

Expresión de la anexina A2 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello

Juan Pablo Rodrigo Tapia^{a,b}, Emma Pena Alonso^a, Juana M. García-Pedrero^a, Manuel Florentino Fresno^c, Carlos Suárez Nieto^{a,b}, Reginald Owen Morgan^d y María Pilar Fernández^d

^aInstituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA). Oviedo (Asturias). España.

^bServicio de Otorrinolaringología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo (Asturias). España.

^cServicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo (Asturias). España.

^dDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo. Oviedo (Asturias). España.

Objetivo: La expresión de la anexina A2 (ANXA2) se ha hallado elevada en varios cánceres. Sin embargo, no hay datos disponibles de la expresión de esta proteína en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. El objetivo de este estudio preliminar es investigar la expresión de la ANXA2 en estos carcinomas.

Material y método: Se analizó la expresión de la ANXA2 mediante inmunohistoquímica en muestras incluidas en parafina de 9 lesiones premalignas y 21 carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

Resultados: Todas las lesiones con displasia mostraron una reducción en la expresión de la ANXA2 respecto al tejido normal. En contraste, se apreció expresión de la ANXA2 en todos menos uno de los tumores estudiados. La disminución de la expresión de la ANXA2 en los carcinomas se correlacionó de forma significativa con una peor diferenciación histológica, con tumores de mayor tamaño y con metástasis ganglionares.

Conclusiones: Nuestros datos muestran por primera vez que la ANXA2 se expresa en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello e indican que su expresión se relaciona con el grado de diferenciación de estos tumores.

Palabras clave: Anexina A2. Cáncer. Cabeza y cuello. Expressión.

Annexin A2 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Objective: Over-expression of annexin A2 (ANXA2) has been reported in various cancers. However, no data are available on the expression of this protein in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). The objective of this preliminary study is to investigate the expression of ANXA2 in these carcinomas.

Material and method: ANXA2 expression was analyzed by immunohistochemistry in paraffin-embedded sections from 9 patients with premalignant lesions and 21 patients with HNSCC.

Results: All dysplastic tissues showed significantly reduced ANXA2 expression compared to normal tissue. In contrast, ANXA2 expression was observed in all but one of the tumours studied. There was a significant correlation of lower ANXA2 expression with a poorer histological differentiation, larger tumours, and nodal metastases.

Conclusions: Our data show for the first time that ANXA2 is expressed in head and neck squamous cell carcinomas and that its expression seems to be related with the degree of differentiation status of these tumours.

Key words: Annexin A2. Cancer. Head and neck. Expression.

Este trabajo ha sido financiado con una ayuda a la investigación del FIS (PI041537). JPRT es beneficiario del Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora del Instituto de Salud Carlos III. JMGP y EPA están financiadas por la Obra Social CajAstur.

Los autores no manifiestan ningún conflicto de intereses.

Correspondencia: Dr. J.P. Rodrigo Tapia.
Servicio de Otorrinolaringología.
Hospital Universitario Central de Asturias.
Celestino Villamil, s/n. 33006 Oviedo (Asturias). España.
Correo electrónico: juanpablo.rodrigo@sespa.princast.es

Recibido el 1-2-2007.

Aceptado para su publicación el 12-2-2007.

INTRODUCCIÓN

Las anexinas constituyen una familia de proteínas caracterizadas por su capacidad de unión a fosfolípidos en presencia de ion calcio, su susceptibilidad a la fosforilación y la desfosforilación y su capacidad de inhibir la fosfolipasa A2. Las anexinas humanas pertenecen a la subfamilia A de las anexinas de los vertebrados, de las que se ha identificado 12 miembros. Se designan con el símbolo ANX seguido de un sufijo que indica el número de la anexina, desde la A1 a la A11 y luego la A13, pues no hay anexina A12. Sus interacciones con otras proteínas y su aparente papel en la transducción de señales han permitido implicarlas en los proce-

sos celulares relacionados con el mantenimiento del citoesqueleto y su interacción con la matriz extracelular, el crecimiento y la diferenciación tisulares, la inflamación y la coagulación de la sangre¹. La anexina A2 (ANXA2) es una de las anexinas más jóvenes y divergentes, de acuerdo con el análisis filogenético, de las 12 anexinas humanas². Varias de las anexinas han sido implicadas en la tumorigénesis, de forma que la expresión alterada de alguna de ellas se ha asociado con la transformación de líneas celulares³, la progresión tumoral⁴ y las metástasis^{5,6}. Esto ha indicado que las anexinas podrían tener un posible papel como supresores tumorales.

La ANXA2, cuando se localiza en la superficie celular, sirve como un receptor o proteína de unión para proteasas (catépsina B, plasminógeno y activador tisular del plasminógeno) y proteínas de la matriz extracelular (colágeno y tenascina C). Se ha propuesto que esta relación entre proteasas y proteínas de la matriz extracelular a través de la ANXA2 puede facilitar la remodelación de la matriz extracelular en procesos fisiológicos y patológicos, como la invasión tumoral⁷. En este sentido, se ha descrito la sobreexpresión de la ANXA2 en tumores malignos de cerebro, pulmón, hígado, páncreas, colon y hemáticos⁸⁻¹⁵. Pero también se ha descrito la disminución de la expresión de esta proteína en el cáncer de próstata¹⁶.

Tabla I. Características clínico-patológicas de los tumores estudiados

Característica	
Edad (años), media (mediana)	59 (61)
Sexo, n (%)	
Varones	20 (95)
Mujeres	1 (5)
Localización, n (%)	
Orofaringe	8 (38)
Supraglótis	5 (24)
Glotis	3 (14)
Hipofaringe	5 (24)
Clasificación pT, n (%)	
T1	4 (19)
T2	3 (14)
T3	9 (43)
T4	5 (24)
Clasificación pN, n (%)	
N0	8 (38)
N1-3	13 (62)
Estadio, n (%)	
I	3 (14)
II	2 (10)
III	3 (14)
IV	13 (62)
Grado de diferenciación, n (%)	
Bien diferenciado	11 (52)
Moderadamente diferenciado	6 (29)
Pobremente diferenciado	4 (19)
Total, n	21

La magnitud y la especificidad de los cambios en la expresión de la ANXA2 en varios cánceres orientan a su potencial papel en la carcinogénesis y como marcador tumoral. Ya se había descrito¹⁷ la expresión de esta proteína en el epitelio normal de las vías aerodigestivas superiores, pero no hay datos disponibles sobre la expresión de la ANXA2 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC). En este trabajo preliminar analizamos mediante inmunohistoquímica la expresión de la ANXA2 en un grupo de lesiones precancerosas y carcinomas invasivos de faringe y laringe, junto con epitelio normal apareado de cada paciente, para intentar establecer su potencial papel en estos carcinomas.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestras de tejidos

Se obtuvieron muestras de tejidos quirúrgicos de 21 pacientes consecutivos con carcinomas epidermoides de cabeza y cuello y muestras de 9 pacientes con lesiones premalignas de laringe de los archivos de anatomía patológica de nuestro hospital, siguiendo las guías del comité de ética. Los pacientes elegidos para este estudio fueron tratados en 2001 y tienen un tiempo de seguimiento de por lo menos 2 años. Se seleccionaron secciones representativas de los tejidos para el estudio, y un patólogo confirmó el diagnóstico de cada lesión. Ninguno de los pacientes había recibido radioterapia y/o quimioterapia antes de la intervención. En todos los casos había mucosa histológicamente normal adyacente al tumor.

Las características de los pacientes estudiados y los rasgos clínico-patológicos de sus tumores (localización, clasificación pT, clasificación pN, estadio de la enfermedad y grado de diferenciación) se muestran en la tabla I. El estadio de la enfermedad se determinó después de la resección quirúrgica del tumor, de acuerdo con el sistema TNM de la Unión Internacional contra el Cáncer (6.^a edición). El grado histológico fue determinado de acuerdo con el grado de diferenciación del tumor (clasificación de Broders). Todos los pacientes eran consumidores habituales de tabaco y alcohol.

La distribución de los pacientes con lesiones premalignas según el diagnóstico histológico fue: hiperplasia/hiperqueratosis (4 casos), displasia leve (1 caso), displasia moderada (2 casos) y displasia severa/carcinoma in situ (2 casos).

Estudio inmunohistoquímico

Los tejidos fijados con formol e incluidos en parafina se cortaron en secciones de 4 μ m, que se adhirieron a portaobjetos siliconados (ChemMate, Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos). Se desparafinó las secciones con xileno y se las hidrató en alcoholes de distinta graduación según el modo convencional. Para la recuperación del antígeno se usó un *buffer* de citrato calentado 10 min en olla a presión. La tinción se realizó a temperatura ambiente en una estación automatizada de tinción (TechMate 1000, BioTEK Solutions). Los portaobjetos fueron colocados durante 20 min en medio bloqueador de peroxidasa de hidrógeno al 3% y luego de 10 min se les permitió reaccionar con el anticuer-

po monoclonal murino IgG anti-ANXA2 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), en dilución 1:400 durante 30 min. La inmunodetección se realizó con el sistema Envision (Envision Plus, Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos) empleando como cromógeno diaminobencidina¹⁸. Se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante 1 min como último paso. Después de la tinción, se deshidrató los portaobjetos mediante alcoholes de diferente graduación, según el método convencional, y se los montó con un cubreobjetos usando un medio estándar.

Los controles positivos utilizados fueron muestras de epitelio laríngeo normal obtenidas de cirugía no oncológica. También se emplearon controles negativos, que consistieron en muestras en las que se omitió el anticuerpo primario.

Se estudió los portaobjetos de forma aleatoria, sin datos clínicos. La tinción fue predominantemente membranosa. Dado que la mayoría de las células, cuando eran positivas, mostraban una tinción intensa, se asignó una puntuación basada solamente en el porcentaje de células con tinción membranosa (0 %-100 %). Se contabilizó al menos 500 células tumorales para cada caso, siguiendo un método estereológico basado en el muestreo aleatorio sistemático¹⁹: en un área definida de la lesión, se incluyó sistemáticamente 1 de cada 5 campos de visión consecutivos y se contabilizó las células positivas y negativas. Se valoró en cada caso 5 campos de visión, amplificados a 400 veces.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con ayuda del paquete estadístico SPSS versión 8.0. Se comparó las medias de las puntuaciones de tinción dentro de los grupos estratificados con respecto a parámetros clínico-patológicos (clasificación T, clasificación N, grado de diferenciación, localización y recurrencia) y dentro del grupo en conjunto. Para esta comparación usamos el análisis de la variancia.

Las curvas de supervivencia fueron calculadas usando el método de Kaplan-Meier. No se consideró fallo del tratamiento las muertes por causas distintas del tumor índice o sus metástasis y se las excluyó del análisis final de la supervivencia específica para la enfermedad. Las diferencias entre las curvas de supervivencia fueron analizadas por el método de rangos logarítmicos. Para analizar el efecto de la expresión de la ANXA2 en la supervivencia, las puntuaciones de la tinción fueron dicotomizadas tomando como punto de corte la mediana. Las curvas de supervivencia de las puntuaciones por tinción entre los diferentes percentiles fueron obtenidas antes de la dicotomización. Se eligió el punto de corte que proporcionaba una mejor discriminación entre las curvas de supervivencia. Se consideró estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Expresión de la ANXA2 en el epitelio normal

Todas las secciones seleccionadas para el estudio contenían epitelio normal y maligno. Tal como habíamos descrito previamente, la expresión de la ANXA2 fue detectada en

células de la capa basal y suprabasales del epitelio normal, con falta de tinción en la mayoría de las capas más externas y diferenciadas (fig. 1A). La tinción de la ANXA2 era preferentemente de localización membranosa, aunque alguna tinción citoplásica fue apreciada, especialmente en células de la capa basal. También observamos una fuerte tinción de las células endoteliales y de los fibroblastos.

Expresión de la ANXA2 en lesiones premalignas

Se realizó el análisis inmunohistoquímico de 9 muestras de lesiones premalignas (distribuidas como se describió en "Material y método") para determinar si la expresión de la ANXA2 cambia de forma precoz en la génesis tumoral de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. Todas las secciones seleccionadas incluían epitelio normal como control interno. El epitelio hiperplásico mostró el mismo patrón de expresión de ANXA2 que el epitelio normal. Sin embargo, se detectó una pérdida de la expresión de la ANXA2 en los tejidos displásicos, en contraste con la fuerte señal de ANXA2 detectada en el correspondiente epitelio normal (fig. 1B).

Expresión de la ANXA2 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello

Todas excepto 1 de las 21 muestras de tejidos cancerígenos estudiadas mostraron algún grado de expresión de la ANXA2. Al igual que en el epitelio normal, la ANXA2 se expresaba fuertemente en la membrana celular, mientras una expresión insignificante se observó en el citoplasma de las células cancerígenas. Además, la ANXA2 se expresaba débilmente en la estroma fibrosa del tejido tumoral.

La tabla II muestra la correlación entre la expresión de la ANXA2 y los hallazgos clínico-patológicos en los 21 tumores examinados. La expresión de esta proteína se correlacionaba significativamente con el grado histopatológico ($p < 0,001$). De esta manera, la expresión de la ANXA2 en tumores bien diferenciados era mayor que en los tumores moderada y pobremente diferenciados. Observamos la tinción de la ANXA2 en casi todas las células cancerígenas en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello bien diferenciados (fig. 1C), mientras que en los carcinomas pobremente diferenciados la mayoría de las células del tumor exhibían una tinción negativa (fig. 1D). En contraste con el epitelio normal, en los tumores bien diferenciados se observaba también una intensa tinción en la mayoría de las áreas diferenciadas y en las queratinizadas de los tumores.

Además, la expresión de la ANXA2 estaba correlacionada significativamente con la clasificación T, más en estadios tempranos T ($p = 0,023$). Hubo diferencias casi significativas en la media de las puntuaciones de tinción de la ANXA2 entre los tumores con metástasis y aquellos sin ellas: las puntuaciones más bajas estaban asociadas con metástasis linfáticas ($p = 0,054$). Aunque la expresión de la ANXA2 era mayor en tumores laríngeos que en los faríngeos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,22$).

Durante el período de seguimiento, en 7 casos se desarrollaron recidivas locales; en 2, recidivas regionales, y en 1, metástasis a distancia. Los casos que presentaron recidiva tumoral (agrupando recidivas locales, regionales y me-

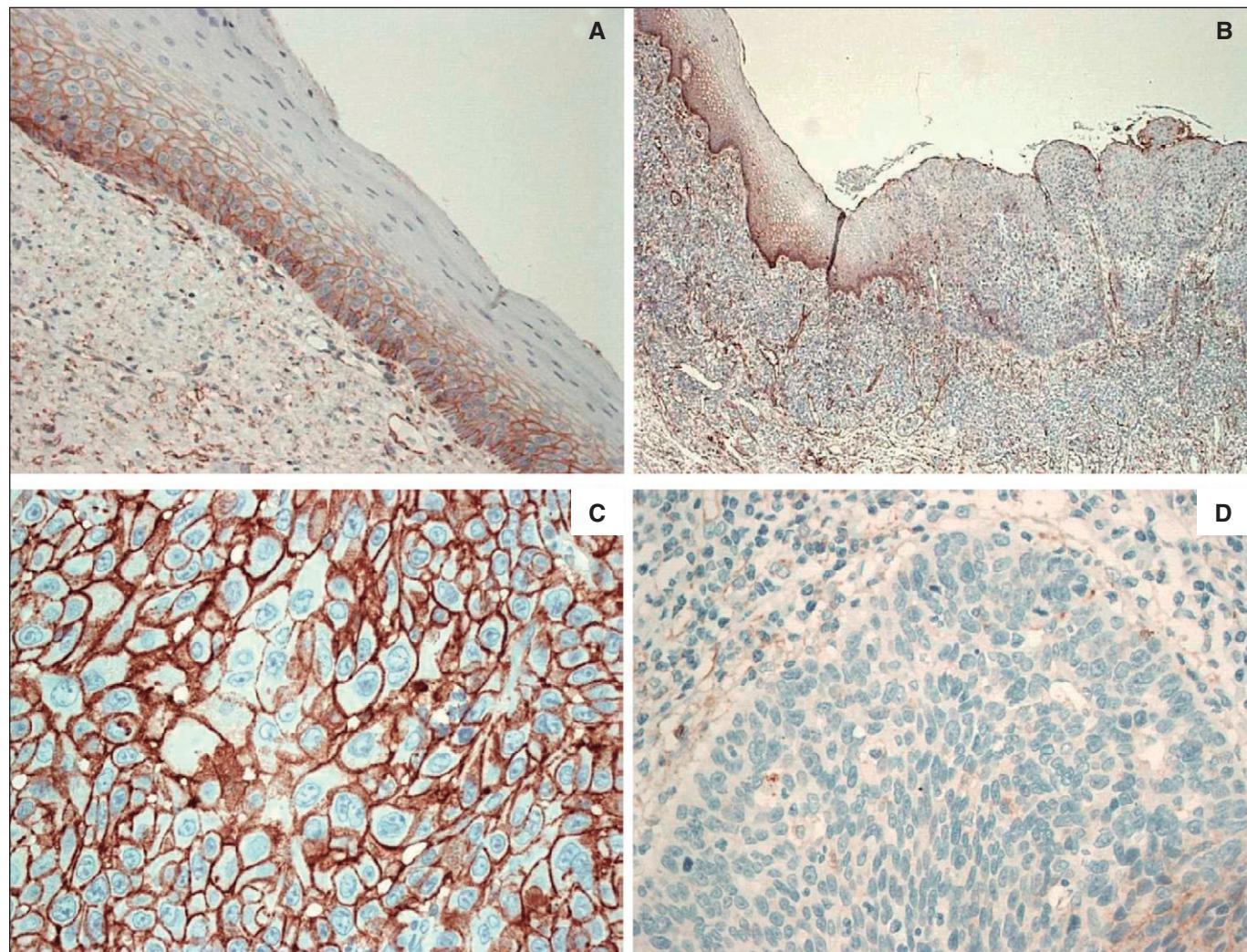


Figura 1. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de la anexina A2. A: epitelio normal ($\times 200$). B: epitelio displásico; el lado derecho de la imagen muestra una reducción de la expresión de la anexina A2 respecto al epitelio normal (lado izquierdo) ($\times 50$). C: tumor bien diferenciado ($\times 400$). D: tumor pobemente diferenciado ($\times 400$).

tástasis a distancia) tenían una puntuación menor de tinción de la ANXA2 que los casos sin recidiva. Además, se apreció una disminución de la supervivencia en los casos con menor expresión de la ANXA2 (fig. 2), pero no significativa (*long-rank test*, $p = 0,18$), probablemente debido al insuficiente número de casos analizados.

DISCUSIÓN

Muchos de los complejos fundamentos biológicos de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello siguen siendo poco conocidos, a pesar de los estudios intensivos. Al igual que otras neoplasias epiteliales, la carcinogénesis de cabeza y cuello parece desarrollarse a través de un proceso con múltiples pasos que involucra cambios biomoleculares sucesivos²⁰. De esta manera, la carcinogénesis epitelial ha sido dividida en 3 fases de iniciación, promoción y progresión que involucra alteraciones genéticas, desregulación de la diferenciación epitelial, proliferación anormal y efectos re-

guladores alterados asociados con la anormal expresión de factores celulares que regulan el crecimiento y el desarrollo. Identificar las alteraciones moleculares asociadas con estos eventos podría dar paso a conocer los mecanismos de iniciación y progresión de las neoplasias y aportar nuevas herramientas de diagnóstico, tratamiento y prevención.

Las anexinas se hallan comúnmente desreguladas en los cánceres³. La ANXA2 está sobreexpresada en una variedad de tumores y líneas celulares cancerígenas, como los astrocitomas cerebrales, el cáncer de páncreas, el carcinoma hepatocelular, el carcinoma pulmonar, el cáncer de mama, el carcinoma colorrectal, el linfoma de células B y la leucemia promielocítica⁸⁻¹⁵, y se ha encontrado disminuida su expresión en el carcinoma de próstata¹⁶. Sin embargo, el patrón de expresión de la ANXA2 en la mucosa normal del tracto aerodigestivo superior se ha estudiado sólo en un trabajo previo¹⁷, y no hay datos disponibles respecto a la expresión de esta proteína en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

Como se mencionó en la introducción, se ha demostrado que la ANXA2 existe como un monómero, un heterodíme-

Tabla II. Expresión de la anexina A2 (ANXA2) en relación con los hallazgos clínico-patológicos

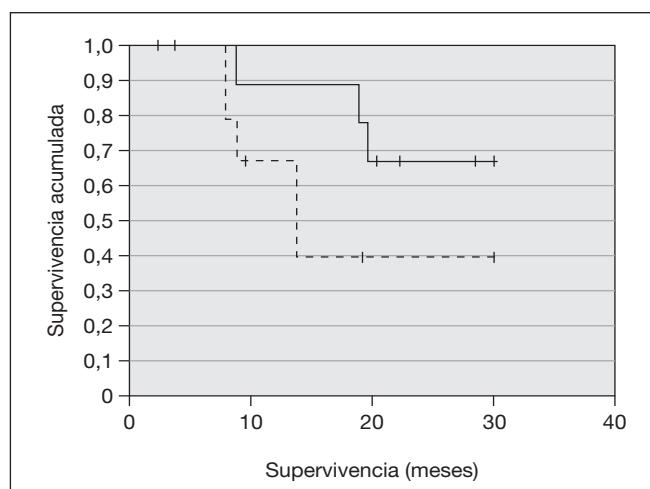
Característica	Casos (n)	Expresión media de la ANXA2 (% células teñidas)	IC del 95 %	p*
Casos totales	21	58	41-74	
Localización				
Faringe	13	50	28-71	0,22
Laringe	8	71	39-101	
Clasificación pT				
T1-T2	7	83	54-111	0,023
T3-T4	14	45	25-64	
Clasificación pN				
N0	8	77	52-102	0,054
N1-3	13	46	24-68	
Grado de diferenciación				
Bien diferenciado	11	87	74-99	< 0,001
Moderadamente diferenciado	6	31	7-56	
Pobemente diferenciado	4	18	-15-51	

IC: intervalo de confianza.

*ANOVA.

ro con S100A10 o un heterotetrámero²¹. La ANXA2 está presente en citoplasma celular en forma monomérica (la cadena pesada de 36 kDa o p36) o en un complejo con la cadena ligera de 11 kDa (p11), un miembro de la familia de la proteína S100. La ANXA2 tetramérica está compuesta por dos copias de la ANXA2 (p36) y dos copias de p11²¹. La formación del heterotetrámero resulta de la asociación de la ANXA2 tetramérica con la membrana plasmática. Aunque la función fisiológica de la ANXA2 no ha sido bien establecida, quizás participe en la exocitosis dependiente del calcio, la endocitosis y la adhesión entre células. Además, la ANXA2 como tetrámero en la superficie celular se ha demostrado que sirve como un receptor o proteína de unión para proteasas (la catepsina B, el plasminógeno y el activador tisular del plasminógeno) y proteínas de la matriz extracelular (colágeno y tenascina C). De esta manera, la ANXA2 como tetrámero puede participar en varios procesos biológicos como la activación del plasminógeno, la transducción de señal mediada por la tenascina C, la adhesión celular y las interacciones célula-matriz extracelular⁷.

El patrón de expresión de la ANXA2, que es distinto entre epitelio normal, epitelio hiperplásico, epitelio displásico y los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello invasivos, señala un papel específico para esta proteína en la carcinogénesis de cabeza y cuello. La expresión de la ANXA2 en las células tumorales invasivas está restringida principalmente a la superficie celular. Esta ANXA2 asociada a la membrana puede ser la forma tetramérica. Como se mencionó antes, se ha visto que la ANXA2 como tetrámero en la superficie celular es un receptor o proteína de unión para ligandos polipeptídicos, entre los que se incluye las proteasas y las proteínas de la matriz extracelular. De esta manera, la ANXA2 como tetrámero aporta uniones estructurales no sólo entre la célula y la matriz extracelular, sino también entre proteasas y moléculas de la matriz. Se ha señalado que la localización de las proteasas y los componentes de la matriz en la superficie celular a través de la

**Figura 2.** Supervivencia de los pacientes en función de la expresión de la anexina A2: por encima de la mediana (línea continua) y por debajo de la mediana (línea discontinua).

ANXA2 como tetrámero podría facilitar la remodelación de la matriz extracelular en procesos fisiológicos y patológicos⁷. De acuerdo con esa función, la sobreexpresión de la ANXA2 y el activador tisular del plasminógeno se ha demostrado en el cáncer de páncreas y se correlaciona con el potencial invasivo del tumor⁹. También se encontró que la sobreexpresión de la ANXA2 estaba relacionada con la invasividad y con peor pronóstico en los carcinomas colorrectal y gástrico^{13,22}. En contraste, se ha relacionado la ANXA2 con la supresión tumoral y la inhibición de la migración celular en el cáncer de próstata¹⁶. Nosotros mostramos que la mayor expresión de ANXA2 se da en los casos más diferenciados y menos invasivos. Los tumores pobemente diferenciados y más invasivos muestran la menor expresión de la proteína. Además, una menor expresión de la ANXA2 se ha correlacionado con estadios tumorales avan-

zados, metástasis linfáticas y menor supervivencia. Tomados juntos, estos hallazgos indican que una reducida, en vez de elevada, expresión de la ANXA2 se relaciona con la invasividad en el cáncer de cabeza y cuello. Estos resultados concuerdan con datos recientes de que la expresión de la ANXA2 está disminuida en el carcinoma escamoso esofágico, y esta disminución de expresión tiene relación con tumores moderada y pobemente diferenciados²³.

Nuestros resultados hacen preguntarse si los cambios en la expresión de la ANXA2 tienen un papel etiológico en la carcinogénesis de cabeza y cuello o son mera consecuencia de cambios en el índice proliferativo o estados de diferenciación de los tumores. La pérdida de expresión de esta proteína en el epitelio displásico y algunos carcinomas epidermoides de cabeza y cuello presumiblemente sea una consecuencia, más que un factor etiológico, y esto se correlaciona con la pérdida de la diferenciación epitelial y la proliferación anormal inherente a la tumorigénesis. Nuestra observación de que una expresión reducida de esta proteína está estrechamente relacionada con cambios histológicos (p. ej., alteraciones en la diferenciación y la proliferación) apoyan esta idea. Sin embargo, en el epitelio normal de cabeza y cuello, la expresión de la ANXA2 se detectó sólo en las capas de epitelio menos diferenciadas y proliferativas (basal y suprabasales). Es interesante que los patrones de expresión de la ANXA2 observados en el epitelio normal y en los carcinomas sean similares a los descritos de algunas moléculas de adhesión tales como la E-cadherina²⁴. Esto apunta a que la ANXA2 podría tener una función en la adhesión celular del epitelio del tracto aerodigestivo superior. Esto también explicaría la relación entre la disminución de la ANXA2 en los carcinomas poco diferenciados y con metástasis.

En resumen, en este estudio preliminar hemos descrito por primera vez que la ANXA2 se expresa en la membrana celular de los carcinomas de cabeza y cuello, pero no en el epitelio displásico, y nuestros resultados indican que la ANXA2 podría tener un importante papel en la diferenciación celular escamosa. Estudios adicionales para establecer el papel patogénico de esta proteína en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello están en curso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*. 2002; 82:331-71.
2. Fernandez MP, Morgan RO. Structure, function and evolution of the annexin gene superfamily. En: *Annexins: Biological importance and annexin-related pathologies*. Bandorowicz-Pikula J, editor. Georgetown: Landes Bioscience; 2003. p. 21-37.
3. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*. 2000;24:227-35.
4. Xin W, Rhodes DR, Ingold C, Chinaiyan AM, Rubin MA. Dysregulation of the annexin family protein family is associated with prostate cancer progression. *Am J Pathol*. 2003;162:255-61.
5. Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, et al. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res*. 2001;61:889-95.
6. Wu W, Tang X, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19:319-26.
7. Mai J, Waisman DM, Sloane BF. Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477:215-30.
8. Roseman BJ, Bollen A, Hsu J, Lamborn K, Israel MA. Annexin II marks astrocytic brain tumors of high histologic grade. *Oncol Res*. 1994;6:561-7.
9. Paciucci R, Tora M, Diaz VM, Real FX. The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro. *Oncogene*. 1998;16:625-33.
10. Frohlich M, Motte P, Galvin K, Takahashi H, Wands J, Ozturk M. Enhanced expression of the protein kinase substrate p36 in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biol*. 1990;10:3216-23.
11. Cole SP, Pinkoski MJ, Bhardwaj G, Deeley RG. Elevated expression of annexin II (lipocortin II, P36) in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer*. 1992;65:498-502.
12. Schwartz-Albiez R, Koretz K, Moller P, Wirl G. Differential expression of annexins I and II in normal and malignant human mammary epithelial cells. *Differentiation*. 1993;52:229-37.
13. Emoto K, Yamada Y, Sawada H, Fujimoto H, Ueno M, Takayama T, et al. Annexin II overexpression correlates with tenascin-C overexpression. A prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2001;92:1419-26.
14. Chiang Y, Davis RG, Vishwanatha JK. Altered expression of annexin II in human B-cell lymphoma cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1313: 295-301.
15. Menell JS, Cesarman GM, Jacobina BS, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA. Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1999;340:994-1004.
16. Liu JW, Shen JJ, Tanzillo-Swartz A, Maldonado CM, Person MD, Lau SS, et al. Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration. *Oncogene*. 2003;22: 1475-85.
17. Rodrigo JP, García Pedrero JM, Pena E, Fernández MP, Morgan RO, Suárez C, et al. Expresión de las anexinas A1 y A2 en la mucosa del tracto aerodigestivo superior. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2004;55:310-4.
18. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, et al. The EnVisionTM + system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMateTM, CSA, LABC and SABC techniques. *J Clin Pathol*. 1998;51:506-11.
19. Van Diest PJ, Van Dam P, Henzen-Lomgams SC, Bernd E, Van der Burg ME, Green J, et al. A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. *J Clin Pathol*. 1997;50:801-4.
20. 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.
21. Waisman DM. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem*. 1995;149:301-22.
22. Emoto K, Sawada H, Yamada Y, Fujimoto H, Takahama Y, Ueno M, et al. Annexin II overexpression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma. *Anticancer Res*. 2001;21:1339-45.
23. Zhi H, Zhang J, Hu G, Lu J, Wang X, Zhou C, et al. The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2003;106:327-33.
24. Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suárez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer*. 2002; 38:1059-64.