Irish J, MacMillan C, Brown D, Xuan Y, Boyington C, et al. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 AND hMSH2. *Int J Cancer*. 2001;93:353-60.
- Laghi L, Bianchi P, Malesci A. Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability. *Oncogene*. 2008;27:6313-21.
- Yalniz Z, Demokan S, Suoglu Y, Ulsan M, Dalay N. Assessment of microsatellite instability in head and neck cancer using consensus markers. *Mol Biol Rep*. 2010;7:3541-5.
- Papouli E, Cejka P, Jiricny J. Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells. *Cancer Res*. 2004;64:3391-4.
- Campbell PT, Curtin K, Ulrich CM, Samowitz WS, Bigler J, Velicer CM, et al. Mismatch repair polymorphisms and risk of colon cancer, tumour microsatellite instability and interactions with lifestyle factors. *Gut*. 2009;58:661-7.
- Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, Herrick J, Caan BJ, Anderson KE, et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:1731-8.
- Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006;38:787-93.
- Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 2009;58:90-6.
- López-Álvarez F, Rodrigo JP, Llorente-Pendás JL, Suárez-Nieto C. Transoral laser microsurgery in advanced carcinomas of larynx and pharynx. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2011;62:95-102.
- Kinsella TJ. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin Cancer Res*. 2009;15:1853-9.