

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA BUCOFACIAL**



**“Estudio de metilación en lesiones  
orales potencialmente malignizables.  
Estudio piloto”**

**Trabajo de Investigación**

**Rocío Díez Pérez**

**Director: Profesor Antonio Bascones Martinez**

**Madrid, 2011**

# **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Antonio Bascones-Martínez, por sus consejos y por compartir desinteresadamente sus amplios conocimientos y experiencia. Agradecerle su paciencia y su disponibilidad.

Al Dr. Israel Ampuero y a todo su equipo, por su generosa y desinteresada ayuda y por su colaboración sin ponerme impedimentos.

A mi familia y amigos por todo el apoyo y cariño que me han brindado.

# INDICE

I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....	2
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	13
III. MATERIAL Y MÉTODOS:.....	15
III.1 MATERIAL	
III.1.1 Selección de pacientes.....	16
III.1.2 Material quirúrgico.....	16
III.1.3 Material de laboratorio.....	16
III.2 MÉTODOS	
III.2.1 Criterios de inclusión.....	20
III.2.2 Toma de biopsias y tratamiento de las muestras.....	21
III.2.3 Extracción del ADN.....	22
III.2.4 Detección de metilación.....	23
III.2.5 Análisis estadístico.....	27
IV. RESULTADOS.....	29
V. DISCUSIÓN.....	38
VI. CONCLUSIÓN.....	45
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	47
VIII. ANEXO I.....	52
IX. ANEXO II.....	54
X. ANEXO III.....	56

# I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados y tiene por tanto gran trascendencia. El cáncer de cabeza y cuello representa el 5-10% de los procesos malignos y en las últimas décadas se ha observado un aumento significativo de la incidencia de cáncer oral y su mortalidad asociada en Europa, sobretodo en la población más joven (1). La mayoría de los tumores malignos de la cavidad oral son carcinomas de células escamosas (COCE) (Fig.1), siendo este el tumor maligno más común de cabeza y cuello, con alta morbilidad y normalmente fatal (2).

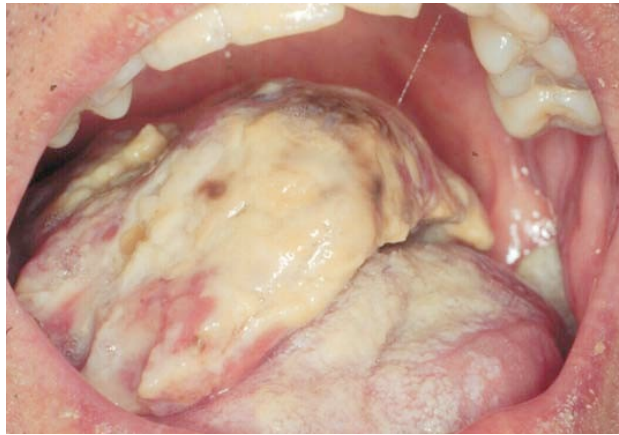


Figura 1: Carcinoma oral de células escamosas (COCE).

Esta agresiva neoplasia epitelial está asociada a una severa morbilidad y menos del 50% de supervivencia a largo plazo a pesar de los avances en el tratamiento quirúrgico, así como de radioterapia y quimioterapia.

Normalmente, estos procesos malignos, van precedidos de lesiones previas potencialmente malignas de las cuales la más común es la leucoplasia (Fig. 2). Esta se describe como una lesión predominantemente blanca de la mucosa oral que no puede caracterizarse o catalogarse como ninguna otra lesión bien definida y, si no se trata, entre el 10-15% de estas lesiones derivará en cáncer oral en poco tiempo (3).



Figura 2: Leucoplasia oral.

Hasta un 10% de los pacientes con leucoplasia tienen un carcinoma invasivo en la lesión (4). La prevención de la malignización de las leucoplasias se hace indispensable teniendo en cuenta la baja supervivencia del cáncer oral sobre leucoplasias, ya que solo del 30-40% de los pacientes alcanzan una supervivencia de 5 años después del diagnóstico (3).

El tabaco es un factor etiológico de gran importancia en el cáncer. El tabaco (incluyendo sus variantes fumado y mascado) es la primera causa de cáncer oral en el mundo. Las lesiones de COCE, leucoplasia y fibrosis oral submucosa (inflamación y fibrosis progresiva del tejido conectivo) están relacionados con el hábito de masticar betel (5) así como con el consumo de tabaco fumado, en el que además se correlaciona directamente con el tiempo que el paciente ha fumado a lo largo de la vida y el número de cigarrillos diarios (6). En cuanto a lesiones potencialmente malignas, en pacientes fumadores la prevalencia de leucoplasia oscila entre un 3,7% y 60,3% (7), aunque también hay otros factores predisponentes implicados en el desarrollo de cáncer,

además del tabaco, como son alcohol, sexo, edad e infección por el virus del papiloma humano (8,9).

La carcinogénesis es un proceso multipaso en el que las células acumulan cambios en su material genético dando paso a una evolución inesperada de la función celular. Algunos de estos cambios no se pueden atribuir a una modificación en la secuencia de ADN como la delección o mutación, siendo estos los llamados cambios epigenéticos.

Como concepto dentro de la genética, la epigenética consiste en la regulación heredable de la expresión génica sin cambio en la secuencia de nucleótidos. Esto se debe a que determinadas modificaciones químicas en el ADN, y sus proteínas asociadas, pueden alterar la expresión génica sin alterar la secuencia del ADN (10). Uno de los procesos más importantes es la metilación, que es considerada como uno de los mecanismos epigenéticos con mayor implicación en la regulación de la expresión génica en los cánceres humanos (11). Además, antes se pensaba que se necesitaba una alteración de ambos alelos de un gen para que se produjera la silenciación del mismo pero hoy en día se ha visto que en ausencia de estas alteraciones se puede silenciar un gen tan solo con la alteración heterocigótica de uno de los alelos del gen. El cáncer (al igual que el envejecimiento) podría ser mediado por una acumulación gradual de cambios epigenéticos (12).

La metilación se produce en las citosinas de los pares de nucleótidos CpG (Cytosine and Guanine separated by phosphate) que se encuentran agrupados formando islas (CpG islands) preferentemente en las regiones promotoras y los primeros exones

de genes codificadores de proteínas. Estas citosinas no se encuentran metiladas en condiciones normales por lo que la alteración de este estado provocará alteraciones en la transcripción de estos genes. El grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) se añade a los nucleótidos de citosina de estas áreas específicas mediante la enzima ADN-metiltransferasa, inhibiendo de este modo la expresión de esa porción del gen. En los genes que suelen estar relacionados con el crecimiento celular, reparación del ADN, adhesión celular, metástasis... y que están activos en células normales, aparecen silenciados de alguna forma en estado de pre-cáncer y cáncer (12). La presencia de metilación de las islas CpG se da con alta frecuencia en células malignas en las que no se produce apoptosis (13) y también se ha asociado a la inhibición de la transcripción de determinados genes supresores de tumores. Esta metilación aberrante se da durante el proceso de carcinogénesis, y es por tanto, una característica común de muchos cánceres humanos, aunque el mecanismo responsable de esta alteración todavía no ha sido dilucidado.

Existen varios genes en los que se ha ido estudiando los efectos de un estado de metilación aberrante en los últimos años, extrayendo, según cada estudio, material genético de células tumorales, células de lesiones potencialmente malignizables, células en suero y tejido sano adyacente a la lesión tumoral. Esto se debe a que la metilación es un proceso que se puede encontrar tanto en lesiones tumorales como en estadios previos e incluso en tejido clínica e histológicamente sano, lo que nos puede llevar a pensar que la metilación es un proceso precoz en la carcinogénesis oral y podría ser utilizado como marcador inicial de la enfermedad (14). La metilación, en el campo que nos ocupa, ha sido analizada en diferentes tipos de muestras: en tumores de cabeza y cuello dando mayor importancia a la región oral y en especial al COCE; lesiones potencialmente malignizables como la leucoplasia, el liquen plano o diversos grados de displasia;

muestras de saliva como medio acuoso que recoge la descamación de la lesión y mucosa sana para establecer comparaciones con un estado de enfermedad.

El tamaño muestral de los estudios disponibles en la literatura es muy variable, de hecho hemos encontrado estudios cuyo tamaño muestral consta de 95 (2) u 80 pacientes con tumores primarios de cabeza y cuello (8) y otros estudios con tan solo 14 pacientes con COCE o displasia severa como muestra (15). La determinación del estado de metilación de los genes promotores también ha mostrado utilidad en la detección de lesiones de COCE con muestras de saliva en análisis en tiempo real y de los márgenes tumorales durante la cirugía (16). De hecho, en los estudios analizados se ha obtenido una correlación del 42% (2) 62,5% (15) y 65% (16) para metilación entre el análisis de muestras tumorales y muestras de saliva; no encontrándose alteraciones en el ADN sérico en ningún paciente que no tuviera también alteraciones en el ADN tumoral (16). Por otro lado se obtuvieron resultados estadísticamente significativos (pese a la pequeña muestra) para un resultado positivo en ADN sérico (en pérdida de heterocigosidad o existencia de nuevos alelos) como factor predictivo de futuras metástasis a distancia (17). El ADN sérico en pacientes con cáncer ya se había detectado con anterioridad: Así Saphiro y cols (18) detectaron que la cantidad de ADN en suero de pacientes con cáncer era cuatro veces mayor que la de pacientes sanos, habiendo determinado previamente León y cols (19) que el ADN sérico era el doble en pacientes con metástasis a distancia que en pacientes sin signos de la misma. Pero los estudios con muestras séricas o de lesiones potencialmente malignizables tienen menor tamaño muestral que los estudios con lesiones tumorales, y esta discrepancia en el tamaño muestral de los estudios, junto con los diferentes tipos de la muestra, complica la labor de aunar resultados y comparar los mismos de modo que pueda establecerse una relación clara entre la metilación y la carcinogénesis.

Se ha estudiado la metilación aberrante en numerosos genes intentando determinar algún tipo de nexo claro entre este mecanismo epigenético y el proceso de carcinogénesis, y de entre todos los genes estudiados dos de ellos parecen destacar en esta relación, aunque con disparidad de resultados en algunos casos y dependiendo del tipo de estudio:

### ***p16INK4a***

Gen supresor tumoral cuya inactivación de p16INK4a por metilación de la región promotora u otras alteraciones genéticas es observada en casi todos los tumores de cabeza y cuello. En cuanto al cáncer de cabeza y cuello, existe un resultado positivo para metilación de este gen en un 17-43% de líneas celulares en cáncer de la cavidad oral y en un 23-67% de tumores primarios. En el caso de lesiones tumorales de cabeza y cuello, varios estudios han resaltado un aumento significativo en el porcentaje de metilación de este gen (2, 8, 15, 16, 20, 21), con valores oscilando entre 76% y 27% respecto a valores de 0% obtenidos de estudios analizando mucosa oral de pacientes sanos. Aún así, se ha detectado hasta un 27,27% de muestras con metilación positiva en un estudio (20) a partir de 22 muestras de mucosa sana peritumoral; hecho que daría pie a pensar que la metilación de p16INK4a podría ser un evento precoz en la carcinogénesis, y por tanto ser utilizado como factor pronóstico y diagnóstico.

Correlacionado con este hallazgo, hay estudios que han analizado la metilación de p16INK4a en lesiones potencialmente malignizables como la leucoplasia y liquen plano. En este caso no se detectó ninguna asociación entre la malignización de la lesión y la metilación de este gen para lesiones de liquen plano (22), al contrario que para

leucoplasia, en la que la metilación de p16 parece estar relacionada de forma significativa con su malignización, sobretodo si se asocia a hábitos tabáquicos, al contrario que si se asocia con hábitos alcohólicos (23). También se ha hallado correlación entre la metilación de p16INK4 $\alpha$  y un mayor grado de displasia de la lesión (22, 23, 24, 25), aunque en otro estudio los pacientes en los que se había detectado metilación de p16INK4 $\alpha$  presentaban distintos intervalos entre la presentación de la metilación y el desarrollo del COCE, lo que parece no correlacionar la metilación de este gen con el estado anatómico-patológico de la lesión (26). Los resultados en el análisis de lesiones potencialmente malignizables y su evolución en relación con la metilación encuentran algunas controversias entre estudios. Por otro lado, se ha observado una mayor tasa de metilación (hasta cuatro veces más) en pacientes histológicamente sanos pero previamente tratados de COCE indicando por tanto una mayor predisposición a una recurrencia del tumor (23).

La metilación de este gen ha sido analizada en muestras de saliva en algunos estudios (2, 15, 16, 24) y se han obtenido porcentajes de entre 31% y 87,5% de metilación de p16INK4 $\alpha$  en muestras de ADN sérico en pacientes con lesiones de leucoplasia y COCE. Estos niveles, que superan los obtenidos de la muestra tumoral, pueden deberse a que la cantidad de ADN sérico es hasta cuatro veces superior en pacientes con cáncer que en pacientes sanos (27) y por tanto suponer una vía de detección de metilación eficaz y no invasiva respecto a la biopsia; aún así estos resultados han sido obtenidos de estudios con pacientes con cáncer, salvo uno que fue realizado en 34 pacientes con leucoplasia (24). Finalmente algunos estudios tomaron muestras de folículos pilosos para estudiar la relación de la metilación con la

localización de la lesión (23, 24) determinando que la metilación de p16INK4 $\alpha$  se relaciona con la región de aparición de la lesión.

De forma paralela al COCE, también se ha estudiado la metilación de p16INK4 $\alpha$  en carcinoma mucoepidermoide de glándulas salivares (21) y se ha observado que la metilación de este gen (34,3% de las muestras) no parece tener suficiente relación con la patogenia de este tipo de cáncer, al contrario que la delección homocigótica de este mismo gen.

***MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase).***

Gen reparador de ADN que se ha observado inactivo en cáncer de pulmón y colon. Este gen al igual que p16 ha sido ampliamente estudiado en cáncer de cabeza y cuello en general y COCE en particular. La metilación de este gen se ha observado en COCE primarios en un 25-52% de las muestras. Los estudios de detección de metilación de MGMT a partir de muestras de tejido tumoral observaron porcentajes de metilación entre un 23% a un 56,4% (2, 15,16, 20, 22, 28) frente a un 9% que se detectó en mucosa oral de pacientes sanos (22).

En el caso de cáncer de glándulas salivares los datos son más confusos, ya que en lesión tumoral la metilación de MGMT es observada en el estudio de Lee y cols. en menos del 20% a partir de 5 líneas celulares y 69 muestras humanas de carcinoma de glándulas salivares, y en mucosa sana hasta en un 15% de las muestras (29).

Por otro lado, se ha observado un porcentaje de metilación para MGMT de entre 68% y 73% de las muestras de mucosa sana perilesional (20, 28), y de 56% y 80% en

muestras de leucoplasia (22, 24, 28) por lo que al igual que ocurría con p16, parece ser que la metilación de MGMT se relaciona con un estadio temprano de la lesión, y podría ser utilizado como factor pronóstico o diagnóstico. De hecho, se observó que la metilación de los genes MGMT se encuentra en lesiones de bajo grado de displasia e incluso en mucosa esofágica clínicamente normal sin lesión histológicamente detectable (22).

En cuanto a los estudios que utilizan muestras de saliva analizando este gen (2, 15, 16, 24), se obtuvieron porcentajes de metilación de entre 48% a 62%, resultando ser un método en principio eficaz en la detección de la metilación para este gen. El bloqueo de MGMT se ha visto relacionado con un estado avanzado de la lesión, metástasis ganglionar, mal pronóstico y hábitos tabáquicos, además de aumentar la inestabilidad genética en lesiones potencialmente malignizables orales (28).

En la relación de estos dos genes, p16INK4 $\alpha$  y MGMT, con otros tumores, se ha observado que la metilación de p16 se ha detectado también en hepatocarcinomas en un 24% viéndose que la inexpressión de este gen se asocia más a tumores de alto grado de malignidad que los de bajo grado; por tanto p16INK4 $\alpha$  parece estar relacionado con un fenotipo de malignidad de este tumor hepático (30). Por otro lado MGMT se encuentra inactivado por metilación con frecuencia en cáncer cerebral, de pulmón y colorrectal, así como en linfomas (31). Se ha descrito que existe una tendencia al aumento de detección de metilación conforme lo hace el grado de displasia epitelial, siendo más patente este aumento en el cambio de displasia leve a displasia severa (22). De hecho la metilación de MGMT ha sido detectada en mucosa oral peritumoral así como en hiperplasia epitelial y displasia (porcentaje de metilación más alta

en esta última). Se sugiere por tanto que la metilación de estos genes es un evento temprano en la carcinogénesis oral (28).

En cuanto a la relación con el hábito tabáquico, en lo referente al cáncer oral, la metilación de p16INK4 $\alpha$  parece estar asociada con el hábito tabáquico, ya que la exposición al tabaco induce, directa o indirectamente, daño en las islas CpG de determinados genes eliminando mecanismos protectores o induciendo la actividad de la ADN-metiltransferasa. De este modo, se podría decir que el tabaco juega un importante papel en la metilación de estos genes y el inicio temprano de este hábito así como su intensidad (cigarrillos fumados por año) aumenta la probabilidad de metilación de p16INK4 $\alpha$ , en cáncer de cabeza y cuello (8). Por otro lado no se detectó ninguna relación entre la metilación de estos genes y el hábito alcohólico (8). De hecho la metilación de p16INK4 $\alpha$  se ha llegado a encontrar en mucosa oral de pacientes sanos fumadores sin antecedentes de lesiones potencialmente malignizables, entre un 1-15% de las muestras analizadas (16, 32).

Parece ser que la mucosa sana que se analiza en pacientes con COCE también presenta metilación de MGMT y p16INK4 $\alpha$  por lo que podrían servir de marcadores de la enfermedad considerándose un evento primario en la carcinogénesis que permanece en el tiempo y se hereda en la división celular, aumentando la capacidad de recurrencia del tumor en pacientes ya tratados de un tumor primario (20, 23, 24).

## II. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

### OBJETIVOS

# **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Como se puede observar en la literatura la región promotora de algunos genes involucrados en la supresión tumoral aparece anormalmente metilada en lesiones de COCE, y del mismo modo, aunque en menor medida, dichos genes podrían hallarse metilados en estadios previos (lesiones potencialmente malignizables) de forma detectable e incluso pudiendo encontrar diferencias significativas al comparar el grado de metilación de estas lesiones pre-malignas con mucosa sana adyacente perilesionar.

## **OBJETIVOS**

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar la detección de metilación de los genes p16INK4 $\alpha$  y MGMT en muestras de tejido a partir de biopsias de lesiones potencialmente malignizables de leucoplasia oral y mucosa normal adyacente a la lesión.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Comparar la presencia de metilación entre las muestras de leucoplasia y mucosa sana y establecer si existen diferencias significativas entre ambos tipos de tejidos.
- 2.- Observar si influyen en dichas diferencias las características del paciente y de la lesión (factores de confusión).

# III. MATERIAL Y MÉTODOS

## III.1 MATERIAL

Para la realización del presente estudio piloto se dispuso del siguiente material:

### **III.1.1 Selección de pacientes**

Ocho pacientes que acudían a la clínica de Medicina Oral, en el Departamento de Estomatología III, Universidad Complutense de Madrid, con indicación de biopsia de al menos una lesión de leucoplasia fueron seleccionados para el presente estudio. Todos fueron informados del procedimiento y todos otorgaron su consentimiento por escrito.

### **III.1.2 Material quirúrgico**

Material del que se dispuso para la toma de biopsias:

- Mango y hojas de bisturí del número 15.
- Pinzas Adson sin dientes.
- Portaagujas tipo mayo.
- Sutura no reabsorbible (4.0).
- Gasas.
- Tijeras para cortar la sutura.

### **III.1.3 Material de laboratorio**

Para el transporte y almacenamiento de las muestras se dispuso de:

- Transportadores de plástico *Cryomold® Standard* (Tissue-Tek, Sakura, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) (Fig.3).
- Gel de alcohol de polivinilo OCT<sup>TM</sup> (Tissue-Tek, Sakura, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) (Fig.3).
- Recipiente con nitrógeno líquido.



Figura 3: Transportadores y gel usados para almacenar las muestras

Para el análisis del grado de metilación de las muestras se dispuso de:

- Extracción de ADN: Kit *DNeasy® Blood and Tissue kit* (QUIAGEN, Hilden, Germany).
- PCR para metilación: kit *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* (ZYMO RESEARCH, California, USA).
- Limpieza de ADN: Kit *Montage®PCR Centrifugal Filter Devices* (Millipore, Massachusetts, USA)
- Primers *Sigma-aldrich®* (New York, USA).
- Espectrofotómetro: Modelo Zuzi UV-4200 (Barcelona, Spain) (Fig. 4).



Figura 4: Espectrofotómetro

- Lámpara de luz ultravioleta (UV) para lectura de geles de agarosa (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) conectada a un ordenador para obtener la imagen del gel (Fig. 5).



Figura 5: Cámara de luz UV conectada un ordenador.

- Secuenciador (ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER, Applied Biosystems, California, USA) conectado a un ordenador con un software para la secuenciación (Sequencing Analysis v5.2) (Fig. 6).

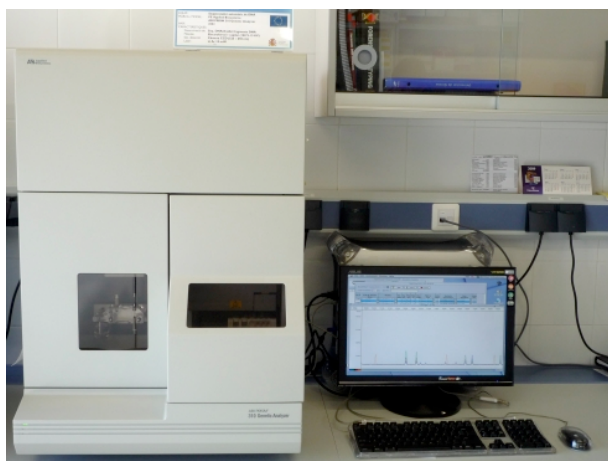


Figura 6: Secuenciador conectado a un ordenador.

- Termociclador: Modelo TC-512 2HS-Block (Techne, Guadalajara, Mexico)  
(Fig. 7).



Figura 7: Termociclador.

## III.2 MÉTODOS

### **III.2.1 Criterios de inclusión**

Para la realización de este estudio se seleccionaron ocho pacientes del Departamento de Medicina Oral que fueran mayores de 18 años y que tuvieran al menos una lesión diagnosticada clínicamente como leucoplasia con indicación de biopsia:

- Presencia de la lesión más de 15 días.
- No ser atribuida a ningún factor etiológico: traumatismo, quemadura...
- Leucoplasia diagnosticada clínicamente como Tipo I según la clasificación de Amagasa y cols. (33) (Tabla 1).

TIPO	CARACTERÍSTICAS DE LA LEUCOPLASIA
I	Lesión homogénea de color blanco y no sobreelevada
II	Lesión plana y blanca con áreas de erosión y zonas eritematosas
III	Lesión blanca ligeramente elevada
IV	Lesión blanca elevada

Tabla 1: Clasificación clínica de las leucoplasias orales.

Se realizaron los siguientes procedimientos:

- Autorización del Comité de Bioética del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Anexo I).
- Información sobre las características y objetivos del estudio y obtención del consentimiento informado (Anexo II).
- Datos demográficos e historia clínica previa y actual que incluía antecedentes personales e historia farmacológica.

### **III.2.2 Toma de biopsias y tratamiento de las muestras**

De los ocho pacientes seleccionados se obtuvo una muestra de la lesión y una muestra de mucosa sana perilesionar. Ambos tipos de biopsia se realizaron de forma excisional con bisturí y realizando sutura de la herida en caso que fuera necesario.

Estas muestras fueron colocadas en los transportadores plásticos transparentes y se embebieron en un gel hasta cubrir el tejido por completo, sin haber sido manipuladas anteriormente. Cada transportador de plástico con la muestra de tejido y el gel se sumergía inmediatamente en nitrógeno líquido y eran trasladadas al laboratorio para su conservación en congeladores a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (24).

Para el posterior análisis de las muestras se siguió el siguiente protocolo:

Cada una de las biopsias tomadas se dividió en dos, conservándose una de las dos mitades del tejido a  $-80^{\circ}\text{C}$  por si se necesitara repetir el procedimiento. Esta división se realizó colocando el transportador de plástico en un bloque de plástico congelado recubierto de papel de aluminio que se cambiaba en cada muestra para que no hubiera contaminación del ADN. La sección de la muestra se realizó con un bisturí con una hoja nº 15 estéril que se limpiaba con alcohol a una concentración de 100% entre muestra y muestra.

Cada muestra de tejido que finalmente se utilizó para el análisis fue colocada en un tubo tipo ependorf a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas para iniciar su descongelación. Y posteriormente se conservaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### III.2.3 Extracción del ADN

Una vez descongeladas las muestras de tejido se procedió a la extracción del ADN de cada una de ellas con el kit *DNeasy® Blood and Tissue kit* (QUIAGEN); brevemente: Se colocó el tejido en un tubo de 1.5ml y se añaden 180µl de buffer (ATL) y 20µl de proteinasa K, se vortea y se conservó a 56°C durante 24 horas de forma que se completara la lisis tisular. Posteriormente se realizaron una serie de lavados con 200 µl de otro buffer (AL) y con 200µl de etanol vorteaando las muestras entre medias y con 500µl de buffer AW1 y buffer AW2 centrifugando las muestras posteriormente a 8000rpm durante 1 minuto y a 14000rpm durante 3 minutos respectivamente. Finalmente se añadieron 200µl de buffer AE y se centrifugó 1 minuto a 8000rpm. De este modo conseguimos eliminar restos tisulares y obtener el material lo más limpio posible. La última dilución de cada muestra se conservó a 4°C hasta su análisis.

Con ayuda de un espectrofotómetro se calculó la concentración de ADN de cada muestra a partir de la absorbancia. Dicho instrumento fue calibrado previamente por el mismo operador que realizó las mediciones.

Calibración del espectrofotómetro: El ADN se detecta a una longitud de onda de 260nm y antes de utilizarlo debe calibrarse de modo que cuando se coloca una muestra de agua (no contiene ADN) el valor a dicha longitud de onda sea igual a cero. La calibración se realizó con agua destilada desionizada para que el control fuera lo más puro posible. El espectrofotómetro nos mostró la absorbancia de cada una de las muestras a partir de 2µl de ADN en 1000µl de agua. Con dicho valor se calculó la concentración de ADN en ng/µl de forma aproximada. Este cálculo se realizó con las

muestras test (lesión de leucoplasia) y con las muestras control (mucosa sana perilesionar) (Tabla 2).

PACIENTE	MUESTRA TEST	MUESTRA CONTROL
1	150	150
2	125	125
3	75	125
4	150	150
5	75	100
6	100	125
7	75	175
8	175	275

Tabla 2: Concentración de ADN de cada una de las muestras (ng/ $\mu$ l).

### III.2.4 Detección de metilación

Genes estudiados:

- p16INK4 $\alpha$ : Gen supresor tumoral. Locus 9p21.
- MGMT: (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*). Gen reparador de ADN.

Locus:10q26.

La metilación se puede estudiar y detectar en el ADN gracias a la MSP (methylation-specific PCR). Esta es una PCR especial para detectar metilación en el ADN tanto de tejido como en saliva, plasma, etc. Para llevarla a cabo se seleccionó el kit *EZ DNA Methylation-Gold<sup>TM</sup> Kit* (ZYMO RESEARCH), brevemente: Se introdujo cada muestra de ADN en bisulfito de sodio (NaHSO<sub>3</sub>) de modo las citosinas no metiladas se transforman en uracilo dejando las metiladas como citosinas (34);

diferenciando así bases metiladas y no metiladas. Una vez tratadas las muestras con bisulfito sódico se realizó la PCR. A partir del ADN tratado con bisulfito sódico, se realizan diluciones de modo que a la hora de realizar la PCR todas las muestras tuvieran la misma concentración.

Para la detección del grado de metilación en las zonas promotoras de ambos genes, p16INK4 $\alpha$  y MGMT, se diseñaron 3 primers (Tabla 3):

- Primer 1: Primer que se corresponde con la región promotora de cada gen sin alterar. Se diseñó a partir de la base de datos de genes *Ensemble* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) donde se selecciona la especie, el gen y la región: para el gen p16INK4 $\alpha$  en el locus 9p21 y para el gen MGMT en el locus10q26.
- Primer 2: Se corresponde con la secuencia de la región promotora metilada: Este primer se diseñó a partir de un programa “*Methyl Primer Express*” (CNIO, Madrid, Spain) diseñado para calcular la secuencia que equivaldría a la opción más probable de bases metiladas de dicha región.
- Primer 3: Primer que se corresponde con la secuencia de la región promotora no metilada. Se diseñó con el mismo programa que el primer 2.

En la literatura se ha observado que es mejor la síntesis de primers para amplificar la región metilada y no metilada por separado con una temperatura de anillamiento (35). Cada uno de los primers se encargó en ambos sentidos: *forward* y *reverse*. Para su uso, estos primer se diluyeron en buffer a una concentración de 100 $\mu$ M.

GEN	PRIMER	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')	T° DE ANILLAMIENTO
P16IN K4 $\alpha$	1. Normal	GAAGAAAGAGGAGGGGTT GG	CTACAAACCTCTACCCAC C	60°C
	2. Metilado	TTATTAGAGGGTGGGGCG GATCGC	GACCCGAACCGCGACCGT AA	62°C
	3. No metilado	TTATTAGAGGGTGGGGTG GATTGT	CAACCCCAAACCACAACC ATAA	62°C
MGMT	1. Normal	GGATATGTTGGGATAGTT	CCAAAAACCCCAAACCC	52°C
	2. Metilado	TTTCGACGTTTCGTAGGTTT TCGC	GCACTCTTCCGAAAACGA AACG	59°C
	3. No metilado	TTTGTGTTTTGATGTTTGT AGGTTTTTGT	AACTCCACACTCTTCCAAA AACAAAACA	65°C

Tabla 3: Secuencia de los primers utilizados en el estudio.

La temperatura de anillamiento (*annealing*) depende del número de enlaces que se tienen que romper/formar en la PCR. Las C y G tienen 3 enlaces y T y A tienen 2 por lo que secuencias con mayor cantidad de C y G (como las regiones promotoras que estudiamos) necesitarán mayor temperatura para romper los enlaces. Esta temperatura se calcula:  $T^{\circ} = (C+G)4 + (A+T)2$ .

Con estos primers se realizó una PCR nido en dos pasos (Fig. 8).

1. PCR para amplificación de la región de interés con los primer 1 correspondientes a cada gen.
2. PCR para amplificación de las secuencias metiladas y no metiladas incluyendo un blanco (pocillo “control” con agua destilada y desionizada) para cada una de las PCR.

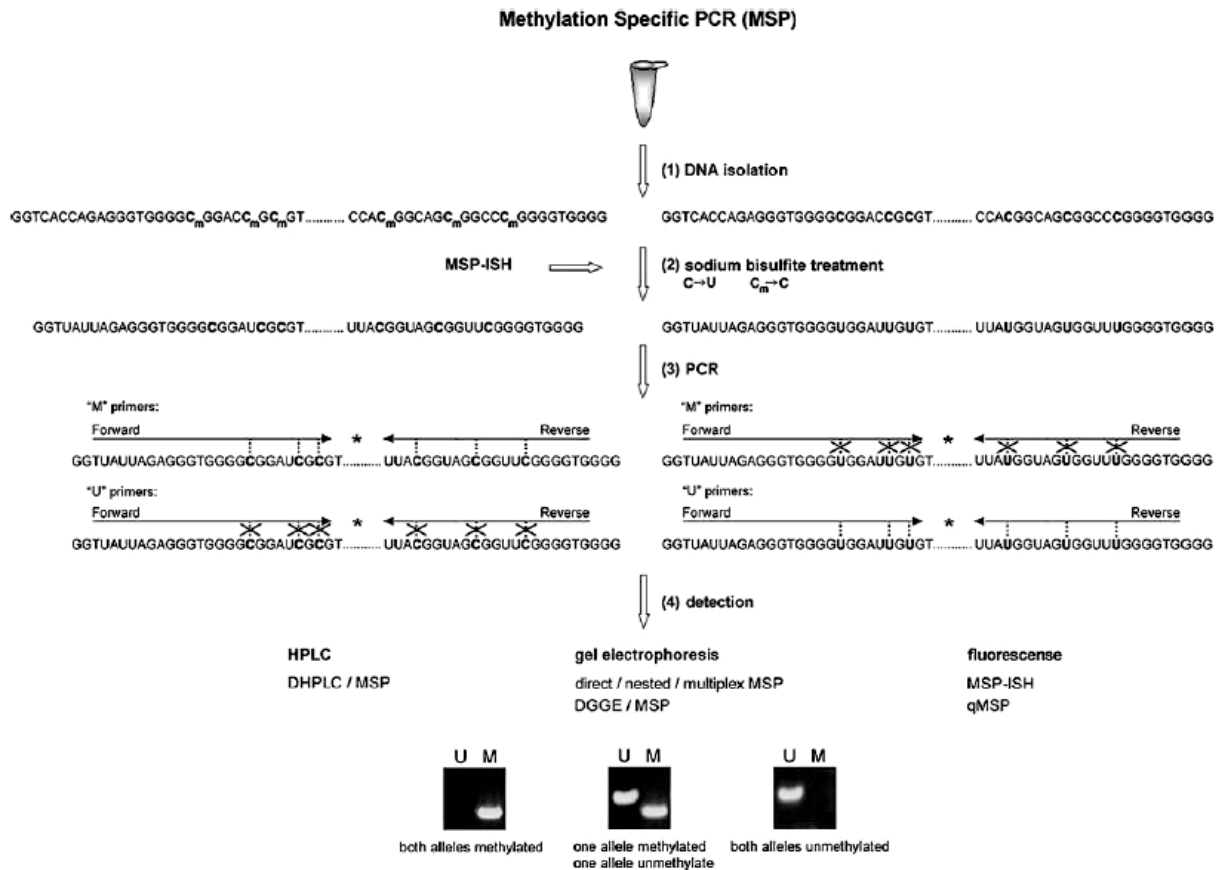


Figura 8: Esquema del proceso de MSP .

El producto de la segunda PCR se dispuso en un gel de agarosa al 3% para visualizar el producto de la PCR amplificado con primers para muestras metiladas y no metiladas. En este análisis se incluyeron 2 blancos por fila. El análisis de las bandas del gel de agarosa se realizó mediante su irradiación con luz ultravioleta y para ver la densidad de cada banda de ADN (a mayor peso, mayor densidad).

Las muestras que dieron diferencias en las bandas entre metiladas y no metiladas se secuenciaron; brevemente: Se procedió a la limpieza del ADN de las muestras con el kit *Montage®PCR Centrifugal Filter Devices* y se repitió la PCR esta vez con las bases (A,T,C,G) marcadas con fluorocromos para que posteriormente pudieran ser detectadas por el secuenciador y así establecer el orden de las bases de una secuencia determinada (Fig. 9).

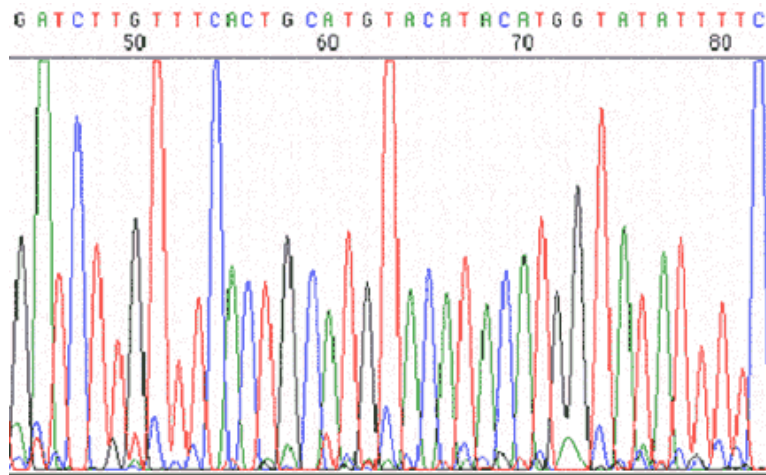


Figura 9: Gráfica resultado del análisis con secuenciador.

### III.2.5 Análisis estadístico

A partir de los pacientes seleccionados, se diseñó un estudio piloto transversal de casos y controles para comparar las diferencias en la tasa de metilación entre leucoplasia (casos) y mucosa sana perilesionar (controles).

Se analizaron las características de los pacientes del estudio: sexo, edad, raza y hábito tabáquico; así como las características clínicas de las lesiones biopsiadas: localización, tipo clínico y tamaño.

Una vez obtenidos todos los datos y realizadas las mediciones oportunas, se registraron en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel 2007 y el procesamiento y análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 15.0. (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

La evaluación de metilación se realizó según la “presencia / ausencia” de metilación de los genes p16INK4 $\alpha$  y MGMT en cada una de las muestras de leucoplasia (test) y mucosa sana (control). Con estos datos se obtuvo el porcentaje de muestras metiladas de ambos grupos y se realizó una comparación de proporciones.

Se evaluó si las diferencias existentes en el grado de metilación entre casos y controles podían atribuirse a las características del paciente o de la lesión.

## **IV. RESULTADOS**

## CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA:

### SUJETOS:

Distribución por raza: El 100% de los pacientes que participaron en el estudio eran de raza caucásica.

Distribución por edad: Todos los pacientes eran adultos de entre 40 y 80 años. Dos de ellos tenían 45 años, uno 50 años, dos 52 años, dos 57 años y una paciente 79 años (Fig. 10).

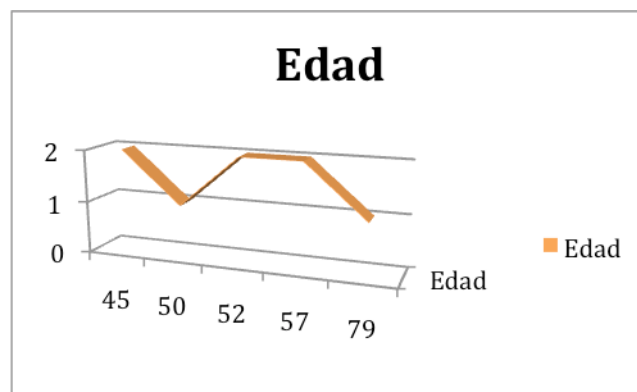


Figura 10: Distribución de la población por edad.

### Distribución por sexo:

El 62,5% (5/8) de la muestra eran mujeres y el 37,5% (3/8) hombres (Fig. 11).

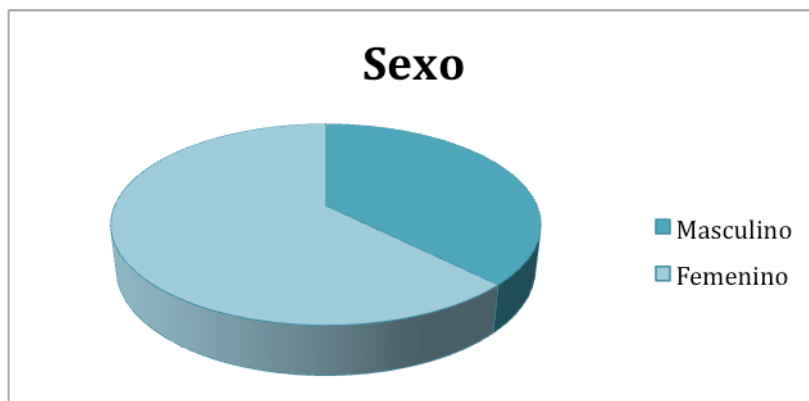


Figura 11: Distribución de la población por sexo.

### Distribución según el uso de tabaco:

Tres de los ocho pacientes eran fumadores y los tres consumían una media de 20 cigarrillos diarios. De los cinco pacientes restantes no fumadores, cuatro de ellos era exfumadores que habían dejado de fumar veinte e incluso treinta años antes del momento de la toma de las biopsias. Sólo uno de los pacientes no había consumido tabaco en ningún momento de su vida (Fig. 12).

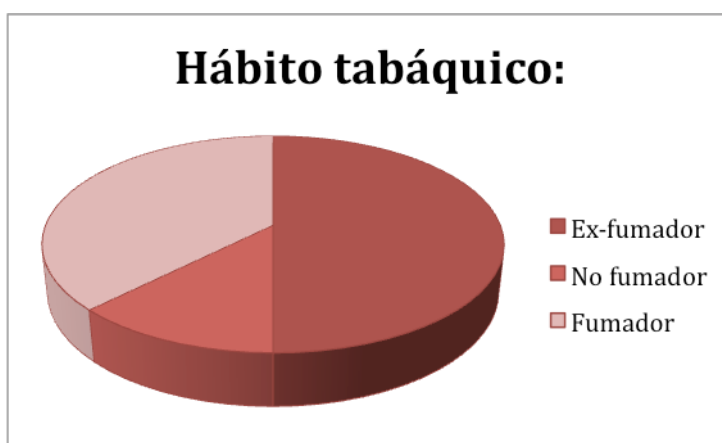


Figura 12: Distribución de la población según el hábito tabáquico.

### *LESIONES:*

#### Distribución según la localización de la lesión:

La localización de la lesión en los ocho pacientes del estudio es muy heterogénea. El 50% de las biopsias (4/8) se tomaron del reborde alveolar, el 25% (2/8) en la mucosa yugal, el 12,5% (1/8) en el límite entre paladar blando y paladar duro y un 12,5% (1/8) en el borde lateral de la lengua (Fig. 13).

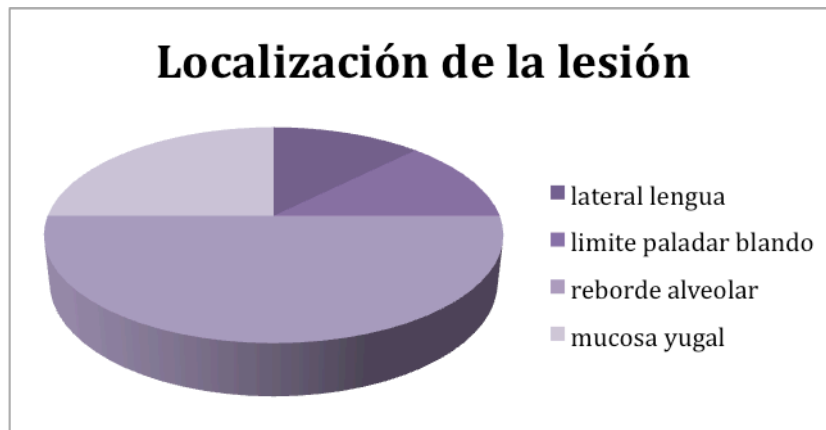


Figura 13: Distribución de las lesiones según su localización intraoral.

#### Distribución según el tamaño de la lesión:

La biopsia se realizó de manera excisional abarcando la lesión de leucoplasia en su totalidad. En cada leucoplasia se midió el diámetro y en aquellas lesiones que no siguieran un patron aproximadamente circular se tomó como medida el eje mayor. De las ocho lesiones biopsiadas, el 25% (2/8) tenían un diámetro de 2mm, el 37,5% (3/8) de 3mm, el 25% (2/8) de 4mm y sólo una lesión presentó una medida de 7mm (12,5%), siendo esta leucoplasia de forma irregular y alargada, y siendo la única lesión que se localizaba en el borde lateral de la lengua (Fig. 14).



Figura 14: Distribución de las lesiones según el tamaño .

Distribución según el tipo clínico: Según la clasificación descrita por Amagasa y cols. todas las lesiones biopsiadas en este estudio eran del tipo I (33).

#### *DETECCIÓN DE METILACIÓN:*

Los resultados del análisis de metilación de las muestras de leucoplasia están representados en la tabla 4.

PACIENTE	LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN	HÁBITO TABÁQUICO	METILACIÓN p16INK4 $\alpha$	METILACIÓN MGMT
1	Reborde alveolar	Exfumador	–	–
2	Mucosa yugal	Exfumador	–	–
3	Lateral de la lengua	No fumador	+	+
4	Paladar blando	Exfumador	–	–
5	Reborde alveolar	Fumador	+	+
6	Mucosa yugal	Exfumador	+	–
7	Reborde Alveolar	Fumador	–	–
8	Reborde Alveolar	Fumador	–	–

Tabla 4: Detección de metilación de p16INK4 $\alpha$  y MGMT en muestras de leucoplasia.

Los resultados del análisis de metilación de las muestras de mucosa sana están representados en la tabla 5.

PACIENTE	LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN	HÁBITO TABÁQUICO	METILACIÓN p16INK4 $\alpha$	METILACIÓN MGMT
1	Reborde alveolar	Exfumador	-	-
2	Mucosa yugal	Exfumador	-	-
3	Lateral de la lengua	No fumador	+	+
4	Paladar blando	Exfumador	-	-
5	Reborde alveolar	Fumador	+	-
6	Mucosa yugal	Exfumador	+	-
7	Reborde Alveolar	Fumador	-	-
8	Reborde Alveolar	Fumador	-	-

Tabla 5: Detección de metilación de p16INK4 $\alpha$  y MGMT en muestras de mucosa sana.

Se detectó metilación de la región promotora del gen p16INK4 $\alpha$  en el 37,5% (3/8) y del gen MGMT en el 25% (2/8) de las muestras de leucoplasia, mientras que en las muestras de mucosa sana adyacente a la lesión se detectó metilación del gen p16INK4 $\alpha$  en el 37,5% (3/8) y del gen MGMT en el 12,5% (1/8).

En el análisis de metilación mediante los gels de agarosa del gen p16INK4 $\alpha$  se obtuvo un resultado positivo en las muestras de leucoplasia y mucosa sana correspondiente a los pacientes 3, 5 y 6. En el caso de las muestras de leucoplasia, la diferencia entre ellas para la detección de metilación supuso cierto grado de ambigüedad en la interpretación del gel de agarosa ya que las bandas correspondientes a los resultados positivos (muestras 3, 5 y 6) eran visiblemente diferenciables debido a una mayor intensidad de la luz UV reflejada, pero el resto de muestras también mostraban una banda al mismo nivel aunque más tenue (Fig. 15). Estas bandas ligeramente marcadas se consideraron inicialmente como resultado negativo aunque

esto no quiere decir que no haya metilación, sino que la metilación se da en un menor grado y no se refleja con tanta intensidad. Para establecer el grado de metilación y por tanto un dato cuantitativo, sería necesaria la secuenciación de los productos de la PCR.

Por otro lado, esto no ocurría al analizar el gel de agarosa correspondiente al mismo gen pero en muestras de mucosa sana perilesionar, ya que en este caso las bandas correspondientes a las muestras que daban un resultado positivo para metilación se diferenciaban claramente de las muestras con resultado negativo (Fig.16).

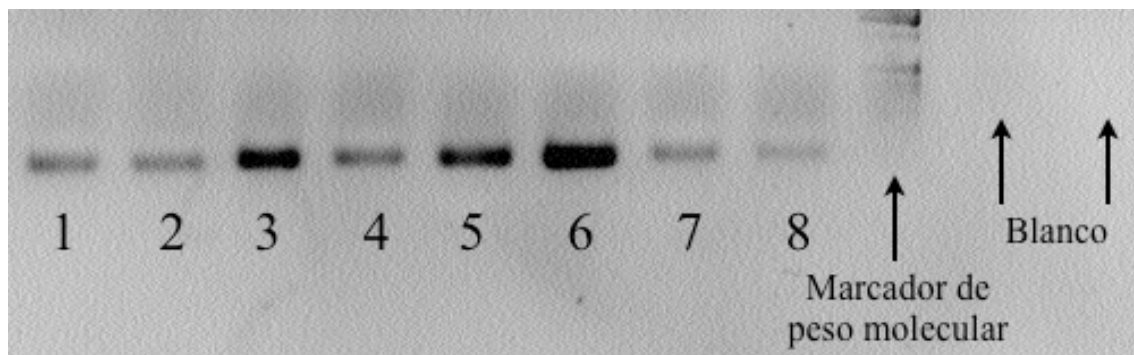


Figura 15: Ejemplo de metilación del gen p16INK4 $\alpha$  en muestras de leucoplasia. El control negativo es agua destilada y desionizada.

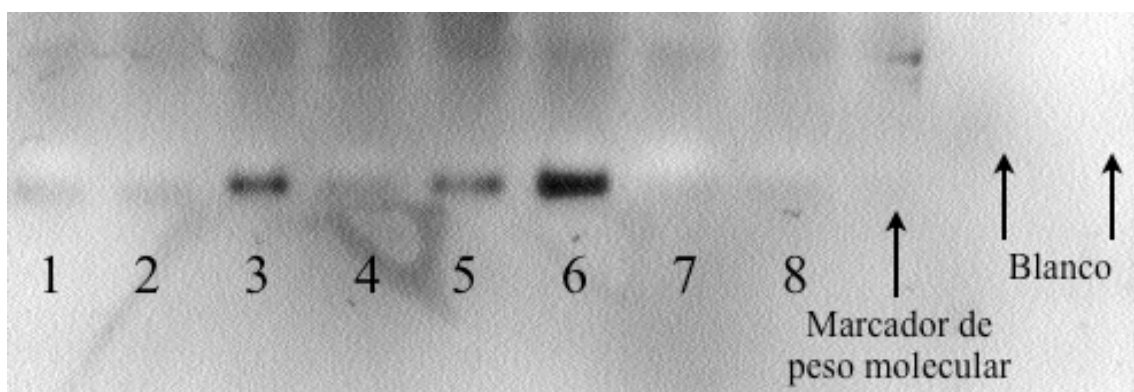


Figura 16: Ejemplo de metilación del gen p16INK4 $\alpha$  en muestras de mucosa sana. El control negativo es agua destilada y desionizada.

En el análisis de metilación a través de los geles de agarosa del gen MGMT se obtuvo un resultado positivo claramente diferenciable a partir del gel de agarosa en las muestras de leucoplasia en los pacientes 3 y 5, mientras que en las muestras de mucosa sana perilesionar solo se obtuvo un resultado positivo para la muestra del paciente 3.

Por tanto, a partir del análisis de los geles se obtuvo que para ambos grupos la metilación de p16INK4 $\alpha$  mostró resultado positivo en el mismo número de pacientes. Para el gen MGMT se observó el doble de resultados positivos en el grupo de leucoplasia que en el grupo de muestras de mucosa normal. Al comparar los porcentajes de ambos genes no se observaron diferencias estadísticamente significativas intra e intergrupo (Tabla 6).

LESIÓN	p16INK4 $\alpha$			MGMT		
	Total	Metilación	Porcentaje	Total	Metilación	Porcentaje
Leucoplasia	8	3	37,5%	8	2	25%
Mucosa sana	8	3	37,5%	8	1	12,5%

Tabla 6: Tasa de metilación de los genes p16INK4 $\alpha$  y MGMT en muestras de leucoplasia y mucosa sana perilesionar.

No se observó metilación positiva en ninguna muestra de mucosa sana cuya pareja en el grupo de leucoplasia no presentara también un resultado positivo para dicha alteración.

En cuanto al análisis de los productos de PCR mediante la secuenciación no se pudo concluir ningún resultado definitivo ya que se continúa con la puesta a punto de la técnica.

### *CORRELACIÓN CON OTRAS VARIABLES:*

Las variables clínicas de la lesión (tamaño, localización) y el hábito tabáquico de los pacientes no mostró correlación con el grado de metilación de ninguno de los dos genes estudiados, aunque el paciente 3 que fue el único que mostró resultado positivo para metilación en ambos genes en muestra de mucosa sana, y uno de los dos pacientes con resultado positivo para ambos genes en muestras de leucoplasia, resultó ser el paciente cuya lesión medía 7mm en su eje mayor. Por otro lado se observó que tres de cuatro pacientes (75%) con lesión en el reborde alveolar eran fumadores, mientras que el paciente restante era exfumador.

# V. DISCUSIÓN

En los últimos años las alteraciones epigenéticas han ido cobrando importancia en la investigación del cáncer. En particular, la metilación aberrante en las regiones promotoras de genes involucrados en la supresión tumoral se ha establecido como mecanismos importantes en la inactivación de dichos genes en el cáncer. Esta alteración epigenética inhibe la expresión de un gen sin alterar la secuencia de bases sino que adhiere un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) a la región promotora de dicho gen impidiendo su transcripción (12). La metilación de los genes se produce en zonas denominadas islas CpG que suelen encontrarse en la región promotora de los genes y conlleva la inactivación de aquellos que normalmente se expresan. El problema se crea en aquellas circunstancias en las que la silenciación de un gen supone un estado en enfermedad en el paciente o, en el caso que nos ocupa, una situación favorable para que se desencadene una lesión maligna. Aún así una sola alteración no provoca que se desencadene un cáncer. Las alteraciones epigenéticas podrían provocar una inestabilidad genética (Fig. 17) que favorecería la expresión de otras alteraciones genéticas o ambientales, facilitando la conversión maligna de determinadas lesiones (36).

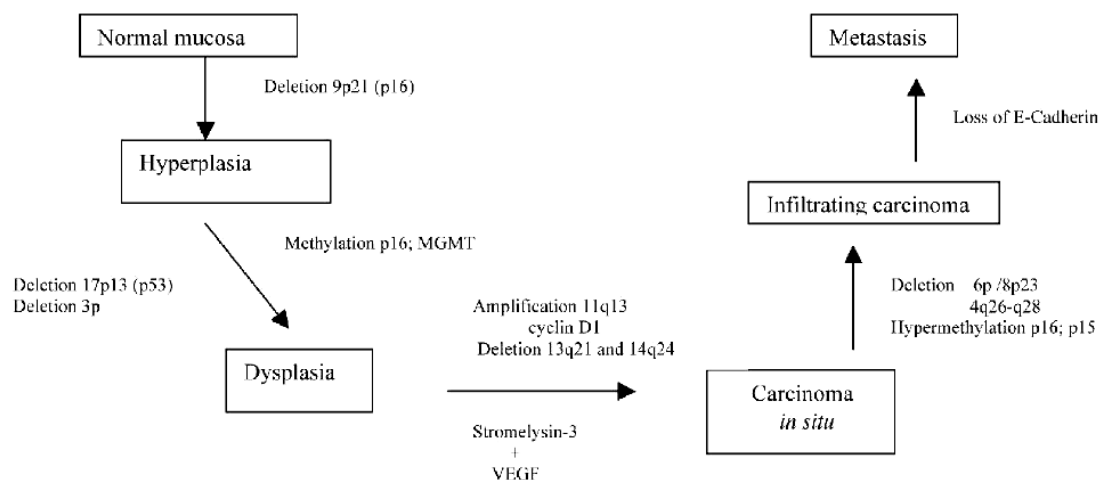


Figura 17: Alteraciones genéticas y epigenéticas implicadas en el origen de lesiones cancerígenas (36).

En la literatura podemos encontrar numerosos estudios en los que se ha observado una mayor tasa de metilación de genes relacionados con la supresión tumoral en pacientes con cáncer de cabeza y cuello que en pacientes clínicamente sanos.

Asimismo también se han observado diferencias en la presencia de metilación al comparar lesiones de COCE y mucosa sana perilesionar del mismo individuo. Kato y cols. realizaron un estudio para evaluar las diferencias en el grado de metilación de los genes p16INK4 $\alpha$  y MGMT en 51 muestras de tejido de COCE (casos) y 18 muestras de mucosa sana perilesionar (controles). En este estudio se detectó que p16INK4 $\alpha$  se encontraba metilado en un 50,9% y MGMT en un 56,4% de los casos mientras que estos valores en mucosa sana perilesionar eran de 27,27% y 40,91% para p16INK4 $\alpha$  y MGMT respectivamente. La metilación de estos dos genes en condiciones normales de salud era ausente, por lo que se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tejido sano y tejido de mucosa perilesionar y de COCE (20).

Aunque la metilación es un proceso ampliamente estudiado en lesiones de cáncer, no ocurre lo mismo con su estudio en las lesiones potencialmente malignizables así que basándonos en este tipo de estudios nuestro objetivo en el presente estudio era estudiar la detección de metilación en lesiones de leucoplasia y compararlo a su vez con mucosa sana perilesionar.

Los resultados obtenidos difieren respecto a otros estudios de similar planteamiento disponibles en la literatura como el de Kato y cols. y puede ser debido al hecho de que el grado de metilación varía según el grado de displasia, siendo esta menor en pre-cáncer que en lesiones de cáncer. En este aspecto, una limitación de este

estudio es la falta de información sobre el estado anatomopatológico de las lesiones, ya que las diferencias en cuanto a la presencia de metilación entre las distintas muestras de leucoplasia podría explicarse por un distinto grado de displasia. Esta idea concuerda con estudios en los que se ha observado una asociación directamente proporcional entre el grado de metilación y la severidad del grado de displasia de la lesión (26) sugiriéndose por tanto que la metilación esta relacionada con un mayor grado de displasia que nos indica a su vez una mayor probabilidad de malignización de la lesión.

Los resultados obtenidos en el presente estudio piloto deben interpretarse teniendo siempre en cuenta las limitaciones del mismo. Añadido a las dificultades en la detección de esta alteración debe resaltarse el reducido tamaño muestral y la selección de pacientes. Debido a que el objetivo principal era observar la detección de metilación a partir de ADN obtenido de tejido se seleccionaron 8 pacientes de forma consecutiva, y debido a que la muestra es muy reducida, cualquier resultado que obtengamos deberá manejarse como una hipótesis generada a partir del análisis de estos sujetos. Otra de las grandes limitaciones del estudio es la falta de homogeneización de los pacientes en cuanto al grado de displasia epitelial de la lesión a partir del análisis histológico, que previamente se ha explicado su influencia y que se debe principalmente al tamaño muestral, y en cuanto al hábito tabáquico.

Sobre el efecto del tabaco, se ha observado que existe una relación más fuerte entre el tabaco y el grado de metilación de algunos genes que en relación con otras alteraciones genéticas como pueden ser la delección o mutación de distintos genes involucrados en la supresión tumoral, incluyendo entre ellos p16INK4 $\alpha$  (8). Esto parece sugerir que un ciclo celular más rápido junto con el descontrol del crecimiento celular

sean las vías carcinogénicas que sigue la metilación de genes supresores de tumores. Esta idea concuerda con estudios realizados en los que se ha estudiado la tasa de metilación de pacientes sanos fumadores y no fumadores, de modo que en el estudio de Von Zeidler y cols. se analizó la metilación del gen p16INK4 $\alpha$  en muestras de mucosa sana en 258 pacientes fumadores libres de cáncer (32). Se detectó que un 9,7% de los pacientes tenían metilado este gen, que aunque no es un porcentaje muy alto, contrasta con el 0% de la mucosa normal de pacientes sanos no fumadores (20), mostrando por tanto que incluso en ausencia total de cáncer y lesiones de pre-cáncer el tabaco aumenta el nivel de metilación de p16INK4 $\alpha$  y por tanto aumenta el riesgo de desarrollo de un proceso cancerígeno. De hecho se ha podido observar que la metilación de este gen se relaciona con leucoplasia en pacientes que consumen tabaco de forma mascada en una población de Sri Lanka (25).

El estudio de la metilación es un proceso laborioso que requiere muchas horas de laboratorio y que se ve afectado no solo por la acción del operador sino también por limitaciones derivadas de la técnica y la interpretación de los resultados. La MSP (Methylation-specific PCR), se ha descrito como un método simple, sencillo y fácil de realizar pero requiere gran cantidad de ADN en buen estado ya que la técnica está limitada a determinadas áreas de restricción específicas (región promotora del gen). La principal dificultad en la detección de bases metiladas es que su alteración no modifica la secuencia de bases y por tanto con una PCR no seríamos capaces de distinguir aquellas bases anormalmente metiladas. Para ello se realiza previo a la PCR el tratamiento de las muestras con bisulfito sódico (NaHSO<sub>3</sub>). Lo que se consigue con este paso previo es que las citosinas no metiladas se transformen en uracilo mientras que las metiladas siguen apareciendo como citosinas, y de este modo somos capaces de detectar

alteraciones en la secuencia de bases (34).

Por otro lado, la MSP es buena para analizar la metilación siempre que se disponga de grandes cantidades de genoma (35), porque si lo que se quiere observar es la metilación en islas CpG específicas, hay que tener en cuenta que se está intentando detectar una región que puede estar modificada de infinitas formas y los primers diseñados normalmente para amplificar la región CpG se basan en la secuencia de bases alterada “más común” detectada en otros estudios previamente publicados.

Además de la especificidad del área a estudiar, la detección de falsos positivos debido a posibles fallos en el tratamiento con bisulfito sódico es otro de los factores que debemos tener en cuenta. Para tratar de evitarlo se recomienda la realización de una primera PCR con primers específicos para amplificar la región promotora del gen a estudiar sin alterar, de modo que se aumenta la cantidad de ADN de forma estable. Esta cantidad de ADN posteriormente se someterá a otras dos PCR esta vez con primers específicos para detectar y amplificar las regiones metiladas y no metiladas (37). En este estudio, los primers para las PCR de metilación y no metilación obtenidos a través del programa “*Methyl Primer Express*” se compararon con los primers utilizados para el estudio de los mismos genes en la literatura (2, 16, 20, 21, 26), de forma que finalmente se comprobó que la secuencia utilizada era la más común para el estudio de esta alteración.

La metilación de los genes p16INK4 $\alpha$  y MGMT aparece relacionada con la ausencia de su expresión en numerosos tumores de cabeza y cuello (31, 38), y se ha observado que es una característica relacionada con la ubicación de la lesión ya que hay

estudios que al analizar lesiones de COCE y leucoplasia han analizado también el porcentaje de mutilación de folículos pilosos de los pacientes para observar la variación de metilación entre muestras tomadas de localizaciones lejanas (23, 24). En este caso se observó que el porcentaje de metilación sólo aparecía en las muestras de mucosa oral (lesión y mucosa sana) mientras que en las muestras de ADN de folículos pilosos no se observaba metilación. Aún no se ha dilucidado la razón por la que determinado conjunto de células de los tejidos orales sufre un mayor grado de metilación desarrollando por tanto un cáncer mientras que el tejido adyacente, aunque presentando también cierto grado de metilación, no desarrolla lesión alguna. En el presente estudio se ha observado el mismo porcentaje de muestras metiladas en el grupo de leucoplasia y en el grupo de mucosa sana en el análisis del gen p16INK4 $\alpha$ , coincidiendo además que las muestras metiladas de ambos grupos pertenecían a los mismos pacientes. Esto puede ser debido a que estas muestras test y control fueron tomadas muy próximas, por tanto el desarrollo de la lesión estaría provocado por una serie de eventos desconocidos en este caso que han favorecido la aparición de la lesión en una región con mayor riesgo para el desarrollo de leucoplasia debido a la inactivación del gen p16INK4 $\alpha$  por metilación. En el caso del gen MGMT la única muestra de mucosa sana que dio un resultado positivo para metilación coincidía con una de las dos muestras con resultado positivo del grupo de leucoplasia, por lo que la explicación podría ser similar. En ambos casos serían necesarios los resultados obtenidos de la secuenciación de los productos de la PCR, ya que la interpretación de resultados de los geles esta sometida a cierto grado de subjetividad por parte del observador, y los datos obtenidos de la secuenciación podrían completar estos resultados aportando datos cuantitativos, y por tanto presentar no solo la detección sino el grado de metilación de las muestras tomadas.

# VI. CONCLUSIÓN

1. Los resultados preliminares de este estudio muestran, a partir del análisis de los productos de PCR en un gel de agarosa, la misma presencia de metilación en ambos grupos de muestras para el gen p16INK4 $\alpha$  y mayor presencia, el doble, de metilación al comparar las muestras de leucoplasia con las muestras de mucosa sana para el gen MGMT, aunque no se alcanza una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tipos de muestras.
2. No se pudo establecer una correlación entre un resultado positivo para metilación y las distintas características de la población.
3. Teniendo en cuenta las limitaciones del presente estudio piloto, podemos determinar que la técnica es efectiva en la detección de metilación pero son necesarios estudios con un mayor número de pacientes y una mayor homogeneización de la muestra en cuanto a posibles factores de confusión, para que los resultados obtenidos puedan ser estadística y clínicamente relevantes .

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Oliver RJ, Dearing J, Hindle I. Oral cancer in young adults: Report of three cases and review of the literature. *Br Dent J* 2000; 188: 362-5.
2. Sánchez-Céspedes M, Esteller M, Wu L *et al*. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Can Res* 2000; 60: 892-5.
3. Scully C. Oncogenes, tumor suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 337-47.
4. Femiano F, Scully C. DNA cytometry of oral leukoplakia and oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10(1): 9-14.
5. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hipermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol* 2004; 40: 145-53.
6. Lin WJ, Jiang RS, Wu SH, Chen FJ, Liu SH. Smoking, Alcohol, and Betel Quid and Oral Cancer: A Prospective Cohort Study. *J Oncol* 2011; 17:1-5.
7. Banoczy J, Gintner Z, Dombi C. Tobacco use and oral leukoplakia. *J Dent Educ* 2001; 65: 322-7.
8. Hasegawa M, Heather HN, Peters E, Ringstrom E, Posner M and Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002; 21: 4231-6.
9. Balderas-Loeza A, Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador VA *et al*: Human papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a casual association of the virus with oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2007; 120: 2165-9.
10. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132(1): 6-13.
11. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-28.

12. Shaw R. The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35(2): 101-8.
13. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990; 62(3): 503-14.
14. Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 2006; 7 (1): 77-82.
15. Viet CT, Jordan RC, Schmidt BL. DNA promoter hypermethylation in saliva for the early diagnosis of oral cancer. *J Calif Dent Assoc* 2007; 35(12): 844-9.
16. Rosas S, Koch W, Carvalho MG *et al*. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumours and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Research* 2001; 61: 939-42.
17. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M and Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996; 2(9): 972-4.
18. Shapiro CM, Bitran JD, Shapiro RA. Remission of metastatic adenocarcinoma of the colon. *JAMA* 1983; 250(18): 2503-4.
19. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37(3): 646-50.
20. Kato K, Hara A, Kuno T *et al*: Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinoma and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132 (11): 735-43.
21. Guo XL, Sun SZ, Wang WX, Wei FC, Yu HB, Ma BL. Alterations of p16INK4a tumour suppressor gene in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Int J Maxillofac Surg* 2007; 36(4): 350-3.

22. Roth M, Abnet CC, Hu N *et al.* p16, MGMT, RAR $\beta$ 2, CLDN3 and MT1G gene methylation in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Oncol Rep* 2007; 15: 1591-7.
23. Ruesga MT, Acha-Sagredo A, Rodríguez MJ *et al.* p16INK4a promoter hypermethylation in oral scrapings of oral squamous cell carcinoma risk patients. *Cancer Lett* 2007; 250: 140-5.
24. López M, Aguirre JM, Cuevas N *et al.* Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients-a diagnostic and/or prognostic tool?. *Eur J Cancer* 2003; 39: 2306-9.
25. Takeshima M, Saitoh M, Kusano K *et al.* High frequency of hypermethylation of p14, p15 and p16 in oral pre-cancerous lesions associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(8): 475-9.
26. Hall GL, Shaw RJ, Field EA *et al.* P16 promoter methylation is a potential predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Can Epid Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2174-9.
27. Shapiro CM, Bitran JD, Shapiro RA. Remission of metastatic adenocarcinoma of the colon. *JAMA* 1983; 250(18): 2503-4.
28. Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J *et al.* MGMT expression in oral precancerous and cancerous lesions: Correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. *Oral Oncol* 2007; 43: 515-22.
29. Lee ES, Issa JP, Roberts DB *et al.* Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: Comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Clin Cancer Res* 2008; 14(9); 2664-72.

30. Huang J, Shen W, Li B, Liao S, Zhang W, Cheng N. Molecular and immunohistochemical study of the inactivation of the p16 gene in primary hepatocellular carcinoma. *Clin Med J* 2000; 31 (8): 443-9.
31. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59(1): 67-70.
32. Von Zeidler SV, Miracca EC, Nagai MA, Birman EG. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *Int J Mol Med* 2004; 14: 807-11.
33. Amagasa T, Yamashiro M, Ishikawa H. Oral leukoplakia related to malignant transformation. *Oral Sci Int* 2006; 3:45–55.
34. Herman JG, Grafft JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 9821-6.
35. Derks S, Lentjes MH, Hellebrekers DM, de Bruïne AP, Herman JG, van Engeland M. Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol* 2004;26(5-6):291-9.
36. Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez JJ, Gonzalez-Moles MA, Bascones-Martinez A. Update on Molecular Pathology in Oral Cancer and Precancer. *Anticancer Res* 2008; 28: 1197-208.
37. Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol* 2003; 163: 1101-7.
38. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3630–3.

## VIII. ANEXO I

CEIC Area 7 - Hospital Clínico San Carlos

**INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

DÑA M<sup>a</sup> DEL MAR GARCÍA ARENILLAS, SECRETARIA DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID.

**CERTIFICA:**

Que en el estudio titulado: **"Estudio de metilación en lesiones orales potencialmente malignizables"** con Código Interno: E-09/366.

- o Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- o Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- o La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
- o El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto por el Dr. Antonio Bascones Martínez de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid como Investigador Principal.

Lo que firmo en Madrid, a 19 de noviembre de 2009

Fdo:



Dra. Mar García Arenillas  
Secretaria del CEIC Area 7 - Hospital Clínico San Carlos

## **IX. ANEXO II**

**FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:  
ESTUDIO DE METILACIÓN EN LESIONES ORALES POTENCIALMENTE  
MALIGNIZABLES.**

Don.....de.....años de edad,  
con domicilio en.....y D.N.I.  
nº.....

DECLARO que el doctor don.....

Me ha explicado que va a proceder a la extracción de mucosa peri-lesionar y de lesión premaligna, con fines de investigación para un proyecto llevado a cabo en la Facultad de Odontología de la UCM.

Comprendo que las muestras de la lesión y el tejido circundante serán realizadas mediante biopsia, y para ello es necesario el uso de anestesia local.

Aunque se me hayan practicado los medios diagnósticos que se han estimado precisos, comprendo que pueden producirse procesos edematosicos, inflamación, dolor o laceraciones en la mucosa yugal o la lengua que no dependen de la técnica empleada ni de su correcta realización, sino que son imprevisibles, en cuyo caso el facultativo tomará las medidas precisas, y continuará el procedimiento.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos del procedimiento.

Y en tales condiciones CONSIENTO que se me practique la toma de muestras.

En.....

Fdo. EL ODONTÓLOGO

Fdo. EL PACIENTE

## X. ANEXO III

## Análisis intragrupo de ambos grupos para gen MGMT. Comparación de proporciones.

```

NPAR TEST
  /BINOMIAL (.50)= VAR00001
  /MISSING ANALYSIS.

```

### Notas

Resultados creados		03-AUG-2011 20:04:14	
Comentarios			
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos0	
	Filtro	<ninguna>	
	Peso	<ninguna>	
	Segmentar archivo	<ninguna>	
	Núm. de filas del archivo de trabajo	8	
Manipulación de los valores perdidos	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario será tratados como perdidos.	
	Casos utilizados	Los estadísticos para cada prueba se basan en todos los casos con datos válidos para las variables usadas en dicha prueba.	
Sintaxis		NPAR TEST /BINOMIAL (.50)= VAR00001 /MISSING ANALYSIS.	
Recursos	Tiempo de procesador	0:00:00,05	
	Tiempo transcurrido	0:00:00,05	
	Número de casos permitidos(a)	196736	

a Basado en la disponibilidad de memoria en el espacio de trabajo.

[Conjunto\_de\_datos0]

### Prueba binomial

	Categoría	N	Proporción observada	Prop. de prueba	Sig. exacta (bilateral)	
VAR00001	Grupo 1	,00	6	,75	,50	,289
	Grupo 2	1,00	2	,25		
	Total		8	1,00		

```

NPAR TEST
  /BINOMIAL (.50)= VAR00002
  /MISSING ANALYSIS.

```

## Pruebas no paramétricas

### Notas

Resultados creados	03-AUG-2011 20:05:41
--------------------	----------------------

Comentarios			
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos0	
	Filtro	<ninguna>	
	Peso	<ninguna>	
	Segmentar archivo	<ninguna>	
	Núm. de filas del archivo de trabajo		8
Manipulación de los valores perdidos	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario será tratados como perdidos.	
	Casos utilizados	Los estadísticos para cada prueba se basan en todos los casos con datos válidos para las variables usadas en dicha prueba.	
Sintaxis		NPAR TEST /BINOMIAL (.50)= VAR00002 /MISSING ANALYSIS.	
Recursos	Tiempo de procesador		0:00:00,00
	Tiempo transcurrido		0:00:00,00
	Número de casos permitidos(a)		196736

a Basado en la disponibilidad de memoria en el espacio de trabajo.

[Conjunto\_de\_datos0]

#### Prueba binomial

	Categoría	N	Proporción observada	Prop. de prueba	Sig. exacta (bilateral)
VAR00002 Grupo 1	,00	7	,88	,50	,070
Grupo 2	1,00	1	,13		
Total		8	1,00		

En el estudio estadístico, con un  $\alpha=0,05$ , de comparación de proporciones, el estadístico de contraste  $Z=0,67$  nos muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Grupos test y control para MGMT).