



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**“Identificación de la metilación de los genes RBM, P16,  
MGMT, hMLH y PLAG-1 en carcinoma mucoepidermoide  
de bajo, intermedio y alto grado”.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

LUIS ALBERTO MARTÍNEZ MARCIAL

TUTOR: Mtra. CARLA MONSERRAT RAMÍREZ MARTÍNEZ

ASESOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

Cd. Mx. octubre de 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I.	Antecedentes.	5
II.	Marco teórico.	6
	II.I. Generalidades de las glándulas salivales.....	6
	II.II. Neoplasia de glándulas salivales.....	6
	II.III. Clasificación de la OMS para neoplasias de glándulas salivales.....	8
	II.IV. Carcinoma mucoepidermoide.....	9
II.V.	Epigenética.	15
	II.V.I Metilación de ADN.....	15
	II.V.II Mecanismos epigenéticos de la metilación en carcinoma mucoepidermoide.....	17
II.VI.	Genes involucrados en la carcinogénesis.	20
	II.VI.I P16 (CDKN2A).....	20
	II.VI.II RbM.....	22
	II.VI.III MGMT.....	23
	II.IV. IV. hMLH1.....	24
	II.IV.V PLAG.....	25
III.	Planteamiento del problema.	26
IV.	Justificación.	27
V.	Pregunta de investigación.	29
VI.	Hipótesis.	29
VII.	Objetivos.	29
	VII.I Objetivo General.....	29
	VII.II Objetivo específico.....	29
VIII.	Materiales y método.	30
IX.	Metodología.	30
	IX.I Diseño de estudio.....	30
	IX.II Población de estudio.....	30
	IX.III Criterios de Selección.....	31
	IX.III.I Criterios de inclusión.....	31
	IX.III.II Criterios de exclusión.....	31
	IX.III.III Criterios de eliminación.....	31

IX.IV. Obtención de ADN.	32
IX.IV.I Extracción ADN .....	32
IX.IV. II. Cuantificación de ADN.....	35
IX.IV.III Bisulfito de Sodio tratamiento genómico para ADN .....	35
IX.IV.IV Cuantificación de ADN.....	37
IX.IV.V PCR .....	37
IX.IV.VI. Foto documentación.....	39
X. Análisis estadístico.	40
XI. Resultados.	40
XII. Discusión.	45
XIII. Conclusiones.	51
XIV. Bibliografía.	53

## Resumen

El carcinoma mucoepidermoide es la neoplasia epitelial maligna de glándulas salivales más frecuente. Aun cuando se ha tratado de asociar a los genes *CRTC1-MAML2* t(11;19), hasta la fecha su patogénesis y mecanismos biomoleculares implicados en su aparición siguen siendo inciertos. En este estudio se identificó la presencia de los genes *RBM*, *P16*, *MGMT*, *hMLH*, y *PLAG-1* en los grados histopatológicos bajo, intermedio y alto en 5 muestras de esta neoplasia y en un grupo control correspondiente a tejido glandular sano obtenidos del Laboratorio de Patología y Medicina Bucal de la DEPEI de la Facultad de Odontología UNAM, en un periodo de 2014 a 2017. Se utilizó la técnica MSP-PCR y se comparó la presencia o ausencia contra el grupo control.

Los resultados se analizaron con el software SPSS versión 22.0, y se realizaron las pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis con pos hoc Dunn.

Los resultados mostraron que el gen *MGMT* metilado mostró una diferencia significativa ( $p > 0.01$ ) al comparar el carcinoma de alto grado contra el grupo control.

## I. Antecedentes:

El carcinoma mucoepidermoide es una neoplasia epitelial maligna de glándulas salivales, conformada por una proporción variable de células mucosas, epidermoides, intermedias, columnares y claras en un patrón histológico que va de quístico a sólido. Fue descrito por primera vez en 1945 por Stewart, Foote y Becke.<sup>1</sup> Afecta con mayor frecuencia a mujeres, en una razón 3:2 en la quinta década de la vida.<sup>2</sup> La primera clasificación del carcinoma mucoepidermoide ocurre en 1991 por la Organización Mundial de la Salud y se encuentra definido como una neoplasia maligna de glándulas salivales clasificado en el apartado de carcinomas.<sup>3</sup>

Debido a que las mutaciones genéticas para esta lesión no se han podido dilucidar el desarrollo de esta neoplasia actualmente se ha propuesto el estudio de los procesos epigenéticos asociados a su formación.

El término epigenética fue acuñado en 1942 por Conrad H. Waddington para los cambios en la expresión génica sin cambio en los genes, años después Holliday propuso por primera vez en 1987, el posible rol de la epigenética en la herencia de enfermedades y en la biología del cáncer<sup>4</sup>

La importancia de la epigenética en la biología del cáncer radica en la expresión de genes supresores tumorales que permitan el avance de una neoplasia.<sup>5</sup> Específicamente, la importancia de la epigenética en la carcinogénesis radica en varios aspectos en la inactivación de genes supresores tumorales que permiten la proliferación neoplásica.<sup>6</sup>

## II. Marco teórico

### II.I. Generalidades de las glándulas salivales

Las glándulas salivales derivan del ectodermo, siendo estas glándulas tubuloacinares exocrinas de secreción merocrina. Su función es la producción y secreción de saliva, por la cual la cavidad oral permanece húmeda y protegida. Algunas de las funciones de la saliva son preparar los alimentos para la digestión, controlar la microflora oral y mantener un correcto pH.<sup>7</sup>

Las glándulas salivales están clasificadas de acuerdo con su tamaño en glándulas salivales mayores y menores, donde las glándulas menores son muy abundantes y están distribuidas en toda la submucosa de la cavidad oral, mientras que las glándulas salivales mayores son pares y se llaman: parótida, submandibular y sublingual.<sup>8</sup>

### II.II. Neoplasia de glándulas salivales.

Los tumores de las glándulas salivales representan entre el 3 y 10% de las neoplasias de cabeza y cuello.<sup>1,9</sup> Las glándulas salivales se caracterizan por tener la capacidad de formar un gran número de neoplasias de cabeza y cuello, con una incidencia global de 2.5 por 100 000 casos al año y de las cuales el 5% corresponde a neoplasias malignas.<sup>1,10</sup>

Afecta con mayor frecuencia al género femenino entre la 4<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup> décadas de vida. La glándula mayor más afectada es la glándula parótida, seguida de la glándula submaxilar y de la glándula sublingual.<sup>11,12</sup>

Actualmente existen dos teorías principales que abordan su origen, la histogenética o teoría bicelular y la morfogenética o teoría multicelular.<sup>11,13</sup>

La teoría histogenética plantea que existen células trocales de aspecto basal en las regiones proximal y distal del sistema de conductos y que corresponden a células progenitoras de la unidad glandular.<sup>14</sup> De acuerdo con ello, las células en la región proximal darán origen a las neoplasias que imitan el complejo ducto-acinar como el carcinoma de células acinares y las células de la región distal a las neoplasias que imitan al conducto excretor, como el carcinoma mucoepidermoide. Sin embargo, aun cuando investigadores han demostrado por inmunohistoquímica la presencia de células de aspecto basal con morfología de células troncales en los conductos de las glándulas salivales, estos resultados moleculares no son suficientes para sustentar que poseen la función de células troncales.<sup>15</sup>

Por otra parte, el enfoque morfogenético o teoría multicelular propuesta por Dardick<sup>16</sup> relaciona la morfología con la diferenciación celular. La relación entre la estructura normal de la glándula salival y la apariencia histológica de las neoplasias puede explicar las clasificaciones morfológicas, es decir, estas neoplasias pueden derivar de cualquiera de las estructuras que conforman el parénquima glandular.<sup>8,13</sup>

De acuerdo con esta clasificación el carcinoma mucoepidermoide derivaría de la porción más externa del sistema de conductos, llamada conducto estriado que presenta un epitelio escamoso estratificado. Sin embargo, se debe considerar que la similitud histológica no necesariamente implica que un tumor particular surge de la estructura que imita.<sup>16</sup>



### II.III. Clasificación de la OMS para neoplasias de glándulas salivales

La clasificación más usada para agrupar a este tipo de neoplasias es de la Organización Mundial de la Salud la cual fue modificada en 2017 y que las cataloga en neoplasias benignas y malignas de origen epitelial, lesiones epiteliales no neoplásicas, lesiones benignas de tejido blando y neoplasias hematolinfoides.<sup>17</sup>

Tumores malignos	Tumores benignos
Carcinoma mucoepidermoide	Adenoma pleomorfo
Carcinoma adenoideo quístico	Mioepitelioma
Carcinoma de células acinares	Adenoma de células basales
Adenocarcinoma polimorfo	Tumor de Whartin
Carcinoma de células claras	Oncocitoma
Adenocarcinoma de células basales	Linfoadenoma
Carcinoma intraductal	Cistadenoma
Adenocarcinoma NOS	Sialoadenoma papilar
Carcinoma de ductos salivales	Papiloma ductal
Carcinoma mioepitelial	Adenoma sebáceo
Carcinoma de epitelio-mioepitelial	Adenoma canicular
Carcinoma ex adenoma pleomorfo	<b>Lesiones epiteliales no neoplásicas</b>
Carcinoma secretor	Adenosis poliquística esclerosante
Adenocarcinoma sebáceo	Hiperplasia oncocítica nodular
Carcinosarcoma	Sialoadenitis linfoepitelial
Carcinoma pobremente diferenciado	Hiperplasia ductal intercalada
Carcinoma indiferenciado	
Carcinoma neuroendocrino de células largas	
Carcinoma neuroendocrino de células cortas	
Carcinoma linfoepitelial	<b>Lesiones benignas de tejidos blandos</b>
Carcinoma de células escamosas	Hemangioma
Carcinoma oncocítico	Lipoma/sialolipoma
Sialoblastoma	Facitis nodular
	<b>Tumores hematolinfoides</b>
	Linfoma extra marginal nodular de la mucosa, asociado a tejido linfoide

Tabla 1. Clasificación de Tumores benignos y malignos según la OMS en 2017<sup>17</sup>

En el grupo de neoplasias malignas de glándulas salivales se incluyen 20 entidades.<sup>17</sup> Entre las modificaciones realizadas en esta clasificación de las neoplasias malignas de glándulas salivales se encuentran, el agrupamiento

del cistadenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso y adenocarcinoma intestinal dentro del adenocarcinoma NOS; la introducción del carcinoma secretor como una nueva entidad dentro de ésta clasificación, la denominación de carcinomas neuroendocrinos y no neuroendocrinos indiferenciados en lugar de carcinomas de células pequeñas y grandes, y por último, la reclasificación del sialoblastoma y paraganglioma como entidades indeterminadas a malignas. El carcinoma mucoepidermoide continúa en la clasificación dentro de los tumores malignos de origen epitelial.<sup>17</sup>

De acuerdo con los datos reportados por Santos et.al la neoplasia maligna más frecuente es el carcinoma mucoepidermoide,<sup>18</sup> presentándose hasta en un 4 a 10% de todas las neoplasias que afectan a las glándulas mayores seguido del carcinoma adenoideo quístico y de células acinares.<sup>19</sup>

#### II.IV. Carcinoma mucoepidermoide.

El carcinoma mucoepidermoide se define como una neoplasia epitelial maligna de glándulas salivales conformada por una proporción variable de células mucosas, epidermoides, intermedias, columnares y claras, en patrón quístico y sólido. Afecta con mayor frecuencia a mujeres en una razón 3:2 entre la segunda y séptima décadas de vida. La glándula salival mayor más afectada es la glándula parótida y dentro de las glándulas salivales menores las glándulas palatinas.<sup>1,2</sup>

La etiopatogenia de esta neoplasia continua incierta, sin embargo se ha relacionado a la exposición de radiación ionizante. Del 38 al 82% de los carcinomas mucoepidermoides presentan una translocación recíproca t(11;19)(q21;p13) lo que resulta en la fusión del oncogén CRTC1-MAML2<sup>20</sup> MAML2 es un miembro de la familia master-mind gene que codifica una

proteína nuclear para unirse al factor transcripcional de CSL y al dominio intracelular del receptor Notch. CRTC1, por otro lado, es miembro coadyuvante de la familia CREB de los elementos de respuesta del gen cAMP. Esta traslocación se identifica en los tumores de bajo e intermedio grado siendo negativa en los tumores de alto grado.<sup>20</sup>

Actualmente se realizan diferentes análisis moleculares con el fin de entender el comportamiento biológico de esta neoplasia. Los estudios citogenéticos han identificado en las neoplasias de bajo grado una translocación entre MAML2 y MECT1, t(11;19)(q21-22;13), aunque dicha translocación no se manifiesta en neoplasias de alto grado. Los pacientes con esta traslocación presentan un mejor pronóstico.<sup>19</sup>

Clínicamente se muestra como un aumento de volumen asintomático, de lento crecimiento cuya evolución se reporta desde meses hasta años. Generalmente los tumores de alto grado producen dolor y parálisis.<sup>20,21</sup>  
(Imagen 1.)

Macroscópicamente se identifica como una neoplasia bien delimitada o parcialmente encapsulada. Al corte puede ser sólido o quístico, y de color café claro o amarillento.<sup>20,23</sup>

En los hallazgos microscópicos, el carcinoma mucoepidermoide presenta patrones histológicos que van de quísticos a sólidos con presencia de células mucosas, intermedias y epidermoides en porciones variables. Las células mucosas poseen abundante citoplasma claro y espumoso positivo a la tinción de PAS resistente a la diastasa. Las células epidermoides son de morfología poligonal con uniones intercelulares y que infrecuentemente pueden llegar a presentar queratinizaciones. Las células intermedias presentan una morfología variable logrando observarse como basaloides, ovoides con escaso citoplasma, o con citoplasma eosinófilo.<sup>24</sup> (Imagen 2.)  
Se cree que estas células son las células progenitoras de las mucosas y las

epidermoides. Para el establecimiento del grado histológico se utiliza un sistema de puntaje en el cual, cada uno de los parámetros histológicos se suman para obtener un puntaje final.

De acuerdo con AUCLAIR et. Al en 1992 los parámetros a medir son el componente intraquístico inferior a 20% (2pts), la invasión neural (2pts), la presencia de necrosis (3pts), de 4 o más mitosis por cada 10 campos de alto poder (3pts) y la presencia de anaplasia (4pts). De acuerdo con este sistema de gradificación se considera una neoplasia de bajo grado las que obtengan un puntaje de 0 a 4, de grado intermedio de 5 a 6 puntos y de alto grado un puntaje igual o mayor a 7 puntos.<sup>24</sup>

Sin embargo, otra clasificación para el carcinoma mucoepidermoide fue propuesta por Brandwein y Cols.<sup>25</sup> ya que ellos encontraron que los criterios de Auclair et Al. tendían a menospreciar los estadios dicha lesión.

Brandwein pensaba que el esquema de la clasificación se beneficiaría con la inclusión de puntos adicionales como fueron la invasión vascular, la invasión a medula ósea y las diversas modelos de infiltración, así como aumentar los valores asignados a cada consideración histopatológica. En este nuevo sistema los tumores de grado I muestran un puntaje igual a 0, el grado II abarca de los 2 a los 3 puntos y el grado III es igual o mayor a los 4 puntos, en esta clasificación se realizó una comparativa estadística respecto a la mortalidad en los pacientes con grado I en 75 meses la cual correspondió a 0%, para el grado II fue de 30% y un 70% en los casos de grado III.<sup>25</sup>

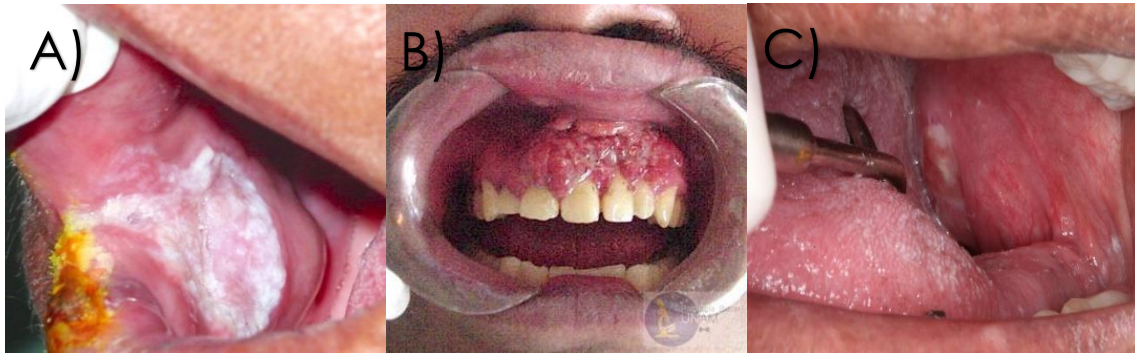


Imagen 1. Fotografías clínicas de carcinoma mucoepidermoide. A) Aumento de volumen en la región retromolar. B) Nódulo en labio inferior asociado a una placa blanca que se extiende por la mucosa del carrillo. C) Aumento de volumen en encía marginal e insertada de la región incisivo canino del maxilar.

Fotos obtenidas del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial.

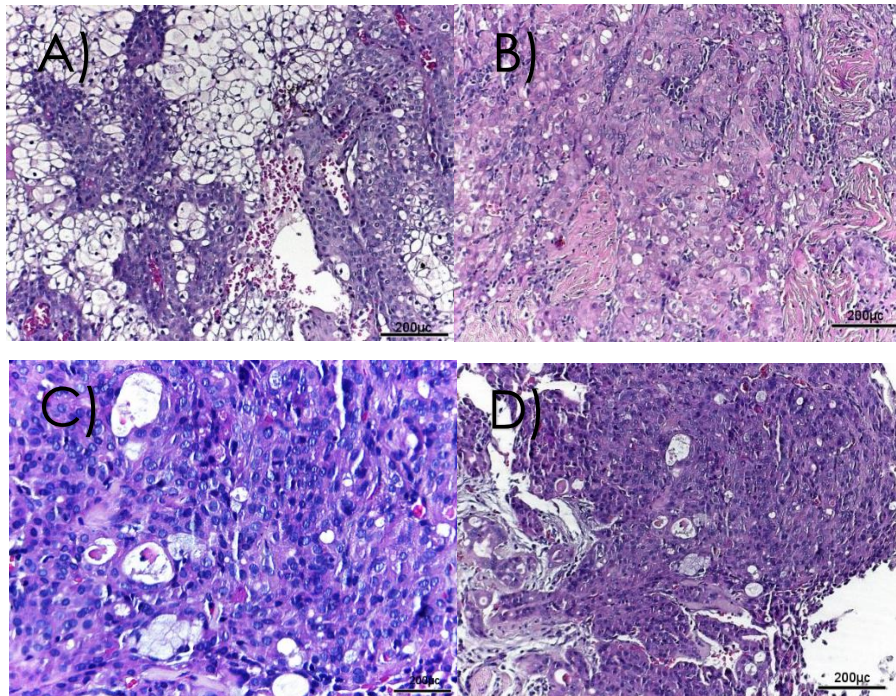


Imagen 2. Fotomicrografías H&E Carcinoma Mucoepidermoide 200x. a) Se observa una proliferación neoplásica de estirpe epitelial con abundantes células de citoplasma claro y núcleo desplazado a la periferia. b) Las células organizándose en un patrón sólido c y d) Las células se organizan en un patrón quístico con presencia de células mucosecretoras. Fotos obtenidas del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial.

El sistema de estadificación TNM (tumor-nódulo-metástasis) fue descrito por Pierre Denoix en 1953.<sup>26</sup> Este sistema tiene utilidad en el correcto estadiaje de los diferentes tumores enfocado hacia el manejo clínico y la decisión terapéutica. La T corresponde al tamaño del tumor, teniendo como nomenclatura desde T0 a T4B. La N se refiere a las adenopatías regionales siendo codificado desde N0 hasta N3, por último, la M corresponde a la presencia o ausencia de metástasis; la correlación de estos puntos nos da una estadificación que va desde el estadio uno con mejor pronóstico al estadio 4B de peor pronóstico<sup>26</sup> (Tabla 2 y3).

<b>Tumor Primario (T)</b>	
<b>Tx</b>	No se puede determinar
<b>T0</b>	No hay evidencia de enfermedad primaria
<b>T1</b>	Tumor de 2 cm o menos, sin extensión extraparanquimatosa.
<b>T2</b>	Tumor > 2cm y<4cm, sin extensión extraparenquimatosa
<b>T3</b>	Tumor > 4cm y/o extensión parenquimatosa
<b>T4a</b>	El tumor invade piel, mandíbula, conducto auditivo y/o nervio
<b>T4b</b>	El tumor invade base de cráneo, alas pterigoides y/o Arteria
<b>Adenopatías regionales (N)</b>	
<b>Nx</b>	No se puede determinar
<b>N0</b>	No hay adenopatía
<b>N1</b>	Adenopatía única ipsilateral, 3 cm o menos
<b>N2</b>	a: Adenopatía única ipsilateral, >3cm y < 6cm b: Adenopatías múltiples ipsilaterales, <6 cm c: Adenopatías bilaterales o contralaterales, < 6cm
<b>N3</b>	Adenopatía > 6cm
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
<b>Mx</b>	No se puede determinar
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia

Tabla 2. Normas de clasificación TNM<sup>26</sup>

Estadificación Tumoral			
<b>Estadio I</b>	T1	N0	M0
<b>Estadio II</b>	T2	N0	M0
<b>Estadio III</b>	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
<b>Estadio IVA</b>	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
<b>Estadio IVB</b>	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier	N3	M0
<b>Estadio V</b>	Cualquier >T4a	Cualquier > N2	M1

Tabla 3. Estadios de la clasificación TNM<sup>26</sup>

El tratamiento para las neoplasias de bajo grado que afectan a la glándula parótida es la resección conservadora con preservación del nervio facial; mientras que para las de grado intermedio y alto es la resección completa con disección cervical. Las neoplasias de bajo grado no tienden a metastatizar; sin embargo, las neoplasias de grado intermedio y alto grado metastatizan a distancia en un 55 a 80% siendo los sitios anatómicos más afectados el pulmón, hueso y cerebro.<sup>26</sup>

Se ha reportado que las neoplasias que afectan la glándula submandibular, la lengua y el piso de boca se asocian a un peor pronóstico.<sup>23</sup>

## II.V. Epigenética

Peter Jones define a la epigenética como el estudio de la regulación heredable de la actividad de los genes; no determinada por las secuencias génicas.<sup>27</sup> De este modo, la epigenética estudia los cambios heredables en expresión sin que ocurra una alteración en la secuencia de ADN. Estos cambios incluyen la metilación y acetilación de las islas CPG promotoras de la expresión génica, los cambios en la estructura de la cromatina, los ARN pequeños no codificantes y el cambio de la estructura de las proteínas. Los cambios más frecuentemente estudiados relacionados con la expresión son la metilación del ADN y los cambios en la estructura de la cromatina.<sup>28</sup>

La metilación del ADN regula la expresión génica de dos formas, la primera al impedir la unión de los factores de transcripción y la segunda propiciando una estructura cerrada de la cromatina también conocida como heterocromatina. Este es un proceso unidireccional estable y heredable a las células hijas.<sup>27,28,29</sup>

### II.V.I Metilación de ADN

El proceso de metilación de ADN ocurre en células normales para producir la inactivación específica de ciertos genes como el imprinting en el cromosoma X inactivo y la metilación de las islas CpG donde estas regiones están asociadas al inicio de la transcripción de ADN y ARN, en regiones centroméricas para contribuir a la estabilidad del cromosoma.<sup>6</sup>

De todas las modificaciones epigenéticas que se han reportado, la metilación del ADN es la más frecuente<sup>30</sup> y participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura cerrada de la cromatina o heterocromatina. El ADN presenta regiones



dispersas de 1000 a 1500 pb ricas en dinucleótidos CpG o también llamadas islas CpG, la mayor parte de las cuales se localizan en la región promotora de los genes supresores tumorales.<sup>30</sup> Estas islas no se encuentran metiladas en genes transcripcionalmente activos, y una vez que se metilan se produce su represión.<sup>31</sup>

La familia de enzimas llamadas ADN-metiltransferasas (DNMTs) controlan la metilación durante la replicación del ADN, por medio de la transferencia covalente de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina al carbono 5 de las citosinas en la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija. Existen tres DNMTs que son fundamentales para la metilación en mamíferos. La DNMT1 también llamada enzima de mantenimiento participa en la restauración del perfil de metilación del ADN después de la replicación.<sup>32,33,34</sup> Las DNMT3a y DNMT3b llevan a cabo la metilación de novo del ADN en los dinucleótidos CpG.<sup>35,36</sup>

La metilación funciona en asociación con modificaciones de la cromatina para reprimir la expresión génica<sup>37</sup> ya que proporciona una plataforma para muchas proteínas de unión a metilo, que incluyen MBD1, MBD2, MBD3 y MeCP2. Estas proteínas operan al reclutar enzimas modificadoras de histonas para coordinar la dinámica de la cromatina.<sup>38,39</sup>

En las neoplasias, las islas CpG de las regiones promotoras de los genes reguladores del ciclo celular, se encuentran generalmente hipermetiladas; este evento causa el silenciamiento transcripcional de los genes supresores tumorales<sup>40,41</sup> lo que contribuye a la progresión neoplásica. Por el contrario, también se ha descrito la hipometilación de la heterocromatina lo que conduce a un aumento en las tasas de mutación y a la inestabilidad cromosómica.<sup>42</sup>

En el caso del carcinoma oral de células escamosas (COCE), la pérdida de material genético se observa en CDKN2A (p16INK4A), p14 (ARF), p53, y APC.

Las regiones cromosómicas 3p14 (FHIT), 3p25 (BVS), 4q, 8p21-23, 9p21-2260, 13q14 (PRB), 17p13.1 (p53), y 18q21.1 (DCC) son las principales localizaciones de heterocigosidad del COCE. Los cambios epigenéticos como la metilación son comunes en la tumorigénesis.<sup>43,44,45</sup>

Debido a la heterogenidad de los tumores de las glándulas salivales, no se han podido estudiar los mecanismos biomoleculares implicados en su desarrollo, por lo que comprender los mecanismos epigenéticos involucrados en su patogénesis ayudaría a entender el curso biológico de estas lesiones que impactarían en el pronóstico de los pacientes.

#### II.V.II Mecanismos epigenéticos de la metilación en carcinoma mucoepidermoide

El análisis de ADN metilado se ha convertido en un poderoso biomarcador para la detección temprana de cáncer que permite clasificar las neoplasias malignas de pulmón, próstata, cabeza, cuello, vejiga, colon y recto<sup>28</sup> considerando los subtipos histológicos, el grado de malignidad, diferencias en la respuesta al tratamiento y los diversos pronósticos. Una importante y reciente aplicación es precisamente su uso como biomonitor de respuesta a la terapia y predictor del pronóstico de cáncer.<sup>46</sup>

En carcinomas orales de células escamosas se ha correlacionado la desregulación epigenética y la progresión del cáncer debido a la hipermetilación y consiguiente silenciamiento de varios genes supresores tumorales que cubren una amplia gama de procesos celulares, que incluyen control del ciclo celular (p16, RB1), adhesión célula-célula (E-cadherina) y reparación del ADN (MGMT y hMLH1).<sup>47,48,49</sup> Sin embargo, este patrón no se ha demostrado en las neoplasias malignas de glándulas

salivales, específicamente en carcinoma mucoepidermoide; esto puede ser debido a la heterogenicidad y a la complejidad de su estudio.<sup>50,51,52</sup>

(Figura 3.)

En el desarrollo de las neoplasias malignas se han detectado metilaciones asociados a los genes supresores tumorales, marca que propicia un silenciamiento de su expresión, lo cual aumenta la inestabilidad genómica y favorece la carcinogénesis.<sup>53</sup>

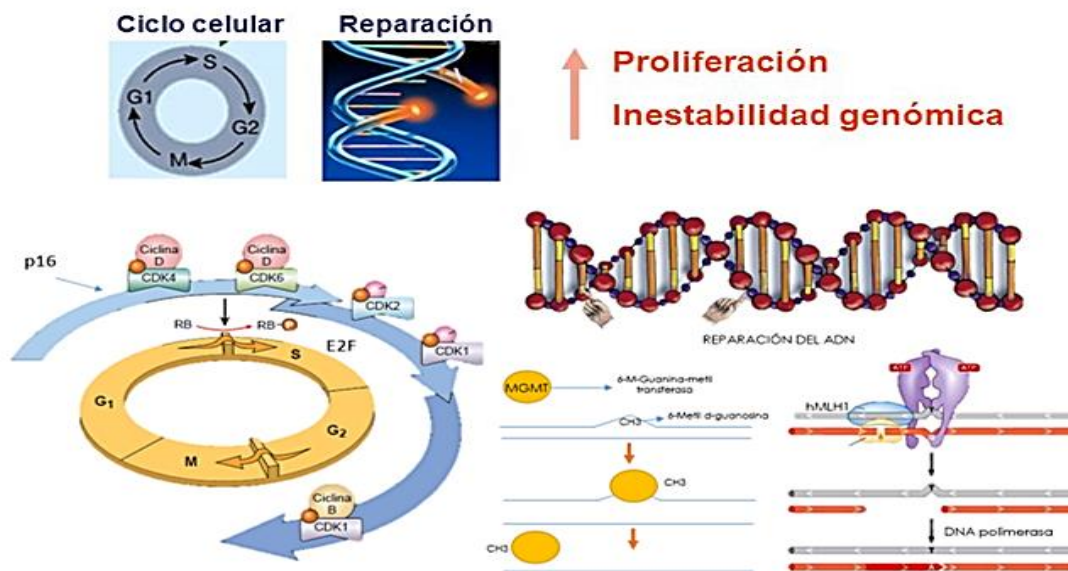


Figura 3. Modificaciones epigenéticas en genes involucrados en el ciclo celular y reparación del ADN. fuente directa

En el Carcinoma mucoepiermoide las alteraciones de P16 como gen supresor tumoral son en gran parte desconocidos.<sup>54</sup>

En un estudio por Guo, X. Et,al.<sup>55</sup> de 2007 mostro que treinta y ocho tumores de glándulas salivales con presencia de carcinoma mucoepidermoide y seis glándulas sanas fueron estudiadas por alteraciones de p16. En el grupo con carcinoma mucoepideroide 14 de los casos presentaron una delección

homocigótica, y dos casos del exón 1 y un caso del exón 2 de p16. La hipermetilación del gen promotor de p16 se encontró en 13 de los casos sin alteraciones de p16 en las glándulas salivales sanas con un 34.2%. Estos descubrimientos sugieren que el principal mecanismo de inactivación de p16 en el carcinoma mucoepidermoide de glándulas salivales es la hipermetilación y las deleciones homocigóticas involucrados en los procesos epigenéticos.<sup>55</sup>

También la relación del estado de la metilación y el grado histológico en el carcinoma mucoepidermoide se evaluó por Sirivanichsuntorn P<sup>56</sup>. en 2013 para obtener una mejor comprensión del comportamiento clínico del tumor; en este estudio se demostró que la metilación al nivel de LINE-1 fue diferente entre los tres grados de diferenciación histológica del carcinoma mucoepidermoide.<sup>56</sup> Curiosamente, cuando comparamos los niveles de metilación de los elementos Alu-1 y Alu de las células microdisccionadas en cada espécimen se demuestro hipometilación, esencialmente en carcinoma mucoepidermoide de bajo grado comparado a tejido normal.<sup>57,58</sup>

Sin embargo, aún no hay suficiente información sobre la epigenética y su papel en el desarrollo de neoplasias, por esta razón continúan las investigaciones en esta área.

## II.VI. Genes involucrados en la carcinogénesis

### II.VI.I P16 (CDKN2A)

Desde el descubrimiento de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas en 1993 el gen supresor tumoral p16 con sus diversos nombres gracias al estudio del mismo gen por diversos autores (INK4A/MTS-1/CDKN2A) ha tomado un lugar importante en estudios de biología molecular relacionados con el cáncer. CDKN2A fue el nombre recientemente asignado a P16 por Human Genome Organisation nomenclature committee, pues es dependiente de ciclina e inhibidor de cinasas 2a se encuentra localizado en el cromosoma y región 9p21, este gen genera variantes severas de la transcripción de los primeros exones siendo este gen un factor fundamental en la regulación del ciclo celular.<sup>54</sup>

CDKN2A es quien codifica a 156 aminoácidos, a 16kD proteínas inhibidoras del ciclo celular, que normal mente bloquea el crecimiento y la proliferación celular al unirse a complejos de quinasas dependientes de ciclinas (CDK 4 y 6) y ciclina D. Esta unión inhibe la actividad cinasa de la encima, la cual arresta el ciclo celular in la fase G1. La mutación de CDKN2A es incapaz de formar complejos estables con la enzima y, por lo tanto, no inhibe eficazmente la progresión de las células a través de divisiones mitóticas inapropiadas. La importancia de esta proteína como regulador del ciclo celular queda demostrada por la amplia gama de tumores en colon y ovario, en los que se han observado mutaciones de CDKN2A.<sup>55</sup>

Las frecuentes mutación y delección de p16 en las primeras líneas de células cancerígenas sugieren rol fundamental en la carcinogénesis.

Se han encontrado al menos tres variantes en la codificación de distintas proteínas, que han sido reportadas, dos de las cuales codifican la estructura relacionado con las isoformas conocidas de la función de los inhibidores de cinasas dependiente de ciclina 4 CDK4 quinasa.

P16 es silenciado en por lo menos tres vías, las cuales son: deleciones homocigóticas, metilaciones en el gen promotor y puntos de mutación.

Las primeras dos vías del compromiso de la inactivación se encuentran presentes en la mayoría de los tumores primarios, adicionalmente la pérdida de la expresión de P16 es un acelerador en el progreso de las neoplasias, porque la deleción de por lo menos una copia es bastante significativa en las lesiones premalignas para el desarrollo de las neoplasias.<sup>29,54</sup>

El restante de la transcripción incluye un primer exón alternativo localizado 20Kb dentro del remanente del gen. Esta transcripción contiene una puerta abierta de marco de lectura a proteínas específicas. La cual no es posible de leer en los productos de otras variantes. Este ARF funciona como estabilizador de las proteínas supresoras de tumores P53 a través de la regulación de los roles de CDK4 y P53 en el ciclo celular en la fase G1. Este gen frecuentemente sufre de mutaciones o deleciones en una gran variedad de tumores y es conocido como un importante gen supresor tumoral.<sup>14,55,59</sup>

## II.VI.II RbM

El gen RbM juega un rol en tres fases, control del ciclo celular, apoptosis y diferenciación. Estas actividades son atribuibles al menos a una parte de la habilidad de interactuar con otras proteínas celulares que afectan a la supresión.<sup>60</sup>

RbM es una proteína nuclear que regula la entrada a la fase S en el ciclo celular, Rb se encuentra constituido por 928 aminoácidos. La reintroducción de RbM en ciertas células tumorales defectuosas bloquea su entrada en la fase S. Por lo tanto, los primeros estudios de este gen centraron la atención en el papel de RbM como regulador del ciclo celular.<sup>60</sup>

El gen RB se encuentra localizado en el cromosoma y región 13q14; se ha demostrado que se muestra alterado epigeneticamente en su expresión en la mayoría de los casos de retinoblastoma, siendo este de los genes supresores tumorales más estudiados.<sup>30,60</sup>

Se piensa que el gen RB está involucrado en la patogénesis de osteosarcomas y leiomiomas. Las anomalías estructurales de RB han sido reportadas en otras lesiones severas mesenquimales. Algunas otras alteraciones en este gen se han observado en tumores epiteliales incluidas en dos de las nueve líneas celulares en cáncer pulmonar; estos datos sugieren que las alteraciones anormales en su estructura incluyen mutaciones y deleciones del gen RB que resulta en una inactivación del gen supresor tumoral encontrándose involucrado en diversos procesos tumorales.<sup>61</sup>

La proteína codificada por el gen RBM (retinoblastoma) es un regulador negativo del ciclo celular y fue el primer gen supresor tumoral encontrado. La proteína que codifica estabiliza también la heterocromatina que mantiene en general la estructura de la cromatina cerrada. La activación

hipofosforilada de la cromatina se une al factor E2F1. Los defectos en este gen son causa de cáncer infantil como la retinoblastoma, y sarcoma osteogénico.<sup>61</sup>

### II.VI.III MGMT

Es una proteína celular de reparación del ADN revierte la alquilación en la posición O6 de guanina, inhibiendo así la reticulación letal y resistencia a los agentes alcalinos. Estudios han sugerido que la deficiencia de MGMT está estrechamente relacionada con la sensibilidad de los tumores cerebrales a agentes alcalinizantes, además, porque la pérdida de proteína MGMT puede ser el resultado de la hipermetilación del promotor. La pérdida de la metilación del promotor en MGMT en gliomas es una fuente de diagnóstico útil de la capacidad de respuesta de los agentes alcalinizantes.<sup>31</sup>

La enzima reparadora de ADN Metil-guanina-metil-trasferasa (MGMT) localizada en el cromosoma y región 10q26 inhibe la eliminación de las células tumorales debido a agentes alcalinos. La actividad de MGMT es controlada por un promotor; la metilación del promotor produce un silenciamiento del gen en el metabolismo del cáncer, esto es consecuencia de la falta de reparación celular por parte de MGMT. En un estudio sobre gliomas en el año 2000 se estudió la responsabilidad de MGMT en la metilación y los agentes alcalinos para la presencia de un tumor.<sup>62</sup>

MGMT, se encuentra involucrada en la defensa celular contra mutaciones y toxicidad proveniente de agentes acetilados. La proteína cataliza estos agentes acetilados convirtiéndolos a grupos metilados reparando así estas lesiones tóxicas. La metilación de los genes promotores ha sido asociada a



severos tipos de cáncer como: colorrectal, pulmonar, cáncer de riñón y linfomas. <sup>63,64</sup>

#### II.IV. IV. hMLH1

El gen hMLH-1 se encuentra en el cromosoma 3q21-23 y es un clásico gen supresor tumoral al cual en muchas investigaciones se le ha estudiado la asociación a la promoción de la metilación en cáncer gástrico aun teniendo en cuenta que las conclusiones no siempre son consistentes. Este gen también puede heterodimerizar con desajustes de la reparación de las endonucleasas PMS2 desajustando la reparación del DNA, proporcionando un punto de entrada a las exonucleasas de degradación. La proteína codificada se encuentra involucrada también en ADN dañado y señalizado que puede ser heterodimerizado con ADN desajustado de reparación por la proteína MLH 3 que se encuentra involucrada en la división celular. Este gen está identificado como un locus frecuentemente mutado en cáncer de colon hereditario. <sup>65,66</sup>

El gen hMLH-1 tiene una función fundamental en la reparación de errores del ADN, generalmente este gen se encuentra mutado en neoplasias hereditarias no polipoides colorrectales. <sup>67</sup>

Herath y Cols <sup>68</sup> encontraron que solo la mitad de todos los tipos de cáncer que estudiaron con un fenotipo de metilación y sin mucosa de colón no maligna; mostraban metilación de hMLH1. Estos hallazgos demuestran que el fenotipo de metilación de la isla CpG emerge primero, lo que lleva a la hipermetilación de hMLH1 en una proporción alta produciendo lesiones malignas y desarrollo posterior de inestabilidad de los microsatélites. <sup>68</sup>

## II.IV.V PLAG

El gen PLAG1 fue descubierto estudiando el cromosoma y región t(3;8)(p21;q12) en su traslocación, la cual ocurría frecuentemente en adenomas pleomorfos en las glándulas salivales de humanos, este gen es un regulador de la fosforilización de zinc y de un factor de transcripción que reconoce una parte específica de bi-partida de ADN regulando la expresión de los blancos genéticos de la familia del gen PLAG1 y PLAG 2 donde se descubrió que es un factor genuino de la transcripción genética.<sup>69,70</sup>

La característica más común de estos factores de transcripción es la habilidad de localizar los núcleos celulares como blancos para la modificación de ADN activando o reprimiendo la transcripción de genes blanco con capacidad de transcripción génica con capacidad de modificación genética.<sup>71</sup>

El gen PLAG codifica a C2H2 que es un factor de transcripción en el crecimiento celular. Este gen en ocasiones sufre de delección o metilación y silenciamiento en distintos tipos de cáncer celular. La expresión de este gen en adultos se encuentra presente en diversos tejidos, como son: lengua, cerebro, riñón, hígado, músculo esquelético, bazo, estomago, glándulas salivales y útero.<sup>72,73</sup>

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las neoplasias malignas de glándulas salivales poseen una gran variedad histológica y un comportamiento biológico agresivo. Clínicamente estas entidades son de rápido crecimiento y producen invasión a zonas vecinas ocasionando un grave daño estructural. Aun cuando se dispone información acerca de las alteraciones genéticas asociados al desarrollo de los carcinomas de glándulas salivales, estas no han podido dilucidar los mecanismos involucrados en la etiopatogenia de dichas alteraciones ni han servido como blancos terapéuticos que mejoren el pronóstico de los pacientes. Se tienen reportes de una translocación recíproca t(11;19) lo que resulta en la fusión del oncogén CRTC1-MAML2,<sup>20</sup> pero estos hechos son poco comprendidos, pues solo son presentes en los grados histopatológicos bajo e intermedio, por lo cual esta duda a nivel genético abre la oportunidad a la epigenética a esclarecer los mecanismo de formación y de acción de esta neoplasia.

#### IV. JUSTIFICACIÓN.

La epigenética muestra un rol fundamental en la patogenia de diversas neoplasias en cabeza y cuello, un ejemplo es el carcinoma oral de células escamosas. El silenciamiento génico de uno o más genes supresores tumorales causa la pérdida de la función de estos a través de la hipermetilación de los promotores y no de las mutaciones genéticas.<sup>75</sup> Estos cambios sugieren una función esencial en el desarrollo, formación y progresión neoplásica.

Actualmente, los avances en biología molecular y celular permiten al patólogo mayor precisión y certeza en su diagnóstico, siendo el mayor inconveniente en estos avances, las pocas lesiones neoplásicas estudiadas bajo estos rubros en cabeza y cuello; por lo que el patólogo sigue basando su capacidad para el diagnóstico en las características morfológicas específicas a las neoplasias malignas. Los principales cambios reportados microscópicamente en las células neoplásicas son las alteraciones morfológicas y de tamaño nuclear, dichos cambios como la presencia de una estructura nuclear condensada, nucléolos prominentes, cromatina hipercromática densa y una alta relación núcleo-citoplasma sugieren profundas alteraciones en la estructura de la cromatina asociadas a modificaciones epigenéticas.

Los cambios epigenéticos en comparación a los cambios génicos tienen el potencial de ser reversibles, característica que les confiere el interés de nuevos investigadores para una oportuna intervención terapéutica. Actualmente se han desarrollado varios inhibidores de las DNMT utilizados con éxito en el tratamiento de neoplasias malignas del sistema hematopoyético y pulmón.

Además, la metilación del ADN coincide en el silenciamiento de los genes relacionados con la quimio resistencia, por lo cual, los agentes desmetilizantes podrían mejorar la sensibilidad de las células neoplásicas a los fármacos oncológicos lo que sería muy prometedor como herramienta para mejorar la quimio sensibilidad de las neoplasias que no responden a otras terapias.

De acuerdo con la literatura referente a la importancia de los cambios epigenéticos en carcinomas orales de células escamosas, la presente propuesta de investigación es analizar el papel de la metilación de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, y reparación del DNA en el carcinoma mucoepidermoide.<sup>2</sup>

En el caso del Carcinoma oral de células escamosas (COCE), la pérdida de material genético se observa en CDKN2A (p16INK4A), p14 (ARF), p53, y APC. Las regiones cromosómicas 3p14 (FHIT), 3p25 (BVS), 4q, 8p21-23, 9p21-2260, 13q14 (PRB), 17p13.1 (p53), y 18q21.1 (DCC) son las principales localizaciones de heterocigosidad del COCE. Los cambios epigenéticos como la metilación son comunes en la tumorigénesis.<sup>7,14</sup>

Debido a la heterogenidad de los tumores de las glándulas salivales, no se han podido estudiar los mecanismos biomoleculares implicados en su desarrollo, por lo que comprender los mecanismos epigenéticos involucrados en su patogénesis ayudaría a entender el curso biológico de estas lesiones que impactarían en el pronóstico de los pacientes.

## V. Pregunta de investigación

¿Cuál es el estado de metilación de los genes RB1, CDKN2A/p16, MGMT, hMLH1, PLAG-1 en los diferentes grados de carcinoma mucoepidermoide?

## VI. Hipótesis.

Los genes RB1, CDKN2A/p16, MGMT, hMLH1 y PLAG se encuentran hipermetilados en el carcinoma mucoepidermoide de grado histológico alto en comparación de los grados intermedio y bajo.

## VII. OBJETIVOS

### VII.I Objetivo General

Determinar el estado de metilación de los genes RB1, CDKN2A/p16, p27, MGMT, hMLH1, PLAG en el carcinoma mucoepidermoide.

### VII.II Objetivo específico

Comparar la marca de metilación en cada grado de diferenciación en carcinomas mucoepidermoides.

Comparar la marca de metilación de cada grado de diferenciación en carcinomas mucoepidermoides con el grupo control.

## VIII. Materiales y método

En 5 casos de carcinoma mucoepidermoide y una muestra control de glándula salival sana registrados en el Laboratorio de Patología Bucal y Maxilofacial de la división de estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología UNAM, en un periodo que abarca de 2013 a 2018 en donde se presentaron dos casos de bajo grado, dos casos de grado intermedio y un caso de alto grado de malignidad respectivamente, de los cuales se obtuvieron muestras de ADN, para su posterior amplificación con PCR, y donde fueron analizados mediante electroforesis y espectrofotometría determinando así el grado de metilación de cada caso.

## IX. Metodología.

### IX.I Diseño de estudio.

Observacional transversal analítico.

### IX.II Población de estudio

5 carcinomas mucoepidermoide seleccionados del 2014 al 2018 del archivo del Departamento de Patología bucal y Maxilofacial de la DEPeI de la Facultad de Odontología de la UNAM.

### IX.III Criterios de Selección

#### IX.III.I Criterios de inclusión:

- Tejidos incluidos en parafina con diagnóstico histopatológico de carcinoma mucoepidermoide.
- Bloques de parafina que cuenten con suficiente cantidad de tejido para su evaluación histológica.

#### IX.III.II Criterios de exclusión:

- Aquellos tejidos que al término de la reevaluación diagnóstica con hematoxilina y eosina no correspondan al diagnóstico de carcinoma mucoepidermoide.

#### IX.III.III Criterios de eliminación:

- Casos que durante el procesamiento se pierda el tejido o no exista presencia de neoplasia en la revisión de laminillas.



#### IX.IV. Obtención de ADN.

Se utilizó el sistema Miniprep gDNA ReliaPrep™ para muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema incorpora un método de desparafinación independiente del xileno u otros solventes volátiles. El grado de fragmentación del ADN es variable dependiendo del tipo de muestra, del tiempo de toma de esta y de su almacenamiento. Por indicaciones del fabricante al diseñar ensayos de amplificación los mejores resultados se logran cuando se dirigen a regiones de 200 nucleótidos o menos.

##### IX.IV.I Extracción ADN

Para la extracción de ADN a partir de muestras en cubos de parafina se requirió de: 5 ml de aceite mineral, 2:1 ml de buffer de lisis (LBA), 250µl de proteinasa K (PK), 3.25ml BL Buffer, Solución de lavado de 3 ml la cual se preparó a 1X con etanol 95-100%, 200µl RNase A, 15 ml de buffer de elución, tubos Eppendorf de 1.5ml previamente esterilizados, tubos de recolección, columnas de unión ReliaPrep™ FFPE, micropipetas de la marca Axypet, termobloque de la marca slect BioProducts a 56C° y 80C°, microcentrífuga Thermo scientific Sorvall Legend Mico 17R.

Se colocaron los 5 cortes en secciones de 10µm que se obtuvieron de las 5 muestras de carcinoma mucoepidermoide y del grupo control en tubos Eppendorf de 1.5ml previamente esterilizados, en donde se añadió aceite mineral 300µl siguiendo las recomendaciones del fabricante para cortes ≤ 50µm y se incubaron a 80C° en el termobloque durante un minuto, posteriormente se llevaron las muestras al vórtice para mezclarlas

homogéneamente durante unos segundos se agregaron 200µl de buffer de lisis y llevarlas a la micro centrifuga a 10,000\*g durante 15 segundos para formar dos fases una acuosa (inferior) y otra oleosa (superior), se agregaron 20µl de proteinasa K directamente a la fase inferior y se mezcló el contenido con ayuda de la micropipeta y se llevaron a incubar en el termobloque a 56C° durante una hora y a 80C° por 4 horas más siguiendo las recomendaciones del fabricante, para una óptima recolección de ADN, ya que el proceso puede ser disminuido en una hora pero generaría pobres resultados en la obtención de ADN, terminado el tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente las muestras para su posterior almacenaje a -20C° durante toda la noche.

Después de 24 horas se dejó que las muestras tomaran temperatura ambiente y se centrifugaron brevemente a temperatura ambiente para recolectar la condensación.

Se agregaron 10µl de RNasa A directamente a la fase acuosa y se mezcló con ayuda de la micropipeta y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente posteriormente se agregaron 220µl de Buffer BL a la muestra lisada junto con 240µl de etanol (95–100%) vórtice para mezclarlas homogéneamente durante unos segundos y se centrifugó a 10.000 × g durante 15 segundos a temperatura ambiente para formar dos fases, inferior (acuosa) y una fase superior (oleosa) para procesar cada muestra, se colocaron en una columna de unión en uno de los tubos de recolección provistos por el kit ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System.

Se transfirió toda la fase acuosa de la muestra, incluido cualquier precipitado que pudiera haberse formado, columnas de unión ReliaPrep™ FFPE y se desechó el aceite mineral restante.

Es importante remarcar que el aceite mineral es inerte y no interfiere con el procedimiento de extracción si parte de la fase de aceite es trasladado a las columnas de unión ReliaPrep™ FFPE

Se centrifugó el conjunto a 10.000\* g durante 30 segundos a temperatura ambiente y se desechó el contenido de la parte superior de columnas de unión ReliaPrep™ FFPE y se insertó nuevamente la columna de unión en el tubo de recolección. Para el lavado y elución de las columnas de unión ReliaPrep™ FFPE, se agregó 500µl de solución de lavado 1X y se tapó la columna para llevarla a la micro centrifuga a 10.000\* g durante 30 segundos a temperatura ambiente se desechó el contenido de las columnas de unión ReliaPrep™ FFPE y se volvió a insertar la columna de unión en el mismo tubo de recolección utilizado para el ácido nucleico.

A continuación se agregaron 500µl de solución de lavado 1X a las columnas de unión ReliaPrep™ FFPE se taparon se centrifugaron a 10.000 × g durante 30 segundos a temperatura ambiente se descartó nuevamente el contenido de las columnas de unión ReliaPrep™ FFPE para llevarlas a la microcentrífuga sin tapar las columnas a 13,000\* g por 3 minutos a temperatura ambiente para poder secar las columnas de unión ReliaPrep™ FFPE, es importante secar completamente las columnas para evitar transferir el etanol en los siguientes pasos de la extracción del ADN.

Se transfirieron las columnas de unión ReliaPrep™ FFPE a un tubo Eppendorf de 1.5ml y se descartó el tubo de recolección, inmediatamente se centrifugo a 16,000\* g durante 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se descartaron las columnas de unión de todos los tubos Eppendorf, se cerraron y se almacenaron a -20C° durante toda la noche.

#### IX.IV. II. Cuantificación de ADN

Se realizó la cuantificación y la evaluación de la calidad del ADN con el sistema Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras cumplieron con el criterio de calidad ( $260/280 > 1.8$ ).

#### IX.IV.III Bisulfito de Sodio tratamiento genómico para ADN

Para este paso de modificación de ADN se requirió: agua destilada a temperatura ambiente solución de NaOH con concentración 2 y 3 M recientemente preparada, Hidroquinona con concentración 10mM preparada al momento, Bisulfito de Sodio con concentración 3.6M preparada al momento, aceite mineral, etanol 95%, glucógeno 10mg/ml acetato de sodio 3M y pH 5.2, micropipetas de la marca Axypet, termobloque de la marca slect BioProducts a 56C° y 80C°, microcentrífuga Thermo scientific Sorvall Legend Mico 17R, tubos Eppendorf de 1.5ml y el Kit Genomic DNA purification system Promega™ el cual contiene: tubos de recolección solución de EDTA con concentración 0.5M y pH 8.0, agua libre de nucleasas, solución de lisis nucleica, solución A RNasa, Wizard SV solución buffer, Wizard SV minicolumns y Wizard SV solución de lavado.

Para la reconstitución ADN, se agregó 1µg en 25µl de agua destilada en un tubo de 1.5ml para microcentrífuga para los 5 casos de carcinoma mucoepidermoide y del grupo control se añadieron 2.75µl de solución de NaOH 2M y se incubó durante 10 min a 37C° en el termobloque, posteriormente se agregaron 15µl de hidroquinona preparada al momento con concentración 10mM por último se agregaron 260 µl de bisulfito de sodio 3.6M preparado al momento y se mezcló en el vórtice para mezclar las muestras homogéneamente durante unos segundos; se cubrió con

suficiente aceite mineral toda la superficie de la fase acuosa y se incubó durante 16 horas a 54C°.

Después de esperar las 16 horas se removió la solución que contenía ADN aproximadamente 300µl del sobrenadante de aceite mineral y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5ml para centrifuga se agregaron 300µl de SV lysis solution y etanol al 95% 1:1 esto se mezcló con micropipeta y se colocó en un Wizard mini spin column proporcionado por el fabricante previamente colocado en un tubo de recolección.

Se centrifugaron durante 1min las muestras y se descartó el contenido del tubo de recolección y se colocó nuevamente el tubo de recolección en la columna Wizard mini spin.

Se agregó 600µl de SV buffer de lavado y 95% de etanol 1:1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante para centrifugar las muestras a 10,000\* g 1min, se descartó lo recolectado en el tubo de recolección y repitió nuevamente el proceso para un total de 3 lavados después del segundo lavado se centrifugo la columna nuevamente sin adicionar solución buffer de lavado para secar la columna y se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5ml para agregar 50µl de agua e incubar 1min a 65 C° en el termobloque para posteriormente centrifugar 1min a 10,000\* g recolectando el ADN de la columna nuevamente.

Por último, se agregaron 5.5µl de solución de NaOH 3M y se incubaron durante 5min a temperatura ambiente para poder añadir lo siguiente: 1µl de glucógeno 10mg/ml, 6µl de acetato de sodio 3M y pH 5.2 y 150µl de etanol al 100% para esperar la precipitación de ADN durante la noche a una temperatura de -20C°.

Después de 12 horas se centrifugaron las muestras a 10,000\* g durante 15min a una temperatura de 4C° para descartar el sobrenadante y añadir etanol

al 70% para centrifugar nuevamente. Al finalizar descarto el sobrenadante y se resuspendió el ADN en 50µl de Tris-Cl concentración 10mM y pH 8.

#### IX.IV.IV Cuantificación de ADN

Se realizó la cuantificación y la evaluación de la calidad del ADN posterior al procedimiento de conversión con bisulfito de sodio con el sistema Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras cumplieron con el criterio de calidad ( $260/280 > 1.8$ ).

#### IX.IV.V PCR

Para este punto fue necesario utilizar: PCR Master mix, Upstream primer 10µM, Downstream primer 10µM, muestra de ADN de los 5 casos de carcinoma mucoepidermoide y del grupo control y agua libre de nucleasas.

El primer paso fue agregar 12.5µl de PCR master mix, 2.5 µl de primer Upstream primer 10 µM, 2.5 µl de primer Downstream primer 10 µM para cada uno de los oligos (Tabla 6) y diferentes cantidades de ADN por muestra estandarizando a 40 µg/ µl y ajustando la cantidad de agua libre de nucleasas a cada muestra para obtener 25 µl. (Tabla 5)

Numero de muestra	Cantidad de ADN µl	Cantidad de Agua libre de nucleasas µl
0	.63µl	9.9 µl
1	2.3 µl	5.2 µl
2	1.6 µl	5.9 µl
3	1.9 µl	5.6 µl
4	1.88 µl	5.62 µl
5	2.17 µl	5.33 µl

Tabla 5. Cantidad de ADN y agua libre de nucleasas utilizada. Fuente directa

Set de primers para MSP-PCR		
	Secuencia no metilada	Secuencia metilada
<b>RB1</b>	up: 5'-GGGAGTTTTGTGGATGTGAT-3' ds:5'-ACATCAAACACACCCCA -3'	up: 5'-GGGAGTTTCGCGGACGTGAC -3' ds:5'-ACGTGCGAAACACGCCCCG -3'
<b>CDKN2A/p16</b>	up: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT -3' ds: 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3	up: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC -3' ds:5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA -3'
<b>MGMT</b>	up: 5'- TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTGT -3' ds: 5'-AACTCCACACTCTCCAAAAACAAAACA -3'	up: 5'- TTTGACGTTTCGTAGGTTTCGC -3' ds: 5'- GCACTCTCCGAAAACGAAACG -3'
<b>hMLH1</b>	up: 5'-TTTTGATGTAGATGTTTATTAGGGTTGT -3' ds: 5'-ACCACCTCATCATAACTACCCACA -3'	up: 5'- ACGTAGACGTTTATTAGGGTCGC -3' ds: 5'- CCTCATCGTAACTACCCGCG -3'
<b>PLAG</b>	up: 5'-TAGACCTGTGCTTCCCATCC-3' ds: 5'-GAGGGAGAGGAAACCCTTG-3'	up: 5'-TCCTCAAGCTGCCAGAAGAT-3' ds: 5'-TACTGCTTCTGGCGGAACCT-3'

ds: downstream; us: upstream. RB1, proteína del retinoblastoma; CDKN2A/P16, inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A; MGMT, metilguanidina-ADN metiltransferasa; hMLH1, homólogo 1 mutL; PLAG, gen del adenoma pleomorfo.

Tabla 6. Primers de PCR utilizados.

Posteriormente las muestras entraron al termociclador Axygen Maxygen II a temperaturas variables de 95C° durante 2min, 95C° 1min, 58C° 1 min, 72C° 1 min y 72C° 5 min, por 40 ciclos para ser almacenadas 4C°.

Este proceso se realizó en 6 ocasiones con los 5 genes que se propusieron como materia de este estudio (RBM, P16, MGMT, hMLH, y PLAG-1).

#### IX.IV.VI. Foto documentación.

Se realizó electroforesis de muestra obtenida por la técnica MSP-PCR en gel de agarosa al 2% durante 30 minutos a 200v. Se agregó 3µl bromuro de etidio durante 30 minutos en la solución Buffer TAE cubriendo el gel en su totalidad para su posterior visualización. El gel fue visualizado por medio del sistema de foto documentación Axygen Gel Documentation System con luz UV a 302 nm. (Figura 5.)

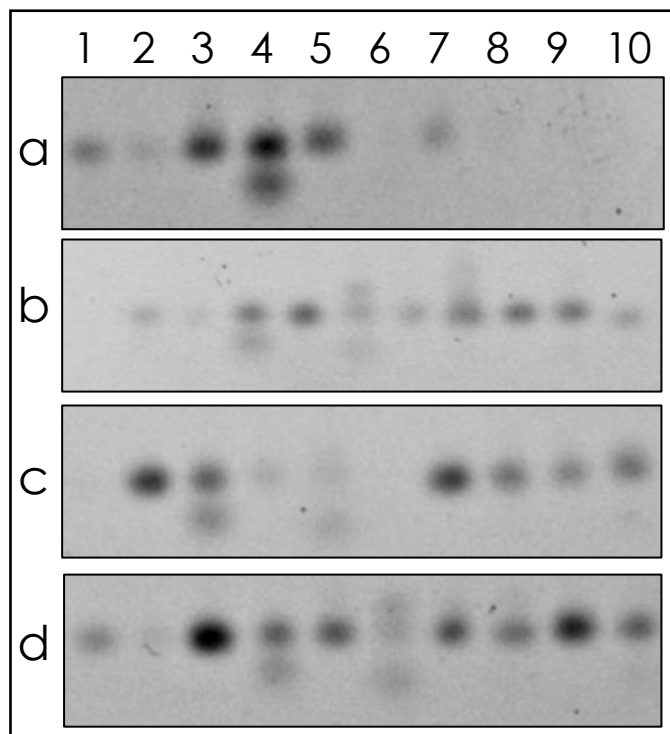


Figura 5. Productos amplificados de marcadores metilados y no metilados. Numeración superior: 1) hMLH Metilado 2) hMLH No metilado 3) Rb Metilado 4) Rb No Metilado 5) PLAG 1 Metilado 6) PLAG 1 No Metilado 7) P16 Metilado 8) P16 No Metilado 9) MGMT Metilado 10) MGMT No Metilado. a) Grupo control B) Carcinoma mucoepidermoide de bajo grado C) Carcinoma mucoepidermoide de grado intermedio D) Carcinoma mucoepidermoide de alto grado.



## X. Análisis estadístico

Para obtener las densidades ópticas posteriores al análisis de los geles de agarosa en el sistema de foto documentación Axygen Gel Documentation System con luz UV a 302 nm; se utilizó el software GelQuant.Net 1.8.2. El análisis se realizó por triplicado tanto para el grupo control como para los 5 casos en cada uno de los genes que fueron analizados. Se realizó una base de datos de los resultados previamente obtenidos con ayuda del software SPSS versión 22.0. Para el análisis descriptivo de las variables cuantitativas se utilizó mediana como medida de tendencia central y rango intercuartilar como medida de dispersión.

Para evaluar la diferencia de marca de metilación entre el grupo control correspondiente a glándula salival normal y los diferentes grados histopatológicos de Carcinoma Mucoepidermoide se realizó la prueba de hipótesis Kruskal-Wallis y pos hoc Dunn, donde se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de  $p < 0.05$ .

Para identificar si existía diferencia entre las marcas de metilación de los genes mencionados entre los grados histopatológicos bajo, intermedio y alto del carcinoma mucoepidermoide, se realizó la prueba Kruskal-Wallis con post hoc U de Mann Whitney donde se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de  $p < 0.05$ .

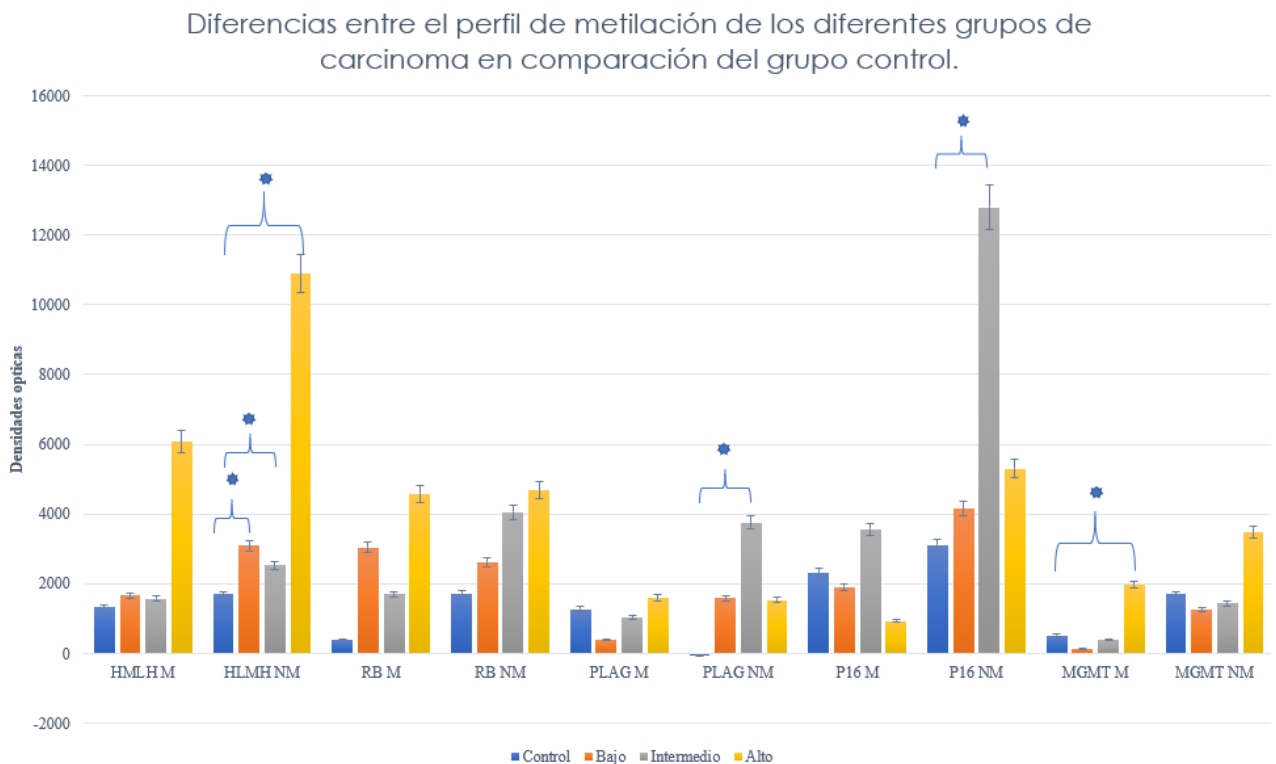
## XI. Resultados

Los resultados descriptivos de los genes estudiados se esquematizan en la tabla 7.

Tipo de muestra	hMLH M (D.O)	hMLH NM (D.O)	Rb M (D.O)	Rb NM (D.O)	PLAG-1 M (D.O)	PLAG-1 NM (D.O)	p16 M (D.O)	p16 NM (D.O)	MGMT M (D.O)	MGMT NM (D.O)
Grupo control Mediana (Q1,Q3)	1332.4 (381.2,2124.4)	1701.6 (392.8,2418.7)	409 (740,2329.1)	1725.3 (740,2329.1)	1272.5 (-201.6,4012.3)	-39.9 (-237.8,-39)	2332.2 (846.9,5864.7)	3114 (2773,4014)	522.8 (349.9,792.7)	1702 (727,2125)
Muestra 1 bajo grado Mediana (Q1,Q3)	242.4 (83.1,532.1)	964.1 (931.5,973)	1616.2 (452.3,2250)	775.3 (314.6,4138.4)	550.3 (492.7,690.5)	882 (323.9,998.2)	374.6 (-309.3818.1)	359.6 (-119.5,967.4)	225.7 (58.2,2012)	-73.5 (-609,637.6)
Muestra 4 bajo grado Mediana (Q1,Q3)	5541.9 (2789.3,7353.9)	5331.4 (0,5412.5)	4014.5 (3820.3,8890.7)	8047.9 (1123.2,11390.1)	97.9 (13.2,324.4)	4511.5 (2162.2,7321.9)	3277.1 (2995,5578.4)	10570.3 (717.7,17190.8)	-44.8 (-319.4,383.4)	2670 (2471.6,2903.6)
Muestra 2 grado intermedio Mediana (Q1,Q3)	1022.3 (-39.5,1474.7)	2258.9 (1876.7,6862.5)	1576.6 (637.1,3024)	6277.9 (2543.8,9884.1)	620 (424.8,723)	1027 (-102.2,1763.3)	3153.5 (10.3,3972.6)	11200.9 (8414.9,11702.2)	9.8 (-215.3,1016.9)	575.4 (-22.5,611.3)
Muestra 3 grado intermedio Mediana (Q1,Q3)	3179.9 (1666.8,3282.2)	2785.7 (-480.1,2807.9)	1826.5 (741,2011.2)	3292 (1153.7,4800.7)	2704.9 (13332.9,3510.9)	6856.9 (5760.4,9509.5)	6369.8 (1859.4,10677.1)	14114.6 (13884,15442.6)	381.7 (374.2,813.6)	2803.1 (2271,3030.6)
Muestra 5 alto grado Mediana (Q1,Q3)	6076.9 (2356.6,6527)	10888.3 (8992.4,11741.7)	4575.4 (4371.9,4968.1)	4685.6 (4354.3,5190.2)	1597 (1587.5,1598.8)	1531.4 (1143,3438)	932 (917.8,6280.5)	5300.6 (4365.3,8661.6)	1971.4 (1258.3,2502.2)	3468.4 (1566.5,5234.7)

Tabla 7. Resultados de mediana y rango intercuartilar de las muestras.

En la comparación de la presencia e intensidad de los genes metilados en los tres grados histológicos del carcinoma mucoepidermoide con el grupo control, se encontró diferencia estadísticamente significativa al analizar hMLH1 en los carcinomas de bajo, intermedio y alto grado en la forma no metilada en comparación del grupo control obteniéndose una  $p=0.001$ . En PLAG 1 solo se observó diferencia estadística ( $p=0.005$ ) en la forma no metilada al comparar el carcinoma de grado intermedio con el grupo control. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.003$ ) en la forma no metilada de p16 entre el carcinoma de grado intermedio en comparación del grupo control. Por último, en el análisis de MGMT se encontró diferencia estadística únicamente en la forma metilada entre el carcinoma de alto grado y el grupo control ( $p= 0.044$ ). (Grafica 1)



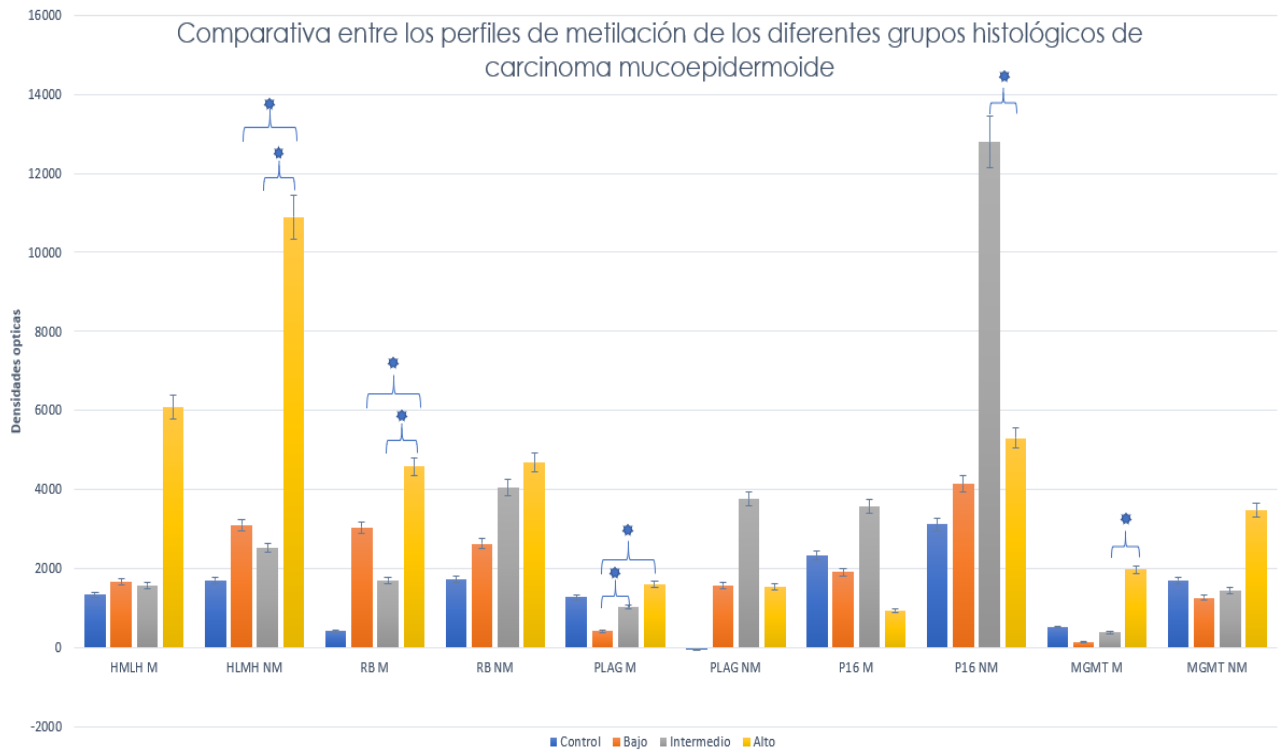
Grafica 1. Diferencias entre el perfil de metilación de los diferentes grupos de carcinoma en comparación del grupo control

En la comparación de la presencia e intensidad de los genes estudiados entre los diferentes grados histológicos del carcinoma mucoepidermoide sólo se encontraron diferencias para las formas no metiladas de los genes hMLH-1 y p16 al comparar los tres grados histopatológicos de carcinoma mucoepidermoide. Para hMLH-1 se obtuvo una  $p=0.035$  al comparar el perfil de metilación de bajo grado vs alto, así como entre el grado intermedio y alto grado con una  $p=0.020$ . Mientras que para p16 se observó diferencia al comparar el grado intermedio contra el alto grado con una  $p=0.039$ .

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas para las formas metiladas de los genes PLAG-1, Rb y MGMT al comparar los tres grados histopatológicos del carcinoma mucoepidermoide. Se observó diferencia al comparar la presencia de PLAG-1 en los carcinomas de bajo grado contra los de alto grado con una  $p=0.020$ , así como al comparar las neoplasias de bajo grado contra las de grado intermedio con una  $p=0.025$ .

Rb mostró diferencia significativa al comparar los carcinomas de bajo grado contra los de alto grado con una  $p=0.045$ , así como al comparar el grado intermedio contra el alto grado con una  $p=0.020$ .

Por último, se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar la presencia de MGMT entre los carcinomas de grado intermedio y alto grado con una  $p=0.020$  (Grafica 2)



Grafica 2. Comparativa entre los perfiles de metilación de los diferentes grupos histológicos de carcinoma

## XII. Discusión:

El carcinoma mucoepidermoide es una neoplasia maligna originada de las glándulas salivales debido al potencial que poseen para desarrollar tumores de cualquiera de sus estructuras.<sup>1,11</sup> El comportamiento agresivo de esta lesión y los escasos estudios epigenéticos que existen actualmente referentes a ella; reiteran la necesidad de crear nuevas líneas de investigación que permitan en un futuro establecer un diagnóstico oportuno, que repercuta directamente pronóstico y calidad de vida en beneficio de los pacientes.

PLAG-1 es un factor de transcripción que suprime al menos 47 genes y activa más de 10, en donde la mayoría codifican a factores de crecimiento.<sup>73</sup> Cerca del 85% de los adenomas pleomorfos, que son neoplasias benignas de glándulas salivales, muestran una alteración cromosómica en PLAG-1 localizado en el cromosoma 8q12-13.<sup>74</sup> Se ha reportado en la literatura que los adenomas pleomorfos recidivantes pueden originar neoplasias malignas mioepiteliales y que este desarrollo o transformación puede estar asociada a PLAG-1. Reinhard E. Friedrich y Cols.<sup>74</sup> en 2012 estudiaron los reordenamientos cromosómicos en PLAG1 en 20 mioepiteliomas y 42 carcinomas mioepiteliales de glándulas salivales, utilizando la técnica de hibridación in situ (FISH). A diferencia de los adenomas pleomorfos que expresan hasta en un 85% de los casos PLAG-1, en los mioepiteliomas dicha expresión solo se observó en el 0.03% de los casos, mientras que en los carcinomas mioepiteliales solo en el 0.02% de los casos. Debido a ello, los autores concluyen que PLAG-1 es un marcador insuficiente para determinar la diferencia entre las lesiones mioepiteliales benignas y malignas además de que no muestra evidencia de estar involucrado en el desarrollo de tumores mioepiteliales.<sup>74</sup>

Las neoplasias malignas para PLAG-1 fueron estudiadas en 2018 por Ashina Et.al.<sup>75</sup> donde se realizó un estudio de los efectos clínico-patológicos de PLAG-1 en adenoma pleomorfo y carcinoma ex adenoma pleomorfo. Analizaron el estado de fusión de PLAG-1 y HMGA-2 en una población de 105 adenomas pleomorfos y 11 carcinomas ex adenomas pleomorfos usando la técnica RT-PCR. Los autores encontraron que la glándula submandibular fue la más afectada (22 casos) por el adenoma pleomorfo con una fusión de PLAG-1 y CTNNB1 ( $p=0.0109$ ). La población para el carcinoma ex adenoma pleomorfo fueron 5 pacientes masculinos y 6 pacientes femeninos en un rango de edad de 51 a 77 años, donde las localizaciones anatómicas fueron las siguientes; 6 en glándula parótida, 4 en glándula submandibular y 1 caso en glándula menor en velo de paladar. Para el carcinoma ex adenoma pleomorfo también la fusión de CTNNB-1 PLAG-1 fue la más frecuente. Hasta la fecha no existen estudios relacionados de este gen con epigenética. Nuestros resultados mostraron que PLAG-1 metilado se expresaba de forma diferente en los 3 grados histopatológicos del carcinoma mucoepidermoide, es decir, observamos una relación directamente proporcional entre la presencia de la marca de metilación y los grados histológicos de la neoplasia. Obtuvimos mayor marca de metilación en PLAG1 de alto grado en comparación con los grados intermedio y bajo. Esto podría relacionarse a un silenciamiento de la función del gen PLAG1 que promovería la agresividad de las lesiones. Nuestros datos se asemejan a los previamente reportados en la literatura, aunque a la fecha no existen estudios relacionados al carcinoma mucoepidermoide. Remarcando así la utilización de este marcador para un diagnóstico oportuno en las lesiones de carcinoma mucoepidermoide.<sup>74</sup>

El gen Rb es un regulador del ciclo celular que reprime el paso de la fase G1 a la fase S. Cuando su función es suprimida puede dar paso al desarrollo de neoplasias malignas. En 2015 De Souza y Cols.<sup>60</sup> estudiaron la desregulación

de la vía de señalización del gen Rb en el adenoma pleomorfo, adenoma pleomorfo recurrente y carcinoma ex adenoma pleomorfo de glándulas salivales con la técnica de inmunohistoquímica. La población del de estudio fue la siguiente: 24 casos de adenoma pleomorfo, 20 casos de adenoma pleomorfo recurrente y 2 casos de carcinoma ex adenoma pleomorfo. Los resultados de los autores mostraron que, en el tejido glandular normal, la tinción de Rb se observó en células ductales y acinares. En todos los grupos de tumores Rb inmunorreactivo fue localizado en algunas células mioepiteliales y ductales. Para el adenoma pleomorfo se encontraron 2 casos con un puntaje 1 para la tinción inmunohistoquímica, para el adenoma pleomorfo recurrente un caso presento un puntaje de 1, para los dos casos de carcinoma ex adenoma pleomorfo no se encontró expresión en la tinción; los autores sugieren mayor tamaño de muestra para resultados más concluyentes. Mayores puntajes no fueron reportados para ambas entidades. Cabe resaltar que hasta la fecha no hay estudios reportados en la literatura que relacionen a Rb con tumores de glándulas salivales con otras técnicas de biología molecular.

Nuestros resultados son contradictorios a los reportados por de Souza y Cols.<sup>60</sup> esto puede ser debido a que nosotros utilizamos una técnica de biología molecular más específica que nos permite ver la expresión del gen Rb. En nuestro análisis de Rb en su forma metilada encontramos, que mostro diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los grados histopatológicos de bajo contra alto grado y de grado intermedio contra alto grado de malignidad. Debido a ello nosotros creemos que la vía Rb es importante para el desarrollo de neoplasias de glándulas salivales. Así como la posibilidad del papel fundamental que podría ocupar Rb como un marcador base para el diagnóstico oportuno en los diferentes grados histopatológicos del carcinoma mucoepidermoide oportunamente.<sup>60</sup>



Los genes hMLH-1 y MGMT participan en la reparación de ADN, cuando se encuentran metilados su función es reprimida y su inactividad puede dar paso a la formación de una neoplasia. En 2015 Michailidi y Cols.<sup>66</sup> evaluaron la expresión y promoción del estado de la metilación de 4 genes, específicamente hablaremos de hMLH-1 y MGMT en pacientes con adenocarcinoma en colon con la técnica RT-PCR. Para este análisis se estudió el adenocarcinoma de colon en 61 pacientes. Este estudio menciona que el adenocarcinoma en colon es el resultado de alteraciones genéticas y epigenéticas acumuladas en las células epiteliales de la mucosa de colon por lo cual los autores analizaron la marca de metilación para hMLH1 y MGMT entre otros marcadores.

Los resultados del estudio de metilación en los marcadores revelaron que hMLH1 y MGMT estuvieron presentes en estadios tempranos de la formación tumoral y en algunas ocasiones fueron detectables en mucosa coló-rectal sana. Los autores Michailidi y Cols.<sup>66</sup> reportaron para MGMT 40 de 61 casos, es decir 66% de los casos con adenocarcinoma de colon presentaron metilación al igual que en el grupo control, 12 de 14 casos presentaron metilación, es decir en un 86%. En el gen hMLH-1 la marca de metilación fue encontrada en 15 de 61 casos lo que es equivalente al 25% a su vez este mismo gen se encontró metilado en el grupo control en 6 casos de 14 donde presentaron marca de metilación lo que es equivalente a un 43%. Los autores Michailidi y Cols.<sup>66</sup> postularon que la metilación del ADN es un útil marcador para monitorear la progresión tumoral y de los promotores de metilación en genes asociados a estadios más avanzados del tumor, en lesiones con pobre diferenciación y metástasis.

Nuestros resultados para el gen MGMT mostraron diferencia en la marca de metilación entre los carcinomas de alto grado en comparación de los de grado intermedio. También observamos una tendencia en la que a mayor grado histológico mayor presencia de metilación habrá así también este

gen mostró marcas de metilación en el grupo control siendo esta marca similar en intensidad en comparativa con el grado histológico bajo e intermedio.

Nosotros encontramos que el gen hMLH-1 solo presento un mayor perfil de metilación en los carcinomas de alto grado, lo cual parece indicar que en estas neoplasias habrá una menor capacidad de reparación de ADN dañado, lo que podría ser un factor que contribuya a la inestabilidad genómica. Fue notable que el comportamiento de hMLH-1 fue relativamente similar a MGMT por lo cual ambos genes podrían ser útiles en el diagnóstico de lesiones malignas que sufran de la pérdida de la regulación del ciclo celular.

Para ambos genes estamos de acuerdo con los resultados de los autores, ya que ambos estuvieron presentes en su forma metilada en el grupo control y en la comparativa de un grado intermedio contra un alto grado. Ambos genes tendrían la posibilidad de ser utilizados principalmente para los estadios primarios de la lesión.

El gen p16 es un regulador del ciclo celular que reprime el paso de la fase G1 a la fase S, cuando su función es suprimida puede dar paso al desarrollo de neoplasias malignas. En 2007 Guo, X. Et,al<sup>55</sup> estudio la las alteraciones de p16 en carcinoma mucoepidermoide para determinar su estado de metilación con la técnica MSP-PCR. La población para el estudio fue de treinta y ocho tumores de glándulas salivales con presencia de carcinoma mucoepidermoide y seis glándulas sanas fueron estudiadas por alteraciones de p16. En el grupo con carcinoma mucoepideroide 14 de los casos presentaron una delección homocigótica, y dos casos del exón 1 y un caso del exón 2 de p16.

La hipermetilacion del gen promotor de p16 se encontró en 13 de los casos sin alteraciones de p16 en las glándulas salivales sanas con un 34.2%

Estos descubrimientos sugieren que el principal mecanismo de inactivación de p16 en el carcinoma mucoepidermoide de glándulas salivales es la hipermetilación y las deleciones homocigóticas involucrados en los procesos epigenéticos.<sup>55</sup>

En nuestros resultados, p16 muestra una pérdida de la marca de metilación en los carcinomas de alto grado en comparación con los grados bajo e intermedio. Lo cual podría indicar que, aunque la expresión de este gen se recupera en este grado histológico, presenta algún tipo de mutación a nivel genómico que haga que su función supresora tumoral se pierda. Por lo tanto, nuestros resultados son similares a los de los autores antes mencionados Además p16 metilado sugiere una función al inicio de la carcinogénesis para esta lesión, perdiendo su marca de metilación en el alto grado de esta lo que sugeriría inestabilidad génica.

### XIII. Conclusiones:

- El gen PLAG-1 fue el que mostró una mayor diferencia significativa al comparar los diferentes grados histopatológicos del carcinoma mucoepidermoide. Se observó que la expresión de las marcas de metilación fue directamente proporcional a los grados histopatológicos de la lesión. Debido a esta tendencia, nosotros proponemos que la metilación de este gen podría jugar un papel fundamental en su carcinogénesis.
- El gen Rb presentó una expresión parecida a PLAG-1, en donde observamos que los carcinomas de alto grado presentaban un perfil de metilación mayor en comparación con las neoplasias de bajo grado. Debido a ello, este gen podría ser útil como factor diagnóstico y pronóstico entre las neoplasias de bajo versus alto grado.
- Para el gen MGMT solo observamos diferencia en la marca de metilación entre los carcinomas de alto grado en comparación de los de grado intermedio. Aun así, observamos una tendencia en la que a mayor grado histológico mayor presencia de metilación habrá. La falta de diferencia estadística al comparar los grados bajo e intermedio pudo ser debida a que el tamaño de la muestra fue pequeño.
- El gen hMLH 1 solo presentó un mayor perfil de metilación en los carcinomas de alto grado, lo cual parece indicar que en estas neoplasias habrá una menor capacidad de reparación del ADN dañado, lo que podría ser un factor que contribuya a la inestabilidad genómica. Debido a ello, consideramos que el silenciamiento de este gen podría ser importante para el desarrollo de estas neoplasias.
- Contrario al perfil de metilación de los genes mencionados anteriormente, p16 muestra una pérdida de la marca de metilación en los carcinomas de alto grado en comparación con los grados bajo

e intermedio. Lo cual podría indicar que, aunque la expresión de este gen se recupera en este grado histológico, presenta algún tipo de mutación a nivel genómico que haga que su función supresora tumoral se pierda.

- Aunque se observó una tendencia mayor en el perfil de hipermetilación en los grados histopatológicos altos del carcinoma mucoepidermoide, los genes PLAG-1 y Rb fueron concluyentes con nuestra hipótesis.

Se necesitan realizar estudios posteriores que incluyan una mayor cantidad de muestra que nos permitan confirmar los hallazgos obtenidos en esta investigación.

#### XIV. Bibliografía

1. Hernández Granados R, Mérida Méndez C, Guarneros López P, Beatriz Aldape-Barrios D. Carcinoma mucoepidermoide Mucoepidermoid carcinoma. Lxvii Número 4 Rev Adm. 2010;1867(4):0-1.
2. Avila RE, Samar ME, Fonseca I, Olmedo L, Asís OG, Ferraris R. Carcinoma mucoepidermoide de glándulas salivales: Factores pronósticos histológicos e inmunohistoquímicos. Int J Morphol. 2011;29(2):455-62.
3. Seifert G, Brocheriou C, Cardesa A, Eveson JW. WHO International Histological Classification of Tumours Tentative Histological Classification of Salivary Gland Tumours. Pathol Res Pract 1990;186(5):555-81.
4. Bird A. Perceptions of epigenetics. Nature. 2007;447(7143):396-8.
5. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. Cell. 2011;146(4):633-44
6. Jouve de la Barreda N. MONOGRAFÍA XXX: Biomarcadores: Analítica, diagnóstico y terapéutica. Real Acad Nac Farm 2010;85-112.
7. Jané Salas E, Jané Pallí E, Estrugo Devesa A, Roselló Llabrés X, López-López J. El diagnóstico del cáncer oral en el paciente geriátrico. Av Odontoestomatol. 2015;31(3):181-90.
8. Politi M, Toro C, Zerman N, Mariuzzi L, Robiony M. Myoepithelioma of the parotid gland: Case report and review of literature. Oral Oncol Extra. 2005;41(6):104-8.
9. Carolina S. Feedback Cancer and Pregnancy . cancer journal for clinicia 1984;127-8.

10. Eveson JW, Cawson RA. Tumours of the minor (oropharyngeal) salivary glands: a demographic study of 336 cases. *J Oral Pathol Med.* 1985;14(6):500–9.
11. do Prado RF, Lima CF, Pontes HAR, Almeida JD, Cabral LAG, Carvalho YR. Calcifications in a clear cell mucoepidermoid carcinoma: a case report with histological and immunohistochemical findings. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2007;104(5):40–4.
12. Mejía-Velázquez CP, Durán-Padilla MA, Gómez-Apo E, Quezada-Rivera D, Gaitán-Cepeda LA. Tumors of the salivary gland in Mexicans. A retrospective study of 360 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012;17(2):183–9.
13. Yook JI, Lee SA, Chun YC, Huh J, Cha IH, Kim J. The myoepithelial cell differentiation of mucoepidermoid carcinoma in a collagen gel-based coculture model. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(4):237–42.
14. Yáñez J. Análisis del Estado de metilación del ADN y su relación con Modificaciones de Histonas del promotor de los Genes MLH1, p16 en diferentes tipos de cáncer. ConicytCl. 2014.
15. Barnes L. Pathology of the head and neck: volume 1. 3<sup>o</sup>ed. Pennsylvania: Informa healthcare; 2008: pág 475.
16. Dardick I, Daya D, Hardie J, van Nostrand AW. Mucoepidermoid carcinoma: ultrastructural and histogenetic aspects. *Journal of Oral Pathology* 1984;13:342-358
17. Seethala RR, Stenman G. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumors of the Salivary Gland. *Head Neck Pathol.* 2017;11(1):55–67.
18. Passador-Santos DF, Al-Samadi DA, Tuomainen MK, Borges PA, Araujo PV, Makitie PA, et al. Cancer associated fibroblasts (cafs) influence tissue invasion on salivary gland mucoepidermoid

- carcinoma (mec) cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2019;128(1):e41.
19. Haddad R, Colevas AD, Krane JF, Cooper D, Glisson B, Amrein PC, et al. Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study. *Oral Oncol.* 2003;39(7):724–7.
20. Tirado Y, Gadd S. CRTC1/MAML2 Fusion Transcript in High Grade Mucoepidermoid Carcinomas of Salivary and Thyroid Glands and Warthin's Tumors: Implications for Histogenesis and Biologic Behavior *Genes Chromosom Cancer.* 2017;56(February):89–116.
21. Pérez Abreus E, González Domínguez N. Patología quirúrgica de glándulas salivales. Reporte de 79 casos. *Rev Cubana Estomatol.* 1999;36(3):212–6.
22. María A, López L, Muela CM, Masana IV, Vila CN, Salmerón I. Cirugía Oral y Maxilofacial Carcinoma adenoide quístico Adenoid cystic carcinoma el tratamiento de tumores del espacio parafaríngeo. *Rev Española Cirugía Oral y Maxilofac* 2011;34(1):41–2.
23. Luna MA. Salivary Mucoepidermoid Carcinoma: Revisited. 2006;13(6):293–307..
24. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL: Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer* 1992, 69(8):2021–2030
25. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, et al. Mucoepidermoid carcinoma: A clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(7):835–45.
26. Burke HB. Outcome prediction and the future of the TNM staging system. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(19):1408–9.



27. Jones, P. A. (2006). The Human Epigenome: Dawn of a New Era for Cancer Prevention, Diagnosis, and Therapy Presidential Address. In *AACR Annual Meeting*.
28. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):143–53.
29. Jiao Y, Feng Y, Wang X. Regulation of Tumor Suppressor Gene CDKN2A and Encoded p16-INK4a Protein by Covalent Modifications. *Biochem*. 2018;83(11):1289–98.
30. Tsakogiannis D, Moschonas GD, Daskou M, Stylianidou Z, Kyriakopoulou Z, Kottaridi C, et al. Polymorphic variability in the exon 19 of the RB1 gene and its flanking intronic sequences in HPV16-associated precancerous lesions in the Greek population. *J Med Microbiol*. 2018;67(11):1638–44.
31. Johannessen LE, Brandal P, Myklebust TÅ, Heim S, Micci F, Panagopoulos I. MGMT gene promoter methylation status – Assessment of two pyrosequencing kits and three methylation-specific PCR methods for their predictive capacity in glioblastomas. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2018;15(6):437–46.
32. Miyamoto K, Ushijima T. Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn J Clin Oncol*. 2005;35(6):293–301.
33. García-Roco Pérez O. Tumores de glándulas salivales: Su comportamiento en 10 años de trabajo (1993-2002). *Rev Cubana Estomatol*. 2003;40(3):0–0.
34. Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet [Internet]*. 2012;13(10):679–92.
35. Issa ME, Takhsa FS, Chirumamilla CS, Perez-Novo C, Vanden Berghe W, Cuendet M. Epigenetic strategies to reverse drug resistance in heterogeneous multiple myeloma. *Clin Epigenetics*. 2017;9(1):1–13.

36. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*. 2001;20(24 REV. ISS. 3):3156–65.
37. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):143–53.
38. Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, Lez M, Cervantes A. Metilación del ADN: Un fenómeno epigenético de importancia Médica. *Rev Investig Clin*. 2004;56(1):56–71.
39. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3(6):415–28.
40. Bird A. Epigenetic Memory. *Genes Dev*. 2002;16:16–21.
41. Langevin SM, Eliot M, Butler RA, Cheong A, Zhang X, McClean MD, et al. CpG island methylation profile in noninvasive oral rinse samples is predictive of oral and pharyngeal carcinoma. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):1–12.
42. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69(6):915–26.
43. Chédin F, Lieber MR, Hsieh CL. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16916–21.
44. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. 2010;70(10):27–56
45. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell*. 2012;150(1):12–27.
46. Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011;17(3):330–9.
47. Baylin SB, Jones PA. *Nat Rev Cancer* 2011 Baylin SB.pdf. 2011;
48. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*. 2006;31(2):89–97

49. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381–95.
50. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(10).
51. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(6):1409–20.
52. Shaw R. The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(2):101–8.
53. Shaw RJ, Hall GL, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Field JK, et al. Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45(8):617–22.
54. Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Haywardt NK, The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Molecular Medicine* 1997;3(1):5–20.
55. 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 Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(4):350–3
56. Sirivanichsuntorn P, Keelawat S, Danuthai K, Mutirangura A, Subbalekha K, Kitkumthorn N. LINE-1 and Alu hypomethylation in mucoepidermoid carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2013;13(1):1–11.
57. Supić G, Kozomara R, Branković-Magić M, Jović N, Magić Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2009;45(12):1051–7.
58. Supic G, Jovic N, Kozomara R, Zeljic K, Magic Z. Interaction between the MTHFR C677T polymorphism and alcohol-impact on oral cancer risk and multiple DNA methylation of tumor-related genes. *J Dent Res.* 2011;90(1):65–70.

59. Liggett WH, Sidransky D. Biology of neoplasia Role of the p16 Tumor Suppressor Gene in Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 1998;16(3):1197–206
60. de Souza AA, Altemani A, Passador-Santos F, Turssi CP, de Araujo NS, de Araújo VC, et al. Dysregulation of the Rb pathway in recurrent pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Virchows Arch*. 2015;467(3):295–301.
61. Kaelin WG. Functions of the retinoblastoma protein. *BioEssays*. 1999;21(11):950–8
62. Natsume A, Ishii D, Wakabayashi T, Tsuno T, Hatano H, Mizuno M, et al. IFN- $\beta$  down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. *Cancer Res*. 2005;65(17):7573–9.
63. England TN. inactivation of the dna-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agentsm Numb Er 19 Response of Gliomas To Alkylating Agents. *N Engl J Med*. 2000;4–8.
64. Esteller M. Hypermethylation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine DNA Methyltransferase and Survival of Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancer Spectrum Knowl Environ*. 2002;94(1):26–32.
65. Jafari M. Relevance of hMLH1 -93G > A , 655A > G and 1151T > A polymorphisms with colorectal cancer susceptibility : a meta-analysis based on 38 case-control studies. 1806;64(10):942–51
66. Michailidi C, Theocharis S, Tsourouflis G, Pletsas V, Kouraklis G, Patsouris E, et al. Expression and promoter methylation status of hMLH1, MGMT, APC, and CDH1 genes in patients with colon adenocarcinoma. *Exp Biol Med*. 2015;240(12):1599–605.
67. Shieh YS, Shiah SG, Jeng HH, Lee HS, Wu CW, Chang LC. DNA methyltransferase 1 expression and promoter methylation of E-

- cadherin in mucoepidermoid carcinoma. *Cancer*. 2005;104(5):1013–21.
68. Herath NI, Leggett BA, MacDonald GA. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(1 PART1):15–21.
69. Voz ML, Åström AK, Kas K, Mark J, Stenman G, Van De Ven WJM. The recurrent translocation t(5;8)(p13;q12) in pleomorphic adenomas results in upregulation of PLAG1 gene expression under control of the LIFR promoter. *Oncogene*. 1998;16(11):1409–16.
70. Voz ML, NS Agten, Van de Ven WJ, K Kas (2000). "PLAG1, el objetivo principal de desplazamiento en adenoma pleomórfico de las glándulas salivales, es un regulador positivo de IGF-II". *Cáncer Res*. 60 (1): 106 – 13.
71. Van Dyck F, Declercq J, Braem C V., Van De Ven WJM. PLAG1, the prototype of the PLAG gene family: Versatility in tumour development (Review). *Int J Oncol*. 2007;30(4):765–74.
72. Hensen K, Braem C, Declercq J, Van Dyck F, Dewerchin M, Fiette L, et al. Targeted disruption of the murine *Plag1* proto-oncogene causes growth retardation and reduced fertility. *Dev Growth Differ*. 2004;46(5):459–70.
73. de Brito BS, Gaspar NG, Egal ESA, Sanchez-Romero C, Martins AS, Tincani ÁJ, et al. PLAG1 expression is maintained in recurrent pleomorphic adenoma. *Virchows Arch*. 2016;469(4):477–81.
74. Friedrich RE, Dilcher J, Jaehne M, Löning T. Chromosomal rearrangements in PLAG1 of myoepithelial salivary gland tumours. *Anticancer Res*. 2012;32(5):1977–82.
75. Asahina M, Saito T, Hayashi T, Fukumura Y, Mitani K, Yao T. Clinicopathological effect of PLAG1 fusion genes in pleomorphic

adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma with special emphasis on histological features. *Histopathology*. 2019;74(3):514–25.

76. Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*. 2005;24(17):2796–809.