



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**División de Estudios de Posgrado e Investigación**  
**Facultad de Odontología**  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,  
Odontológicas y de la Salud

**Análisis del estado de metilación y acetilación en carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoideo quístico.**

**T E S I S**

Que para optar por el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**Mtra. Carla Monserrat Ramírez Martínez**

Tutor

**Dra. Elba Rosa Leyva Huerta**

Comité tutor

**Dr. Javier Portilla Robertson**

**Dr. Luis Fernando Jacinto Alemán**

Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial  
División de Estudios de Posgrado e Investigación, F.O. UNAM

Asesor

**Dra. Ana María Cano Valdés**

Instituto Nacional de Cancerología

**Ciudad Universitaria, CDMX, septiembre 2022**



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.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por siempre guiar mis pasos y nunca dejarme sola. Gracias por todas las bendiciones.

A mi mamá, mi tía Lula y a mis hermanos por sus consejos, por siempre estar a mi lado e impulsarme para alcanzar mis sueños. Infinitas gracias, los amo profundamente.

A mis amigos, Tamara, David, Emiliano, Maribel, Alan, a todos mis seres queridos y a Max.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi querida Universidad, a la Facultad de Odontología y al personal académico y administrativo del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

A mi tutora, la Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, por su cariño, enseñanzas y guía durante mi formación. Por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por sus consejos que me han permitido crecer y madurar tanto personal como profesionalmente.

A mi comité tutor, al Dr. Luis Fernando Jacinto Alemán, gracias por su amistad sincera, por su apoyo y consejos que me ayudaron a mejorar el proyecto; así como al Dr. Javier Portilla Robertson por evaluar mi desempeño y guiarme en el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Ana María Cano Valdés, por su invaluable asesoría en la elección de los casos utilizados en el proyecto.

A mis grandes profesores, el Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda y el Mtro. Daniel Quezada Rivera (QEPD).

A mi jurado de examen de candidatura y al jurado de examen de grado, gracias por brindarme su tiempo para evaluar mi trabajo.

Al Dr. Luis Pablo Cruz Hervert por el apoyo para la publicación del artículo del presente proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para poder realizar mis estudios de doctorado.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	10
3.1 Neoplasias malignas de glándulas salivales .....	10
3.2 Clasificación de la Organización Mundial de la Salud .....	11
3.3 Generalidades del CME .....	12
3.4 Generalidades del CAQ .....	14
3.5 Mecanismos epigenéticos .....	16
3.5.1 Metilación de ADN .....	16
3.5.2 Acetilación de las histonas .....	17
3.6 Epigenética y cáncer .....	18
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	19
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	19
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	21
6.1 Objetivo General .....	21
6.2 Objetivos Específicos.....	21
<b>7. HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>8. METODOLOGÍA</b> .....	22
8.1 Diseño de estudio.....	22
8.2 Población de estudio.....	22
8.3 Selección y tamaño de la muestra. ....	22
8.4 Criterios de Selección.....	22
8.4.1 Criterios de inclusión:.....	22
8.4.2 Criterios de exclusión: .....	22
8.4.3 Criterios de eliminación: .....	23
8.5 Operacionalización de las variables. ....	23
8.6 Material y métodos .....	24
8.6.1 Confirmación diagnóstica por análisis histoquímico.....	24
8.6.2 Inmunohistoquímica (IHQ) .....	25

8.6.3	Análisis de inmunexpresión. ....	26
8.6.4	MSP-PCR. ....	27
8.6.5	Análisis estadístico. ....	30
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
9.1.	Análisis descriptivo de la muestra de la UNAM. ....	31
9.2	Análisis descriptivo de la muestra del INCan. ....	32
9.3	Inmunohistoquímica para H3Lys9-Ac. ....	33
9.4	MSP-PCR muestras UNAM. ....	35
9.4.1	Estado de metilación en CME.....	35
9.4.2	Estado de metilación de en hMLH1 y grado histopatológico. ....	36
9.4.3	Estado de metilación de en Rb1 y grado histopatológico.....	37
9.4.4	Estado de metilación de en p16 y grado histopatológico. ....	37
9.4.5	Estado de metilación de en Plagl-1 y grado histopatológico. ....	38
9.4.6	Estado de metilación de en MGMT y grado histopatológico de CME. ....	39
9.4.7	Metilación en múltiples genes en CME.....	39
9.4.8	Estado de metilación en CAQ.....	40
9.4.9	Estado de metilación de genes en CAQ.....	40
9.5	MSP-PCR muestras INCan. ....	41
9.5.1	Estado de metilación en CME. ....	41
9.5.2	Estado de metilación de en hMLH1 y grado histopatológico. ....	42
9.5.3	Estado de metilación de en Rb1 y grado histopatológico.....	43
9.5.4	Estado de metilación de en p16 y grado histopatológico. ....	43
9.5.5	Estado de metilación de en Plagl-1 y grado histopatológico. ....	44
9.5.6	Estado de metilación de en MGMT y grado histopatológico.....	44
9.5.7	Comparación del estado de metilación entre los grados histopatológicos del CME.....	45
9.5.8	Metilación en múltiples genes en CME.....	46
9.5.9	Estado de metilación en CAQ.....	46
9.5.10	Estado de metilación de en hMLH1 y grado histopatológico. ....	47
9.5.11	Estado de metilación de en Rb1 y grado histopatológico.....	48
9.5.12	Estado de metilación de en p16 y grado histopatológico. ....	49
9.5.13	Estado de metilación de en Plagl-1 y grado histopatológico. ....	49
9.5.14	Estado de metilación de en MGMT y grado histopatológico.....	50
9.5.15	Comparación del estado de metilación entre los grados histopatológicos del CAQ. ....	50

9.5.16 Metilación en múltiples genes en CAQ. ....	51
<b>9. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>53</b>
<b>10. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>61</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....</b>	<b>62</b>

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Las neoplasias malignas de glándulas salivales poseen gran variabilidad histológica y comportamiento biológico agresivo, sin asociación a factores de riesgo. De ellas, el carcinoma mucoepidermoide (CME) y el carcinoma adenoideo quístico (CAQ) son los más frecuentes. Los cambios epigenéticos, en específico la metilación de genes, son fundamentales en el desarrollo de otras neoplasias epiteliales, lo que hace pensar que puedan estar involucrados en la etiopatogenia del CME y CAQ en sus diferentes grados histológicos.

**Objetivo:** Analizar el estado de metilación y acetilación del CME y CAQ.

**Metodología:** Se analizaron 30 casos, 18 CME y 12 CAQ el archivo histopatológico de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI), Facultad de Odontología (FO) y del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Se realizó extracción de DNA del tejido en parafina (50 µm), conversión con bisulfito de sodio y amplificación por MSP utilizando oligos para la forma metilada y no metilada de p16, Rb1, MGMT, hMLH1 y PLAG1. Se resolvió en agarosa al 2%, cuantificando la densidad óptica (DO) con el software GelCuantNet. La acetilación de H3Lys9 fue determinada por inmunohistoquímica; el patrón de tinción fue evaluado con el software ImageJ®. Se utilizó como control glándula salival normal. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. La comparación de los grados histológicos se realizó con la prueba Kruskal-Wallis y T de Student ( $p < 0.05$ ).

**Resultados y conclusión:** Los CME y CAQ presentaron hipermetilación en los genes encargados de la regulación del ciclo celular y reparación de doble hebra del DNA. Plagl-1 se encontró metilado en todos los grados histológicos tanto de CME y de CAQ, por lo que podría ser propuesto como un gen importante en la carcinogénesis de las neoplasias de glándulas salivales. La positividad de Ac-H3Lys9 sugiere una histogénesis basal.



## ABSTRACT

**Introduction:** Malignant neoplasms of the salivary glands have great histological variability and aggressive biological behavior, without association with risk factors. Mucoepidermoid carcinoma (CME) and adenoid cystic carcinoma (CAQ) are the most frequent. Epigenetic changes, specifically gene methylation, are fundamental in the development of other epithelial neoplasms, which suggests that they may be involved in the etiopathogenesis of CME and ACC in their different histological degrees.

**Objective:** To analyze the state of methylation and acetylation of the CME and CAQ.

**Methodology:** 30 cases, 18 CME and 12 CAQ, were analyzed from the histopathological archive of the DEPeI, FO and the National Cancer Institute (INCan). DNA extraction from the tissue in paraffin (50 µm), conversion with sodium bisulfite and amplification by MSP-PCR using primers for the methylated and unmethylated form of p16, Rb1, MGMT, hMLH1 and PLAG1 was performed. It was resolved in 2% agarose, quantifying the optical density (OD) with the GelCuantNet software. H3Lys9 acetylation was determined by immunohistochemistry; the staining pattern was evaluated with ImageJ® software. Normal salivary gland was used as a control. All assays were performed in triplicate. Histological grades were compared with the Kruskal-Wallis test and Student's T test ( $p < 0.05$ ).

**Results and conclusion:** CME and CAQ showed hypermethylation in genes responsible for cell cycle regulation and DNA double-strand repair. Plagl-1 was found to be methylated in all histological grades of both CME and ACC, so it could be proposed as an important gene in the carcinogenesis of salivary gland neoplasms. The positivity of Ac-H3Lys9 suggests a basal histogenesis.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las neoplasias de glándulas salivales pueden originarse de cualquiera de las estructuras que conforman el parénquima o el estroma glandular; razón por la cual constituye un grupo de tumores morfológicamente diversos.<sup>1</sup> Presentan una incidencia global de 2.5 por cada 100 000 casos al año.<sup>2</sup> De acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) modificada en el año 2017, el CME y CAQ son las neoplasias malignas más frecuentes, representando aproximadamente el 35% y 21.9% de los casos respectivamente.<sup>3,4</sup>

El CME, se presenta en una amplia distribución de edades con un pico de incidencia en la segunda década de vida. Afecta tanto a las glándulas salivales mayores como a las menores y presenta predilección por el género femenino.<sup>3</sup> Clínica e histopatológicamente muestra diversos grados de malignidad.<sup>5,6</sup>

La etiopatogenia de los CME continúa siendo incierta y los estudios que han tratado de dilucidar su desarrollo, han investigado los cambios en la secuencia del ADN, principalmente la translocación cromosómica recíproca t (11; 19) (q21; p13) que da lugar a la oncoproteína de fusión MECT1-MAML2; esta fusión parece estar involucrada en la interrupción de la señalización de Notch<sup>7</sup> y representa un parámetro pronóstico importante<sup>8,9,10</sup> debido a que los CME asociados a esta translocación tienen una forma menos agresiva de tumor.<sup>8</sup>

El CAQ se presenta en un promedio de edad de 57 años, sin predilección por género. <sup>11</sup> Clínica e histopatológicamente muestra tres grados de malignidad descritos en 1984 por Szanto y cols.<sup>12</sup> Los CAQ tienen una gran afinidad por la invasión perineural y por presentar metástasis a distancia, por lo que se consideran neoplasias agresivas. <sup>11</sup> El 60% de los CAQ se han asociado a la translocación cromosómica t (6; 9) (q22-23; p23-24), que da lugar a la oncoproteína de fusión MYB-NFIB. La repercusión de esta fusión no ha sido esclarecida, pero se considera un evento biomolecular importante en este tipo de lesiones.<sup>13</sup>

Pese a que se siguen estudiando las alteraciones en la secuencia génica, estos cambios no explican el desarrollo ni se presentan en todos los CME y CAQ. Por lo tanto, quedan muchas interrogantes sobre los mecanismos biomoleculares y factores de riesgo asociados a su desarrollo.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Neoplasias malignas de glándulas salivales

Las neoplasias que se originan en las glándulas salivales frecuentemente se presentan entre la 4° y 7° décadas de vida, con predilección por el género femenino. Dentro de la presentación en glándulas salivales mayores, la glándula parótida es habitualmente la más afectada, seguida por la glándula submandibular y sublingual.<sup>14, 15</sup>

Actualmente, existen dos teorías principales que abordan su origen: la histogenética o teoría bicelular y la morfogenética o teoría multicelular.<sup>16, 17, 18, 19.</sup>

La teoría histogenética propuesta por Batsakis<sup>20</sup> plantea que existen células de reserva de aspecto basal en las regiones proximal y distal del sistema de conductos y que corresponden a células troncales progenitoras de la unidad glandular. De acuerdo con ello, las células en la región proximal darán origen a las neoplasias que imitan el complejo ducto-acinar y las células de la región distal las neoplasias que imitan el sistema de conducto excretor. Aun cuando investigadores han demostrado por inmunohistoquímica la presencia de células basales de aspecto indiferenciado en los conductos salivales, estos estudios no son suficientes para sustentar que actúan como células troncales.<sup>21</sup>

Por otra parte, el enfoque morfogenético o teoría multicelular propuesta por Dardick<sup>17</sup> relaciona la morfología con la diferenciación celular derivada de la expresión de diferentes genes en las células.<sup>22</sup> La relación entre la estructura normal de la glándula salival y la apariencia histológica de las neoplasias puede explicar las clasificaciones morfológicas. Sin embargo, se debe considerar que la similitud histológica no necesariamente implica que un tumor particular, surge de la estructura que imita.<sup>19</sup> En la clasificación morfológica de las neoplasias de glándulas salivales, el conducto intercalado representa el segmento más importante debido a que se ha relacionado con tumores benignos como el adenoma pleomorfo y el adenoma de células basales; y con tumores malignos como el carcinoma adenoideo quístico, carcinoma epitelial-mioepitelial, carcinoma ductal y adenocarcinoma de células basales. Todos ellos muestran

tanto diferenciación epitelial como mioepitelial,<sup>17, 21, 22, 23, 24</sup> al igual que el conducto intercalado de la glándula salival normal. Los conductos intercalados de la glándula parótida son más largos que los de las glándulas submandibular y sublingual; esto podría explicar por qué el 80% de las neoplasias se desarrollan en esta glándula.<sup>25</sup>

### 3.2 Clasificación de la Organización Mundial de la Salud

La clasificación más usada para categorizar a este tipo de neoplasias es la de la OMS, la cual fue modificada en el año 2017 y las divide en neoplasias benignas y malignas de origen epitelial, lesiones epiteliales no neoplásicas, lesiones benignas de tejido blando, y neoplasias hematolinfoides (Figura 1).<sup>3</sup>

Neoplasias Malignas	Neoplasias Benignas
Carcinoma Mucoepidermoide Carcinoma adenoideo quístico Carcinoma de células acinares Adenocarcinoma polimorfo Carcinoma de células claras Adenocarcinoma de células basales Carcinoma Intraductal Adenocarcinoma NOS Carcinoma de ducto salival Carcinoma mioepitelial Carcinoma epitelias mioepitelial Carcinoma ex adenoma pleomorfo Carcinoma secretor Adenocarcinoma sebáceo Carcinosarcoma Carcinoma pobremente diferenciado. Carcinoma linfoepitelial Carcinoma escamocelular Carcinoma oncocítico Neoplasias inciertas potencialmente malignas.	Adenoma Pleomorfo Mioepitelioma Adenoma de células basales Tumor de Wharthin Oncocitoma Linfadenoma Cistadenoma Sialadenoma papilifero Papiloma ductal Adenoma sebáceo Adenoma canalicular y otros adenomas ductales
Lesiones epiteliales no neoplásicas	Lesiones benignas de tejidos blandos
Adenosis poliquística esclerosante Hiperplasia nodular oncocítica Sialadenitis linfoepitelial Hiperplasia del ducto intercalado	Hemangloma Lipoma/Sialolipoma Facitis Nodular
Neoplasias hematolinfoides	
Linfoma esxtranodal de la zona marginal del tejido linfoide asociado a la mucosa (Linfoma MALT)	

**Figura 1.** Clasificación de neoplasias de glándulas salivales de la OMS 2017.<sup>FD</sup>

En el grupo de neoplasias malignas de glándulas salivales, se incluyen a 20 entidades. Entre las modificaciones realizadas en esta clasificación se encuentran, el agrupamiento del cistadenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso y adenocarcinoma intestinal dentro del adenocarcinoma NOS; la inclusión del

papiloma ductal, intraductal e invertido en un solo apartado; la introducción del carcinoma secretor como una nueva entidad dentro de esta 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. De acuerdo con esta clasificación, la neoplasia maligna de glándula salival mayor más frecuente, es el carcinoma mucoepidermoide, seguida del carcinoma adenoideo quístico.<sup>3</sup>

### 3.3 Generalidades del CME

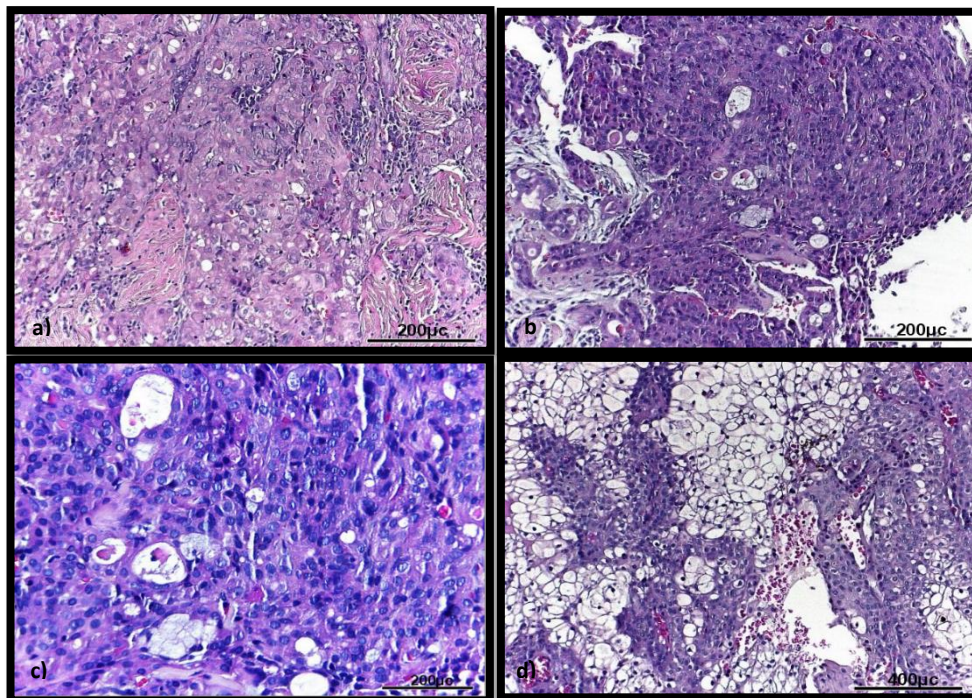
Se define como una neoplasia epitelial maligna con proporciones variables de células mucosas, epidermoides e intermedias.<sup>26</sup> Corresponde a la neoplasia maligna de glándula salival más frecuente, representando en promedio el 35% de todos los tumores. Su formación se ha relacionado con radiaciones ionizantes. No presenta predilección de edad, aunque si de sexo, siendo las mujeres ligeramente más afectadas que los hombres. Se presenta con mayor frecuencia en la glándula parótida, seguida de las glándulas salivales menores. Clínicamente, se observa como un aumento de volumen, generalmente asintomático y de crecimiento lento (Figura 2). Cuando son sintomáticos pueden manifestarse con dolor, parálisis facial y disfagia.<sup>27</sup>



**Figura 2. Imagen clínica intraoral de CME.** 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 DEPEI FO UNAM.

Macroscópicamente, es bien circunscrito, parcialmente encapsulado o de periferia imprecisa. Al corte puede ser sólido o quístico, con superficie café claro o amarilla.<sup>28</sup> Microscópicamente, puede presentar patrones histológicos, quístico y sólido con presencia de células mucosas, intermedias y epidermoides en proporciones variables (Figura 3). Para el establecimiento del grado histológico se utiliza un sistema en el cual, cada uno de los parámetros histológicos se suman para obtener un puntaje final. Los parámetros medidos son: componente intraquístico inferior a 20% (2pts), invasión neural (2pts), presencia de necrosis (3pts), 4 o más mitosis por cada 10 campos de alto poder (3pts) y anaplasia (4pts). Se consideran de bajo grado las neoplasias con un puntaje de 0 a 4, de grado intermedio de 5 a 6 y de alto grado con puntaje mayor o igual a 7. El tratamiento para las neoplasias de bajo grado 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 de grado intermedio y alto, metastatizan a distancia en un 55 a 80%, siendo los órganos más afectados el pulmón, hueso y cerebro.<sup>29</sup>



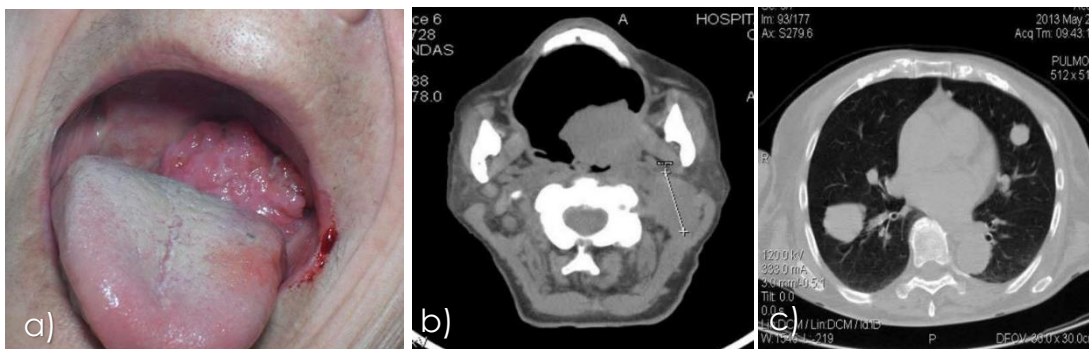
**Figura 3. H&E Carcinoma mucepidermoide.** a) Células epidermoides en patrón sólido, b) y c) Células mucosecretoras y epidermoides en patrón microquístico, d) Variante de células claras.

Obtenidas de bloque propiedad del Departamento de Patología Bucal DEPEI FO UNAM.

Actualmente, se realizan diferentes análisis moleculares con el fin de entender el comportamiento biológico de estas neoplasias. Los estudios citogenéticos han identificado en las neoplasias de bajo grado una translocación entre el gen MAML2 y MECT1,  $t(11;19)(q21-22;p13)$ , aunque dicha translocación no se manifiesta en neoplasias de alto grado.<sup>30</sup>

### 3.4 Generalidades del CAQ

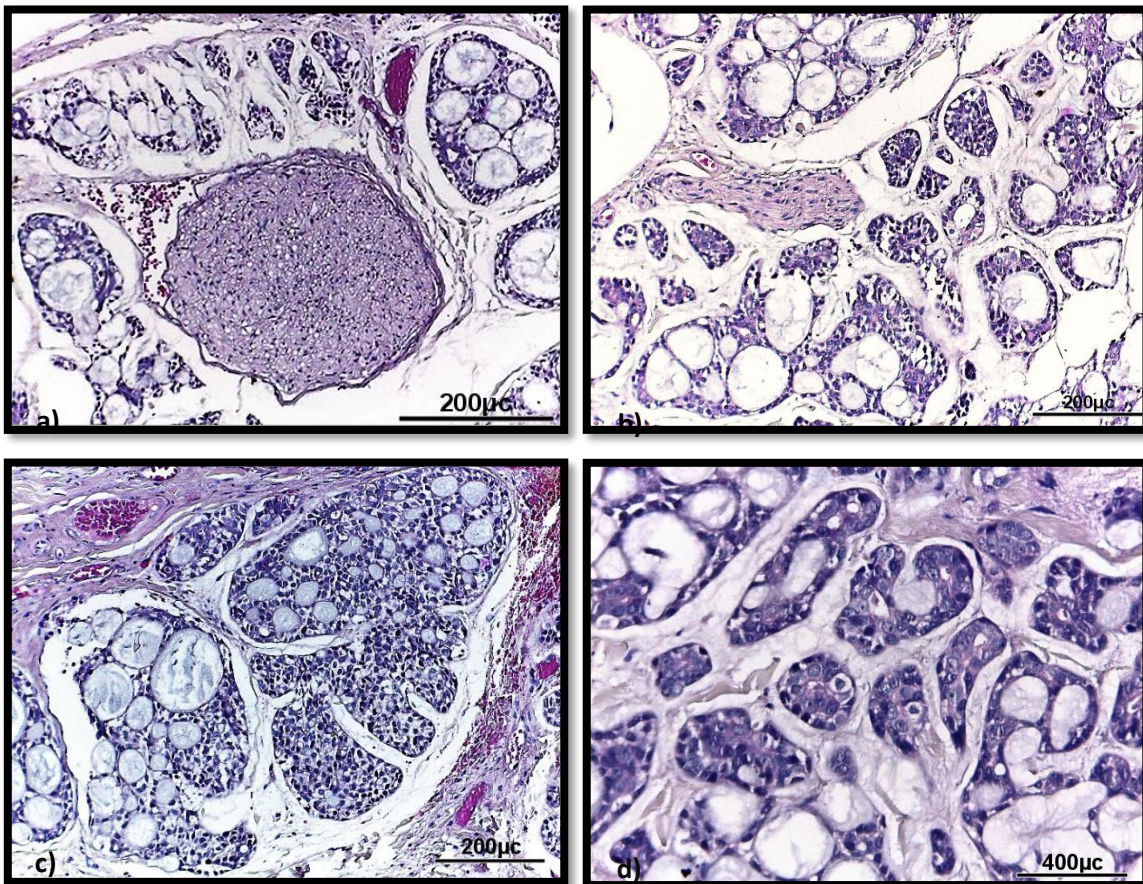
Se define como una neoplasia epitelial maligna con diferenciación mioepitelial y ductal.<sup>3</sup> Corresponde al cuarto tumor maligno más frecuente de glándula salival que se manifiesta tanto en glándulas salivales mayores y menores, siendo la glándula parótida la más afectada. Es frecuente en la 6ª década de vida con predilección por el género femenino en una relación 3:2. Clínicamente se presenta como un aumento de volumen doloroso y que ocasiona parálisis facial (Figura 4).<sup>31</sup>



**Figura 4. Imagen clínica intraoral de CAQ.** a) lesión de aspecto vegetante que ocupa gran parte de orofaringe b) TC lesión isodensa a tejido blando en la región palatina. c) TC compromiso pulmonar múltiple.<sup>32</sup>

Macroscópicamente, no es circunscrito y al corte es sólido, de color blanco a grisáceo. Microscópicamente, corresponde a una neoplasia formada por células pequeñas con núcleos angulados y nucléolos prominentes, con invasión perineural típica y que infiltra tejidos profundos. Puede presentar tres patrones histológicos: cribiforme, tubular y sólido.<sup>33</sup> El patrón cribiforme, se caracteriza por presentar nidos epiteliales que contienen pseudoquistes; estos no son verdaderas luces glandulares, sino que forman parte del estroma tumoral y contienen glucosaminoglucanos amorfos y lámina basal hialinizada. En el patrón tubular las luces resultan más visibles, y se encuentran rodeadas por células ductales y una

segunda capa de células mioepiteliales. Los nidos epiteliales se encuentran separados por estroma eosinófilo hialino. El patrón sólido presenta mayor grado de pleomorfismo nuclear, se asocia a un aumento en la actividad mitótica y presenta áreas de necrosis. Para considerar que la neoplasia presenta este patrón se necesita un 30% de crecimiento sólido como mínimo.<sup>34</sup> La gradificación depende principalmente del patrón histológico que predomina. Las neoplasias de bajo grado presentan un patrón tubular; las de grado intermedio un patrón cribiforme y las de alto grado un patrón sólido (Figura 5).<sup>3</sup>



**Figura 5. H&E Carcinoma adenoideo quístico.** a) y b) Células neoplásicas con invasión peri neural, y c) Patrón cribiforme, d) Patrón tubular. Obtenidas de bloque propiedad del Departamento de Patología Bucal DEPEI UNAM.

El tratamiento consiste en resección radical con quimioterapia adyuvante. La supervivencia a los 15 años depende del grado histológico, siendo del 39% en el grado I, del 26% en el grado II y del 5% en el grado III. Los factores de pronóstico desfavorable incluyen tumores de más de 4cm., metástasis a cadena cervical regional y metástasis a pulmón y hueso.<sup>35</sup>



### **3.5 Mecanismos epigenéticos**

El término epigenética, fue descrito por primera vez en 1942 por Conrad Waddington para referirse a cambios estables en el fenotipo celular sin alteraciones genéticas.<sup>36</sup> Las modificaciones epigenéticas se refieren a cambios estables y hereditarios en la expresión génica que no alteran la secuencia de ADN y que ocurren con mayor frecuencia que las mutaciones persistiendo durante toda la vida celular e incluso durante múltiples generaciones.<sup>36,37</sup> La transcripción de cada gen puede cambiar desde un nivel de expresión alto, hasta un nivel de silenciamiento completo, dependiendo de la influencia de las "epimutaciones" que interfieren con la acción de los activadores y supresores en los promotores específicos de la cromatina.<sup>38</sup> Todos los procesos de diferenciación se desencadenan y mantienen mediante mecanismos epigenéticos; dichos mecanismos incluyen la metilación del ADN, las modificaciones covalentes de las histonas, la remodelación de la cromatina, el silenciamiento mediado por ARN no codificantes y la expresión proteica de los polycombs.<sup>39, 40</sup>

La interrupción de cualquiera de los mecanismos epigenéticos que se refuerzan mutuamente conduce a una expresión genética inapropiada.<sup>41,42</sup> Debido a ello, se consideran importantes en el proceso de carcinogénesis y pueden servir como posibles métodos de detección temprana, tratamiento y de evaluación pronóstica para los pacientes con neoplasias malignas.<sup>43</sup>

#### **3.5.1 Metilación de ADN**

De todas las modificaciones epigenéticas que se han reportado, la metilación del ADN es la más frecuente<sup>44</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>45</sup> Estas islas no se encuentran metiladas en genes transcripcionalmente activos, y una vez que se metilan se produce su represión.<sup>46</sup>

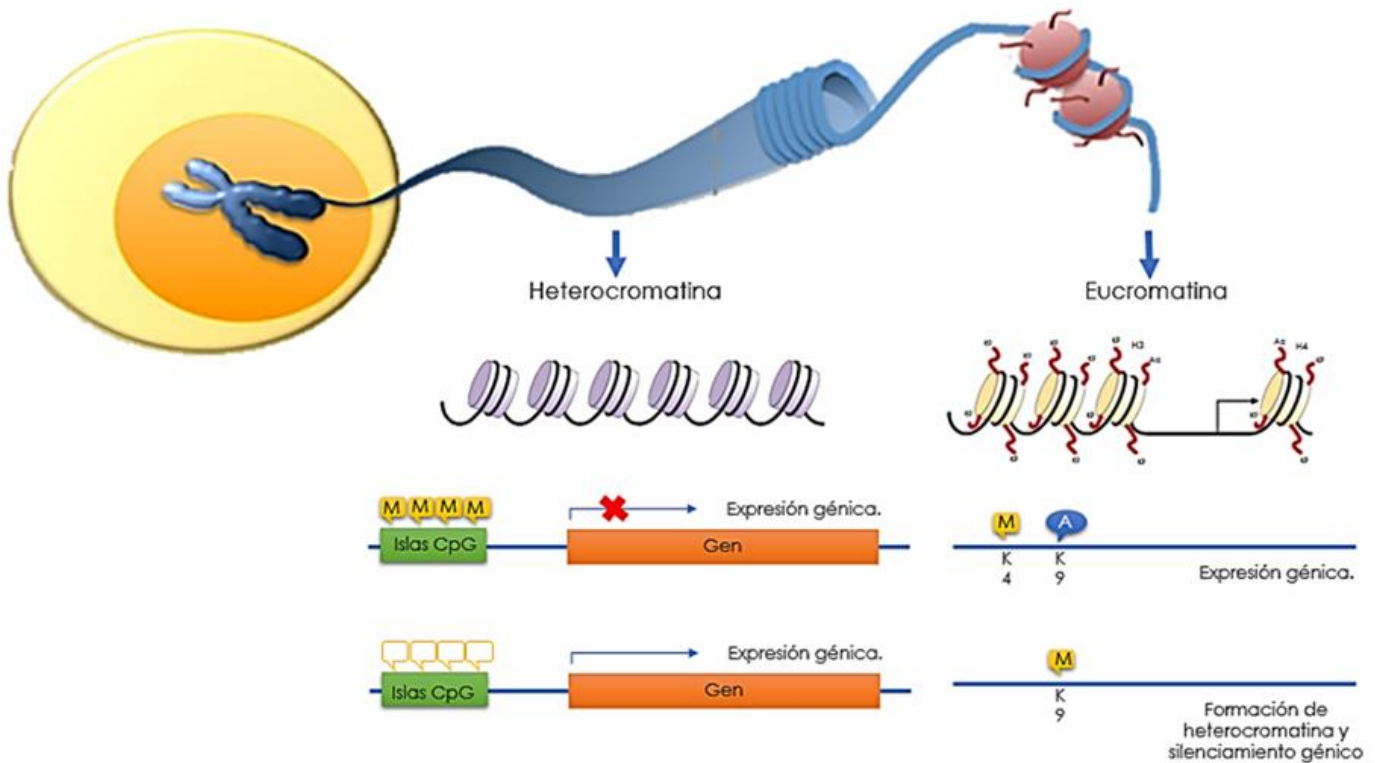
La familia de enzimas llamadas ADN-metiltransferasas (DNMTs) controlan la metilación durante la replicación del ADN, por medio de la transferencia covalente de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina al carbono 5 de las citosinas en la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del 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>47, 48, 49</sup> Las DNMT3a y DNMT3b llevan a cabo la metilación de novo del ADN en los dinucleótidos CpG.<sup>42,50,51</sup> La metilación funciona en asociación con modificaciones de la cromatina para reprimir la expresión génica<sup>52</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>53</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 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>46, 52</sup>

### **3.5.2 Acetilación de las histonas**

La acetilación es una modificación covalente postraducciona de las histonas, esta regula la expresión génica en diversos procesos biológicos como la replicación y reparación del ADN, la apoptosis y la segregación cromosómica. La acetilación de histonas está altamente controlada por un equilibrio entre las histonas acetil transferasas o HAT y las desacetilasas o HDAC.<sup>54</sup> Debido a que las modificaciones de las histonas impulsan la organización de la cromatina y la expresión génica, las alteraciones en la acetilación de las histonas se encuentran asociadas con el desarrollo del cáncer.<sup>55</sup> La cromatina se divide en dos conformaciones distintas: heterocromatina, que está densamente compactada y silenciada transcripcionalmente, y eucromatina, que es menos condensada y

transcripcionalmente activa. El estado estructural de la cromatina da como resultado la actividad transcripcional del gen (Figura 6).<sup>56</sup>



**Figura 6.** Cambios en la cromatina por metilación y acetilación.<sup>FD</sup>

### 3.6 Epigenética y cáncer

En los carcinomas orales de células escamosas se ha relacionado la desregulación epigenética con 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>57, 58, 59, 60</sup> Además, se ha demostrado que la pérdida de la acetilación de la H3Lys9 es un marcador de quimiorresistencia que se ha asociado con el incremento en la proliferación celular y la activación de la transición epitelio-mesenquimal durante la carcinogénesis oral.<sup>61</sup> Sin embargo, este patrón no se ha demostrado en las neoplasias malignas de glándulas salivales, esto puede ser debido a la heterogeneidad y a la complejidad de su estudio.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El estudio de las neoplasias malignas de glándulas salivales representa un reto debido a la diversa morfología que presentan y a su baja prevalencia. Sin embargo, el solo hecho de su infrecuencia no justifica los escasos estudios que existen en la literatura que nos permitan entender los mecanismos involucrados en su origen, desarrollo y agresividad.

Aunado a esta situación, la mayoría de las investigaciones se han enfocado a evaluar solo las mutaciones génicas o alteraciones en la secuencia de ADN que pudieran estar relacionados con su formación, sin que hasta la fecha podamos generalizar este tipo de cambios como un fenómeno en todos los CME y CAQ, o que podamos asegurar que sea solo esta vía de mutación la involucrada en su etiopatogenia. Ejemplo de ello son otras neoplasias de estirpe glandular, como el adenocarcinoma de colon, en donde hasta la fecha se han estudiado 3 vías que permiten explicar el diverso desarrollo y comportamiento de estas lesiones. La primera vía llamada clásica, estudia las mutaciones presentes en genes supresores tumorales, la segunda vía o vía del mutador, se asocia a la disfunción de las enzimas encargadas de la reparación del ADN, y la tercera vía, que son los mecanismos epigenéticos, que involucran la metilación de promotores de genes encargados en la regulación del ciclo celular y la apoptosis. De hecho, el estudio de estos perfiles moleculares ha permitido entender la transición adenoma-adenocarcinoma en estas neoplasias. Debido a ello, nos preguntamos:

¿Cuál es el estado de metilación y acetilación del carcinoma mucoepidermoide y el carcinoma adenoideo quístico?

#### **5. JUSTIFICACIÓN**

El comportamiento biológico y clínico de las neoplasias malignas de glándulas salivales es 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 descifrar los mecanismos involucrados en la etiopatogenia de

dichas alteraciones ni han servido como blancos terapéuticos que mejoren el pronóstico de los pacientes.

Además, a pesar de los recientes avances en las técnicas de biología molecular y celular, el diagnóstico por parte del patólogo se sigue basando en su capacidad para identificar las características morfológicas específicas de las neoplasias malignas. Algunos de los cambios más importantes observados microscópicamente en las células neoplásicas son las alteraciones en la morfología y 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 con las modificaciones epigenéticas.

Se ha demostrado que los cambios epigenéticos juegan un papel importante en la patogénia de otras neoplasias de la región de cabeza y cuello como es el caso del carcinoma oral de células escamosas. La pérdida de función de los genes supresores tumorales se ha atribuido al silenciamiento epigenético a través de la hipermetilación de los promotores y no a las mutaciones genéticas, lo que indica que estos cambios tienen un papel significativo en el desarrollo y progresión neoplásica.

A diferencia de las alteraciones genéticas, los cambios epigenéticos son objetivos atractivos para la 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 quimiorresistencia, 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 quimiosensibilidad de las neoplasias que no responden a otras terapias.

Debido a ello, nosotros proponemos analizar el estado de metilación en los genes Rb1, p16, Plagl-1 involucrados en la regulación del ciclo celular, en los genes

MGMT y hMLH1 relacionados con la reparación de ADN y la acetilación de la H3Lys9 como principales mecanismos presentes en el CME y CAQ.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General**

Analizar el estado de metilación y acetilación del carcinoma mucoepidermoide (CME) y carcinoma adenoideo quístico (CAQ).

### **6.2 Objetivos Específicos**

- Determinar el estado de metilación de Rb1, p16, Plagl-1, MGMT y hMLH1 en los CME mediante la técnica MSP-PCR.
- Comparar el estado de metilación Rb1, p16, Plagl-1, MGMT y hMLH1 en los CME de grado histopatológico bajo, intermedio y alto.
- Identificar si existe una correlación entre los genes Rb1, p16, Plagl-1, MGMT y hMLH1 en su forma metilada y no metilada en los CME.
- Conocer el estado de metilación de Rb1, p16, Plagl-1, MGMT y hMLH1 en los CAQ quísticos mediante la técnica MSP-PCR.
- Comparar el estado de metilación de RB1, CDKN2A/p16, MGMT, hMLH1, y PLAG-1 en los CAQ de grado histopatológico intermedio y alto.
- Identificar si existe una correlación entre los genes Rb1, p16, Plagl-1, MGMT y hMLH1 en su forma metilada y no metilada en los CAQ.
- Identificar la presencia de la forma acetilada de H3Lys9 en CME por IHQ.
- Relacionar la presencia de la forma acetilada H3Lys9 con el grado histológico bajo, intermedio y alto de los CME.
- Identificar la presencia de la forma acetilada de H3Lys9 en CAQ por IHQ.
- Relacionar la presencia de la forma acetilada H3Lys9 con el grado histológico intermedio y alto de los CAQ.

## **7. HIPÓTESIS**

Los CME y CAQ, presentaran un estado hipermetilado en los genes Rb1, p16, Plagl-1, MGMT y hMLH1, e hipoacetilación de la H3Lys9.

## **8. METODOLOGÍA**

### **8.1 Diseño de estudio.**

Observacional, descriptivo y transversal.

### **8.2 Población de estudio.**

54 bloques de parafina con diagnóstico de CME y CAQ disponibles en el archivo del departamento de anatomía patológica del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en un periodo del 2009 al 2015, y 15 bloques de parafina del departamento de patología bucal y maxilofacial DEPEL FO de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con diagnóstico de CME y CAQ, en un periodo de 1986 a 2017.

### **8.3 Selección y tamaño de la muestra.**

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia donde se analizó la muestra total disponible.

**Tamaño de la muestra INCan:** 21 bloques de parafina, 10 con diagnóstico de CME y 11 con diagnóstico de CAQ del 2009 al 2015, que cumplieron con los criterios de selección.

**Tamaño de la muestra UNAM:** 9 bloques de parafina, 8 con diagnóstico de CME y 1 con diagnóstico de CAQ de 1986 a 2017, que cumplieron con los criterios de selección.

### **8.4 Criterios de Selección.**

#### **8.4.1 Criterios de inclusión:**

- Bloques con diagnóstico de CME y CAQ, confirmados por reevaluación histopatológica.
- Bloques que presenten adecuada cantidad de tejido neoplásico para su evaluación.
- Bloques de parafina que cuenten con suficiente cantidad de tejido que permita realizar las técnicas de inmunohistoquímica y de MSP-PCR.

#### **8.4.2 Criterios de exclusión:**

- Bloques de parafina que presenten mayor cantidad de parénquima residual o estroma y no tejido neoplásico que pueda ser evaluado.

- Bloques repetidos de un mismo caso, debido a permanencia de la lesión.
- Bloques de parafina en un estado deteriorado que no permitan recuperar el tejido embebido.

#### 8.4.3 Criterios de eliminación:

- Muestras de los que no se pueda recuperar una suficiente cantidad y calidad de ADN para su evaluación.

### 8.5 Operacionalización de las variables.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	CATEGORÍA	ESCALA DE MEDICIÓN
<b>CME</b> <b>Independiente</b>	Neoplasia epitelial maligna con proporciones variables de células mucosas, epidermoides e intermedias. <sup>26</sup>	Estadificación de acuerdo a sus características histológicas basados en la Clasificación de la OMS del 2017. Se consideran de bajo grado las neoplasias con un puntaje de 0 a 4, de grado intermedio de 5 a 6 y de alto grado con puntaje mayor o igual a 7	I. Bajo grado. II. Grado intermedio. III. Alto grado.	Cualitativa Ordinal
<b>CAQ</b> <b>Independiente</b>	Neoplasia epitelial maligna con diferenciación mioepitelial y ductal. <sup>3</sup>	Categorización de Szanto y cols. <sup>12</sup> Se consideran de bajo grado son las que presentan un patrón tubular, las de grado intermedio aquellas con patrón cribiforme y las de alto grado las que presentan un componente sólido >30%.	I. Bajo grado. II. Grado intermedio. III. Alto grado.	Cualitativa ordinal.
<b>RB1.</b> <b>Dependiente</b>	Gen localizado en 13q14.1-q14.2 cuya función principal es la inhibición de la progresión del ciclo celular antes de la entrada en mitosis, de manera que la célula no entra en división hasta que está preparada para ello y se dan las condiciones adecuadas: pRb impide por tanto la proliferación celular. <sup>35</sup>	Extracción de ácidos nucleicos, MSP-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares metilados y no metilados, electroforesis, y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles y el programa GelQuantNET.	Unidades de densidad óptica (DO).	Cuantitativa continua.
<b>CDKN2A/p16</b> <b>Dependiente.</b>	Gen localizado en 9p21.3, involucrado en la regulación del ciclo celular por la desaceleración de la progresión de las células de fase G1 a fase S y por tanto actúa como un supresor tumoral que está implicado en la prevención del cáncer. <sup>36</sup>	Extracción de ácidos nucleicos, MSP-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares metilados y no metilados, electroforesis, y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles y el programa GelQuantNET.	Unidades de densidad óptica (DO).	Cuantitativa continua.
<b>MGMT</b> <b>Dependiente.</b>	Gen O6- metilguanina ADN metiltransferasa. Es crucial para la estabilidad del genoma ya que evita el desajuste y errores durante la replicación del DNA y transcripción. Por consiguiente, pérdida de MGMT aumenta el riesgo de carcinogénesis. <sup>37</sup>	Extracción de ácidos nucleicos, MSP-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares metilados y no metilados, electroforesis, y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles y el programa GelQuantNET.	Unidades de densidad óptica (DO).	Cuantitativa continua.



VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	CATEGORÍA	ESCALA DE MEDICIÓN
<b>PLAG1. Dependiente.</b>	Codifica una proteína dedo de zinc con 2 señales de localización nuclear putativos. PLAG1 ha demostrado consistentemente ser reordenado en los adenomas pleomórficos de las glándulas salivales. <sup>38</sup>	Extracción de ácidos nucleicos, MSP-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles y el programa GelQuantNET.	Unidades de densidad óptica (DO).	Cuantitativa continua.
<b>hMLH1 Dependiente.</b>	Proteína codificada por el gen MLH1 situado en el cromosoma 3. Es un gen comúnmente asociado con el cáncer colorrectal hereditario sin Poliposis.	Extracción de ácidos nucleicos, MSP-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares metilados y no metilados, electroforesis, y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles y el programa GelQuantNET.	Unidades de densidad óptica (DO).	Cuantitativa continua.
<b>H3Lys9 Dependiente.</b>	Histona H3 es una de las cinco proteínas histonas principales implicadas en la estructura de la cromatina en las células eucariotas. Con un dominio globular principal y un N-terminal largo cola, H3 está involucrada con la estructura de los nucleosomas de la estructura de 'cuentas en un hilo'. La cola N-terminal de la histona H3 sobresale del núcleo del nucleosoma globulares y puede someterse a diferentes tipos de modificaciones epigenéticas que influyen en los procesos celulares. Estas modificaciones incluyen el accesorio covalente de grupos metilo o acetilo a los aminoácidos lisina y arginina y la fosforilación de la serina o treonina. <sup>39</sup>	Se examinará el estado de acetilación de la H3 usando un anticuerpo contra el acetil H3Lys9 con técnica de IHQ. Se encontrará como positivo las zonas que presente una tinción marrón intensa. Las fotografías serán analizadas con el programa ImageJ para la cuantificación celular.  Se medirá la localización celular de la tinción positiva.	Nº de células positivas.  1. Células abluminales. 2. Células luminales. 3. Células mucosecretoras/claras. 4. Células intermedias. 5. Células epidermoides. Células acinares.	Cuantitativa discreta.  Cualitativa nominal.

## 8.6 Material y métodos

### 8.6.1 Confirmación diagnóstica por análisis histoquímico.

Previo a la evaluación y confirmación del grado histopatológico de los casos, se realizó el análisis de concordancia Kappa de Cohen asesora-alumna por triplicado; obteniendo un valor de kappa 0.91 interobservador.

De cada uno de los 9 bloques del departamento de patología bucal y maxilofacial DEPEI FO UNAM, se obtuvieron: 1 corte a 5 µm para laminilla teñida en H&E que permitió la confirmación del diagnóstico y la elección de las zonas representativas de la neoplasia, 1 corte a 5 µm para el análisis inmunohistoquímico, así como 10 cortes histológicos a 5 µm que se conservaron en un microtubo para la

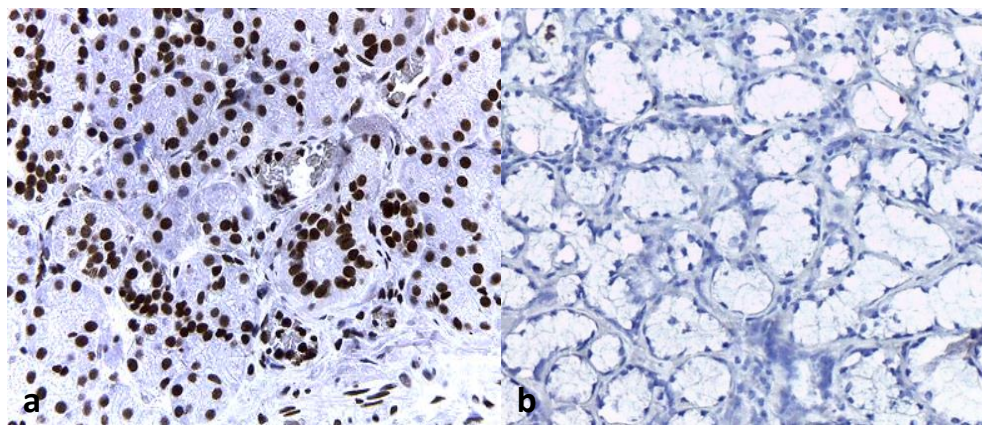
técnica de MSP-PCR. De cada uno de los 21 bloques del departamento de anatomía patológica del Instituto Nacional de Cancerología, la confirmación histológica fue realizada por patólogos adscritos al instituto. De los 9 bloques obtenidos de la UNAM, 4 fueron CME de bajo grado (CMEI), 3 de grado intermedio (CMEII), 1 alto grado (CMEIII) y 1 CAQ de grado intermedio (CAQII). De los 21 bloques obtenidos del INCan, 10 fueron CME y 11 CAQ. De los CME, 4 fueron CMEI, 3 de CMEII y 3 CMEIII. En cuanto a los CAQ, 6 fueron CAQII y 5 de alto grado (CAQIII).

### **8.6.2 Inmunohistoquímica (IHQ)**

Se realizaron ensayos de estandarización para determinar la concentración óptima del anticuerpo ac-H3LYS9-Ac (SC- 56516). El procedimiento para IHQ fue realizado de acuerdo con lo reportado por Goldstein y Watkins en 2008. Primero las laminillas se desparafinaron en 3 baños de xilol durante 15 minutos y rehidrataron en 2 baños en alcohol de 100%, seguidos de 2 más en alcohol de 96% durante 3 minutos cada uno. Posteriormente, se lavaron con agua destilada desionizada y se realizó la recuperación antigénica utilizando un buffer de citratos con pH 6 al 0.1 M y se llevó en baño de agua al horno de microondas durante 5 minutos a potencia 800 w y posteriormente 15 minutos más a potencia 400 w.

Se realizaron 3 lavados con Buffer de fosfato (PBS) por 3 minutos cada uno y se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% incubándolo durante 20 minutos en cámara húmeda; y transcurrido el tiempo se hicieron 3 lavados de PBS por 3 minutos más. Se delimitó la muestra con lápiz hidrofóbico y posteriormente se realizó el bloqueo del marcaje inespecífico con PBS-albúmina al 0.2% durante 20 minutos en cámara húmeda y se realizaron 3 lavados de PBS de 3 minutos, enseguida se permeabilizó con Tritón-X10 al 0.2% durante 20 minutos y nuevamente se lavó con PBS 3 veces durante otros 3 minutos. Se colocó el anticuerpo primario incubando toda la noche a 4°C.

Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS de 3 minutos para colocar el anticuerpo secundario anti-mouse/rabbit en cámara húmeda por 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados en PBS de 3 minutos cada uno. Se prosiguió a la incubación de la peróxidasa de rábano (HRP) en cámara húmeda por 10 minutos, seguido de 3 lavados con PBS de 3 minutos. Se empleó diaminobencidina (DAB) como cromógeno y se colocó a cada tejido durante 3 minutos. Después de aplicar el cromógeno se lavaron las laminillas con agua corriente, se dejaron en agua destilada desionizada durante 1 minuto. Se realizó la contratinción con hematoxilina de Mayers durante 10 minutos y posteriormente se lavaron con agua corriente. Se realizó la deshidratación de los tejidos con alcoholes de diferentes concentraciones y xilol para realizar el montaje con resina hidrofóbica. Se utilizó como control positivo, glándula salival normal. El control negativo se obtuvo por la omisión del anticuerpo primario sustituido por PBS (Figura 7).



**Figura 7. Fotomicrografías acinos glandulares 400x.** a) Control positivo b) Control negativo. Propiedad del autor

### 8.6.3 Análisis de inmunoexpresión.

Se tomaron fotografías con el programa Leica Las-Ez versión 3.2.0. En cada caso se seleccionaron los campos de mayor celularidad neoplásica a 40 aumentos y se tomaron 5 fotografías de esas zonas a 200 aumentos. Posteriormente se realizó la cuantificación del número de células positivas con la ayuda del software ImageJ® versión 1.46 previamente calibrado, por medio de la herramienta "Multi point". Se convirtieron las fotografías a escala de grises y cambio de pixelaje a 2.0 obteniendo las DO. Se obtuvieron medianas de la cuantificación de las 5 imágenes

por caso. También se registró el patrón de positividad celular, de acuerdo con lo registrado en las variables.

#### **8.6.4 MSP-PCR.**

Previo a los ensayos experimentales se realizó la estandarización de las temperaturas de hibridación para los primers empleados para el MSP-PCR.

##### **8.6.4.1 Extracción y conversión de ADN.**

Se obtuvieron 5 cortes a 10 micras cada uno para cada caso incluido el control (casos UNAM e INCan). Estos se almacenaron en microtubos de 1.5ml previamente esterilizados. Se realizó la extracción de ADN con el sistema Miniprep gDNA ReliaPrep™. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se agregó 300 µl de aceite mineral, se incubó en el termobloque a 80°C por un minuto, se agregó 200µl buffer para centrifugar a 10 000 rpm por 15 segundos para formar dos fases: acuosa (inferior) y oleosa (superior), se agregó 20 µl de proteinasa K a la fase inferior, para incubar a 56°C por una hora y a 80°C por 4 horas para una óptima recolección de ADN. Posteriormente, se agregó 10 µl de RNasa A para incubar a temperatura ambiente 5 minutos. Se adiciono 220 µl de Buffer BL seguido de 240 µl de etanol al 100% filtrado, se centrifugo a 10 000 rpm por 15 segundos. Posteriormente se transfirió toda la parte inferior acuosa al ensamble de columna de unión/tubo colector para centrifugar 10 000 rpm por 30 segundos. Se realizó el lavado del DNA capturado con 500 µl solución de lavado 1x centrifugando a 10 000 rpm por 30 segundos en dos ocasiones. Se secó el ensamble centrifugando a 13 000 rpm por 5 minutos. Se transfirió la columna de unión a un tubo de 1.5 ml estéril para agregar 50 µl de solución de elusión y centrifugar a 13 000 rpm por 3 minutos. El DNA obtenido fue cuantificado mediante el espectrofotómetro Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras con cantidad y calidad superior a 1.8 de la relación 260/280nm fueron conservadas (Tabla 1). Derivado de la cantidad de DNA base obtenido en ensayos previos y para mejorar la cantidad de DNA convertido para la técnica de MSP, se decidió agrupar el ADN de las muestras del INCan por grado histopatológico. Se obtuvieron 5 muestras: 1 microtubo para el CMEI o de bajo grado I, 1 microtubo para el CMEII o grado intermedio, 1 microtubo para el CMEIII o de alto grado, 1 microtubo para el CAQII o de grado intermedio y finalmente 1 microtubo para el CAQIII o de alto grado.

**Tabla 1. Cuantificación de ADN posterior a la extracción.**

<b>Cuantificación de ADN- UNAM.</b>			
	<b>Muestra</b>	<b>ng/μl</b>	<b>260/280</b>
<b>1</b>	Control	91.2	1.8
<b>2</b>	CAQII	39.6	1.82
<b>3</b>	CMEI	10.7	1.92
<b>4</b>	CMEI	26.2	2.04
<b>5</b>	CMEI	46.4	1.91
<b>6</b>	CMEII	270.9	1.84
<b>7</b>	CMEII	100.2	1.86
<b>8</b>	CMEI	31.9	1.93
<b>9</b>	CMEII	58.7	1.91
<b>10</b>	CMEIII	52.8	1.82
<b>Cuantificación de ADN- Incan.</b>			
<b>11</b>	CMEI	15.1	2.01
<b>12</b>	CME II	88.9	1.87
<b>13</b>	CMEIII	160.4	1.87
<b>14</b>	CAQII	154.5	1.87
<b>15</b>	CAQ III	193.2	1.85

Se comenzó con una concentración de 500 ng de cada muestra para el ensayo de conversión por bisulfito. A cada muestra se agregó 2.75μl de solución de NaOH 2M y se incubó durante 10 min a 37C° en el termobloque, posteriormente se agregaron 15μl de hidroquinona al10mM por último se agregaron 260 μl de bisulfito de sodio a 3.6M se mezcló en vórtex durante unos segundos; se cubrió con 100 μl de aceite mineral y se incubó durante 16 horas a 54C°. Se retiró la fase acuosa del fondo (aproximadamente 300μl) para transferirlo a un nuevo tubo de 1.5ml, agregaron 300μl de SV lysis solution/etanol al 95% 1:1. Todo el volumen se transfirió al ensamble Wizard mini spin-column colectora para centrifugar a 10 000 rpm por un minuto. Se lavó con 600μl buffer de lavado SV/95% de etanol1:1, para centrifugar nuevamente a 10,000 rpm por un minuto, repitiendo este proceso 2 ocasiones. El mini spin fue insertado en un tubo de 1.5 ml nuevo para eluir el DNA capturado con 50 μl agua bidestilada estéril precalentada a 65°C, centrifugando a 13 000 rpm por un minuto. Se agregó 5.5 μl de solución de NaOH 3M incubando durante 5min a

temperatura ambiente para poder agregar el preparado de concentración (1µl de glucógeno 10mg/ml, 6µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 150µl de etanol al 100%) para esperar la precipitación de DNA a -20C° toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 13 000 15 min a 4°C, eliminando el sobrenadante para añadir etanol al 70% y centrifugar nuevamente eliminado el nuevo sobrenadante y resuspender el DNA en 50µl de Tris HCl (pH8). La cuantificación se realizó con el sistema Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras cumplieron con el criterio de calidad (260/280>1.8)

#### 8.6.4.2 Amplificación

La amplificación del ADN obtenido, se realizó utilizando los primers de la región promotora para la forma metilada (M) y no metilada (U) de los 5 genes Rb1, p16, MGMT, hMLH1 y Plagl-1. Las secuencias se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Primers para la secuencia metilada y no metilada (eurofins genomics).**

SET DE PRIMERS PARA MSP-PCR.		
GEN	Secuencia no metilada	Secuencia metilada
<b>Rb1</b>	up: 5'-GGGAGTTTTGTGGATGTGAT-3' ds:5'-ACATCAAAACACACCCCA -3'	up: 5'-GGGAGTTTCGCGGACGTGAC -3' ds:5'-ACGTCGAAACACGCCCCG -3'
<b>CDKN2A/p16</b>	up: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT -3' ds: 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3	up: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC -3' ds:5'-GACCCCGAACC CGC GACCGTAA -3'
<b>MGMT</b>	up: 5'- TTTGTGTTTGTATGTTGTAGGTTTTGT -3' ds: 5'- AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA -3'	up: 5'- TTTGACGTCGTCGTTAGTTTTTCGC -3' ds: 5'- GCACTCTCCGAAAACGAAACG -3
<b>hMLH1</b>	up: 5'- TTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTGT -3' ds: 5'- ACCACCTCATCATAAACCACCA -3'	up: 5'- ACGTAGACGTTTTATTAGGGTTCGC -3' ds: 5'- CCTCATCGTAACTACCCGCG -3'
<b>Plagl-1</b>	up: 5'-TAGACCTGTGCTCCCATCC-3' ds: 5'-GAGGGAGAGGAAACCCCTTG-3'	up: 5'-TCCTCAAGCTGCCAGAAGAT-3' ds: 5'-TACTGCTCTGGCGGAACCT-3'

ds: downstream; us: upstream. Rb1, gen de la proteína de la retinoblastoma; CDKN2A/P16, inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A; MGMT, metilguanidina-ADN metiltransferasa; hMLH1, homologo 1 mutL; Plagl-1, gen del adenoma pleomorfo.

Se agregó 12.5 µl de PCR master mix, 2.5 µl del primer upstream 10 µM, 2.5 µl de primer downstream 10 µM para cada uno de los oligos y 40 ng/ µl de DNA muestra, ajustando el volumen a 25 µl con agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó en el termociclador Axygen Maxygen II a 95C°,

programando 40 ciclos, ajustando las temperaturas de hibridación para cada primer. 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). Posteriormente se resolvió el producto en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, mediante electroforesis horizontal a 500 mA durante 40 minutos. Se tiñó con 3 µl bromuro de etidio durante 30 minutos en 300 ml de 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 y se cuantificaron con ayuda del software GelQuantNet versión 1.8.2. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

#### **8.6.5 Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos de la cuantificación de los genes hMLH1, Rb1, p16, Plagl-1, 1 y MGMT, tanto en su forma metilada y no metilada se expresaron en unidades de densidad óptica (DO) y se analizaron con el software IBM®SPSS® Statistic versión 25. Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los genes del CME, obteniéndose una  $p < 0.05$  ( $p = 0.000$ ), lo cual nos indicó que la distribución observada en los genes estudiados no se asemejaba a la distribución normal. Debido a ello, para el análisis descriptivo se utilizaron medianas y rangos intercuartilares. Para la comparación de las DO de los genes en los CME en los tres diferentes grados histopatológicos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con post hoc U de Mann Whitney, considerándose una diferencia significativa cuando se obtuviera un valor de  $p \leq 0.016$ . Para identificar la correlación entre los genes metilados y no metilados se realizó el coeficiente de correlación de Spearman.

En cuanto a los datos del CAQ, también se realizó la prueba normalidad Shapiro-Wilk, obteniéndose una  $p > 0.05$  ( $p = 0.20$ ) lo cual nos indicó que la distribución observada se asemejaba a la distribución normal. Debido a ello, para el análisis descriptivo se utilizaron medias y desviación estándar. Para la comparación de las DO de los CAQ en los dos grados histopatológicos estudiados, se utilizó la prueba de T-Student para muestras independientes, considerándose una diferencia significativa cuando se obtuviera un valor de  $p < 0.05$ . P Para

identificar la correlación entre los genes metilados y no metilados se realizó el coeficiente de correlación de Pearson.

## 9. RESULTADOS

Para este estudio se seleccionaron 30 bloques que cumplieron con los criterios de selección, 9 obtenidos de la UNAM y 21 del INCan. La proporción de casos se enlistan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Distribución de CME y CAQ por grado histopatológico.**

	CME			CAQ	
	n=18			n=12	
	I	II	III	II	III
	n=8	n=6	n=4	n=7	n=5
<b>UNAM n=9</b>					
n, (%)	4 (45)	3(33)	1(11)	1(11)	0
<b>INCan n=21</b>					
n, (%)	4 (19)	3 (14)	3 (14)	6 (29)	5 (24)

### 9.1. Análisis descriptivo de la muestra de la UNAM.

Los datos clínicos fueron obtenidos de las hojas de solicitud de estudio histopatológico. Solo se contaron con los datos de sexo, edad y glándula afectada. Los CMEI fueron más frecuentes en el sexo femenino 3(75%), presentándose en una media de edad de  $49.5 \pm 24.11$  años, afectando en la totalidad de los casos a las glándulas salivales menores (GSM). Los CMEII también mostraron una predilección por el sexo femenino 2 (67%), en una edad promedio de  $53.33 \pm 8.7$  años, presentándose en igual proporción en GSM, glándula parótida y submandibular. En cuanto al CMEIII, el caso obtenido fue del sexo masculino, con una edad de 54 años, con localización de GSM. El único bloque al que tuvimos acceso correspondió a CAQII, de sexo femenino, con 54 años, que manifestó la lesión en GSM. Los detalles de las variables clínicas en esta muestra se enlistan en la Tabla 4.



**Tabla 4. Información clínica de los CME y CAQ UNAM.**

<b>Variables</b>	<b>CMEI n=4</b>	<b>CMEII n=3</b>	<b>CMEIII n=1</b>	<b>CAQII n=1</b>
<b>Sexo</b>				
F, n (%)	3 (75)	2 (67)	0	1 (100)
M, n (%)	1 (25)	1 (33)	1 (100)	0
<b>Edad</b>				
Media, SD, años.	49.5, 24.11	53.33, 8.7	50	54
<b>Glándula afectada</b>				
GSM, n (%)	4 (100)	1 (33)	1 (100)	1 (100)
Parótida, n (%)		1 (33)		
Submandibular, n (%)		1 (33)		

### **9.2 Análisis descriptivo de la muestra del INCan.**

Los datos clínicos fueron obtenidos del expediente clínico electrónico INCanet. Se contaron con los datos de sexo, edad y glándula afectada. Los CMEI no presentaron predilección por sexo, presentándose en una media de edad de  $42 \pm 24.09$  años, afectando con mayor frecuencia las GSM 3 (75%), y solo 1 (25%) la glándula parótida. El tamaño tumoral promedio fue de  $33.33 \pm 15.2$ mm., con manifestación de diseminación regional a nódulos cervicales en 1 (25%) caso. No se encontraron datos de metástasis a distancia. Los CMEII mostraron una predilección por el sexo femenino 2 (67%), en una edad promedio de  $53.33 \pm 11.50$  años, presentándose 2 (67%) en GSM y 1 (33%) glándula parótida. El tamaño tumoral reportado fue de  $50 \pm 7.3$ mm., con manifestación de diseminación regional a nódulos cervicales en 1 (33%) caso. Tampoco se encontraron datos de metástasis a distancia. En cuanto al CMEIII, todos los bloques fueron del sexo masculino, en un promedio de  $45.66 \pm 21.07$  años, presentándose 2 (67%) en GSM y 1 (33%) glándula parótida. El tamaño tumoral reportado fue de  $80 \pm 5.43$ mm., con manifestación de diseminación regional a nódulos cervicales en 2 (67%) casos. Tampoco se encontraron datos de metástasis a distancia

Por otra parte, los CAQII mostraron una predilección por el sexo femenino 4 (67%), en una edad promedio de  $47.5 \pm 13.30$  años, presentándose 4 (66%) en GSM, 1 (17%) en glándula parótida y 1 (17%) en glándula submandibular. El tamaño

tumoral reportado fue de 27.5 ±3.53mm. No se reportó diseminación regional a nódulos cervicales, pero si 4 (67%) metástasis a pulmón. Se encontró muerte por enfermedad en 2 (33%) de las lesiones. Los CAQIII, también fueron más frecuentes en el sexo femenino 3 (60%), en un promedio de 56.2 ±15.73 años, presentándose 4 (80%) en GSM y 1 (20%) glándula submandibular. El tamaño tumoral reportado fue de 30 ±8.34mm. Tampoco se reportó diseminación regional a nódulos cervicales, pero si 3 (60%) metástasis a pulmón. Se encontró muerte por enfermedad en 1 (20%) de las lesiones. Los detalles de las variables clínicas en esta muestra se enlistan en la Tabla 5.

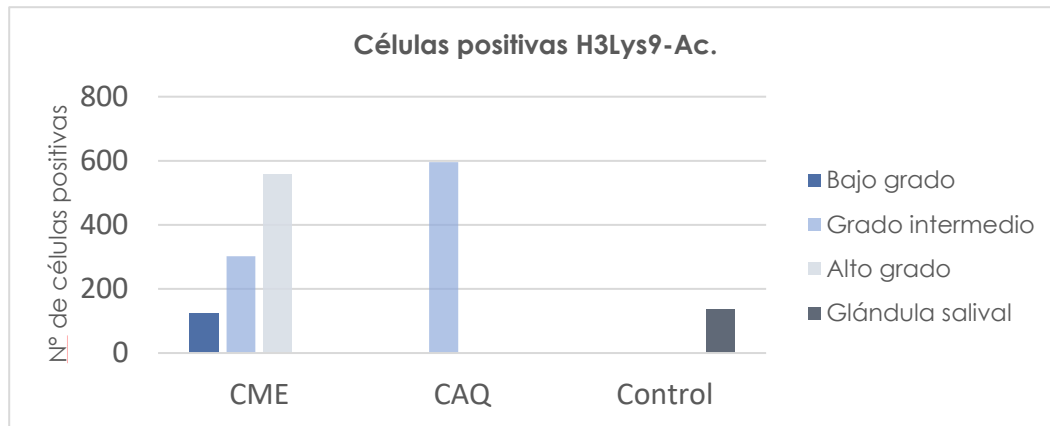
**Tabla 5. Información clínica de los CME y CAQ INCan.**

<b>Variables</b>	<b>CMEI n=4</b>	<b>CMEII n=3</b>	<b>CMEIII n=3</b>	<b>CAQII n=6</b>	<b>CAQIII n=5</b>
<b>Sexo</b>					
F, n(%)	2 (50)	2 (67)	0	4 (67)	3 (60)
M, n (%)	2(50)	1 (33)	3 (100)	2 (33)	2 (40)
<b>Edad</b>					
Media, SD, años.	42, 24.09	53.33, 11.50	45.66, 21.07	47.5, 13.03	56.2, 15.73
<b>Glándula afectada</b>					
GSM, n (%)	3 (75)	2 (67)	2 (67)	4 (66)	4 (80)
Parótida, n (%)	1 (25)	1 (33)	1 (33)	1 (17)	0
Submandibular, n (%)				1 (17)	1 (20)
<b>Tamaño tumoral</b>					
Media, SD, mm.	33.33, 15.2	50, 7.3	80, 5.43	27.5, 3.53	30, 8.34
<b>Nódulos positivos</b>					
Presencia, n (%)	1 (25)	1 (33)	2 (67)	0	0
Ausencia, n (%)	3 (75)	2 (67)	1 (33)	6 (100)	5 (100)
<b>Metástasis a distancia</b>					
Presencia, n (%)	0	0	0	4 (67)	3 (60)
Ausencia, n (%)	4 (100)	3 (100)	3 (100)	2 (33)	2 (40)
<b>Muerte por enfermedad</b>					
Presencia, n (%)	0	0	0	2 (33)	1(20)
Ausencia, n (%)	4 (100)	3 (100)	3 (100)	4 (67)	4 (80)

### **9.3 Inmunohistoquímica para H3Lys9-Ac.**

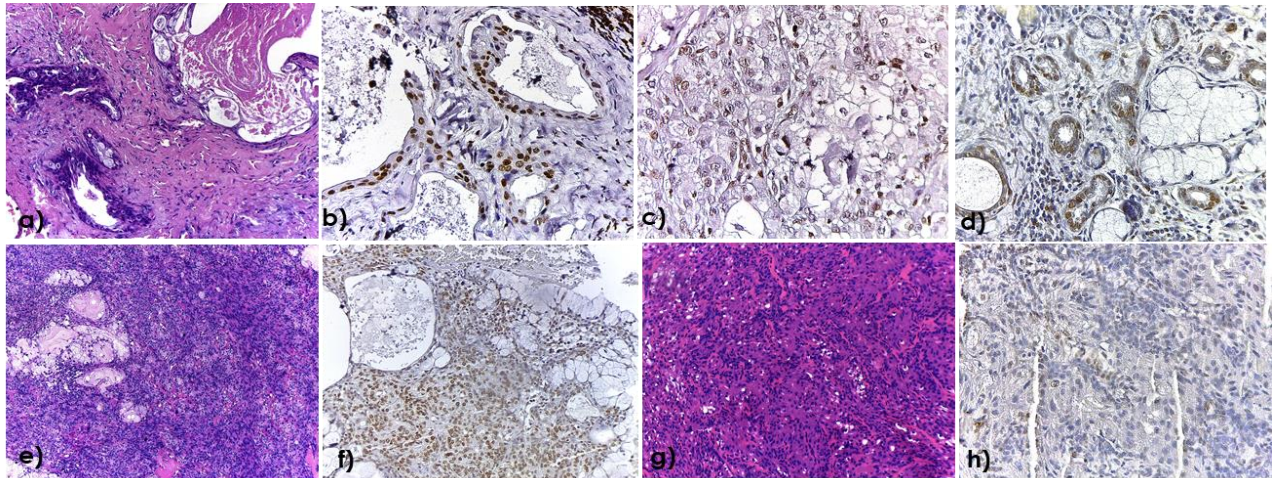
Los ensayos de inmunohistoquímica (IHQ)solo pudieron realizarse con la muestra de la UNAM. Se cuantificaron las células positivas para el anticuerpo H3Lys9-Ac en los CMEI, CMEII, CMEII y CAQII, así como su patrón de positividad celular. Se analizó tejido glandular sano como control.

El tejido glandular sano presentó una cuantificación de 136 (50, 210) células positivas para H3Lys9 de. Los CMEI presentaron 122 (52, 511) células positivas. Los CMEII presentaron una mediana de 302 (37, 690) células positivas. Los CMEIII, 558 (320, 601) células positivas. El único caso de CAQII presentó una mediana de 596 (404, 789) células positivas (Gráfica 1).



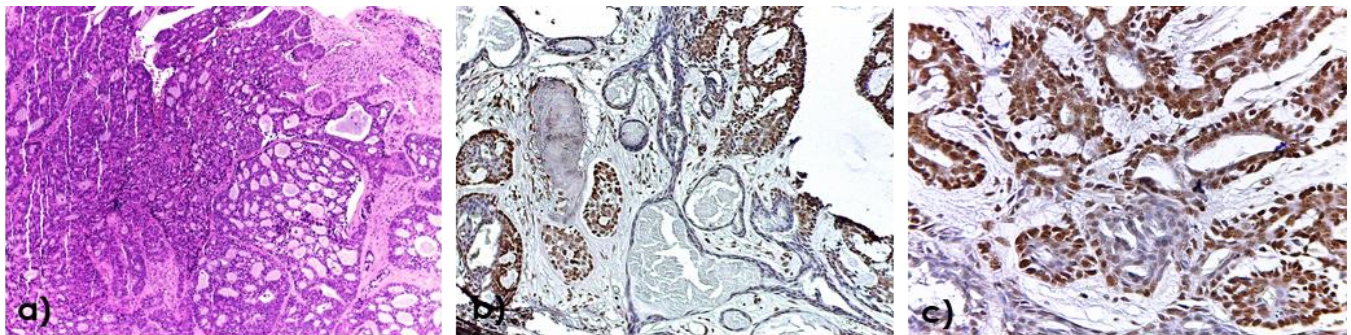
**Gráfica 1. Cuantificación de células positivas para H3Lys9-Ac.**

En cuanto al patrón de positividad celular, el grupo control solo presentó positividad fuerte nuclear en las células acinares. Los CMEI presentaron positividad fuerte nuclear y citoplasmática en las células claras y en las células que rodean las formaciones quísticas (Figura 8 b y c). Los CMEII presentaron positividad nuclear fuerte en las células intermedias (Figura 8 f) y el CMEIII positividad nuclear y citoplasmática en las áreas sólidas. (Figura 8 g y h). Un dato relevante es que el parénquima glandular asociado a la neoplasia también presentó un patrón de positividad citoplasmática nuclear en las células ductales (Figura 8 d).



**Figura 8. IHQ para H3Lys9-Ac 200x.** CMEI a) Campo representativo H&E, b y c) Reacción nuclear para el anticuerpo en las células ductales, quísticas y claras d) positividad en el parénquima glandular peri tumoral CMEII e) Campo representativo de células intermedias y epidermoides H&E. f) Positividad nuclear en células intermedias y epidermoides. CMEIII g) Campo representativo áreas sólidas H&E h) Positividad nuclear y citoplasmática en células epidermoides.

Por otra parte, el CAQ presento una positividad fuerte nuclear y citoplasmática en las células abluminales, siendo negativa para las células lumbinales de las áreas cribiformes (Figura 9).

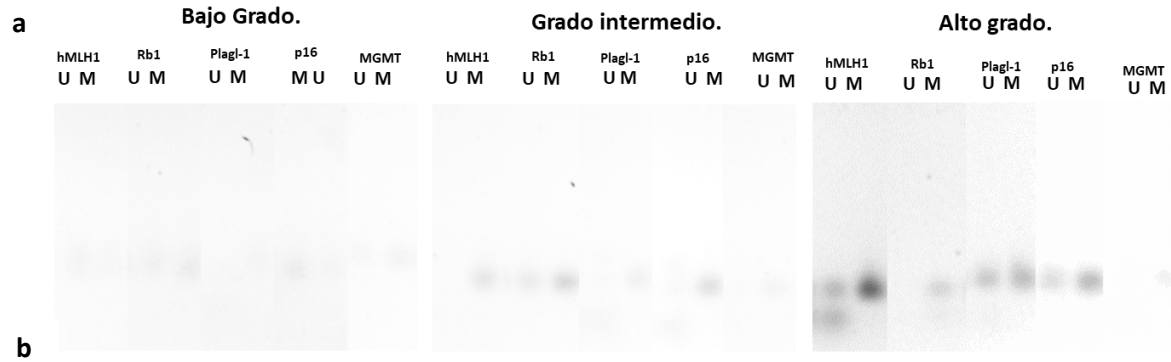


**Figura 9. IHQ para H3Lys9-Ac 200x.** CAQII a) Campo representativo H&E en un patrón tubular-cribiforme b y c) positividad nuclear en las áreas de disposición cribiforme.

#### 9.4 MSP-PCR muestras UNAM.

##### 9.4.1 Estado de metilación en CME.

Las DO obtenidas de los genes hMLH1, Rb1, p16, Plagl-1, 1 y MGMT en los CME se observan en la Figura 10.



**b**

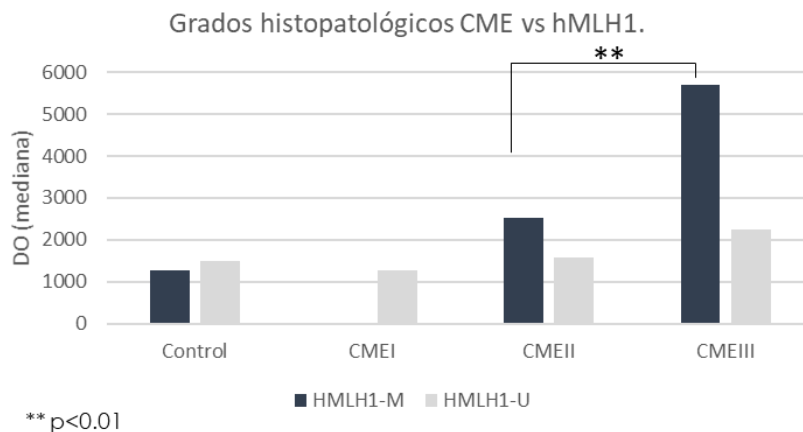
Genes analizados en los CME-UNAM.

Variable, unidad	HMLH1-M	HMLH1-U	RB-M	RB-U	P16-M	P16-U	Plagl-1-M	Plagl-1-U	MGMT-M	MGMT-U
<b>CME I</b>										
Mediana	0	*1282	646	*1616	*360	0	*324	323	383.4	*1256
(Q1, Q3), DO.		(1135, 2801)	(0, 1219)	(0, 5233)	(0, 2692)		(1302, 1028)	(0, 2197)	(0, 1370)	(0, 2903)
<b>CME II</b>										
Mediana	*2522	1570.75	*4046	1701	*12793	3563	1027	*3761	378	*1441
(Q1, Q3), DO.	(1972, 2802)	(1135, 2801)	(2730, 5908)	(949, 1965)	(11326, 14056)	(2183, 5770)	(646, 2361)	(1211, 6582)	(100, 705)	(584, 2670)
<b>CME III</b>										
Mediana	*5705.55	2240	*3341	3207	*4190	1632	*1592	552	*1913	1025
(Q1, Q3), DO.	(1880, 10414)	(1530, 5146)	(1876, 4602)	(817, 4524)	(3339, 5067)	(921, 4981)	(1351, 1598)	(39, 1793)	(1600, 3132)	(590, 1793)

**Figura 10. a) Geles de electroforesis de CME.** Imagen armada de fragmentos de los geles obtenidos por triplicado de cada gen **b) Cuantificación DO.** Se observa un aumento de DO en la mayoría de los genes en los grados de mayor agresividad.

#### 9.4.2 Estado de metilación de en hMLH1 y grado histopatológico.

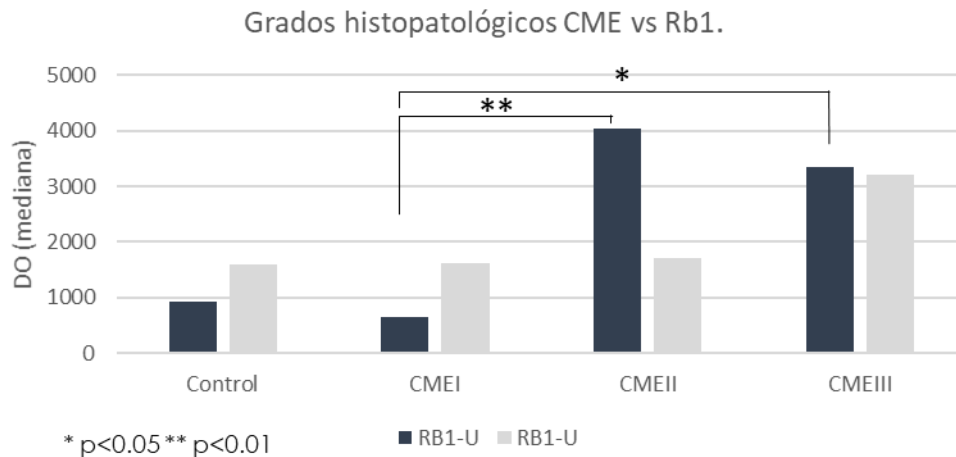
El gen hMLH1 en el CMEI presentó una cuantificación mayor en su forma no metilada(U), con mediana de, 1282 (1135, 2082) DO. Contrario a su cuantificación en el CMEII y CMEIII donde presento una mayor cuantificación en su forma metilada (M), con una mediana de 2522 (1972, 2802) y 5705.58 (1880, 10414). En el análisis de comparación entre grupos, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los CMEI y CMEIII en su forma metilada ( $p=0.002$ ) (Gráfica 2).



**Gráfica 2.** Cuantificación de hMLH1 en los diferentes grados histopatológicos de CME.

### 9.4.3 Estado de metilación de en Rb1 y grado histopatológico.

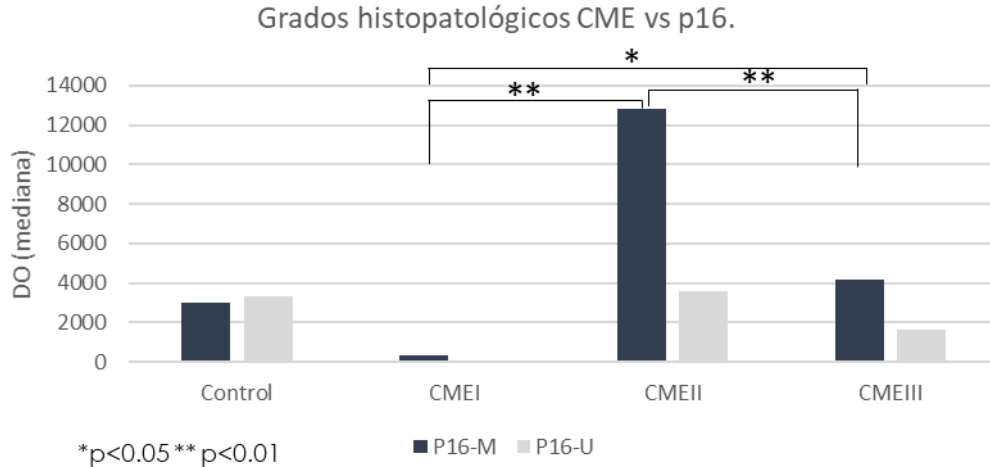
El gen Rb1 presentó una cuantificación mayor en su forma metilada(M) sólo en el CMEII, con una mediana de, 4046 (2730, 5908) DO. Los CMEI presento una cuantificación mayor en su forma no metilada(U) del gen, con mediana de, 1616 (0, 5233) DO. En el análisis de comparación entre grupos se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los CMEI y CMEII ( $p=0.009$ ) y los CMEI y CMEIII ( $p= 0.022$ ) y para su forma metilada (M) (Gráfica 3).



**Gráfica 3.** Cuantificación de Rb1 en los diferentes grados histopatológicos de CME.

### 9.4.4 Estado de metilación de en p16 y grado histopatológico.

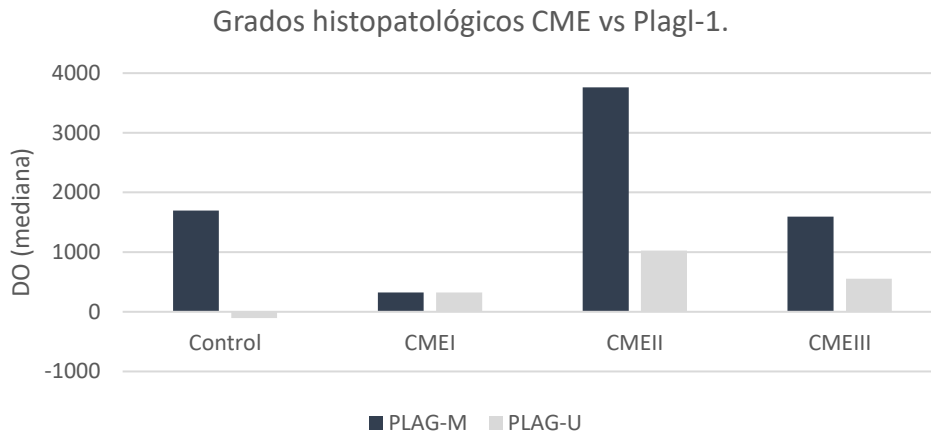
El gen p16 presentó una cuantificación mayor en su forma metilada (M) en los tres grados histopatológicos, siendo mayor en los CMEII y CMEIII, con medianas de cuantificación 4046 (2730, 5908) y 3341 (1876, 4602) DO respectivamente. En el análisis de comparación entre grupos, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los CMEI y CMEII ( $p=0.001$ ), entre CMEI y CMEIII ( $p=0.018$ ) y entre CMEII y CMEIII ( $p=0.004$ ) en su forma metilada (M) (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Cuantificación de p16 en los diferentes grados histopatológicos de CME.

#### 9.4.5 Estado de metilación de en Plagl-1 y grado histopatológico.

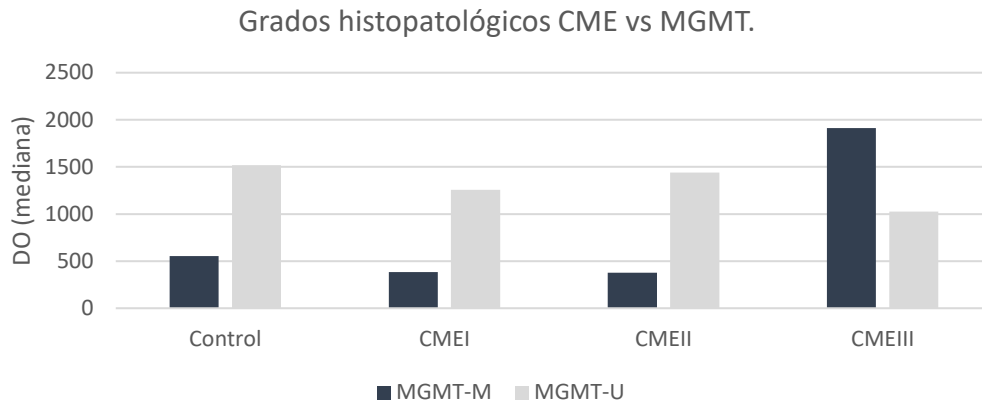
El gen Plagl-1 en el CMEI presento una disminución en su estado de metilación en comparación del control, con una mediana de, 324 (1302, 1028) DO. La forma metilada del gen (M) aumentó en el CMEII y CMEIII con medianas de 1027 (646, 2361) y 1592 (1351, 1598) DO respectivamente (Gráfica 5).



**Gráfica 5.** Cuantificación de Plagl-1 en los diferentes grados histopatológicos de CME.

### 9.4.6 Estado de metilación de en MGMT y grado histopatológico de CME.

El gen MGMT presentó una predilección de medición en su forma no metilada(U) en los CMEI y CMEII CME con medianas de, 1256 (0, 2903) y 1441 (584, 2670) DO respectivamente. El CMEII presentó una cuantificación mayor en su estado metilado (M), con una mediana de 1913 (1600, 3132) DO (Gráfica 6).



**Gráfica 6.** Cuantificación de MGMT en los diferentes grados histopatológicos de CME.

### 9.4.7 Metilación en múltiples genes en CME.

Se observó una correlación positiva fuerte entre los genes hMLH1U y MGMTM, así como correlaciones positivas moderadas entre hMLH1M y Rb1M, hMLH1M y p16M, entre Rb1M y p16M y entre Rb1M y MGMTM (Tabla 6).

**Tabla 6.** Correlación de la metilación de genes en los CME.

		Rb1		p16		Plagl-1		MGMT	
		M	U	M	U	M	U	M	U
hMLH1	M	.674**	.373*	.523**	.420*				
	U		.750**					.882**	
Rb1	M			.728**	.356*	.390*	.407*	.768**	
	U								

■  $r_s = 0.8$  a  $1$ . ■  $r_s = 0.5$  a  $0.799$ . ■  $r_s = 0.3$  a  $0.499$  \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



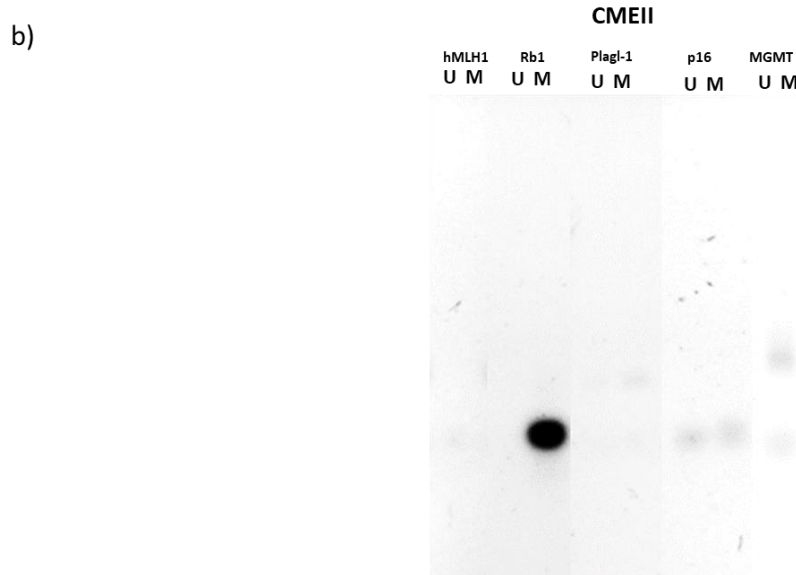
### 9.4.8 Estado de metilación en CAQ.

Las DO obtenidas de los genes hMLH1, Rb1, p16, Plagl-1, 1 y MGMT en los CME se observan en la Figura 11.

a)

Genes analizados CAQ- UNAM.										
Variable, unidad	HMLH1-M	HMLH1-U	RB-M	RB-U	P16-M	P16-U	Plagl-1-M	Plagl-1-U	MGMT-M	MGMT-U
CMEI	11086.16,	3067.56,	207316.96,	0	55120.63,	27643	5921.133,	0	0	5108.93,
Media, SD, DO.	$\pm 4034.15$	$\pm 5313.1$	$\pm 275662.01$		$\pm 1134.25$	$\pm 4156.11$	$\pm 5141.03$			$\pm 4496.65214$

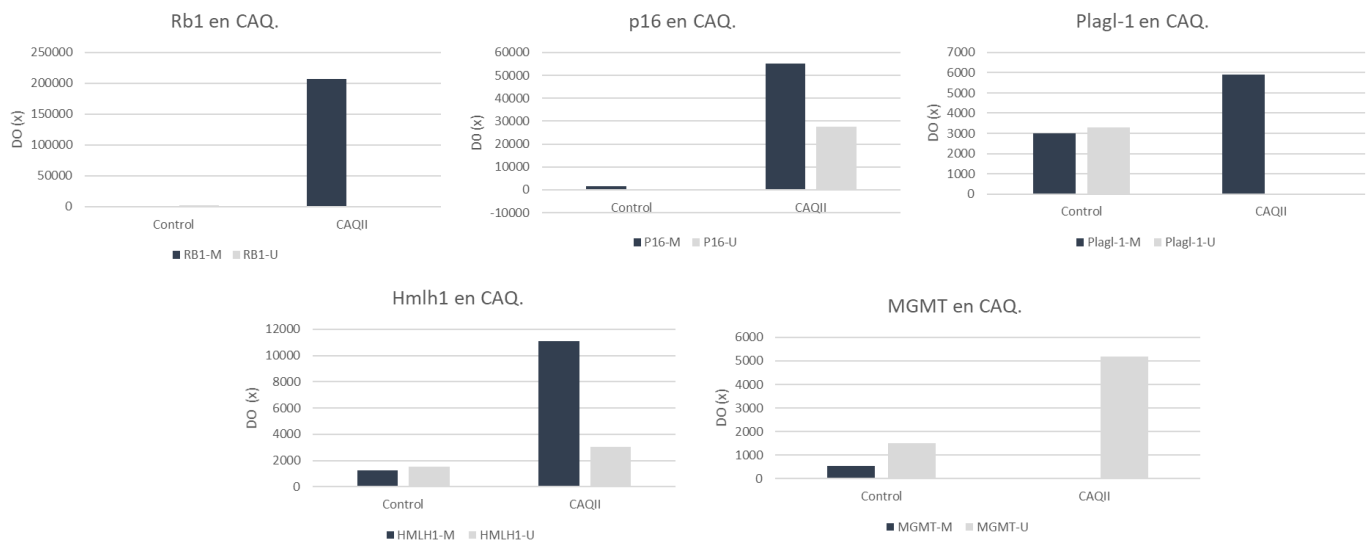
\* Estado de metilación con mayor cuantificación de DO. M= metilado, U= no metilado. Datos obtenidos en ensayos por triplicado.



**Figura 11. a) Geles de electroforesis de CAQ.** Imagen armada de fragmentos de los geles obtenidos por triplicado de cada gen **b) Cuantificación DO.** Se observa un perfil de metilación (M) en la mayoría de los genes, con excepción del MGMT.

### 9.4.9 Estado de metilación de genes en CAQ.

El CAQII mostro mayor cuantificación de los genes hMLH1, Rb1, p16 y Plagl-1 en su forma no metilada, a excepción del MGMT, el cuál presentó mayor cuantificación en la forma no metilada, con un promedio de  $5108.93 \pm 4496.65$  DO. (Gráfica 7). No se observó una asociación lineal de los genes estudiados.



**Gráfica 7.** Cuantificación de genes M y U en el CAQ.

## 9.5 MSP-PCR muestras INCAn.

### 9.5.1 Estado de metilación en CME.

Las DO obtenidas para los genes hMLH1, Rb1, p16, Plagl-1, 1 y MGMT en los CME se observan en la Figura 12 y se enlistan en la Tabla 7.

### Carcinoma mucoepidermoide.



**Figura 12. Geles de electroforesis de CME.** Se observa un aumento de DO en la forma metilada (M) en p16 y Plagl-1 en los tres grados histopatológicos del CME.

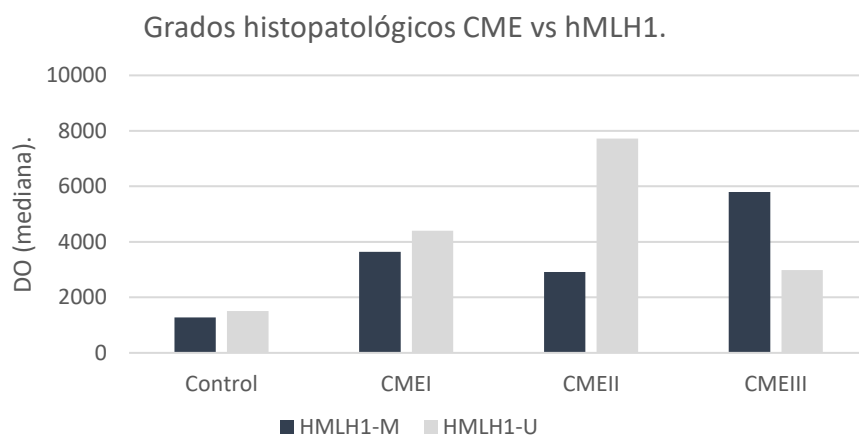
**Tabla 7. Cuantificación en DO de los genes en los diferentes grados de los CME.**

Genes analizados en los CME.										
Variable, unidad	hMLH1-M	hMLH1-U	Rb1-M	Rb1-U	p16-M	p16-U	Plagl-1-M	Plagl-1-U	MGMT-M	MGMT-U
<b>CMEI</b>										
Mediana (Q1, Q3), DO.	3644 (2469, 4021)	*4407 (3796, 9405)	*9604 (5782, 12621)	1543 (1348, 2587)	*38496 (20783, 76154)	10281 (6316, 17328)	*11603 (6237, 19234)	2093 (989, 3761)	798 (334, 848)	*2211 (1416, 7393)
<b>CME II</b>										
Mediana (Q1, Q3), DO.	2910 (2586, 564950)	*7722 (4441, 592796)	3562 (2956, 678524)	*5904 (5037, 1734386)	*29319 (18326, 10199386)	18790 (12690, 5008067)	*14410 (8708, 2231192)	2490 (2481, 337194)	774 (676, 120992)	*2309 (2246, 278269)
<b>CME III</b>										
Mediana (Q1, Q3), DO.	*5799 (3714, 329560)	2985 (2968, 371079)	3261 (2624, 371217)	*5096 (3481, 1241430)	*40434 (24235, 957708)	7966 (6767, 2396643)	*8126 (7640, 2225599)	940 (739444763)	2397 (1410, 37153)	*6360 (5277, 646518)

\* Estado de metilación con mayor cuantificación de DO. M= metilado, U= no metilado. Datos obtenidos en ensayos por triplicado.

### 9.5.2 Estado de metilación de en hMLH1 y grado histopatológico.

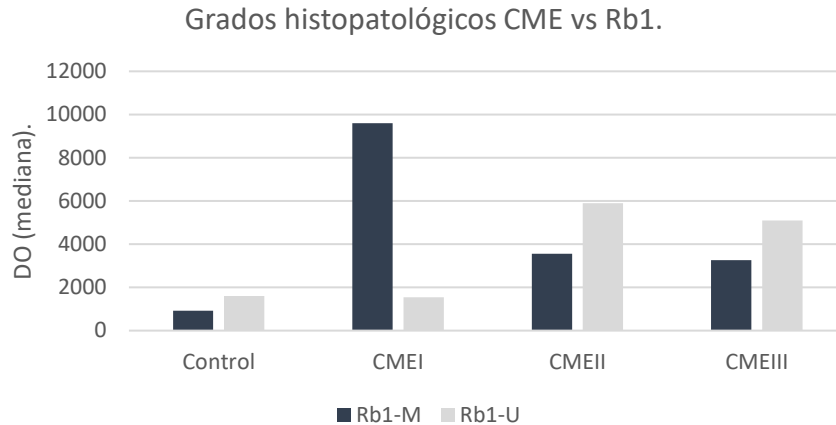
El gen hMLH1 en los CMEI y CMEII presentó una cuantificación mayor en su forma no metilada(U), con medianas de, 4407(3796, 9405) DO y 7722 (4441.2, 592796) DO respectivamente. Contrario a su cuantificación en el CMEII donde presento una mayor cuantificación en su forma metilada (M), con una mediana de 5799 (3714, 329560) DO (Gráfica 8).



**Gráfica 8.** Cuantificación de hMLH1 en los diferentes grados histopatológicos de CME.

### 9.5.3 Estado de metilación de en Rb1 y grado histopatológico.

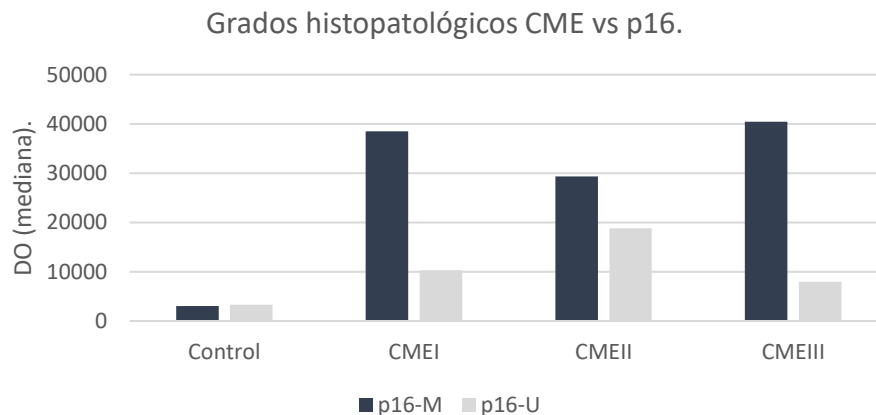
El gen Rb1 presentó una cuantificación mayor en su forma metilada(M) sólo en el CMEI, con una mediana de 9604(5782, 12621) DO. Los CMEII y CMEIII presentaron una cuantificación mayor en su forma no metilada(U) del gen, con medianas de 5904 (5037, 1734386) DO y 5096 (3481, 1241430) DO respectivamente (Gráfica 9).



**Gráfica 9.** Cuantificación de Rb1 en los diferentes grados histopatológicos de CME.

### 9.5.4 Estado de metilación de en p16 y grado histopatológico.

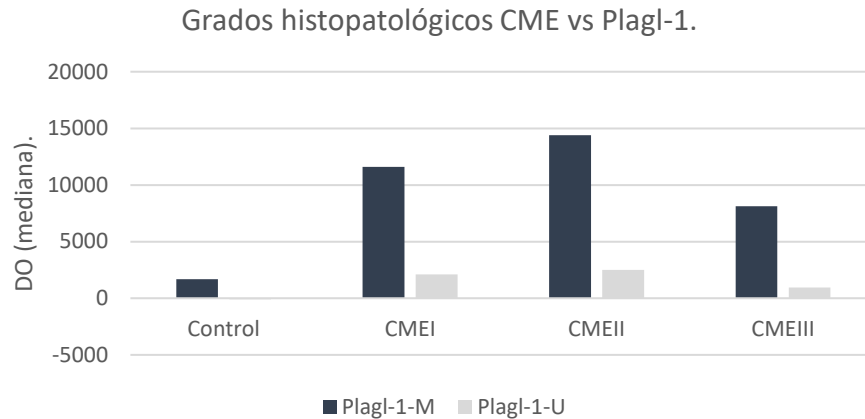
El gen p16 presentó una predilección de medición en su forma metilada(M) en los tres grados histopatológicos de CME, siendo mayor la cuantificación de DO en el CMEIII. El CMEI presentó una mediana de 38496 (20783, 76154) DO, el CMEII una mediana de, 29319 (18326, 10199386) DO y el CMEIII una mediana de 40434 (24235, 957708) DO (Gráfica 10).



**Gráfica 10.** Cuantificación de p16 en los diferentes grados histopatológicos de CME.

### 9.5.5 Estado de metilación de en Plagl-1 y grado histopatológico.

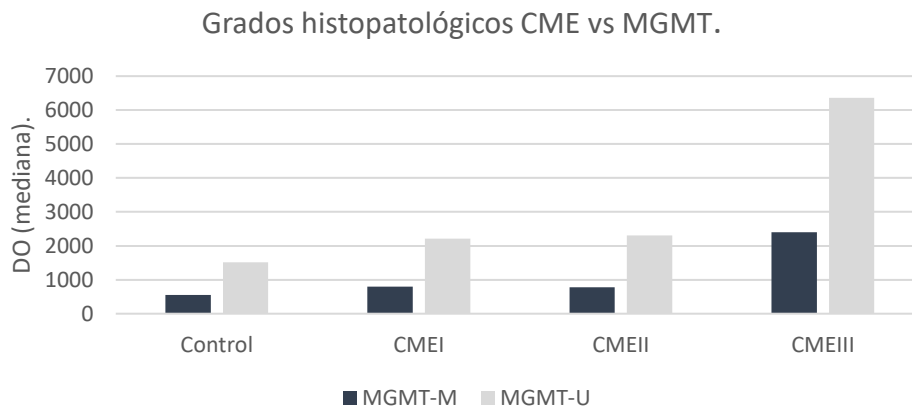
El gen Plagl-1 presentó una predilección de medición en su forma metilada(M) en los tres grados histopatológicos de CME, siendo mayor la cuantificación de DO en el CMEII. El CMEI presentó una mediana de, 11603 (6237, 19234) DO, el CMEII una mediana de, 14410 (8708, 2231192) DO y el CMEIII una mediana de, 8126 (7640, 2225599) DO (Gráfica 11).



**Gráfica 11.** Cuantificación de Plagl-1 en los diferentes grados histopatológicos de CME

### 9.5.6 Estado de metilación de en MGMT y grado histopatológico.

El gen MGMT presentó una predilección de medición en su forma no metilada(U) en los tres grados histopatológicos de CME, siendo mayor la cuantificación de DO en el CMEIII. El CMEI presentó una mediana de, 2211 (1416, 7393) DO, el CMEII una mediana de, 2309 (2246, 278269) DO y el CMEIII una mediana de, 6360 (5277, 646518) DO (Gráfica 12).



**Gráfica 12.** Cuantificación de MGMT en los diferentes grados histopatológicos de CME.

### 9.5.7 Comparación del estado de metilación entre los grados histopatológicos del CME.

Se realizó un análisis comparativo no paramétrico entre los CMEI, CMEII y CME III y los diferentes genes analizados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los 3 grupos, obteniéndose en todos los genes valores de  $p > 0.05$ . Los valores de  $p$  se enlistan en la Tabla 8.

**Tabla 8. Análisis comparativo entre los grados histopatológicos y el estado de metilación de los genes analizados.**

Gen	GRADOS HISTOPATOLÓGICOS DEL CME.		
	I vs III	I vs II	II vs III
	Sig. asintótica.	Sig. asintótica.	Sig. asintótica.
<b><i>hMLH1</i></b>			
<b>M</b>	0.733	0.827	0.827
<b>U</b>	0.875	0.827	0.827
<b><i>Rb1</i></b>			
<b>M</b>	0.875	0.877	0.513
<b>U</b>	0.099	0.050	0.513
<b><i>p16</i></b>			
<b>M</b>	0.837	0.827	0.827
<b>U</b>	0.773	0.513	0.513
<b><i>Plagl-1</i></b>			
<b>M</b>	0.837	0.513	0.827
<b>U</b>	0.561	0.275	0.513
<b><i>MGMT</i></b>			
<b>M</b>	0.733	0.827	0.827
<b>U</b>	0.393	0.513	0.275

Análisis Kruskal-Wallis, significancia estadística  $p < 0.05$ . M= metilado, U= no metilado.

### 9.5.8 Metilación en múltiples genes en CME.

Se realizó un análisis de coeficiente de correlación de Spearman para identificar si existía una asociación lineal entre cada uno de los genes estudiados. Para Rb observamos una correlación positiva alta con los siguientes genes: entre Rb1-M y p16-U  $r_s=0.983$ , Rb1-M y Plagl-1-M  $r_s=0.933$ , Rb1-M y MGMT-M  $r_s=0.900$  y entre Rb1-M y hMLH1-U  $r_s=0.833$ . Para p16 una correlación positiva alta con los siguientes genes: p16-M y Plagl-1-M  $r_s=0.933$ , p16-U y Plagl-1-M  $r_s=0.950$ , p16-M y hMLH1-U  $r_s=0.800$ , p16-U y hMLH1-U  $r_s=0.880$ , p16-M y MGMT-U  $r_s=0.867$ , así como p16-U y MGMT-U  $r_s=0.800$ . Por último, para Plagl-1 encontramos una correlación positiva alta entre Plagl-1-M y Hmlh1-U  $r_s=0.900$ , así como entre Plagl-1-M y MGMT-M  $r_s=0.833$ . Los datos se esquematizan en la Tabla 9.

**Tabla 9. Correlación de la metilación de genes en los CME.**

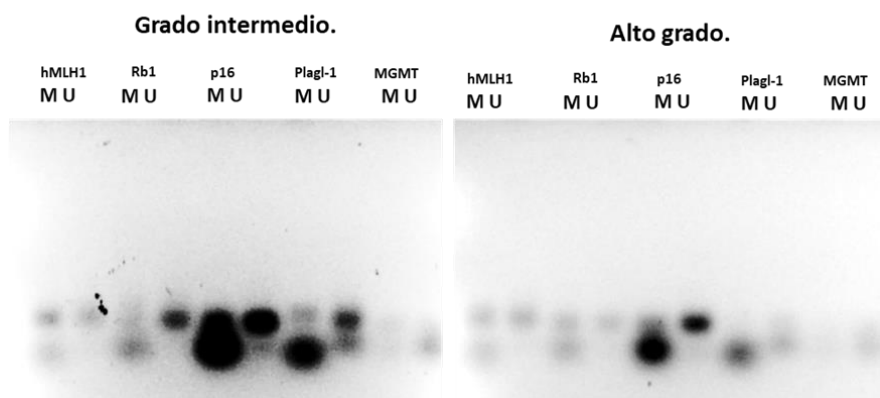
		p16		hMLH1		Plagl-1		MGMT	
		M	U	M	U	M	U	M	U
Rb1	M	.833**	.983**		.833**	.933**	.867**	.900**	.763*
	U		.700*				.700*	.700**	
p16	M			.800**	.933**	.700*	.717*	.867**	
	U			.880**	.950**	.883**	.883**	.800**	
Plagl-1	M	.933**	.950**	.900**				.783*	.833**
	U								

$r_s \geq 0.900$ 
  $r_s = 0.800$  a  $0.899$ .
   $r_s = 0.700$  a  $0.799$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 9.5.9 Estado de metilación en CAQ.

Las DO obtenidas para los genes hMLH1, Rb1, p16, Plagl-1, 1 y MGMT en los CAQ se observan en la Figura 13 y se enlistan en la Tabla 10.

### Carcinoma adenoideo quístico.



**Figura 13.** Geles de electroforesis de CAQ. Se observa una doble expresión de la forma metilada (M) y no metilada (U) en el gen p16 y Plagl-1, en el CAQII.

**Tabla 10. Cuantificación en DO de los genes en los diferentes grados de los CAQ.**

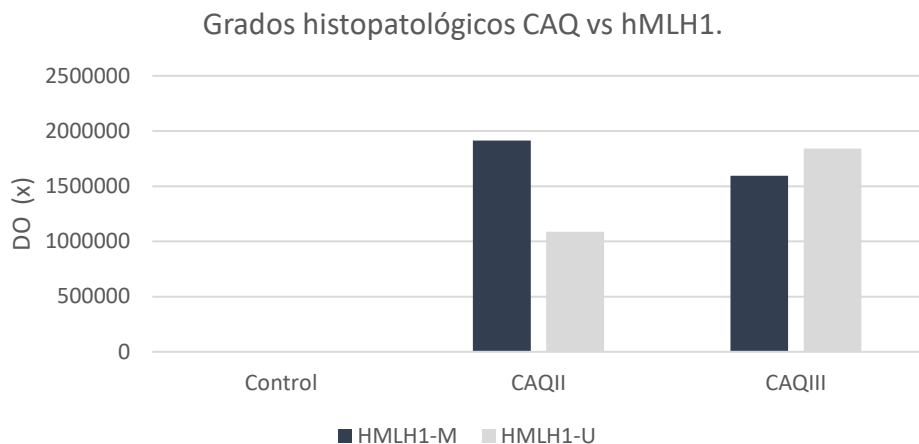
Variable, unidad	Genes analizados en los CAQ.									
	hMLH1-M	hMLH1-U	Rb1-M	Rb1-U	p16-M	p16-U	Plagl-1-M	Plagl-1-U	MGMT-M	MGMT-U
<b>CAQII</b>										
Media (SD) DO.	* 1914573.4 ±2168.3	1088148.7 ±402508	* 4934863.5 ±77293	3423887 ±2300455.6	* 27381189.2 ±15641681.7	9842807.7 ±394666.8	* 12150926.3 ±2518777.6	5608859.4 ±4528983.4	360432.3 ±138664	* 2150553.7 ±122494.7
<b>CAQIII</b>										
Media (SD) DO.	1595620.5 ±321319	* 1842613.1 ±1229547	* 1730364.7 ±749267	608572.6 ±80838.5	* 23457690.8 ±14392657.2	10709902.2 ±5496813.6	* 5086793 ±2977763	997200.8± 731782.15	363646.5 ±69512.7	* 2624894.3 ±200881.9

\* Estado de metilación con mayor cuantificación de DO. M= metilado, U= no metilado. Datos obtenidos en ensayos por triplicado.

#### 9.5.10 Estado de metilación de en hMLH1 y grado histopatológico.

El gen hMLH1 presentó una cuantificación mayor en su forma metilada (M) en el CAQII con una media de, 1914573.4 ±2168.3 DO. Mientras que el CAQIII presentó una cuantificación mayor en su forma no metilada (U) con una media de 1842613.1 ±1229547 DO (Gráfica 13).

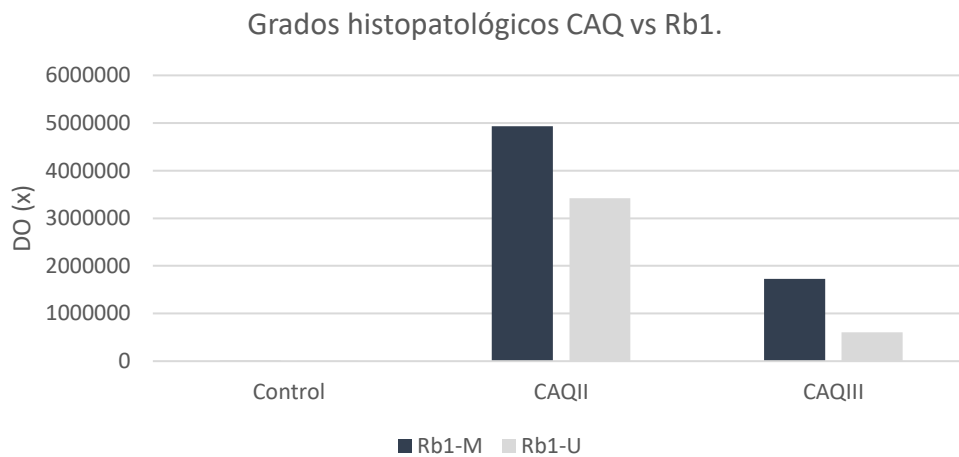




**Gráfica 13.** Cuantificación de hMLH1 en los diferentes grados histopatológicos de CAQ.

**9.5.11 Estado de metilación de en Rb1 y grado histopatológico.**

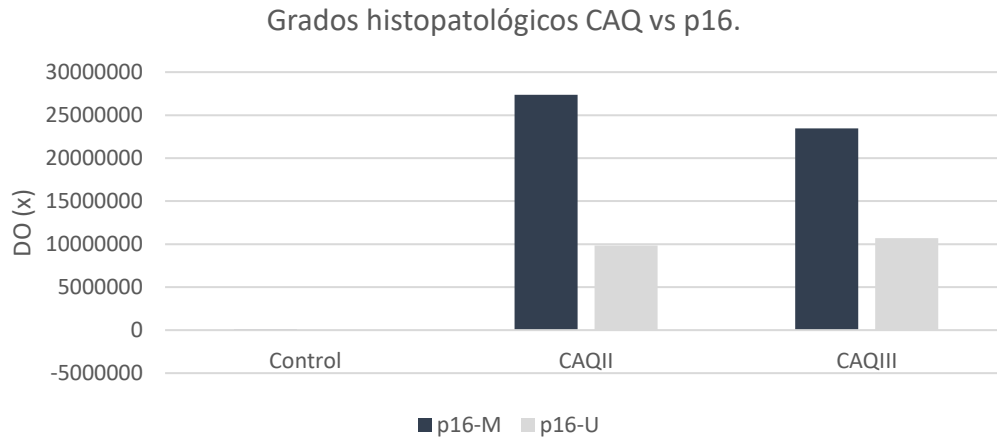
El gen Rb1 en los CAQII y CAQIII presentó una cuantificación mayor en su forma metilada(M), con una media de,  $4934863.5 \pm 77293$  DO y  $1730364.7 \pm 749267$  DO respectivamente. La expresión fue mayor en el CAQII (Gráfica 14).



**Gráfica 14.** Cuantificación de Rb1 en los diferentes grados histopatológicos de CAQ.

### 9.5.12 Estado de metilación de en p16 y grado histopatológico.

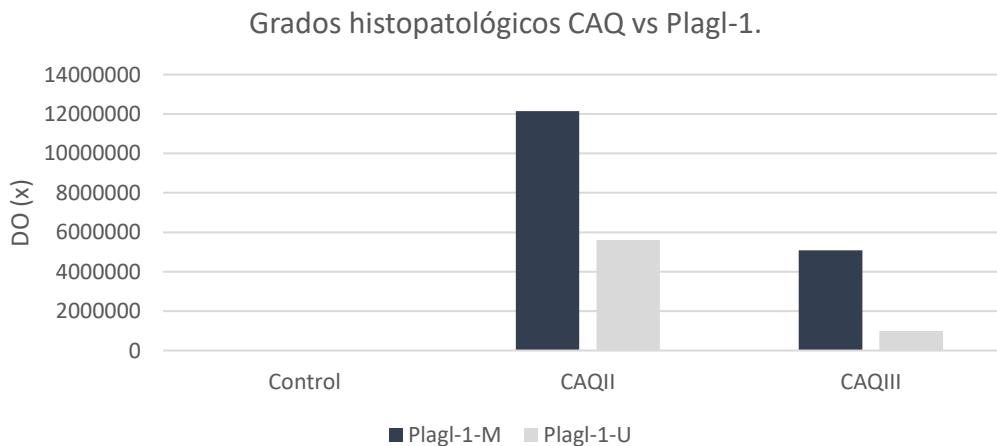
El gen p16 en los CAQII y CAQIII presentó una cuantificación mayor en su forma metilada(M), con una media de, 27382289.2  $\pm$ 15641681.7 DO y 23457690.8  $\pm$ 14392657.2 DO respectivamente. La expresión fue mayor en el CAQII (Gráfica 15).



**Gráfica 15.** Cuantificación de p16 en los diferentes grados histopatológicos de CAQ.

### 9.5.13 Estado de metilación de en Plagl-1 y grado histopatológico.

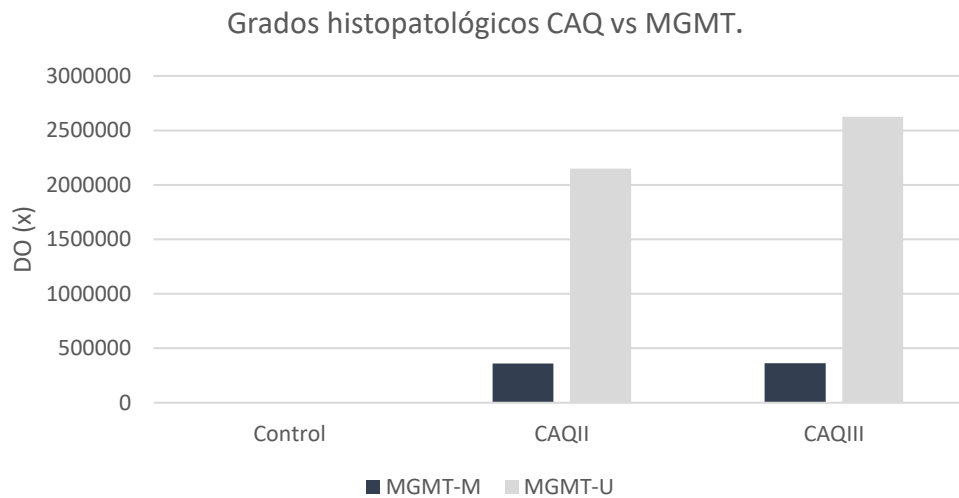
El gen Plagl-1 en los CAQII y CAQIII presentó una cuantificación mayor en su forma metilada(M), con una media de, 12150926.33  $\pm$ 2518777.6 DO 5086793  $\pm$ 2977763 DO respectivamente. La expresión nuevamente fue mayor en el CAQII (Gráfica 16).



**Gráfica 16.** Cuantificación de Plagl-1 en los diferentes grados histopatológicos de CAQ.

#### 9.5.14 Estado de metilación de en MGMT y grado histopatológico.

El gen MGMT presentó una predilección de medición en su forma no metilada(U) en los CAQII y III, siendo mayor la cuantificación en el CAQIII. El CAQII presentó una media de,  $2150553.7 \pm 122494.7$  DO, el CAQ una media de,  $2624894.3 \pm 200881.9$  DO (Gráfica 17).



**Gráfica 17.** Cuantificación de MGMT en los diferentes grados histopatológicos de CAQ.

#### 9.5.15 Comparación del estado de metilación entre los grados histopatológicos del CAQ.

Se realizó un análisis comparativo paramétrico T- Student para muestras independientes entre los CAQII y CAQIII y los diferentes genes analizados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los 2 grupos, obteniéndose en todos los genes valores de  $p > 0.05$ . Los valores de p se enlistan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Análisis comparativo entre los grados histopatológicos y el estado de metilación de los genes analizados.

Gen	T-Student. p
<b><i>hMLH1</i></b>	
<b>M</b>	0.812
<b>U</b>	0.593
<b><i>Rb1</i></b>	
<b>M</b>	0.291
<b>U</b>	0.267
<b><i>p16</i></b>	
<b>M</b>	0.866
<b>U</b>	0.918
<b><i>Plagl-1</i></b>	
<b>M</b>	0.367
<b>U</b>	0.301
<b><i>MGMT</i></b>	
<b>M</b>	0.991
<b>U</b>	0.743

Significancia estadística  $p < 0.05$ . M= metilado, U= no metilado.

#### **9.5.16 Metilación en múltiples genes en CAQ.**

Se realizó un análisis de coeficiente de correlación de Pearson para identificar si existía una asociación lineal entre cada uno de los genes estudiados. p para hMLH1 observamos una correlación positiva alta con los siguientes genes: hMLH1-M y Rb1-M  $r=0.813$ , hMLH1-M y p16-U  $r=0.817$ , hMLH1-M y Plagl-1-M  $r=0.831$ , así como para hMLH1-M y MGMT-M  $r=0.923$ , hMLH1-M y MGMT-U  $r=0.915$ . Para Rb1 una correlación positiva alta con los siguientes genes: Rb1-M y Plagl-1-M  $r=0.973$ , Rb1-U y Plagl-1-M  $r=0.886$ . Para p16, una correlación positiva alta con los siguientes

genes: p16-M y: Plagl-1-M  $r=0.862$ , p16-M y MGMT-M  $r=0.952$ , p16-U y MGMT-M  $r=0.913$ , así como para p16-U y MGMT-U  $r=0.937$ . Por último, también encontramos correlación positiva entre Plagl-1-M y MGMT-M  $r=.819$ , así como para Plagl-1-U y MGMT-U  $r=.926$ . Los datos se esquematizan en la Tabla 12.

**Tabla 12. Correlación de la metilación de genes en los CAQ.**

		Rb1		p16		Plagl-1		MGMT	
		M	U	M	U	M	U	M	U
hMLH1	M	.813**			.817*	.831*		.923**	.915*
	U				.933**				.849*
Rb1	M					.973*			
	U					.886*			
p16	M					.862*		.952**	
	U							.913**	.937**
Plagl-1	M							.819*	
	U								.926*

$r_s \geq 0.900$ 
  $r_s = 0.800$  a  $0.899$ .
   $r_s = 0.700$  a  $0.799$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 9. DISCUSIÓN.

Las neoplasias de glándulas salivales representan un desafío importante debido a que su diversidad biológica conduce a una respuesta impredecible al tratamiento. Hasta la fecha, a nivel mundial no se ha logrado mejorar las tasas de supervivencia a 5 años de estas lesiones, que generalmente se reporta entre el 60-80%,<sup>61</sup> pero que puede disminuir hasta el 37 % en tumores de alto grado.<sup>62, 63</sup> El cáncer es un proceso de múltiples pasos que involucran alteraciones o cambios en la actividad transcripcional de genes asociados a una gran cantidad de procesos celulares para el desarrollo tumoral, incluyendo la proliferación, senescencia y metástasis entre otros. Mecanismos genotóxicos y no genotóxicos contribuyen a la transformación maligna. La regulación epigenética puede considerarse como un mecanismo no genotóxico que promueve la formación tumoral y que implica alteraciones en los patrones de metilación del ADN que junto con modificaciones de histonas específicas contribuyen a un cambio en el estado transcripcional de la cromatina.<sup>64</sup>

En general, el aumento de la metilación del ADN en la región promotora de los genes provoca el silenciamiento génico y, en este sentido, puede contribuir al proceso de carcinogénesis en múltiples etapas. Además, en las células de mamíferos, tanto la metilación del ADN como la estructura de la cromatina están interconectadas, de modo que los genes se transcriban o reprimen. El estado de acetilación de la cromatina es importante para regular la actividad transcripcional, la acetilación de histonas mantiene la cromatina en un estado transcripcionalmente activo, mientras que la desacetilación de histonas mantiene el silenciamiento transcripcional.<sup>65</sup> Se han asociado modificaciones específicas de histonas en el silenciamiento génico, incluidas la metilación de la histona H3 en las lisinas 9 y 27, que hasta la fecha son las más estudiadas y que da como resultado la metilación del ADN para reprimir la activación transcripcional.<sup>61,65</sup>

Sin embargo, existen investigaciones que han reportado que la disminución en la acetilación de histonas se relaciona a un aumento en la proliferación celular y es frecuente en los adenocarcinomas pancreáticos. Además, se ha observado que los inhibidores de la enzima desacetilasa de histonas (HDAC), disminuyen el

crecimiento celular e incrementan la apoptosis en líneas celulares de este mismo adenocarcinoma.<sup>66, 67, 68</sup>

Los estudios acerca de las modificaciones en las histonas en las neoplasias malignas de glándulas salivales son escasos. Wagner y cols.,<sup>69</sup> en el 2017 investigaron el papel de la acetilación en neoplasias de glándulas salivales y su relación con el incremento en la proliferación celular. Analizaron mediante la técnica de microarreglos de tejidos, la presencia de células positivas por IHQ al anticuerpo H3Lys9 acetilado, así como Ki67, comparando el perfil de positividad entre 42 neoplasias benignas (33 adenomas pleomorfos y 9 cistadenomas papilar linfomatoso) versus 42 neoplasias malignas (22 CAQ, 15 CME y 5 carcinomas de células acinares). Encontraron que todas las neoplasias fueron positivas para este anticuerpo, sin embargo, reportaron una disminución en la proporción de células positivas en las neoplasias malignas (<50%). Reportaron que las neoplasias malignas estaban hipoacetiladas en comparación con las benignas ( $p=0.04$ ), así como una correlación inversa con Ki67 ( $p=0.002$ ). Otro estudio realizado en el 2013, por Ronghui Xia y cols.,<sup>70</sup> se enfocó a investigar la expresión de la trimetilación en H3Lys9 (H3Lys9me3) y la acetilación de H3Lys9 (H3Lys9-Ac) en CAQ mediante IHQ, así como su correlación con parámetros clínico-patológicos como la supervivencia, presencia de metástasis y patrón histológico. Encontraron una correlación positiva entre la presencia de H3Lys9me3 y la metástasis a distancia ( $p=0.001$ ), así como a un patrón histológico sólido ( $p=0.001$ ). Además, observaron que las neoplasias sólidas presentaron niveles de expresión de H3Lys9-Ac más bajos que las neoplasias con patrón tubular y cribiforme ( $p=0.003$ ). La expresión de H3Lys9me3 se identificó como un predictor independiente de supervivencia libre de enfermedad.

Aunque nuestra hipótesis apoyaba que en estas neoplasias encontraríamos un estado hipoacetilado en H3Lys9, nuestros resultados difieren de los reportados por Wagner y Xia. Encontramos una mayor cuantificación de células positivas para el anticuerpo H3Lys9-Ac en neoplasias malignas versus glándula salival normal, y aunque no obtuvimos una diferencia estadísticamente significativa, si observamos una tendencia de cuantificación celular mayor en neoplasias de grado histopatológico alto. Además, el patrón de positividad celular fue diferente. En nuestra muestra, los CME fueron positivos solo en las células intermedias y

epidermoides, mientras que para el CAQ la positividad solo se evidencio en las células abluminales. Las diferencias de los resultados pueden deberse en primer lugar a la metodología empleada, porque si bien, en todos los casos se utilizó la técnica de IHQ, difirió la cantidad de tejido y campos cuantificados. En segundo lugar, ninguno de los estudios previamente reportados menciona el uso de un control, como lo es glándula salival normal. Las comparaciones realizadas por Wagner y cols., fueron realizados entre neoplasias benignas y malignas de diferentes comportamientos biológicos, que por un lado, hacen que su muestra sea demasiado heterogénea y por ende, podría sesgar sus resultados obtenidos y, por otro lado, al no tener un valor de referencia, es difícil evaluar si realmente existe un estado hipo o hiper acetilado. En tercer lugar, nosotros evaluamos una muestra pequeña en comparación a los estudios previamente mencionados. Los estudios de IHQ solo se pudieron realizar con la muestra obtenida de la UNAM, que además de contar con solo 9 casos, no cuenta con todos los datos clínicos que permitan correlacionar las variables del estadio clínico. La única semejanza con el estudio de Xia y cols., es que encontramos positividad fuerte de H3Lys9-Ac en CAQ con patrón tubular-quistico, pero no pudimos confirmar que este patrón de positividad disminuye en el patrón sólido, debido a que no contábamos con casos con este patrón en la muestra. En ningún estudio se hace referencia a la positividad nuclear en el parénquima glandular asociado al tumor.

Por otra parte, los genomas de las células preneoplásicas y neoplásicas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación. Primero, la hipometilación de la heterocromatina, que conduce a la inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segundo, la hipermetilación de genes individuales y tercero, la hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes supresores tumorales<sup>71</sup>. La metilación del ADN contribuye a la carcinogénesis no solo por un mecanismo epigenético. La 5-metilcitosina puede inducir mutaciones debido a su considerable inestabilidad y, en consecuencia, favorece la carcinogénesis genética.<sup>72</sup>

Las investigaciones sobre metilación en promotores de genes en neoplasias de glándulas salivales son más frecuentes que los de acetilación y se enfocan generalmente en el estudio del CAQ, algo que llama la atención debido a que el



tumor más frecuente es el CME. En ensayos de MSP-PCR, Zhang y cols.,<sup>73</sup> reportaron la metilación de RASSF1A en el 35% de los CAQ y asociaron este estado con el patrón sólido ( $p=0.002$ ) y con una pobre supervivencia global ( $p=0.001$ ); mientras que Tan et al,<sup>74</sup> y Shao et al,<sup>75</sup> informaron que la hipometilación del promotor de AQP1 es común en los CAQ y que el aumento en el estado de metilación se asocia a un mejor pronóstico. Un año más tarde, los mismos autores estudiaron a suprabasina como nuevo candidato oncogénico que juega un papel importante en el mantenimiento de la proliferación celular.<sup>76</sup>

Nuestro estudio se centró en evaluar el estado de metilación en genes involucrados en la regulación del ciclo celular, así como en la reparación de ADN. En cuanto a los genes que regulan el ciclo celular, Nikolic<sup>77</sup> y cols., investigaron la metilación de p14, p16, TP53 y hTERT en el CME, usando el ensayo MSP-PCR en 35 CME. Encontraron que el 100 % de los casos estudiados presentaron hipermetilación de p14, lo que indicaría un silenciamiento en el regulador crucial de la actividad de TP53. La hipermetilación de p16 se reportó en el 60% de los MEC. La presencia de metilación de p14 se ha reportado en el 19.4% de los carcinomas adenoideos quísticos<sup>78</sup> y en el 20% de los carcinomas de células escamosas<sup>79</sup>, encontrando una asociación significativa con estadios clínicos altos, por lo que podría ser un evento molecular clave en la progresión tumoral. Guo y cols.,<sup>80</sup> reportaron que el 34% de los MEC analizados presentaron metilación en p16 y que la tasa de metilación aumentó con la progresión tumoral, pero sin significancia estadística.

Por otra parte, Kishi y cols.,<sup>81</sup> investigaron el estado de metilación de Rb1, p21, p27, PTEN, TP53 y MGMT en una muestra heterogénea de 36 neoplasias malignas, entre ellas se estudiaron 17 CAQ y 7 CME. Reportaron que el gen más frecuente metilado fue Rb1 en un 41.7% de los casos, y p16 solo en el 8.3%. Concluyeron que el silenciamiento epigenético de genes supresores tumorales podría ser un evento crucial en la carcinogénesis de las neoplasias de glándulas salivales.

Nuestros resultados del estado de metilación para p16 fueron consistentes con lo reportado en la literatura. En las muestras de CME y CAQ tanto de la UNAM como del INCAN predominó la expresión de la forma metilada del gen en sus diferentes grados histológicos, observándose una diferencia estadísticamente

significativa en la comparación de los 3 grados histopatológicos de CME ( $p < 0.05$ ). En cuanto a Rb1, se expresó en su forma metilada en los CAQII y CAQIII en ambas muestras; mientras que sólo expresó un estado metilado en los CMEI de la muestra del INCan; así como en los CMEII y CMEIII de la muestra de la UNAM, observándose una diferencia estadísticamente significativa en la comparación entre sus diferentes grados histopatológicos ( $p = 0.008$ ). La recuperación de la forma no metilada de Rb1 en estas neoplasias puede deberse a la regulación que existe por parte de p16. p16 juega un papel clave en el control del ciclo celular al detener la vía de la señal de ciclina D, lo cual evita la hiperfosforilación de las proteínas Rb necesarias para el inicio de la replicación. La metilación de p16, por tanto, podría conducir a la pérdida de control del ciclo celular de la fase G1 a S. Además, la metilación presente directamente en Rb1 silenciaría su expresión, provocando que células con daño en el ADN progresen en el ciclo celular, aumentando de esta forma la proliferación de células neoplásicas.

En cuanto a Plagl-1, son pocos los estudios acerca de su estado de metilación en neoplasias de glándulas salivales. Matsuyana y cols.,<sup>82</sup> estudiaron la expresión de Plagl-1 en 45 adenomas pleomorfos mediante RT-PCR, encontrándolo solo en 8 casos. También realizaron IHQ, encontrando positividad para el anticuerpo Plagl-1 en los 45 casos. Debido a ello los autores sugirieron que la sobreexpresión de este gen es esencial en la tumorigénesis de los adenomas pleomorfos. Contrario a ellos, Kowalczyk y cols.<sup>83</sup> mencionaron, que se ha observado pérdida o regulación a la baja de la expresión de Plagl-1 en diversas neoplasias humanas. Ellos, compararon su expresión en el cáncer colorrectal vs mucosa colónica sana. Encontraron que el nivel de ARNm de Plagl-1 en el tejido tumoral fue en promedio 2 veces menor que en las muestras de la mucosa colónica sana. Además, la disminución de los niveles de proteína Plagl-1 en las muestras tumorales se correlacionó con la afectación de los ganglios linfáticos, la presencia de metástasis y un estadio de enfermedad TNM más alto.

Aunque no obtuvimos diferencias significativas para la expresión de este gen, los resultados obtenidos para Plagl-1 en nuestro estudio son consistentes a lo reportado por Kowalczyk y cols. Tanto en el CME y CAQ en sus diferentes grados histopatológicos predominó el estado metilado del gen, lo que coincide con los

datos de que su expresión se pierde en las neoplasias malignas. Plagl-1 se ha implicado tanto en la regulación del ciclo celular como en la apoptosis, debido a las interacciones génicas que tiene con TP53, aunque hasta la fecha se desconoce su mecanismo de acción. También observamos que el comportamiento de la forma metilada del gen fue muy similar a la expresión vista en p16.

Por otra parte, en cuanto a los genes involucrados en la reparación de ADN, analizamos la metilación de hMLH1 y MGMT. hMLH1 se expresa especialmente en células humanas que experimentan una rápida renovación, como en las células de la mucosa oral. Kyung-Hwa Lee y cols.,<sup>84</sup> mencionaron que la expresión hMSH2 y hMLH1 disminuyen en el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis, dando como resultado un aumento en la inestabilidad de microsatélites. Estos microsatélites conducen rápidamente al desplazamiento en el marco de lectura en secuencias repetidas de genes supresores tumorales. Se ha informado de una expresión reducida de hMSH2 y hMLH1 en carcinomas endometriales, ováricos y de vejiga urinaria. Una expresión reducida de las proteínas hMSH2 y hMLH1 es una característica de los tumores de ovario y vesicales de alto grado. Castrilli y cols.,<sup>85</sup> realizaron un estudio inmunohistoquímico para detectar la expresión de hMSH2 y hMLH1 en tumores de glándulas salivales y en glándulas no neoplásicas adyacentes. Encontraron que todas las variantes histológicas de las neoplasias malignas evaluadas (CME, CAQ, carcinoma de células escamosas; NOS, adenocarcinoma de células acinares, de células basales, polimorfo de bajo grado; tumores mixtos malignos) expresaron estas proteínas. Reportaron que las neoplasias benignas expresaron niveles más bajos de hMLH1 en comparación con las malignas., por lo que ellos concluyeron que un error de replicación puede constituir un evento temprano en el desarrollo de las neoplasias de glándulas salivales.

Los CME de la UNAM analizados, mostraron metilación para hMLH1 en los grados histopatológicos intermedio y alto, mientras que los CME de la muestra del INCan presentaron metilación solo en las neoplasias de alto grado. Los CAQII tanto de la UNAM como del INCan mostraron metilación. Solo los CAQIII del INCan presentaron una mayor expresión de la forma no metilada del gen. Estos datos podrían sugerir que el silenciamiento de hMLH1 provocaría una disminución en la reparación de errores de apareamiento de bases en los grados histopatológicos

altos, que podría relacionarse a inestabilidad de microsatélites como un evento tardío en los CME. A diferencia de los CAQ, en el cual el evento se daría en etapas más tempranas.

Además, se ha propuesto disminución en la expresión de genes de reparación del ADN como un mecanismo importante de carcinogénesis en la transición de adenoma-carcinoma de colón. Kristine Oh y cols.,<sup>86</sup> evaluaron la expresión de hMLH1, hMSH2, MGMT en pólipos colónicos mixtos con carcinoma (transición adenoma-carcinoma). Estos mostraron una pérdida de la expresión de MGMT hasta en el 37% de los casos, mientras que hMLH1 en el 34 %de los casos. La alteración en MGMT aumenta la tasa de mutación génica y por lo tanto el riesgo de cáncer. En cuanto a investigaciones en glándulas salivales, Scesnaite y cols.,<sup>87</sup> evaluaron el valor pronóstico de la inactivación de MGMT en 286 pacientes con carcinomas de glándulas salivales, entre ellos 46 CAQ y 42 CME, utilizando pirosecuenciación. La hipermetilación de MGMT se asoció significativamente ( $p = .021$ ) con la pérdida de proteínas. La pérdida de MGMT se encontró en el 39,2% de los carcinomas de glándulas salivales y fue predominante en los tumores agresivos. Williams y cols.<sup>88</sup> Investigaron el estado de metilación por MSP-PCR de RASSF1, RARbeta2, DAPK y MGMT para determinar su papel en la tumorigénesis de las glándulas salivales. No detectaron metilación en los tejidos normales. La metilación de MGMT, DAPK y RASSF1 se observó en el 30.8% de los CAQ y el 33.3% de CME. Ellos concluyeron que los carcinomas de grado alto estaban metilados significativamente en comparación con los fenotipos de grado bajo.

Nuestros resultados difieren a lo reportado previamente. En los CMEI, CMEII y CMEIII de la muestra del INCan encontramos mayor expresión de la forma no metilada. En la muestra de la UNAM, solo los CMEIII expresaron la forma metilada del gen. Si bien nuestros resultados podrían sugerir que MGMT se encuentra en un estado funcional, no podríamos descartar la posibilidad de que esa forma no metilada, presente mutaciones génicas, como mutaciones sin sentido que produzcan una forma no funcional. Además, analizando la marca de metilación tanto en los CAQ, como en los CME se observó una tendencia de aumento en el estado de metilación del gen conforme aumentó el grado histopatológico.

Es interesante observar una correlación positiva fuerte entre la forma metilada y no metilada de los genes estudiados, congruente a un fenotipo metilador de islas CpG, es decir, la metilación simultánea de diversas islas CpG que se propaga en un grupo de genes como p16 y hMLH1, que casi nunca se encuentran metilados en tejidos normales. Es un fenotipo de inestabilidad molecular que es responsable de la mayoría de los casos de inactivación de genes supresores y que puede ser responsable de muchos casos de inestabilidad de microsatélites en formas esporádicas de carcinoma de colon.<sup>72</sup> Esto es consistente con el hecho de que p16 y MGMT metilados al mismo tiempo se asocian a neoplasias de peor pronóstico<sup>89</sup>, o las interacciones que existen entre Plagl-1 y TP53, que podrían asociarse a p16 por medio de MDM2 o a Rb1. El gen que más interacciona significativamente en los CME es el Rb en su forma metilada, mientras que en el CAQ el gen hMLH1 metilado.<sup>90</sup>

## **10. CONCLUSIONES.**

Observamos un estado hipermetilado en los genes p16, Rb1, Plagl-1 y hMLH1 en los CME y CAQ. Encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre la metilación de hMLH1, p16 y Rb1 en los diferentes grados histopatológicos del CME de la muestra UNAM.

Plagl-1 se encontró metilado en todos los grados histológicos tanto de CME y de CAQ, por lo que podría ser propuesto como un gen importante en la carcinogénesis de las neoplasias de glándulas salivales

El patrón de metilación de hMLH1, abre la posibilidad de estudios futuros enfocados a la inestabilidad de microsatélites en tumores de glándulas salivales.

Se observó que en la mayoría de los CME y CAQ, MGMT se encontraba no metilado. Las diferencias encontradas en la metilación de MGMT con estudios previos pudo deberse a que las poblaciones estudiadas fueron distintas, o a la diferente ubicación de sitios CpG para la hibridación.

Identificamos un estado hiperacetilado de H3lys9 en CME y CAQ. Las diferencias encontradas en la acetilación de H3lys9 respecto a estudios previos pueden deberse a que la muestra estudiada fue pequeña y a la diferencia entre la cuantificación de positividad celular.

Los patrones de metilación de ADN podrían ayudar a la creación de una clasificación molecular de las neoplasias de glándulas salivales.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Speight PM, Barret AW: Salivary Gland Tumors, Oral Dis. 2002; 8 (5): 229-40.
2. Eveson JW, Cawson Ra. Tumours of the minor (oropharyngeal) salivary glands: a demographic study of 336 cases. J Oral Pathol. 1985; 14: 500.
3. El-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T, Slootweg P. IARC WHO Classification of Head and Neck Tumours. 2017; 9.
4. Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR, et al. Tumours of the salivary glands. In: Pathology & Genetics Head and Neck Tumours. Lyon, France: IARC Press; 2005:209-281.
5. Mullin MH, Brierley DJ, Speight PM. Second opinion reporting in head and neck pathology: the pattern of referrals and impact on final diagnosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2015;119:656-660.
6. Chenevert J, Barnes LE, Chiosea SI. Mucoepidermoid carcinoma: a five-decade journey. Virchows Arch. 2011;458:133-140.
7. Kang H, Tan M, Bishop JA, et al. Whole-exome sequencing of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. Am Assoc Cancer Res. 2017;23:283-288. clincanres-0720.
8. Tonon G, Modi S, Wu L, et al. t (11; 19)(q21; p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. Nat Genet. 2003;33:208-213.
9. Ilić Dimitrijević I, Loening T, Falk M, et al. Incidence and clinical relevance of t (11; 19) translocation in salivary gland mucoepidermoid carcinoma. Genetika. 2014;46:601-610.
10. Miyabe S, Okabe M, Nagatsuka H, et al. Prognostic significance of p27 Kip1, Ki-67, and CRTC1-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma: a molecular and clinicopathologic study of 101 cases. J Oral Maxillofac Surg. 2009;67:1432-1441.
11. van Weert S, Reinhard R, Bloemena E, Buter J, Witte BI, Vergeer MR, Leemans CR. Differences in patterns of survival in metastatic adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Head Neck. 2017 Mar;39(3):456-463. doi: 10.1002/hed.24613. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27775851.

12. Szanto PA, Luna MA, Tortoledo ME, White RA. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer*. 1984 Sep 15;54(6):1062-9. doi: 10.1002/1097-0142(19840915)54:6<1062::aid-cnrcr2820540622>3.0.co;2-e. PMID: 6088017.
13. Ho AS, Kannan K, Roy DM, Morris LG, Ganly I, Katabi N, Ramaswami D, Walsh LA, et.al. The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. *Nat Genet*. 2013 Jul;45(7):791-8. doi: 10.1038/ng.2643. Epub 2013 May 19. PMID: 23685749; PMCID: PMC3708595.
14. Politi M, Toro C, Zerman N. Myoepithelioma of the parotid gland: Case report and review of literature. *Oral Oncology Elsevier*. 2005; 41: 104-108.
15. Teocharis S, Gribilas G, Giangis C. Angiogenesis in salivary gland tumours: from clinical significance to treatment. *Expert Opin Targets*. 2015; 19(6): 807-19.
16. Riva A, Serra GP, Proto E, Faa G, Puxeddu R, Riva FT. The myoepithelial and basal cells of ducts of human major salivary glands: a SEM study. *Arch Histol Cytol*. 1992; 55: 115-124.
17. Dardick I, Bireck C, Lingen M, Rowe PE. Differentiation and the cytomorphology of salivary gland tumors with specific reference to oncocytic metaplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 88:691-701.
18. Thackray AC, Lucas RB. Tumors of the major salivary glands. In: *Atlas of Tumor Pathology, Series 2, Fascicle 10*. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology. 1974:11-14.
19. Eversole LR. Histogenetic classification of salivary tumors. *Arch Pathol*. 1971; 92: 433-443.
20. Batsakis JG. Salivary gland neoplasia: an outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 49: 229-232.
21. Dardick I, Burford-Mason AP. Current status of the histogenetic and morphogenetic concepts of salivary gland tumorigenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993 4: 639-677.



22. Dardick I, van Nostrand AW, Jeans MT, Rippstein P, Edwards V. Pleomorphic adenoma. II. Ultrastructural organization of a stromal regions. *Hum Pathol.* 1983; 14: 798-809.
23. Shear M. The structure and function of myoepithelial cells in salivary glands. *Arch Oral Biol.* 1966; 11: 769-780.
24. Palmer RM. Epithelial-myoepithelial carcinoma: an immunocytochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 59: 511-515.
25. Nico, Benagiano, Mangieri, Maruotti, Vacca. Evaluation of microvascular density tumors: pro and contra. *Histology and Histopathology.* 2008; 23: 601-607.
26. Cheuk W. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology.* 2007; 51 (1): 1-20.
27. Do Prado RF. Calcifications in a clear cell mucoepidermoid carcinoma: a case report with histological and immunohistochemical findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 105 (5): e40-44.
28. Barnes L. *Pathology of the head and neck: volume 1.* 3<sup>ed</sup>. Pennsylvania: Informa health care; 2008: pág 475.
29. Triantafillidou K. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. *Oral Dis.* 2006; 12 (4): 364-370.
30. Haddad R. Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study. *Oral Oncol.* 2003; 39(7): 724-727.
31. latek A. Patterns of recurrence and survival of head and neck adenoid cystic carcinoma after definitive resection. *Laryngoscope.* 2010; 109 (1): 109-116.
32. Sociedad Argentina de Citología: <http://sociedaddecitologia.org.ar/sac/casos/casos-julio-de-2013-carcinoma-adenoide-quistico-de-paladar/>. 14 de enero 2021.
33. Barret W. Perineural invasion in adenoid cyst carcinoma of the salivaryglands: a valid prognostic indicator? *Oral Oncol.* 2009; 45 (11): 936-940.
34. Friedrich RE. Adenoid cystic carcinoma of salivary and lacrimal gland origin: localization, classification, treatment results and long-term follow-up control in 84 patients. *Anticancer Res.* 2003; 23(2A): 931-940.

35. Araújo Vc. The cribiform features of adenoid cyst carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma: cytokeratin and integrin expression. *Ann Diagn Pathol.* 2001; 5(6) : 330-334.
36. Bird, A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007, 447, 396–398.
37. Gupta, P.B.; Fillmore, C.M.; Jiang, G.; Shapira, S.D.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Lander, E.S. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011, 146, 633–644.
38. Greaves, M.; Maley, C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012, 481, 306–313.
39. Heyn, H.; Esteller, M. DNA methylation profiling in the clinic: Applications and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13, 679–692
40. Issa, M.E.; Takhsha, F.S.; Chirumamilla, C.S.; Perez-Novó, C.; Vanden Berghe, W.; Cuendet, M. Epigenetic strategies to reverse drug resistance in heterogeneous multiple myeloma. *Clin. Epigenet.* 2017, 9, 17.
41. Rountree, M.R.; Bachman, K.E.; Herman, J.G.; Baylin, S.B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001, 20, 3156–3165.
42. Feinberg, A.P.; Tycko, B. The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* 2004, 4, 143–153.
43. Papillon-Cavanagh, S.; Lu, C.; Gayden, T.; Mikael, L.G.; Bechet, D.; Karamboulas, C.; Ailles, L.; Karamchandani, J.; Marchione, D.M.; Garcia, B.A.; et al. Impaired H3K36 methylation defines a subset of head and neck squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* 2017, 49, 180–185.
44. Jones, P.A.; Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2002, 3, 415–428.
45. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002, 16, 6–21.
46. Langevin, S.M.; Eliot, M.; Butler, R.A.; Cheong, A.; Zhang, X.; McClean, M.D.; Koestler, D.C.; Kelsey, K.T. CpG island methylation profile in non-invasive oral rinse samples is predictive of oral and pharyngeal carcinoma. *Clin. Epigenet.* 2015, 7, 125.
47. Li, E.; Bestor, T.H.; Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992, 69, 915–926.

48. Chedin, F.; Lieber, M.R.; Hsieh, C.L. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 16916–16921
49. Kulis, M.; Esteller, M. DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.* 2010, 70, 27–56.
50. Dawson, M.A.; Kouzarides, T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell* 2012, 150, 12–27.
51. Rodriguez-Paredes, M.; Esteller, M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* 2011, 17, 330–339.
52. Baylin, S.B.; Jones, P.A. A decade of exploring the cancer epigenome—Biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* 2011, 11, 726–734.
53. Klose, R.J.; Bird, A.P. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 2006, 31, 89–97.
54. Bannister, A.J.; Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011, 21, 381–395.
55. Li, Y.; Seto, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016, 6, a026831.
56. Ellis, L.; Atadja, P.W.; Johnstone, R.W. Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications. *Mol. Cancer Ther.* 2009, 8, 1409–1420.
57. Shaw, R. The epigenetics of oral cancer. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2006, 35, 101–108.
58. Shaw, R.J.; Hall, G.L.; Woolgar, J.A.; Lowe, D.; Rogers, S.N.; Field, J.K.; Liloglou, T.; Risk, J.M. Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma. *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2007, 45, 617–622.
59. 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.*
60. 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, 65–70.

61. Chen, Y.W.; Kao, S.Y.; Wang, H.J.; Yang, M.H. Histone modification patterns correlate with patient outcome in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2013, 119, 4259–4267.
62. Terhaard CH, Lubsen H, Van der Tweell et al. Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group. *Head & neck* 2004; 26: 681-92; discussion 692-3.
63. Fonseca FP, Carvalho M de V, De Almeida OP et al. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 2012; 114: 230-9.
64. Bell RB, Dierks EJ, Homer L et al. Management and outcome of patients with malignant salivary gland tumors. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2005; 63: 917-28.
65. Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr. Opin. Genet.* 2005; 490-495.
66. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008 Jul 18;266(1):6-11. doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.026. Epub 2008 Mar 26. PMID: 18372104.
67. Giaginis C, Damaskos C, Koutsounas I et al. Histone deacetylase (HDAC)-1, -2, -4 and -6 expression in human pancreatic adenocarcinoma: associations with clinicopathological parameters, tumor proliferative capacity and patients' survival. *BMC gastroenterology* 2015; 15: 148.
68. Chien W, Lee DH, Zheng Y et al. Growth inhibition of pancreatic cancer cells by histone deacetylase inhibitor belinostat through suppression of multiple pathways including HIF, NFkB, and mTOR signaling in vitro and in vivo. *Molecular carcinogenesis* 2014; 53: 722-35.
69. Wagner VP, Martins MD, Guimaraes DM, Vasconcelos AC, Meurer L, Vargas PA, Fonseca FP, Squarize CH, Castilho RM. Reduced chromatin acetylation of malignant salivary gland tumors correlates with enhanced proliferation. *J*

- Oral Pathol Med. 2017 Oct;46(9):792-797. doi: 10.1111/jop.12557. Epub 2017 Apr 9. PMID: 28161900.
70. Ronghui Xia, Rongrui Zhou, Zhen Tian, Chunye Zhang, Lizhen Wang, Yuhua Hu, et. al., High Expression of H3K9me3 Is a Strong Predictor of Poor Survival in Patients With Salivary Adenoid Cystic Carcinoma. Arch Pathol Lab Med. 2013; 137, 1761-1769.
71. Mesa-Cornejo Viviana, Barros-Nuñez Patricio, Medina-Lozano Claudina. Metilación del AND: marcador diagnóstico y pronóstico de cancer. Gac Med Méx. 2006; 142 (1): 81-82.
72. Lichtenstein A.V, Kisseljova NP. DNA Methylation and Carcinogenesis. Biochemistry. 2001; 3: 293-317.
73. Zhang CY, Zhao YX, Xia RH, Han J, Wang BS, et al. (2014) RASSF1A Promoter Hypermethylation Is a Strong Biomarker of Poor Survival in Patients with Salivary Adenoid Cystic Carcinoma in a Chinese Population. PLOS ONE 9(10): e110159
74. Tan M, Shao C, Bishop JA, Feng Z, Trock BJ, Westra WH, Ha PK. Aquaporin-1 promoter hypermethylation is associated with improved prognosis in salivary gland adenoid cystic carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg. 2014 May;150(5):801-7. doi: 10.1177/0194599814521569.
75. Shao C, Sun W, Tan M, Glazer CA, Bhan S, Zhong X, Fakhry C, Sharma R, Westra WH, Hoque MO, Moskaluk CA, Sidransky D, Califano JA, Ha PK. Integrated, genome-wide screening for hypomethylated oncogenes in salivary gland adenoid cystic carcinoma. Clin Cancer Res. 2011 Jul 1;17(13):4320-30.
76. Shao C, Tan M, Bishop JA, Liu J, Bai W, Gaykalova DA, Ogawa T, Vikani AR, Agrawal Y, Li RJ, Kim MS, Westra WH, Sidransky D, Califano JA, Ha PK. Suprabasin is hypomethylated and associated with metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma. PLoS One. 2012;7(11):e48582. doi: 10.1371/journal.pone.0048582.
77. Nikolic N, Carkic J, Ilic Dimitrijevic I, Eljabo N, Radunovic M, Anicic B, Tanic N, Falk M, Milasin J. P14 methylation: an epigenetic signature of salivary gland

- mucoepidermoid carcinoma in the Serbian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Jan;125(1):52-58.
78. Nishimine M, Nakamura M, Kishi M, et al. Alterations of p14 ARF and p16 INK4 a genes in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep*. 2003;10:555-560.
79. Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, et al. Promotor hypermethylation of p14 ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2005;41:614-622.
80. Guo XL, Sun SZ, Wang WX, Wei FC, Yu HB, Ma BL. Alterations of p16 INK4 a tumour suppressor gene in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 36:350-353.
81. Kishi M, Nakamura M, Nishimine M, Ikuta M, Kirita T, Konishi N. Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol*. 2005 Feb;41(2):161-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2004.08.004. PMID: 15695118.
82. Matsuyama A, Hisaoka M, Nagao Y, Hashimoto H. Aberrant PLAG1 expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland: a molecular genetic and immunohistochemical study. *Virchows Arch*. 2011 May;458(5):583-92. doi: 10.1007/s00428-011-1063-4. Epub 2011 Mar 11. PMID: 21394649.
83. Kowalczyk AE, Krazinski BE, Godlewski J, Kiewisz J, Kwiatkowski P, Sliwiska-Jewsiewicka A, Kiezun J, Wierzbicki PM, Bodek G, Sulik M, Kmiec Z. Altered expression of the PLAGL1 (ZAC1/LOT1) gene in colorectal cancer: Correlations to the clinicopathological parameters. *Int J Oncol*. 2015 Sep;47(3):951-62. doi: 10.3892/ijo.2015.3067. Epub 2015 Jun 29. PMID: 26134521.
84. Lee KH, Lee JS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Lee JH. Promoter methylation status of hMLH1, hMSH2, and MGMT genes in colorectal cancer associated with adenoma-carcinoma sequence. *Langenbecks Arch Surg*. 2011 Oct;396(7):1017-26. doi: 10.1007/s00423-011-0812-9. Epub 2011 Jun 25. PMID: 21706233.
85. Graziella Castrilli, Alfredo Fabiano, Giampiero La Torre, Luca Marigo, Chiara Piantelli, Giorgio Perfetti, et.al. Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the

- human DNA mismatch repair system in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 31: 234–8.
86. Oh K, Redston M, Odze RD. Support for hMLH1 and MGMT silencing as a mechanism of tumorigenesis in the hyperplastic-adenoma-carcinoma (serrated) carcinogenic pathway in the colon. *Hum Pathol*. 2005 Jan;36(1):101-11. doi: 10.1016/j.humpath.2004.10.008. PMID: 15712188.
87. Scesnaite A, Jarmalaite S, Mueller M, Agaimy A, Zenk J, Hartmann A, Iro H, Peters B, Schwarz S, Schneider-Stock R. Prognostic value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase loss in salivary gland carcinomas. *Head Neck*. 2014 Sep;36(9):1258-67. doi: 10.1002/hed.23445. Epub 2013 Nov 27. PMID: 25201059.
88. Michelle D. Williams, Nitin Chakravarti, Merrill S. Kies, Shin-Ichiro Maruya, Jeffrey N. Myers, Joie C. Haviland, Randal S. Weber, Reuben Lotan and Adel K. El-Naggar. Implications of Methylation Patterns of Cancer Genes in Salivary Gland Tumors. *Clin Cancer Res* December 15 2006 (12) (24) 7353-7358; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1272.
89. Krtolica K, Krajnovic M, Usaj-Knezevic S, Babic D, Jovanovic D, Dimitrijevic B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol*. 2007 Feb 28;13(8):1187-94. doi: 10.3748/wjg.v13.i8.1187. PMID: 17451198; PMCID: PMC4146992.
90. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, Maitland A, Mostafavi S, Montojo J, Shao Q, Wright G, Bader GD, Morris Q/ University of Toronto. *GeneMania*. <https://genemania.org/>.