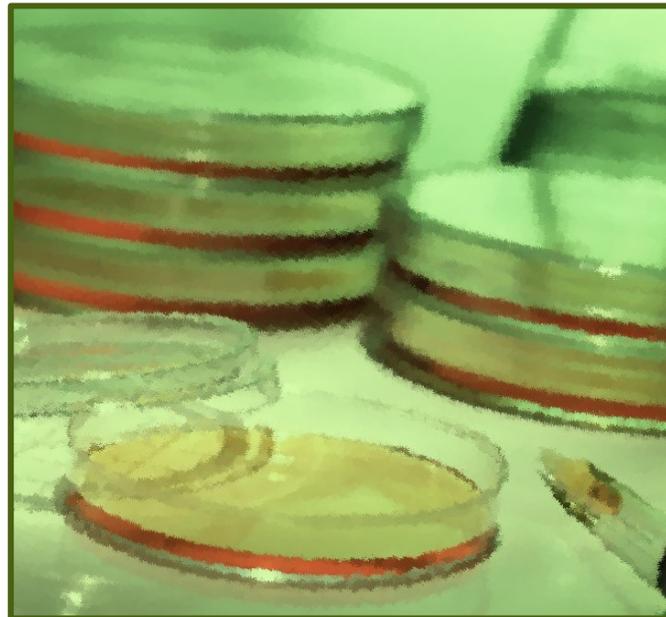


# MARCADORES SALIVALES EN LESIONES POTENCIALMENTE MALIGNAS DE LA CAVIDAD ORAL Y EN CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS



TRABAJO FINAL MÁSTER INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

CURSO 2013-2014

TRABAJO FIN MÁSTER. MARÍA DEL CARMEN BERGA

1

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN _____	3
_ Lesiones potencialmente malignas y carcinoma oral de células escamosas _____ en cavidad oral. Prevalencia, Clínica y Diagnóstico	3
_ La saliva y su aplicación diagnóstica en Cáncer Oral _____	14
.- Saliva: composición y función _____	14
.- Saliva: estudio específico de biomarcadores _____	18
.- Revisión bibliográfica _____	21
_ Justificación e Hipótesis _____	28-29
DISEÑO PROYECTO _____	29
_ Descripción del estudio _____	29
.- Objetivos _____	30
.- Metodología _____	30
.Tipo de diseño _____	30
. Ámbito de estudio _____	30
. Tamaño muestral y Criterios de selección _____	30
. Procedimiento, recogida y tratamiento de las muestras _____	32
. Monitorización del seguimiento _____	39
. Variables del estudio _____	40
. Determinación y Cuantificación de Biomarcadores Salivales _____	41
. Análisis de Datos Estadísticos _____	44
. Limitaciones del estudio _____	44
. Consideraciones éticas _____	44
_ Plan de Trabajo _____	45
_ Financiación _____	47
_ Transferencia de resultados a la Práctica Clínica _____	48

## BIBLIOGRAFÍA

# INTRODUCCIÓN

## Lesiones potencialmente malignas y Carcinoma Oral de Células Escamosas en cavidad oral. Prevalencia, Clínica y Diagnóstico.

El **Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE)** es la neoplasia maligna de origen epitelial más frecuente en la cavidad oral. Los tumores malignos de la cavidad oral suponen un 4% del total de tumores malignos del organismo, del cual el 90% corresponden a COCE, siendo éste el más común de los cánceres de cabeza y cuello.

Su incidencia es variable dependiendo del área geográfica estudiada, siendo mayor en los países asiáticos (hasta un 30%) que en EEUU o Europa, donde supone un 2-4%. (Bagán y cols, 2013)

Sólo en España se diagnostican cada año 5100 nuevos casos de COCE. Podríamos apuntar que la tasa oscila entre 5 - 12 nuevos casos por cada 100000 habitantes y año para los hombres y entre 0.6 - 2.2 nuevos casos por cada 100000 habitantes y año para las mujeres.

Es una neoplasia más frecuente en varones, aunque en los últimos años su incidencia en mujeres está aumentando considerablemente.

Las tasas de supervivencia global y libre de enfermedad son de 56 y 58% respectivamente, no evidenciándose un incremento significativo en la supervivencia a los 5 años en las últimas décadas a pesar de los grandes avances y perfeccionamiento en las diferentes modalidades terapéuticas, por lo que en la actualidad, el diagnóstico precoz en estadios iniciales sigue siendo el objetivo primordial en el tratamiento de estos pacientes.

En concreto más del 50% de los casos de COCE son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad, cuya supervivencia a los 5 años es tan solo del 30-50% de los casos; de aquí deriva la necesidad de seguir trabajando en el diagnóstico temprano de la enfermedad y de buscar un adecuado método de screening para el Carcinoma Oral de Células Escamosas.

Cabe describir también el conjunto de **lesiones potencialmente malignas de la mucosa oral** (tabla 1), ya que van a ser objeto de nuestro estudio.

<i>Lesiones potencialmente malignas</i>
• Leucoplasia
• Eritroplasia
• Liquen Plano Oral
• Fibrosis Oral Submucosa
• Queilitis Actínica
• Algunos cánceres con carácter sindrómico y hereditario
• Inmunodeficiencias

**Tabla 1.**

La LEUCOPLASIA ORAL (L.O.) es la lesión potencialmente maligna más frecuente de la mucosa oral y su definición clínica la describe como una lesión predominantemente blanca de la mucosa oral que no se desprende al raspado y que no puede caracterizarse o catalogarse como ninguna otra lesión definida y en la que existe un riesgo constatado de desarrollar cáncer oral. Desde el punto de vista clínico hay dos tipos de leucoplasias, las Homogéneas y las No homogéneas (entre las que destaca un subtipo con un comportamiento especialmente agresivo que son las Leucoplasias Verrugosas Proliferativas). Para su clasificación se atiende al tamaño y al resultado histológico, señalando la presencia o no de displasia epitelial (tabla 2). (Bagán y cols, 2013)

<b>Características de la Displasia Epitelial</b>
<b>Arquitectura</b>
Estratificación irregular del epitelio
Pérdida de polaridad de las células basales
Pérdida de la forma de las crestas epiteliales
Incremento del número de figuras mitóticas
Mitosis superficial anormal
Alteración en la maduración de los queratinocitos (di queratosis)
Perlas de queratina con crestas epiteliales
<b>Citología</b>
Variación anormal del tamaño del núcleo (anisonucleosis)
Variación anormal de la forma del núcleo (polimorfismo)
Variación anormal del tamaño celular (anisocitosis)
Variación anormal de la forma celular (pleomorfismo celular)
Incremento del ratio núcleo-citoplasma

Incremento del tamaño del núcleo
Figuras mitóticas atípicas
Incremento del número y tamaño del núcleo
Hipercromatosis

*Tabla 2*

En la situación histológica de displasia epitelial, existen tres posibles grados: displasia leve o ligera, moderada o severa.



*Figura 1. Leucoplasia heterogénea en borde lateral lingual.*



*Figura 2. Leucoplasia Verrugosa Proliferativa en borde lateral lingual y suelo de boca.*

La ERITROPLASIA es toda aquella lesión de la cavidad oral que presenta zonas rojas y que no puede ser diagnosticada como otra entidad; es una definición sin connotaciones histológicas. Puede ser de aspecto liso, siendo en algunos casos granular o moteada. Son lesiones de alto riesgo, cuyo grado de malignización es muy elevado en comparación con otras lesiones de la mucosa oral. (Bagán y cols, 2013)

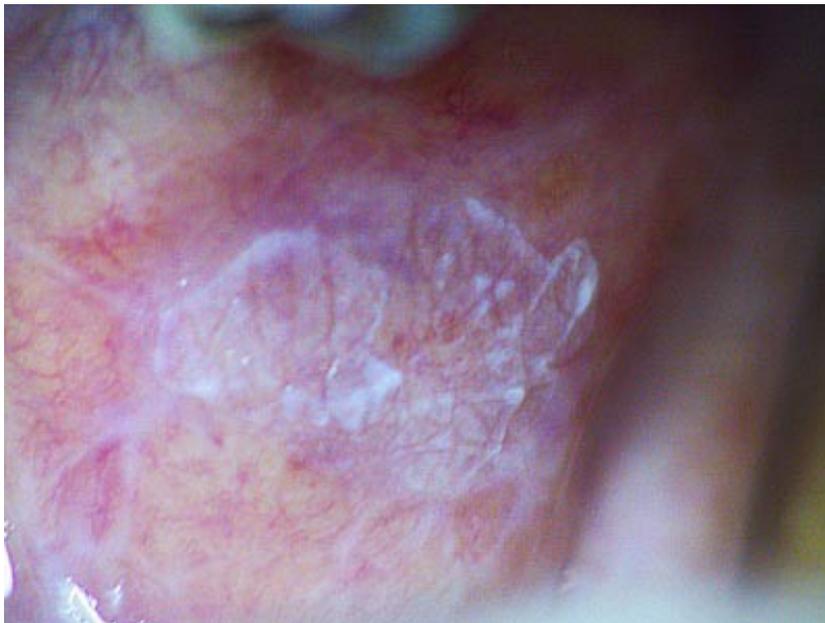


*Figura 3. Eritroplasia en mucosa de hemipaladar derecho.*

El LIQUEN PLANO es una enfermedad mucocutánea de etiología desconocida que puede afectar a la piel, mucosa oral y otras mucosas. Es de curso crónico con frecuentes reactivaciones y existen tres tipos clínicos: reticular, atrófico (eritematoso) y erosivo (ulcerativo).

Se considera una lesión potencialmente maligna con un porcentaje de malignización del 0.4-5%.

(Bagán y cols, 2013)



*Figura 4. Liquen Plano Oral reticular en mucosa yugal.*

La QUEILITIS ACTÍNICA es un proceso inflamatorio inespecífico de los labios, cuyo factor etiológico es una exposición prolongada al sol, pudiendo aparecer de forma aguda o crónica. La forma crónica es la más frecuente e importante en términos de pronóstico, y aparece en personas o trabajadores que están mucho tiempo al aire libre, debido a la exposición prolongada y mantenida (años) a los rayos ultravioleta del sol. En un porcentaje de 1 – 3%, degenera en carcinoma de células escamosas. (Bagán y cols, 2013).



*Figura 5. Queilitis Actínica en mucosa labial inferior.*

En la actualidad el **GOLD STANDARD** para el diagnóstico de cualquier lesión potencialmente maligna y del COCE es el examen clínico y la toma de una biopsia para su estudio histopatológico.

Para el seguimiento clínico y terapéutico de los pacientes se utiliza la clasificación TNM (American Joint Comité, Unión Internacional Contra Cáncer). Para describir la extensión anatómica de la enfermedad se basa en 3 parámetros:

- \_ tamaño tumoral (T)
- \_ presencia de ganglios linfáticos regionales a la palpación (N)

\_ presencia o no de metástasis a distancia (M)

Según estos parámetros existen 4 estadios clínicos para el Carcinoma Oral de Células Escamosas.

Las investigaciones actuales se centran en el diagnóstico precoz del COCE, en conocer cuándo y cómo una lesión de naturaleza premaligna o precancerosa se transforma en una verdadera neoplasia maligna. Los trabajos intentan descubrir qué señales y qué cambios suceden en el organismo, que desencadenen la aparición de un carcinoma. La situación ideal supondría detectar las mutaciones genéticas que presentan las células del tumor primario o de la lesión precancerosa, en la composición de los fluidos que bañan el tumor (la saliva en nuestro caso), ANTES de que tenga lugar la expresión fenotípica del tumor.

Tratamos de investigar qué conjunto de marcadores pueden servirnos, con total fiabilidad, para predecir la posible transformación maligna.

Además es necesario descubrir por qué dos tumores de igual estadiaje (TNM) se pueden llegar a comportar de forma tan diferente, de manera que uno puede responder perfectamente al tratamiento y otro resultar ser letal.

Además de la biopsia, otras *pruebas diagnósticas* que también se emplean para el diagnóstico y estudio de dichas lesiones son:

1. PRUEBAS DE IMÁGENES: Tomografía Computerizada y Resonancia Magnética.

2. MARCADORES BIOMOLECULARES: los biomarcadores, en general, son alteraciones celulares, bioquímicas, moleculares o genéticas, que, a través de un procesamiento biológico, pueden ser reconocidas o monitorizadas. Pueden mensurarse en los fluidos, en los tejidos o en las células. Un biomarcador puede ser secretado por el tejido que ha malignizado (derivar directamente de la lesión de naturaleza maligna) o puede ser una respuesta específica del organismo ante la presencia de cáncer. Sus funciones suponen predecir la agresividad tumoral, poder seleccionar los pacientes susceptibles de tratamientos invasivos e identificar a los pacientes de ALTO riesgo. En cáncer y precáncer oral, existen varios subtipos de marcadores, según su función biológica, que pueden ser identificados en estudios inmunohistoquímicos a partir de biopsias de lesiones orales:

- Marcadores que actúan en la aceleración y proliferación del ciclo celular: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), Ciclina D1, Ki67, Antígeno de Proliferación Celular Nuclear (PCNA) y Akt1 (es un tipo de proteína quinasa B involucrada en la

inhibición de procesos apoptóticos e implicada como principal factor de muchos tipos de cáncer; este grupo de marcadores ha sido más estudiado en lesiones precancerosas.

- Marcadores de genes supresores de tumores (p53/p63, p21/p27) y apoptosis tumoral (Bax, Bcl-2: proteínas que pertenecen a una misma familia cuya función es regular procesos de permeabilidad mitocondrial y que además constituyen un punto clave en la vía intrínseca de la apoptosis celular; la subfamilia Bcl2 posee función antiapoptótica y Bax, función proapoptótica). Por otra parte, la proteína pRB, es la proteína del retinoblastoma y constituye una proteína supresora de tumores que se altera en muchos tipos de cáncer. Una de sus funciones es inhibir la progresión del ciclo celular y por tanto la proliferación celular; de esta forma, su inactivación puede suponer la aparición de cáncer.
- Biomarcadores de Hipoxia como HIF-1 $\alpha$ , anhidrasa carbónica IX, Transportador de la Glucosa T-1 (GLUT-1) y el receptor de la eritropoyetina (EpoR), cuya función es rescatar glóbulos rojos progenitores de la apoptosis; se asocian a crecimiento tumoral agresivo y a fracaso terapéutico en varios tumores sólidos humanos.
- Biomarcadores de angiogénesis: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), CD105 y Eph receptor (se trata de la subfamilia más grande de receptores tirosina Quinasa; estos receptores en unión a sus ligandos constituyen unas proteínas de membrana que juegan un papel crítico en el mantenimiento de varios procesos como angiogénesis, diferenciación del cáncer y mantenimiento de células madre).
- Biomarcadores de degradación y adhesión celular: Matriz Metaloproteinasas (MMP) que degradan componentes de la matriz extracelular y que desempeñan un papel importante en la diferenciación, proliferación celular y apoptosis; también CD44, Cadherina, Cateninas y Versican; se está desarrollando investigación con inhibidores específicos de E-cadherina/Syndecan-1 como Diana terapéutica en el tratamiento del COCE.

Los factores de más poder predictivo hasta el momento son la expresión de la proteína p53, la existencia de polisomía cromosómica y otras alteraciones como la pérdida de heterocigosidad (LOH) en los brazos de los cromosomas 3p o 9p.

Existen numerosos trabajos que han estudiado los posibles marcadores biomoleculares de LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNAS (tabla 3), en concreto de la LEUCOPLASIA ORAL, como lesión de mayor prevalencia en este grupo de patologías.

MARCADORES  
BIOMOLECULARES EN  
LEUCOPLASIA ORAL

AUTORES	MARCADOR	RESULTADOS
Mao et al, 1996	Pérdida de heterocigosidad (LOH) en brazos de los cromosomas: 9p21 y 3p14.	LOH en 9p21 y 3p14, asociados a estadios iniciales de desarrollo de COCE en cabeza y cuello.
Mutirangura et al, 1996	Telomerasa	La telomerasa suele activarse en las fases tardías de las lesiones orales Premalignas.
Garzino-Demo et al, 1998	Integrinas	La ausencia de polarización restrictiva a nivel basal de integrina $\alpha 6$ , puede asociarse a estadios iniciales de enfermedad, pero NO considerarse como marcador específico de MALIGNIDAD en cavidad oral.
Partridge et al, 1998	Alteraciones en cromosomas	La evaluación y estudio del número de alelos en algunos cromosomas, podría identificar pacientes con riesgo de desarrollo de COCE.
Thonapet et al, 1998	Integrinas	Lesiones de Leucoplasia Oral muestran pérdidas de integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$ en células suprabasales; pero la expresión de moléculas de adhesión no nos permite diferenciar entre tejido con signos inflamatorios y lesiones premalignas o COCE.
Liu et al, 1998	Ki 67, CENP-F(proteína F del centrómero)	El estrato superficial del epitelio oral muestra un incremento de actividad proliferativa, de forma más marcada en Leucoplasia Oral con displasia severa.
Hamidi et al, 2000	Integrinas	La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 6$ podría asociarse a transformación maligna de L.O.
Iwasa et al, 2001	PCNA (antígeno de proliferación celular nuclear), p53, DNA-f y DFF45 (factor de fragmentación 45), AgNORs (proteínas asociadas a regiones de nucléolos) y Factor de Crecimiento Vascular endotelial.	La proporción de lesiones con positividad para la PCNA, p53, DFF45 y los valores para los parámetros de AgNORs, se van incrementando conforme se produce la alteración epitelial, desde hiperplasia epitelial hasta displasia moderada y severa.
Srinivasan et al, 2001	EGFR Y TGF- $\alpha$	Son marcadores tempranos de malignidad en L.O. con displasia.
Chattopadhyay et Al, 2002	AgNORs	La media de sus valores aumenta gradualmente desde un epitelio normal hasta un epitelio con displasia en LO y COCE.
Cruz et al, 2002	p53	La presencia de displasia moderada o severa asociada a la expresión de p53, demuestra mayor sensibilidad para detectar lesiones que van a evolucionar a cáncer en el 91% de los casos.
Kövesi et al, 2003	Ki67 y p53	El aumento de apoptosis y de los valores de Ki67 podría indicar un diagnóstico desfavorable en LO
Maraki et al, 2004	Contenido DNA	Citometría de ADN
Sun et al, 2005	Expresión de COX-2 y FEGF	Su expresión resultó muy marcada en la carcinogénesis temprana en mucosa oral.

Fan et al, 2006	Expresión de proteínas p57 (kip-2), p53 y hsp60	La expresión de p57 disminuye en LO con displasia moderada o severa y en carcinoma de células escamosas.
Datta et al, 2007	Polimorfismo mitocondrial	El polimorfismo (pmf) en el loci mitocondrial de forma individual o asociado con el riesgo de presencia de genotipos en GSTP1, aumenta el riesgo de cáncer oral.
Thomson et al, 2008	Marcadores de ciclo celular	Su análisis permite identificar pacientes con riesgo en el avance de su enfermedad de naturaleza premaligna
Buajeeb et al, 2009	p16	NO es muy válida en la expresión de displasia epitelial o de transformación de la lesión.
Wang et al, 2009	Análisis proteómico	Tres homólogos de la PA28 (proteasome) juegan un papel importante en la transformación maligna de la lesión.
Pontes et al, 2009	p-Akt y proteína Metalotioneína (MT)	Su activación es relevante en el potencial de malignidad de las lesiones
Cervigne et al, 2009	microRNA	La sobreexpresión de los miR-21, miR-181b y miR-345 es potencialmente útil en la identificación de leucoplasias con riesgo de transformación maligna.
Watanabe et al, 2009	PI3K (enzima fosfoinosítido3-quinasa)	La activación del canal PI3K-AKT está asociado con la carcinogénesis.
Macha et al, 2010	Expresión de TC21	La alteración en la expresión de esta proteína se manifiesta en estadios tempranos de cáncer y se correlaciona con mal pronóstico de COCE.
Caldeira et al, 2011	Inmunoexpresión de hMLH1, p53 y el número de AGNOR	La alteración en su patrón de inmunoexpresión parece asociarse con la expresión con la expresión temprana de carcinogénesis oral.
Winter et al, 2011	Expresión de los genes Doc-1 y S100A7-g	
Matsubara et al, 2011	$\Delta$ Np63 Marcador de células madre de queratinocitos	Su expresión se asocia a transformación maligna del epitelio y a presencia de displasia y a mal pronóstico de cáncer.
Bremmer et al, 2011	Ploidia	El ADN anaploide en LO se asocia a mayor riesgo y a progresión a cáncer; pero su valor como biomarcador en LO es muy limitado.

**Tabla 3**

3. SISTEMAS ÓPTICOS: se basan en la interacción de la luz con los tejidos, lo que puede manifestar CAMBIOS ESTRUCTURALES y en el METABOLISMO de los tejidos:

- Ácido acético diluido en enjuagues y su observación con Luz Quimioluminiscente (Vizilite®). Resulta una técnica poco

específica y no resulta coste/efectiva respecto a la exploración convencional.

- Fluorescencia: es una técnica con poca especificidad y sensibilidad, que se basa en la captación de luz fluorescente emitida por los tejidos (Sistema VELscope®). La pérdida de fluorescencia es el resultado de una alteración de la distribución de los fluoróforos en el tejido.

Otras técnicas englobadas en los sistemas ópticos son Doppler OCT, resonancia magnética nuclear por espectroscopia, cromo endoscopia, imagen de banda estrecha, técnicas de inmunofotodiagnóstico.

#### 4. ESTUDIOS SALIVALES

- Las muestras de citología exfoliativa se pueden emplear también para detectar alteraciones genéticas en el epitelio oral de pacientes con alto riesgo de desarrollar COCE y para detectar alteraciones microsátélites en COCE.
- Promotores de hipermetilación de p16, O6-metilguanina-DNA-metiltransferasa y proteína quinasa asociadas a muerte celular, se han identificado en saliva de pacientes con cáncer.
- Entre los MARCADORES SALIVALES destacan las Citoquinas como IL-6, IL-8, FNT- $\alpha$ , y la IL-1 $\beta$ , que presentan factores elevados en pacientes con carcinomas. Otros marcadores como factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la endotelina 1 se encuentran incrementados en saliva de pacientes con cáncer y asociados a extensión y metástasis tumoral. Las mutaciones en el gen p53 se consideran una de las alteraciones genéticas más frecuentes en la aparición de neoplasias, en la cual se produce una acumulación de proteína p53 inactiva que mediante un mecanismo de autoinmunidad induce la aparición de anticuerpos antip53, que se ha encontrado en saliva y plasma de muchos tumores.
- Niveles de CD44 salivales: se presentan en valores más elevados en pacientes con cáncer que en los controles sanos.

### **La saliva y su aplicación Diagnóstica en Cáncer Oral**

## **Saliva: composición y función.**

La saliva es un fluido corporal que contiene numerosa información acerca del estado de salud o de enfermedad y, según se está estudiando, los componentes salivales cambian cuando se inicia o aparece una patología. La capacidad de poder identificar y controlar el estado de salud de un paciente, o la aparición de una enfermedad, su progresión y la respuesta al tratamiento, suponen un gran objetivo y avance para la ciencia.

La saliva contiene diferentes tipos de proteínas y péptidos, cada uno de ellos con diferentes funciones biológicas importantes. Además el avance de los nuevos medios tecnológicos (la bioinformática, la metabolómica, la genómica y la proteómica) han hecho que la saliva suponga una gran herramienta de estudio.

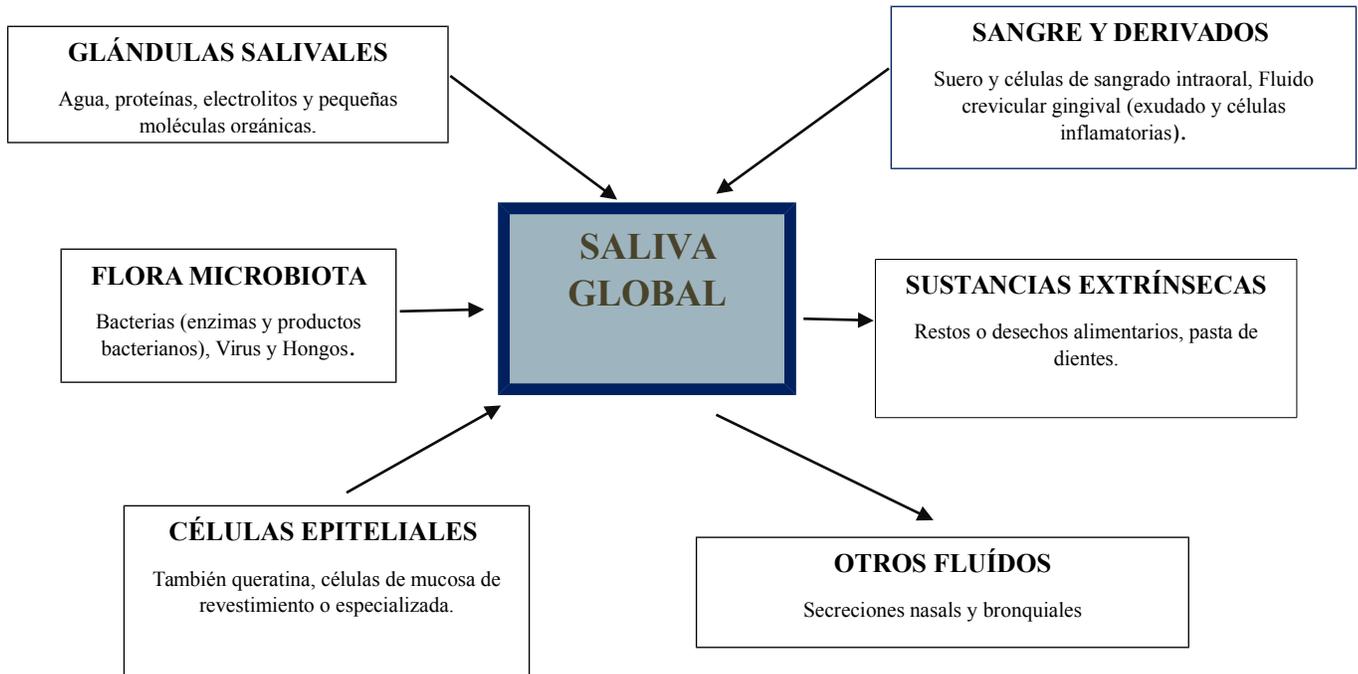
Como fluido diagnóstico, la saliva presenta superioridad sobre el suero, puesto que su recolección se hace de forma no invasivo y supone un procedimiento de muestreo fácil, constituyendo un enfoque rentable para el estudio en grandes poblaciones. Otra ventaja es que la toma de muestras salivales es un método indoloro, que no genera estrés y que permite tomar varias muestras al día; ésto es ventajoso para poderlo aplicar principalmente en sectores de la población como niños, pacientes con discapacidad o con ansiedad. Además la saliva es fácil de recoger, de transportar, de almacenar, no requiere personal entrenado ni específicamente cualificado y su manipulación es muy segura para el personal sanitario. De igual forma, destacamos de la saliva frente al suero, que la composición de la saliva NO es tan compleja ni variable como la de la sangre, por lo que debería reflejar de forma más exacta al condición actual del organismo en cada recogida.

Por otra parte, la saliva es un fluido a TIEMPO REAL porque las glándulas salivales son glándulas exocrinas que dan perfiles proteicos indicativos del estado del individuo en el momento de la colecta.

La saliva es un fluido oral con gran cantidad de metabolitos, proteínas, ARNm, ADN, enzimas, hormonas, anticuerpos, constituyentes antimicrobianos, factores de crecimiento y otras moléculas que pueden asociarse con el fenotipo de la enfermedad.

Para nuestro estudio pretendemos tomar muestras de saliva global (no específica de ninguna glándula saliva mayor específica) NO estimulada, en reposo.

## **COMPOSICIÓN SALIVA GLOBAL**



La saliva es una secreción compleja que procede de las glándulas salivales mayores y menores, las cuales se localizan por todas las regiones de la boca excepto en encía y en la porción más anterior de paladar duro. Resulta estéril en su salida inmediata de las glándulas salivales, pero deja de serlo en cuanto se mezcla con el fluido crevicular, restos alimentarios, microorganismos, células que se descaman de la mucosa oral, etc.

La saliva, en composición, difiere de la del torrente sanguíneo, pero es a partir de él de dónde van a proceder muchos de sus componentes, a través de diversos mecanismos de transporte.

Así pues, la saliva está constituida por componentes creados y secretados por las glándulas salivales mayores y menores y por otros elementos que NO se crean en dichas glándulas y provienen del torrente sanguíneo.

El paso de elementos de suero a saliva ocurre por varios procesos:

\_ Mediante el transudado del fluido crevicular del surco gingival o derivado de lesiones directamente de la mucosa oral.

\_ Mecanismos PARACELULARES: por ultrafiltración a través de los espacios o uniones intercelulares, entre células secretoras (acinares y ductales) de las glándulas salivales. Este trayecto sólo lo llevan a cabo moléculas cuyo peso molecular es < 1900 Da, como agua, iones,

determinadas hormonas, etc. La concentración de estas moléculas es de 300-3000 veces menor en saliva que en plasma.

\_ Mecanismos TRANSCELULARES: supone un transporte selectivo a través de la membrana plasmática mediante Difusión Pasiva como lo hacen las moléculas lipofílicas o por Transporte Activo con Canales de proteínas.

En la composición saliva tenemos un contenido de un 99% de agua y el resto son moléculas orgánicas, inorgánicas y proteínas.

La COMPOSICIÓN SALIVAL (ese 1 %) se puede clasificar en 4 grupos (Chiappin et al, 2007):

.- Compuestos inorgánicos:  $Ka^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $HPO_3^{2-}$ ,  $NH_3$ . Muchos factores pueden modificar la concentración de iones en la saliva, y es más, la composición iónica de saliva No estimulada es diferente de la estimulada (cuya composición es más similar a la del plasma).

.- Compuestos orgánicos: ácido úrico, bilirrubina, creatinina, glucosa, lípidos (colesterol, ácidos grasos), putrescina, cadaverina.

.- Proteínas y Compuestos Polipeptídicos.

Los niveles salivales de proteínas aumentan también por la actividad  $\beta$ -simpática, debido a que la secreción saliva está provocada por la acción de los mediadores adrenérgicos. La saliva contiene gran cantidad de productos proteicos cuya función y estructura se han estudiado con varias técnicas: cromatografía líquida, electroforesis, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, técnicas de inmunoensayo (Elisa...), pruebas genéticas.

Se están desarrollando técnicas proteómicas que permiten obtener un patrón completo de las proteínas salivales (tabla 4). Generalmente en un experimento proteómico, las proteínas son separadas en primer lugar con una técnica de electroforesis de 2 dimensiones y después se detectan con una tinción adecuada. Con este método se obtiene una zona o imagen a modo de mancha que es extirpada para su posterior digestión enzimática. Los fragmentos resultantes son analizados por espectrometría de masas, asistida por láser para poder medir la masa molecular de los péptidos. Desde este punto se han ido desarrollando múltiples técnicas mejoradas en proteómica salival.

PROTEÍNAS RECONOCIDAS EN SALIVA (Guo et al, 2006; Tanaka et al, 2006)
---

$\alpha$ -amilasa: función digestiva
Albúmina: origen plasmático
Grupo de Cistatinas: función antimicrobiana, con origen glándulas submandibular y sublingual.
Histatina: función antifúngica, con origen glándula parótida.
Ig-A secretora: función antimicrobiana y su producción radica en los linfocitos B cercanos a las glándulas salivales, que lanzan las Ig al fluido intersticial, para que sean adoptados por las células ductales y acinares. El resto de Igs (IgG/ IgM) derivan del fluido crevicular y de las fugas plasmáticas.
Lactoferrina: función antimicrobiana, presente tanto en la saliva mucosa como en la serosa.
Lisozima: función antimicrobiana, con origen en todas las glándulas salivales mayores.
Mucinas: función lubricante, presentes en saliva mucosa
Proteínas ricas en Prolina (PRP): promueven la remineralización del esmalte por la unión de iones de calcio, sintetizadas por las glándulas salivales.
Estaterina: función remineralizante del esmalte dental.
Trasnsferrina: origen plasmático.
Otras: enzimas (metaloproteinasas, citoquinas, etc.)

**Tabla 4**

Trabajos bastante recientes (Miller et al, 2010) han catalogado unas 2290 proteínas en saliva global y además, aproximadamente un 27% de las proteínas del plasma sanguíneo se han hallado también en la saliva. Al contener la saliva menor cantidad de proteínas, presenta una ventaja en su estudio frente al suero sanguíneo, puesto que se disminuye el riesgo de interferencias inespecíficas y de interacciones hidrostáticas.

.- Hormonas: catecolaminas, tiroxina, hormonas esteroideas (de lo que se extrae una aplicación interesante de diagnóstico saliva, ya que el nivel de hormonas libres en saliva pueden orientar sobre el nivel de hormonas libres en suero), hormonas proteínicas polipeptídicas, etc.

La **función** de la **saliva** es proteger y mantener la integridad de la mucosa oral facilitando lubricación, fonación, masticación y deglución, regulación del PH, protección inmunitaria, función antibacteriana, remineralización del esmalte dental y digestión de los hidratos de carbono y de las grasas, La cantidad y composición de la saliva depende de varios factores como la tasa de flujo individual, los ritmos circadianos, el tipo y tamaño de las glándula salivales, la duración y tipo de los estímulos de producción saliva, de la dieta, de los fármacos, de la edad y sexo de la persona, del tipo sanguíneo y del estado fisiológico o patológico. (Pfaffe et al, 2011)

Como hemos introducido anteriormente las **PROTEÍNAS SALIVALES** tienen un importante valor diagnóstico para las enfermedades sistémicas. A pesar de que los constituyentes proteómicos son la primera elección como análisis de Diagnóstico saliva, los blancos o **DIANAS GENÓMICAS** están emergiendo como biomarcadores discriminatorios altamente informativos.

La clave estará en el uso de un panel de biomarcadores en combinación con herramientas de screening para mejorar el diagnóstico en precisión y especificidad.

### **Saliva: estudio específico de biomarcadores**

La detección de Biomarcadores en Saliva ha surgido como un nuevo enfoque en el diagnóstico de COCE en todas sus etapas de desarrollo, procesos iniciales, invasión, recurrencia y tratamiento.

Deseamos que un biomarcador tenga las cualidades de Sensibilidad (capacidad de detectar muy bien la enfermedad) y Especificidad (capacidad de discriminación entre salud y enfermedad), para conseguir un diagnóstico preciso de la patología. Un biomarcador mínimamente aceptable debería ser capaz de detectar por lo menos el 98% de los casos de cáncer.

Podemos definir los criterios que le exigimos a un biomarcador (JingyiLiu et al, 2012):

- \_ Producto principal de la modificación oxidativa que pueda estar directamente implicada en el desarrollo de una enfermedad.

- \_ Producto estable, no susceptible de inducción por artefacto, que no sea fácil de perder y no modificable durante el almacenamiento.

- \_ Representativo del balance entre generación y destrucción del daño oxidativo.

- \_ determinado por un ensayo analítico y que sea **ESPECÍFICO, SENSIBLE, REPRODUCIBLE y ROBUSTO.**

- \_ Exento de factores de confusión e interferencia de la ingesta dietética.

- \_ Accesible en el tejido diana (blanco) o en un tejido válido.

- \_ Detectable y mensurable dentro de los límites de detección de un procedimiento analítico fiable.

Recientes investigaciones están centrándose en el estudio de los **exosomas** como medios de transporte de los biomarcadores salivales (Palanisamy et al, 2010; Sharma et al, 2010). Los exosomas son vesículas internas presentes en los endosomas multivesiculares celulares. Cuando

los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana celular, dejan libres los exosomas en el medio extracelular y difunden hacia otras células o líquidos corporales (sangre, linfa, saliva...), por lo que, estas vesículas, suponen la llave de la comunicación intercelular (Chairoungdua et al, 2010). La revelación de que los proteomas o los transcriptomas salivales están contenidos en los exosomas, explica o da forma a un mecanismo a través del cual estas nanovesículas (exosomas) pueden mediar o ser mediadores de un eje de comunicación / transducción señalizador que traslade contenido exosomal específico de cada enfermedad (constituyentes moleculares de ARNm, microARN, proteínas proto-oncogénicas y pro-angiogénicas) hacia órganos diana o dianas anatómicas, incluyendo las glándulas salivales. Así pues, los exosomas se cree que funcionan como importantes moduladores en determinados procesos de oncogénesis.

Algunos **biomarcadores** que han sido más estudiados (tabla 5) y que se han asociado con COCE son:

B	<b>BIOMARCADORES SALIVALES alterados en COCE en comparación con sujetos SANOS</b>	
IAP		
SCC		
CEA		
CA 19-9		
CA 125		
Cyfra 21-1		citoqueratina 19 (proteína que conforma parte del citoesqueleto celular). Su sobreexpresión está normalmente relacionada con los tumores de origen epitelial; se ha comprobado que se presenta en mayor concentración en la saliva de pacientes con COCE.
TPS		Antígeno polipeptídico específico tisular. Se encontró específicamente elevado en la saliva de los pacientes con COCE.
RNS		Especies reactivas de Nitrógeno
8-OHdG		Marcador de daño de AND
IgG		Inmunoglobulina
IgAs		Inmunoglobulina de mucosa
CD44		Proteína de la superficie celular implicada en mecanismos de adhesión y migración celular, comunicación celular, presentación de citoquinas...etc. Su aumento en saliva tiene lugar en la mayoría de pacientes con COCE y su uso radica en la especificidad para diferenciar entre pacientes con COCE y

	sanos.
VEGF, EGF, IGF y TGF- $\beta$ 1.	Factores de crecimiento; el TGF- $\beta$ 1 es el factor de crecimiento transformante beta de las citoquinas, que es una proteína que lleva a cabo diversas funciones celulares, como el control de crecimiento celular, crecimiento celular, procesos de diferenciación y apoptosis.
MMP-2, MMP-11, MMP-1 y MMP-9	Metaloproteinasas, que son capaces de degradar la matriz celular (biomarcadores extracelulares)
LOH	Región con pérdida de heterocigosidad
DNA hipermetilación	Inactivación gen
DUSP1	Mediadores de la inflamación
Citoquinas: IL-6, FNT- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ y	Se han encontrado niveles aumentados de dichas CITOQUINAS en saliva y suero de pacientes con COCE y con lesiones potencialmente malignas como L.O.
AutoAcp53	El nivel de estos autoanticuerpos medido en saliva se correlaciona con el nivel en suero, por lo que ofrecen un buen método específico para la detección de un subconjunto de pacientes COCE que presentan mutaciones en el gen p53.
c-myc, c-Fos, c-Jun	Oncogenes
Hipermetilación p16 y DAPK	Genes relacionados con el cáncer
HIF- $\alpha$ , CA-9	Marcadores de Hipoxia
E-cadherina, N-cadherina y $\beta$ -catenina	Marcadores de transición Epitelio - Mesenquimal
CK13, 14 y 16	Citoqueratinas
Otros (saliva micro RNA)	B2M, FTH1, GOS2, GADD45B, H3F3A, HSP, CO16, IER3, MAP2K3, PRG1, RGS2.

**Tabla 5**

Éstos son algunos de los biomarcadores que han mostrado resultados significativos, pero son necesarios más estudios que consoliden su validación.

## Revisión bibliográfica

Son numerosos los trabajos y proyectos que han estudiado los biomarcadores en saliva; tras la revisión bibliográfica realizada con artículos desde 2002 hasta la fecha (tabla 6), he decidido destacar la siguiente información.

LESIÓN ESTUDIADA	DATOS DEL TRABAJO	BIOMARCADOR (BM)	HALLAZGOS SIGNIFICATIVOS
Lesiones potencialmente malignas o de naturaleza premaligna		p53	
Lesiones potencialmente malignas o de naturaleza premaligna		Ki67	Un aumento en los valores de este BM puede significar un pronóstico desfavorable en leucoplasia oral.
Lesiones potencialmente malignas o de naturaleza premaligna		Cox-2	
Lesiones potencialmente malignas o de naturaleza premaligna	Alexis Korostov et al, 2011	VEGF (factor de crecimiento angiogénico), IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, y FNT- $\alpha$ .	Los estados de naturaleza premaligna pueden ser identificados con este pool de citoquinas salivales.
Lesiones potencialmente malignas o de naturaleza premaligna		MicroRNA	La sobreexpresión de MiR-21, MiR-18 <sub>1b</sub> y MiR-345, puede facilitar la identificación de leucoplasias con riesgo de transformación maligna.
Lesiones potencialmente malignas o de naturaleza premaligna		EGFR	Es un marcador temprano de malignidad en leucoplasia oral con displasia.
Lesiones potencialment			Disminuye su expresión

e malignas o de naturaleza premaligna		Bcl-2	en lesiones displásicas.
Leucoplasia oral (LO) con displasia	MohitSharma et al, 2011	IL-6	Se han hallado elevados niveles de IL-6 en pacientes con leucoplasia y enfermedad periodontal. En pacientes con LO los niveles de IL-6 aumentan en relación proporcional al aumento de severidad en la displasia.
COCE		EGFR	Marcador temprano de malignidad
COCE		Ki67	
COCE		p53	Sobreexpresión del gen p53, parece significar pronóstico favorable.
COCE	El- Naggar et al, 2001	LOH (pérdida de heterocigosidad en los brazos de los cromosomas 3p o 9p)	La pérdida de algunas regiones específicas en los cromosomas que contienen presuntos genes Supresores Tumorales, supone una predicción temprana de una progresión cancerosa. Se observe que el 49% de las muestras salivales de pacientes Coce tenían LOH en 25 de los B, estudiados.
COCE		Alteraciones microsatélite	
COCE		IL-6	
COCE	Tan W et al, 2008  SilkyRajeshPunyani et al, 2013	IL-8	Se han determinado altas concentraciones de IL-8 en pacientes Coce. Además parece que contribuye en la patogénesis del cáncer, vinculándose al crecimiento tumoral y a la metástasis. Se está

			<p>estudiando como Bm de estadio temprano en Coce.</p> <p>Este bm es muy útil en Coce pero no en lesiones premalignas; además se propone la IL-8 como Diana Terapéutica.</p>
COCE	T Kamatani et al, 2013	IL-1 $\beta$	<p>Este bm mostró diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones salivales pre y post tratamiento. Su existencia aumenta la patogenicidad del Coce.</p>
COCE		IL-1 $\alpha$	
COCE	Tavassoli M, 1998	Auto Acp53	<p>Puede ofrecer un método específico para detectar un subconjunto de pacientes Coce con aberraciones en gen p53. Pero esto ha presentado un potencial limitado en la predicción de Coce.</p>
COCE	Franzman EJ et al, 2007	CD44	<p>Se hallaron altos niveles de CD44 en pacientes Coce. También se han asociado los niveles de CD44 soluble a metástasis en algunos tumores. Lo más interesante es que la combinación del Test de CD44 soluble con la determinación de una posible hipermetilación con PCR específica cd44,</p>

			obtiene una prueba para diagnóstico de Coce de ALTA sensibilidad y especificidad.
COCE	Zhong LP et al, 2007. También Kurokawa et al, Nagler et al, Bhatavdekar et al, Yen et al.	Cyfra 21-1	Se hallaron altas concentraciones en saliva de pacientes Coce. Se consiguió sensibilidad 71%, especificidad 75%.
COCE		Transcritos o ARN <sub>m</sub> de determinadas biomoléculas: B <sub>2</sub> M, FTH <sub>1</sub> , GOS <sub>2</sub> , GADD <sub>45b</sub> , H <sub>3</sub> F <sub>3</sub> A, H <sub>2</sub> P-CO <sub>16</sub> , IER <sub>3</sub> , MAP <sub>2</sub> K <sub>3</sub> , PRG <sub>1</sub> , RGS <sub>2</sub> , HA <sub>3</sub> , OAZ <sub>1</sub> , S <sub>100</sub> P, SAT, DUSP <sub>1</sub> , IL-8, IL-1 $\beta$	Estos marcadores se estudian, porque además de su utilidad en diagnóstico, parecen participar en algún momento de la carcinogénesis, por lo que no se descarta su utilidad como diana terapéutica.
COCE	Viet CT et al, 2008	Hipermetilación de genes asociados con cáncer: p16 y DAPK.	La hipermetilación aberrante en zonas promotoras de dichos genes es frecuente en cáncer de cabeza y cuello y puede usarse como bm de células cancerosas. La metilación puede reflejar el pronóstico del tumor y como resulta reversible con agentes demetilantes, supone una vía para el tratamiento del cáncer.
COCE		Defensina 1	
COCE		Altos niveles de nitritos / nitratos	
COCE		Gran actividad de la enzima nitrato reductasa	
COCE		Proteína Moesina	
COCE	Nagler R et al, 2006	C.A. 125	Se hallaron altas concentraciones en

			saliva de pacientes Coce. Se consiguieron valores de sensibilidad 71% y especificidad 75%.
COCE		Mucina 5B, Mucina 7	
COCE	Kurokawa et al, 1993/1997	IAP	
COCE	Hoffman et al, Krimmel et al, Nagler et al, Hellner et al, Zoller et al. (1997/1989/1999/2006 )	SCC Ag (antígeno asociado a carcinoma de células escamosas)	Los estudios realizados hasta la fecha aportan baja sensibilidad y especificidad. Kurokawa et al consiguieron aumentar a valores de 81 y 77.8% de sensibilidad y precisión en trabajos con este bm. En general, la concentración de este bm es más alta en pacientes Coce que en sanos.
COCE	Ídem a SCC excepto Hellner	CEA (carcinógeno embriogénico).	
COCE	Bahar et al, 2007	RNS (especie reactiva a nitrógeno)	Altas concentraciones salivales en pacientes Coce
COCE	Hoffmann et al, Krimmel et al	CA 19-9, CA 12, CA-128 (antígenos carcinogénicos)	La concentración de CA 19-9 fue más alta en pacientes Coce.
COCE	Nagler R et al, 2006	TPS Ag (antígeno tisular polipeptídico)	Se hallaron altas concentraciones en saliva de pacientes Coce
COCE		8-OHdG (marcador de daño de AND)	Se hallaron altas concentraciones en pacientes Coce
COCE		IgG	
COCE		IgA sec	
COCE		IGF	
COCE		MMP-2 y 11( matriz metaloproteinasa)	
COCE	You YJ, Cheng-	Transferrina	Se hallaron altos

	WenLin, 2010		niveles en pacientes Coce y además los niveles de la proteína estaban fuertemente correlacionados con el estadio y el tamaño del tumor.
COCE	Shintani S et al, 2010	Cistatina SA-I con delección del aminoácido 3 N-término.	Proteína específica de COCE, con diferencias en los patrones de expresión en pacientes Coce, antes y después del tratamiento.
COCE		VEGF	
COCE		FNT- $\alpha$	En pacientes Coce se ha hallado a concentraciones de 30 $\mu$ g/ml y en sujetos sanos en 3 $\mu$ g/ml.
COCE Lingual	Masood R at al, 2011	IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, VEGF y FNT- $\alpha$	Panel de BM para screening de Coce Lingual. Se demostró que estos 5 Bm fueron elevados en pacientes con Coce lingual invasivo o endofítico, en comparación con sanos. Los niveles salivales de estos 5 bm pueden identificar la PROGRESIÓN de pacientes de alto riesgo hacia neoplasia, siendo útil como bm para detección precoz.
COCE		ADA salival (adenosinadeaminasa)	Posible herramienta de diagnóstico precoz en Coce Lingual.
		El panel de ARN <sub>m</sub> se va precisando: DUSP <sub>1</sub> , H <sub>3</sub> F <sub>3</sub> A, IL-8, IL-1 $\beta$ , OAZ <sub>1</sub> , S100P y SAT	Se han hallado niveles aumentados de este panel de transcritos en la saliva de pacientes

COCE	Yang Li et al, 2004		COCE, especialmente de IL-8. La combinación de estos biomarcadores produce una sensibilidad y especificidad aproximada de un 91%.
COCE Lingual	Shpitzer T et al, 2009	Biomarcadores que indican Daño Oxidativo: carbonilos, 8-OHG, maspin, Ki67, phosphor-Ser, CycD1, MMP-9, LDH (marcador de daño o colapso tisular)	Se obtuvieron diferencias al alza en los carbonilos, Ki67, CycD1, MMP-9 y LDH en Coce lingual; 8-OHG, maspin y phosphor-Ser disminuyeron. La carbonilación indica el daño oxidativo de las proteínas. Se sabe también que los polimorfismos de MMP-9 presentan una fuerte asociación con desarrollo de Coce.
COCE		ROS (Biomarcador de daño oxidativo, especie de oxígeno reactivo)	
COCE		Ácido úrico y Glutathione (antioxidantes de bajo peso molecular)	Algunos antioxidantes salivales presentaban bajas concentraciones en los perfiles de pacientes Coce.
COCE		$\alpha$ - actinina 4	
COCE		Enzima hialuronidasa salival	
COCE	ShenHu et al, 2008	Panel de Biomarcadores proteicos: M <sub>2</sub> BP, MRP <sub>14</sub> , CD59, catalasa y profilina (proteína reguladora del sistema microfilamento,	Potenciales biomarcadores en Coce.

		implicada en vías de señalización celular)	
COCE		Clusterina	Proteína presente en controles sanos pero no en pacientes COCE, implicada en la muerte celular programada.
COCE	MarziehHamzavi et al, 2013	IL-10	La expresión de IL-10 es significativamente más alta en pacientes Coce, pero NO se halló relación alguna entre expresión tisular, suero y niveles salivales.

**Tabla 6**

Aunque como hemos podido constatar existen numerosos trabajos que estudian biomarcadores en saliva y que concluyen que existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de dichos biomarcadores entre pacientes y sanos, no hemos encontrado un estudio específico en el que se analicen a la vez aquellos que han resultado posibles candidatos a ser método de screening en trabajos previos, lo que **JUSTIFICA** la realización de la investigación planteada en este proyecto.

Numerosos trabajos se han llevado a cabo analizando niveles de biomarcadores salivales en pacientes con Coce, pero la mayoría de ellos tienen como gran limitación un pequeño tamaño muestral; además son necesarios también más proyectos que investiguen el perfil en saliva de los biomarcadores cuando las lesiones todavía no han sufrido una transformación neoplásica, más que cuando la lesión ya ha sido diagnosticada como carcinoma.

Con los datos anteriores, nuestro trabajo de investigación plantea la **HIPÓTESIS** de que van a existir diferencias estadísticamente significativas en los niveles de biomarcadores salivales entre aquellas lesiones precancerosas con gran tendencia a malignizar y las que presentan buen pronóstico y sujetos sanos. De igual forma van a existir diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión de biomarcadores entre pacientes con Coce y sanos.

## **DISEÑO PROYECTO**

### **DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**

Pretendemos medir y estudiar las variaciones de 5 tipos de Biomarcadores que van a existir en la saliva de pacientes con Lesiones Potencialmente Malignas y en pacientes diagnosticados de Carcinoma Oral de Células Escamosas. Para valorar estas lesiones se realizará un estudio anatomopatológico previo, que queremos completar con un estudio ultraestructural para poner de manifiesto la presencia de exosomas y microvesículas secretadas por las células tumorales.

Para analizar las variaciones en los Biomarcadores salivales vamos a emplear como instrumentos, un panel de 5 marcadores moleculares salivales (5 en lesiones potencialmente malignas: Ac antiP53, Ki 67, VEGF, COX-2 y MicroRNAs) y otros 5 en lesiones de carcinoma oral: citoquinas tipo IL-8, CD44, EGF, transferrina y MicroRNAs), los cuales determinaremos y cuantificaremos comparando con un grupo control de sujetos sanos.

### **OBJETIVOS**

\_ Determinar diferencias o variaciones cualitativas o cuantitativas en un panel de biomarcadores salivales entre individuos sanos y pacientes con **Lesiones Potencialmente Malignas**, Carcinoma Oral de Células Escamosas o **Recidiva de Carcinoma**.

\_ Caracterizar al Microscopio Electrónico las muestras histológicas de los subtipos de Lesiones Potencialmente Malignas, de COCE en tres de sus estadios diferentes y del tejido patológico con recidiva neoplásica.

## METODOLOGÍA

### A/ Tipo de diseño

Será un estudio prospectivo a 3 años, de tipo experimental y observacional.

### B/ Ámbito de estudio

Se llevará a cabo con pacientes del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial.

### C/ Tamaño muestral y Criterios de selección (inclusión y exclusión)

Los criterios de exclusión de los participantes del estudio comprenden: que los individuos no hayan padecido ninguna neoplasia maligna con anterioridad, no padezcan ninguna inmunodeficiencia, ningún desorden o enfermedad autoinmune añadida, ni hepatitis ni que sean VIH +.

Los pacientes que incluiremos en el estudio los vamos a clasificar en dos grupos:

- Sujetos Sanos: se seleccionarán sujetos (hombres y mujeres) con edades comprendidas entre 25 y 75 años que acudan al Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial por algún posible tipo de patología de ATM o para cirugía de cordales.
- Sujetos enfermos, que dividiremos en 3 grupos:
  - Pacientes con LESIONES POTENCIALMENTE MALIGNAS:

# LEUCOPLASIA ORAL



- Pacientes diagnosticados de CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS:

- \_ 20 pacientes COCE Estadío I
- \_ 20 pacientes COCE Estadío II
- \_ 20 pacientes COCE Estadíos III ó IV

- Pacientes que fueron diagnosticados e intervenidos de COCE mediante tratamiento Quirúrgico, Radioterapia, Quimioterapia o combinación de dichas modalidades terapéuticas. Este subgrupo de unos 20 pacientes también, es de gran importancia, ya que se pretende estudiar a qué perfil tienden el panel de marcadores en estos casos, estableciendo diferencias

entre si surge una recurrencia de neoplasia o si permanecen como libres de enfermedad.

Los sujetos incluidos en el estudio se agruparán dentro de cada categoría descrita, según factores de riesgo, para homogeneizar las muestras y para minimizar sesgos.

Los factores de riesgo a tener en cuenta para agrupar a los individuos son el hábito tabáquico (a partir de 15/20 cigarrillos al día) y el hábito enólico (valorar en cada caso según frecuencia, cantidad y tipo de alcohol consumido).

En nuestro proyecto vamos a estudiar los COCE localizados estrictamente en cavidad oral, por lo que excluirémos los pacientes con carcinoma de orofaringe o nasofaringe.

#### D/ Procedimiento, recogida y tratamiento de las muestras

Los pacientes ya intervenidos previamente de COCE serán tomados de la base de datos del Servicio de Cirugía Maxilofacial en el momento de comenzar el estudio, siguiendo los criterios de inclusión y exclusión anteriormente citados; el resto de pacientes serán preseleccionados el día de su primera visita en las Consultas Externas de Maxilofacial, bajo la sospecha clínica de una lesión potencialmente maligna o de COCE. En ese momento se les citará un día para la recogida de saliva, ANTES de la toma de Biopsia. De esta forma se estandarizan las condiciones de colecta salival.

Tras obtener los resultados de Anatomía Patológica, aquellos pacientes sin un diagnóstico definitivo de Lesión precancerosa o de COCE, se descartarán para el estudio de investigación.

### **ESTANDARIZACIÓN DE LA COLECTA DE MUESTRAS SALIVALES**

*Se les recogerán muestras salivales a los sujetos que acudan al Servicio de Cirugía Maxilofacial por otra dolencia diferente (patología ATM o patología de cordales), a los pacientes ya diagnosticados e intervenidos de COCE y a los preseleccionados bajo sospecha clínica de lesión premaligna o cancerosa.*

Para la toma de muestras salivales se instruirá a todo el equipo del Servicio, mediante un curso de 1 hora, ya que cualquier profesional sanitario podrá desempeñar dicha función.

Para las COLECTAS SALIVALES, se darán unas recomendaciones a los pacientes y de esta manera, se estandariza la recogida de saliva en la medida de lo posible. Éstas instrucciones previas a la toma de muestras salivales se incluirán en el Díptico informativo que estamos preparando, donde se incluirá un resumen del proyecto y una cartilla de citaciones para que los pacientes tengan programadas las fechas en las que tienen que acudir al hospital para la recogida de saliva. También, tras consultar al Comité Ético del IACS en la preparación de los documentos necesarios, se ha redactado el Consentimiento informado que deberán leer y firmar todos los sujetos participantes en el proyecto. Para conseguir la plena colaboración de los pacientes y de los sujetos sanos del grupo control, es muy importante que se conozca claramente cual es el objetivo del estudio y cómo se va a llevar a cabo el trabajo de investigación.

Antes de acudir a la colecta salival, deben conocer las condiciones en las que tienen que acudir a la toma de la muestra; se pretende que la recogida de muestras se haga siempre a las 10 de la mañana, de forma que aproximadamente en las 2 horas previas, el individuo no haya ingerido nada de alimento, ni haya masticado chicle ni haya fumado ni se haya cepillado los dientes. Antes de comenzar la recogida de saliva, el paciente deberá enjuagarse la boca con agua destilada preferentemente.

El método más fiable para este estudio es la recogida de **Saliva Total** o Saliva Global mediante la **Técnica de Drenaje** ó Técnica Pasiva de Saliva NO estimulada llevada a cabo durante 5 minutos. (Pía y cols, universidad Murcia, 1993). Colocaremos a los pacientes con la cabeza hacia delante y los labios entreabiertos, para dejar que la saliva fluya espontáneamente, ya que se trata de una técnica que no requiere estimulación en la producción salival. La saliva se recoge mediante un tubo graduado que conectaremos a un embudo. Instruiremos al paciente para que durante el tiempo de la prueba, no realice movimientos orales y trate de no respirar por la boca en la medida de lo posible. Los recipientes de almacenamiento de la saliva se clasificarán con pegatinas de diferentes colores, las cuales, según el color, tendrán un significado u otro. (por ejemplo rojo: muestra sólo para almacenamiento, verde: muestra destinada a estudio proteico ... etc). De igual forma cada recipiente tendrá anotado el número de historia clínica del paciente y la fecha de recogida.

Se desecharán aquellas muestras que presenten contaminación por sangre.

A veces, y dependiendo de cuándo se prevea que se va a realizar el análisis de la saliva, es necesario incluir en el recipiente y antes de la colecta, determinados aditivos específicos o algunos inhibidores enzimáticos para garantizar que algunas moléculas no sean degradadas y se conserven íntegras para su posterior estudio. También es conveniente centrifugar las muestras de forma previas a su estudio durante 15 minutos a 4°C.

Para el ALMACENAMIENTO de las muestras salivales, se recomienda la CONGELACIÓN de las mismas a -80 °C, sobretodo si el análisis puede retrasarse unos días o incluso meses tras la

recogida de las mismas. Es importante sellar muy bien los recipientes para su mejor conservación y hasta el momento de la congelación, mantenerlas en hielo.

Existen otras posibilidades para mejorar las condiciones de almacenamiento de las muestras de la saliva, que si es posible llevarlas a cabo, conservan perfectamente la saliva (Chiappin et al, 2007):

\_ se recomienda que si la saliva va a analizarse inmediatamente después de su recogida o entre 30-90 minutos después, mantenerla a temperatura ambiente; si va a analizarse a las 3-6 horas, debe conservarse en la nevera a 4°C; y si vamos a tardar días o meses, debe someterse a congelación a -20-30°C o incluso a -80°C.

\_ otra opción es congelar la muestra al instante tras su colecta en nitrógeno líquido; se mezclaría la saliva con igual volumen de glicerol en solución acuosa al 80% y después introducirla en nitrógeno líquido. Así se evita sobretodo la degradación de la IgA.

\_ para inhibir la actividad enzimática presente en la saliva, debemos mezclar las muestras con determinados inhibidores enzimáticos como la aprotinina, leupeptina, pepstatina A, fenil metil sulfonil fluórido, EDTA, etc.

\_ puede añadirse  $\text{NaN}_3$  para retrasar el crecimiento bacteriano.

\_ añadir acetato trifluor en solución acuosa al 10% para desnaturalizar enzimas salivales que puedan iniciar la degradación de determinadas proteínas que sean objeto de estudio.

Las muestras obtenidas serán transportadas para su conservación, almacenamiento y preparación al CIBA (Centro de Investigación Biomédica de Aragón), donde se llevarán a cabo todo los estudios pertinentes.

Es importante remarcar en este punto del proyecto, que las muestras salivales obtenidas tras la sospecha clínica de lesión potencialmente maligna o COCE, se almacenarán bajo las condiciones detalladas anteriormente hasta la confirmación histopatológica de la lesión. Cuando, y tras la realización de la biopsia, el estudio histopatológico nos confirme la naturaleza de la lesión, las colectas salivales se seleccionarán o se desecharán, dependiendo de si el tejido es patológico o está libre de enfermedad.

**TOMA DE BIOPSIA PARA  
SU ESTUDIO  
HISTOPATOLÓGICO AL  
MICROSCOPIO ÓPTICO Y  
ELECTRÓNICO Y PARA  
TÉCNICAS  
INMUNOHISTOQUÍMICAS**

•

Los cirujanos o residentes del Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Miguel Servet, y los dentistas voluntarios que deseen participar en el proyecto, serán los encargados de realizar las biopsias a los pacientes. Todos los profesionales sanitarios encargados de esta función serán previamente instruidos para estandarizar el procedimiento de la toma de biopsia.

✓ Para **MICROSCOPIA OPTICA (M.O.)**

\_ Preparación del tejido: nuestras muestras serán todas preparadas para técnicas histológicas convencionales (tinción con hematoxilina-eosina, y colorante vital) que nos proporcionarán el diagnóstico de confirmación de lesión precancerosa, COCE o tejido libre de enfermedad. Tras el acto clínico de la biopsia, la pieza se fija de inmediato en formol al 10%, durante 4 a 8 horas a temperatura ambiente. Una vez el tejido ya fijado, las muestras se lavan con agua corriente, se pasan por alcohol de 70°C, iniciándose así la deshidratación, sumergiéndolas en alcoholes de gradación ascendente hasta llegar a alcohol absoluto. Posteriormente las piezas deben bañarse en xilol comercial, etiquetarse e incluirlas en parafina líquida, para así formar bloques que se almacenarán para realizar las diferentes técnicas.

\_ Técnicas:

.- *Técnica histológica convencional*: los bloques de parafina se cortan seriadamente con un grosor de 5µm, en grupos de 3 o 4 cortes por porta según el tamaño

de la pieza. Posteriormente se procedía a la extensión de los cortes en baño de agua caliente (50°C) y una vez extendidos, se recogen en un portaobjetos y se secan en estufa. Cuando están secos se procede a desparafinar e hidratar previamente a la tinción pertinente, mediante baños sucesivos de xilol comercial e inmersión en una sucesión de cubetas con alcohol de gradación descendente, empezando por alcohol absoluto y finalizando con agua, donde se sumergen y se lavan abundantemente; de esta manera tenemos el tejido preparado para la tinción deseada.

→Tinción con hematoxilina-eosina: con esta tinción pretendemos una visión general de las regiones biopsiadas elegidas para contrastar las estructuras histológicas según el tipo de lesión. Emplearemos el método convencional: inmersión unos 5 minutos en hematoxilina de Mayer (comercial), tras la cual se lava abundantemente con agua corriente (20 minutos/ 1 hora) y se sumerge en alcohol durante 30 segundos, controlando la tinción de los núcleos con microscopio, y una vez se han teñido, se lavan en abundante agua corriente y se sumergen en la cubeta de eosina durante unos 30 segundos; después se vuelven a lavar con agua corriente y se meten a alcohol de 70°C. A continuación se deshidratan, se aclaran con agua y se montan con DPX (8711 Difco). Con esta tinción conseguimos teñir los núcleos azul-violeta, los vasos en rosa y el resto de tejidos en diversas gradaciones de rosa.

Para las muestras de lesiones orales elegiremos la Tinción con hematoxilina-eosina.

#### ✓ Para **TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS**

\_ Preparación del tejido: el estudio inmunohistoquímico pretende realizarse con el método “En Vision”, que es un método inmunohistoquímico desarrollado por la casa Dako, con una alta sensibilidad, y que puede aplicarse tanto a secciones de tejido incluidas en parafina como a secciones de tejido congelado. Esta técnica “En Vision” se basa en la unión del anticuerpo secundario a un polímero de dextrano de gran tamaño, que puede llevar asociadas hasta ocho moléculas de peroxidasa, lo que amplía enormemente la señal. Las piezas se fijarán de 6 a 12 horas en una solución de formaldehído al 10%, neutralizado con metanol purísimo (Panreac 143091). Una vez fijadas, se pasan directamente (sin lavar) al alcohol, para seguir el proceso estándar de inclusión en parafina. Los cortes se recogen en portas gelatinizados, se dejan secar toda la noche y al día siguiente se meten en estufa a 56°C durante unos minutos. Se llevan a xilol 20 minutos (dos pasos de 10 minutos cada uno), para seguir la rehidratación de forma convencional.

Técnica: método En Vision DAko®. Para una mejor recuperación antigénica se colocan las preparaciones en un cestillo dentro de una olla a presión, en la que se pone: 200cc de tampón citrato (Dako S2031) + 1800cc de agua destilada; es importante controlar el pH = 6 con NaOH 0.2 M. Cuando se inicia la ebullición se cuentan 3 minutos, se enfría hasta perder presión y se deja 20 minutos más; después se lavan los cortes con agua destilada durante 3 minutos.

La peroxidasa endógena se inhibe con un bloqueante (Dako S2001), colocando una gota encima de cada corte, y lavando en PBS o solución tampón buffer (3 lavados de 3 minutos cada uno). Se diluye el anticuerpo primario, según concentraciones indicadas, utilizando el diluyente de anticuerpos (Dako S2022), y se pone una gota del anticuerpo primario encima de cada corte. Se incuba de 30 minutos a 2 horas en cámara oscura. Después de 3 lavados de 3 minutos cada uno en PBS, se coloca una gota del anticuerpo secundario, conjugado con el polímero enzimático, encima de cada corte (Dako K5007) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Realizados 3 lavados en PBS de 3 minutos cada uno se procede al revelado mediante DAB (Diaminobencidina) 1 ml + cromógeno 1 µl (Dako K3468) colocando una gota encima de cada corte durante 10 minutos. Después de 3 lavados en agua destilada, se contrasta el tejido con hematoxilina de Harris 10 segundos, para, a continuación deshidratar los cortes y montar con DPX.

✓ Para **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (M.E.)**

Preparación del tejido: las piezas de tejido para M.E., se retallan controladamente bajo lupa y se fijan en 1 ml de glutaraldehído al 2.5% + 4 ml de solución de tampón Millonig (fosfato monosódico al 2.26%, hidróxido sódico al 2.5%, glucosa al 5.4%, cloruro cálcico al 1%) a pH= 7.3. Las piezas permanecen en esta mezcla de 4 a 5 horas a temperatura de 4°C tras las cuales, se lavan durante 20 minutos con solución de tampón de Millonig; después pueden permanecer en la nevera durante meses.

Técnica:

→ Inclusión: se realiza durante 5 días:

PRIMER DÍA: fijación durante 2 horas en Fijador de Palade (una parte de solución de osmio al 2%, una parte de solución tampón). La solución de osmio supone 1 gr de osmio, 25 ml de agua destilada; se realiza siempre bajo campana extractora por la gran toxicidad de los vapores, dejándola posteriormente en frasco de cristal oscuro herméticamente cerrada y a 4°C. La solución tampón supone 10 ml de acetato sódico al 1.904%, 10 ml de Veronal sódico al 2.58%, 10 ml de ácido clorhídrico 0.1N y 20 ml de agua destilada. Segudamente se lavan las piezas con tampón de Palade en 3 tandas de 15 minutos cada una. Se procede a la inmersión en cubetas de acetona de gradación ascendente (30% durante 15 minutos, al 50% 2 tandas de 15 minutos, 70% 2 tandas de 15 minutos). El contraste se realiza con acetato de uranilo (2 g de uranilo en 100cc de

acetona al 70%, se agita durante 1 hora completamente a oscuras), y se dejan las piezas hasta el día siguiente. Antes de ser utilizada la solución del acetato de uranilo debe ser centrifugada durante 20 minutos a 3000 revoluciones.

**SEGUNDO DÍA:** se realiza la inmersión de las muestras en 2 tandas de acetona al 90% durante 15 minutos cada una, 2 tandas de acetona al 100% una de 15 minutos y otra de 30 minutos, tras la cual se introduce en sulfato de cobre, en saturación con acetona al 100% durante 30 minutos. Posteriormente otros 30 minutos en sulfato de cobre, 2 tandas de 60 minutos en óxido de propileno, en nevera y la inclusión en araldita I (endurecedor 10 ml + plastificante 0.15 ml + resina 10 ml). El proceso continúa con la inmersión en 3 partes de óxido de propileno + 1 de araldita I 120 minutos, 120 minutos en 2 partes de óxido de propileno + 3 partes de araldita I hasta el día siguiente.

**TERCER DÍA:** inclusión en araldita I durante 30 minutos, 120 minutos incluida en araldita I en estufa a 50°C, quedando las piezas inmersas en araldita hasta el día siguiente.

**CUARTO DÍA:** inclusión en araldita II (endurecedor 10 ml, acelerador 0.4 ml, plastificante 0.15 ml, resina 10 ml) durante 30 minutos, a continuación en araldita II en 2 tandas, estufa a 50°C durante 30 minutos y una segunda tanda en estufa 60 minutos. Se incluyen en cápsulas, dejando en estufa a 70°C durante 48 horas como mínimo. Y por último, la salida de la inclusión, en la que se sacan los bloques de araldita con las piezas incluidas de las cápsulas y se las etiquetaba convenientemente según la rutina del laboratorio de microscopía electrónica.

Corte: El tallado de los bloques se realiza con un piramidotomo, eliminando la araldita sobrante hasta llegar a la pieza, para el corte se utilizan cuchillas de vidrio con balsa recoge cortes. Los cortes semifinos, de 1-0.5  $\mu\text{m}$ , se realizan con cuchilla de diamante, en un ultramicrotomo RMC (MT XC Biotechnology Tools, Arizona)

Tinción de los cortes: se realiza con gotas de azul de toluidina (agua destilada 50 ml, tetraborato de sodio 0.5 g, azul de toluidina 0.25 g, agitado durante dos horas y filtrado), colocadas en los cortes semifinos sobre plancha caliente.

Selección a microscopio óptico de los cortes semifinos y realización de los ultrafinos: los cortes semifinos se observan en el M. óptico, se selecciona la zona de interés y se retallan los bloques eliminando el resto. Los cortes ultrafinos se cortan a 600  $\text{Å}$ , se

recogen en la balsa con la cuchilla en alcohol al 30% y se colocan en las rejillas de cobre de 200 retículas.

\_ Contraste:según el método Reynolds: inmersión en el reactivo de plomo (1.33 g de nitrato de plomo, 1.76 g de citrato sódico en 30 ml de agua destilada desionizada, 8 ml de hidróxido sódico 1N y se diluye hasta 50 ml pH=12) durante 5-30 minutos y lavar con hidróxido sódico 0.02N de 2 a 5 minutos; posteriormente se lavan varias veces con agua destilada.

La observación de las muestras obtenidas se realiza en un microscopio electrónico de la casa GEOL (JM-1010), acoplado a una cámara digital de la casa GATAN Inc. (Pleasanton, CA).

Tras el estudio histopatológico, dispondremos de los diagnósticos de confirmación de cada paciente, y aquellos que hayan sido diagnosticados de COCE, se les llevarán a cabo todas las pruebas complementarias y el protocolo prequirúrgico de rutina del servicio (analítica sanguínea, escáner, resonancia magnética si fuese necesario,etc).

Hemos determinado que para el estudio al microscopio electrónico, seleccionaremos 2 muestras de cada subtipo de lesión potencialmente maligna, 2 de COCE en estadio inicial (I ó II) y 2 de COCE en estadio avanzado (III ó IV); las muestras de COCE se tomarán intraoperatoriamente, el día que el paciente sea intervenido y esté bajo anestesia general.

#### E/ Monitorización del seguimiento

Se programarán revisiones periódicas para todos los pacientes con una frecuencia aproximada de 3-4 meses (dependiendo de la evolución individual de cada uno), en las que se irán tomando de nuevo muestras salivales.

\_ Pacientes con Lesiones Potencialmente Malignas: sus controles se programarán con el objetivo también de repetir la toma de biopsia si fuera necesario por sospecha clínica.

\_ A los pacientes ya intervenidos de COCE, se les clasificará atendiendo a la modalidad de terapia recibida (Cirugía exclusivamente, Cirugía y Radioterapia o Cirugía y Quimioterapia) y se les citará para la recogida de muestras salivales. Es interesante la observación de estos pacientes, porque pretendemos ver cómo cambian los perfiles de Biomarcadores Salivales y si tienden a parecerse al de los sujetos sanos.

En el segundo y tercer año del estudio, las revisiones pueden espaciarse más en el tiempo, en función del pronóstico, evolución y resultados del seguimiento en el primer año.

*De esta forma, a lo largo de los tres años de duración del estudio, vamos a poder correlacionar los diferentes perfiles de biomarcadores salivales con la transformación neoplásica de algunas lesiones potencialmente malignas, observando posibles diferencias cualitativas y cuantitativas en el momento más próximo a la carcinogénesis.*

#### F/ Variables del estudio (principales y secundarias)

##### 1. Presencia de Biomarcadores Salivales:

- \_ Ac antiP53
- \_ Ki 67
- \_ VEGF
- \_ COX-2
- \_ MicroRNA: MiR-21, MiR-181b y MiR-345



- \_ Citoquinas: IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6
- \_ CD 44
- \_ EGF
- \_ Transferrina
- \_ MicroRNA de B<sub>2</sub>M, MAP<sub>2</sub> y FTH<sub>1</sub>.



2. Carga viral (Virus Papiloma Humano) tanto en muestras de COCE como en lesiones potencialmente malignas.

#### G/ Determinación y Cuantificación de Biomarcadores Salivales

Los Biomarcadores Salivales que queremos medir en saliva son en su mayoría Proteínas y también algún ácido nucleico.

→ Proteínas: para la separación de proteínas emplearemos la técnica de electroforesis o la Cromatografía en fase líquida (HPLC) y posteriormente la técnica de Espectrometría de masas para su cuantificación.

La HPLC es una técnica de separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Los componentes de la mezcla son llevados a través de la fase estacionaria por el flujo de una fase móvil líquida y la separación de los mismos se basa en cuánto tiempo se retienen, ya que cada componente viaja a una velocidad diferente y es por lo que se separan en diferentes momentos en el tiempo. Existe un tipo de HPLC conocido como *fase reversa*, cuya aplicación clínica es la determinación de aminoácidos, péptidos y ácidos nucleicos, que también puede suponer una técnica candidata en nuestro trabajo.

Otra opción es el empleo también de Técnicas de Inmunoensayo como ELISA (ensayo inmunoenzimático) para la determinación de proteínas en la saliva, tras la separación por tamaño mediante electroforesis con un sistema automático del tipo Multiplex.

→ Ácidos nucleicos: para su determinación emplearemos MICROMATRICES, cuya aplicación es detectar de forma simultánea la expresión de muchos genes. Consisten en sondas de ADN fijadas a un soporte sólido, como una membrana de nailon o un portaobjeto. En el caso de nuestros biomarcadores a determinar (micro ARN), necesitaremos transformarlo en una doble cadena de ADN complementario con la transcripción inversa o retrotranscripción, para que posteriormente, tenga lugar la hibridación. La transcripción inversa, en presencia de un nucleótido marcado produce moléculas de DNA con una marca fluorescente. La fluorescencia de cada punto se evalúa con barrido microscópico.

Los datos de expresión génica obtenidos a partir de micromatrices son herramientas, en general, muy eficaces para determinar la naturaleza de las dianas terapéuticas en el cáncer.

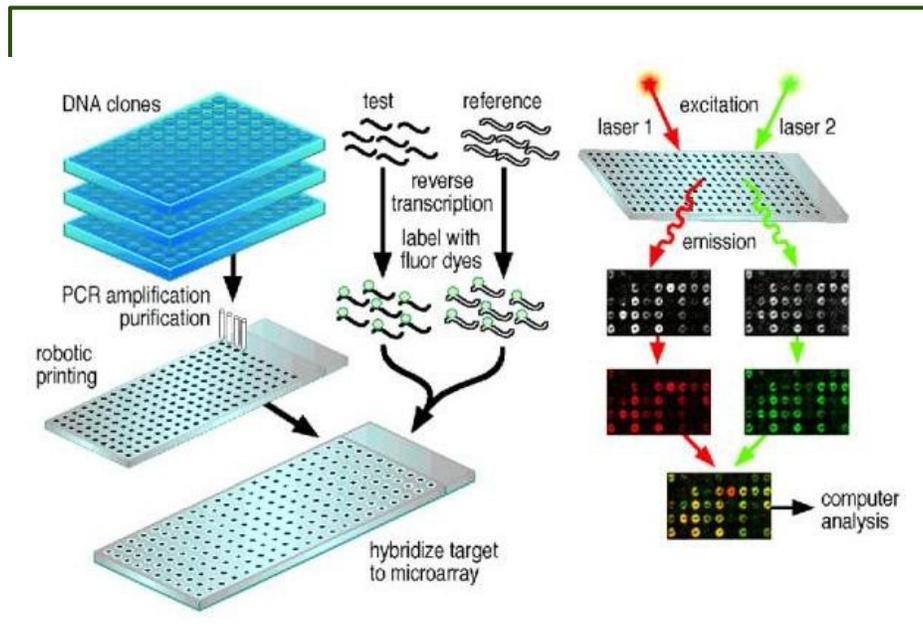
También pueden identificarse transformando el ARN de partida en ADN complementario mediante Retrotranscripción y posteriormente empleando la Reacción en Cadena de la enzima Polimerasa (PCR) convencional para detectar la expresión o no del gen en cuestión ó PCR cuantitativa para cuantificar el ADN<sub>c</sub> al gen de interés.



*Figura 6. Cromatógrafo de Fase Líquida*



*Figura 7. Espectrómetro de masas*



*Figura 8. Micromatrices para la determinación de ácidos nucleicos.*

#### H/ Análisis de Datos estadísticos:

\_ Análisis descriptivo: se calculará la distribución de frecuencias de los porcentajes de cada categoría para cada variable cualitativa. Las variables estudiadas cuantitativas serán exploradas con la prueba de conformidad de Kolmogorov-Smirnov (prueba de bondad de ajuste a una distribución normal) y se calcularán indicadores de tendencia central (media o mediana) y de dispersión (desviación estándar o percentiles).

\_ Análisis bivariado: la asociación entre los diferentes parámetros y los grupos de estadio en cada patología se investigará mediante pruebas de contraste de hipótesis, con comparación de proporciones cuando ambas variables sean cualitativas (chi-cuadrado, prueba exacta de Fisher) y comparaciones de medias cuando una de ellas sea cuantitativa (t de Student, ANOVA), y si no siguen distribución normal el test de la U de Mann-Whitney o el de Kruskal-Wallis. Para comparaciones de los parámetros en el mismo sujeto al inicio y a los 6 meses, se emplearán los correspondientes test para muestras apareadas.

Se completará el análisis con la construcción de modelos de regresión logística, tomando como variable dependiente el estadio e independientes aquellas que presentaran diferencias estadísticamente significativas en los contrastes anteriores, controlando además por otras variables demográficas como sexo y edad.

Además se emplearán técnicas de agrupación de datos (análisis discriminante) tomando los grupos de clasificación según resultados previos y al mismo tiempo se determinarán los parámetros de Sensibilidad, Especificidad, Reproducibilidad y Seguridad (valor predictivo positivo o negativo) para valorar de forma objetiva la validez diagnóstica según los resultados obtenidos.

El análisis se realizará tomando como nivel de significación  $p < 0.05$

I/ Limitaciones del estudio: el estudio vendrá limitado en función del número de pacientes con el que podamos contar en un período de tres años.

J/ Consideraciones éticas: la obtención de saliva del paciente no es una prueba invasiva ni dolorosa y se realizará al mismo tiempo que la revisión rutinaria que se le haga durante las sucesivas visitas médicas. Se solicitará la aprobación de este proyecto al CEICA. El paciente estará debidamente informado del estudio que se va a realizar y se solicitará su aceptación de participación mediante la hoja de Consentimiento Informado correspondiente que se les entregará junto con el díptico informativo. Las muestras serán custodiadas debidamente por la investigadora de este proyecto.

## PLAN DE TRABAJO

Haremos un plan de trabajo por *meses* (36 meses de duración del proyecto completo) según se establezca la frecuencia de las revisiones y por tanto la frecuencia de las pruebas o por *trimestres*.

### ✓ Propuesta de Cronograma por Meses y Objetivos

	DURACIÓN (meses)											
<b>Objetivos Principales</b>												
<b>Objetivos Secundarios</b>												

### ✓ Propuesta de Cronograma por Trimestres

<u>TRIMESTRES</u>	<u>TAREAS PROPUESTAS</u>
<u>1</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Seleccionar 20 pacientes de la Base de Datos del Hospital que hayan sido intervenidos quirúrgicamente de COCE y que estén en protocolo de revisión para recogerles muestras salivales. Estos pacientes serán citados cada tres meses para su revisión rutinaria y para la toma de biopsia si fuese necesario; en caso de sospecha de malignidad se recogerá también muestra de saliva.</u></li> <li>- <u>Seleccionar pacientes de primeras visitas de la Consulta de Cirugía Maxilofacial que acudan por otros motivos (valoración de cordales, patología articular) para ir formando el grupo control de sanos e ir recogiendo también sus muestras salivales.</u></li> <li>- <u>Seleccionar pacientes de primeras visitas con posibles lesiones malignas (COCE) o potencialmente malignas (bajo sospecha clínica), para recoger muestras salivales y almacenarlas hasta obtener los resultados de anatomía patológica tras las biopsias pertinentes. (Lo ideal es tomar las muestras de saliva ANTES de realizarles la biopsia).</u></li> <li>- <u>Estudio de todas las muestras al M.O. para su diagnóstico y tratamiento.</u></li> </ul>
<u>2</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Continuar con la selección de casos hasta completar los 200 necesarios para la muestra global del estudio; se les recogerá la muestra salival y será almacenada. LO QUE SE PRETENDE es que con una frecuencia trimestral se revise a los pacientes agrupados con lesiones potencialmente malignas para analizar su saliva ante la sospecha de malignidad, a aquellos ya intervenidos</u></li> </ul>

	<p><u>de COCE para descartar posibles recidivas.</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Realizar intervenciones quirúrgicas de todos los casos de COCE y en el acto operatorio realizar una segunda biopsia para su caracterización al M.E.</u></li> <li>- <u>Procesado de las muestras al M.E.</u></li> <li>- <u>Realización de Técnicas de HPLC / Espectrometría de Masas y PCR para la determinación del perfil proteico salival y de los ácidos nucleicos presentes en aquellas muestras salivales seleccionadas de todos los pacientes que definitivamente han sido incluidos en el estudio.</u></li> <li>- <u>Conforme vamos estudiando los casos, será necesario agrupar y clasificar los grupos de pacientes para homogeneizar al máximo las muestras (clasificación por grupos de edad, sexo, tipos de hábitos, estadios tumorales, naturaleza de lesiones premalignas, terapias recibidas en el tratamiento del cáncer para el estudio de las muestras salivales en lesiones recidivantes...).</u></li> <li>- <u>LO MÁS INTERESANTE DEL ESTUDIO ES CONTROLAR RIGUROSAMENTE CADA 3 MESES A LOS PACIENTES CON LESIONES DE NATURALEZA PREMALIGNA, para en el momento en que exista una sospecha de transformación tumoral, recoger muestra salival y confirmar diagnóstico.</u></li> </ul>
<u>3</u>	<u>IDEM AL SEGUNDO TRIMESTRE y Observación de las Muestras al M.E</u>
<u>4</u>	<u>IDEM AL SEGUNDO Y TERCER TRIMESTRE.</u>
<u>5</u>	<u>Es posible que en algún caso en vez del empleo de técnicas de HPLC / Espectrometría de Masas, sea necesario el uso de Técnicas InmunoHistoQuímicas para la determinación Proteica. Al comienzo del segundo año del estudio será necesario contar con la colaboración del Departamento de Estadística de la Facultad de Medicina de Zaragoza para que nos aleccionen en el tratamiento de todos los datos que vamos recabando y sobre cómo debemos agrupar y ordenar toda la información obtenida.</u>
<u>6</u>	<u>Ademas de continuar con la recogida de muestras salivales, será importante ir comparando resultados en la cuantificación de proteínas y ácidos nucleicos. Se continuará con el estudio de las muestras al M.E. y la comparación entre las mismas, según tipo y estadio de lesión.</u>
<u>7</u>	
<u>8</u>	<u>A lo largo de estos 6 trimestres realizaremos lo mismo que en los anteriores y avanzaremos en el estudio de todas las muestras al M.E. Se mantendrá la frecuencia trimestral de revisión para los pacientes con lesiones potencialmente malignas y para aquellos ya intervenidos que van siendo controlados por una posible recidiva, pueden programarse las revisiones de forma semestral, según criterio médico.</u>
<u>9</u>	
<u>10</u>	
<u>11</u>	
<u>12</u>	

En el PRIMER TRIMESTRE, los cirujanos maxilofaciales que vayan a realizar las biopsias y las posteriores intervenciones quirúrgicas de los pacientes, serán instruidos para la toma de biopsia de forma específica según las muestras vayan a ser estudiadas al Microscopio Óptico (toma de biopsia de forma rutinaria) o al Microscopio Electrónico (en una segunda fase del estudio). Para minimizar el daño a los pacientes, aquellos que sean diagnosticados de COCE tras el estudio de la muestra al M.O., se les llevará a cabo una segunda biopsia específica para ser caracterizada al M.E. de forma *intraoperatoria*, es decir, en el mismo acto terapéutico de erradicación del tumor. Para el estudio al M.E. destinaremos 2 muestras de Leucoplasia Oral (LO) sin displasia, 2 de LO con displasia leve, 2 LO con displasia moderada, 2 de eritroplasia, 2 de Liquen Plano Oral, 2 de Queilitis Actínica, 2 lesiones de COCE en estadios I ó II, 2 COCE en estadios III ó IV y 2 muestras de COCE recidivante.

De FORMA PARALELA, a lo largo de los tres años aproximados de duración del proyecto, se llevará a cabo la actualización y estudio de todos los artículos relacionados con el tema que vayan siendo publicados por otros grupos o líneas de investigación.

Lo que PRETENDEMOS es que cada paciente con una lesión de COCE o con una lesión de naturaleza premaligna sea seguido y revisado con una frecuencia trimestral a lo largo de tres años y simultáneamente le sean tomadas muestras salivales que nos ayuden a estudiar el perfil de biomarcadores que existen en cada fase de la enfermedad.

Cada paciente dispondrá de un díptico informativo donde diseñaremos una cartilla individual de visitas, para anotar y registrar cada cita del paciente y lo que se le realiza en cada una de las visitas trimestrales. Estableceremos un día de la semana para llevar a cabo las recogidas de las muestras salivales, de forma que, cada semana agrupemos en un solo día a todos aquellos pacientes que requieran su revisión y toma de muestras trimestral.

Se asignará una sala del Hospital Miguel Servet para la toma y recogida de muestras salivales y un espacio del laboratorio específico para la congelación de las mismas hasta el momento de analizarlas o desecharlas (cuando el paciente sea excluido del estudio).

## **FINANCIACIÓN**

Solicitaremos financiación para el estudio al Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), especialmente para desarrollar las técnicas de HPLC, Espectrometría de masas y PCR;

Paralelamente estamos en contacto con el Institute for Research in Biomedicine (IRB) de Barcelona, para presentarles nuestra propuesta de trabajo y requerir su colaboración; en concreto, hemos establecido comunicación con el Dr. Salvador Aznar Benitah, que lidera el grupo de investigación de “Stem cells and Cancer”.

También disponemos de una persona de contacto en el Instituto Universitario de Investigación de Computación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) que puede colaborar con nosotros en las técnicas de determinación y cuantificación de proteínas salivales.

Estamos confeccionando de forma aproximada un presupuesto que incluya todos los posibles gastos mínimos de material, técnicas de determinación de proteínas y ácidos nucleicos, procesado y observación de muestras al Microscopio Electrónico ...etc.

MATERIAL PARA EL ESTUDIO Y COSTES APROXIMADOS

CONCEPTO	CUANTÍA
<b><u>FUNGIBLE:</u></b> _Reactivos generales de laboratorio para muestras salivales.	--
<b><u>MUESTRAS para estudio anatomo-patológico:</u></b> _Preparación y Observación de cortes para M.E (Servicio Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza): 12 muestras de lesiones premalignas, 4 muestras de COCE y 2 de carcinoma oral recidivante.	--
<b><u>Determinación y cuantificación Proteica en HPLC y Espectrómetro de masas de 4 proteínas por muestra salival.</u></b>	--
<b><u>PCR a partir de ácidos nucleicos de muestras salivales.</u></b>	--
<b><u>VIAJES Y DIETAS (difusión de resultados de investigación)</u></b>	--
<b><u>OTROS GASTOS VARIOS (publicaciones, dípticos informativos, envío material...)</u></b>	--
<b><u>TOTAL</u></b>	

**TRANSFERENCIA DE RESULTADOS A LA PRÁCTICA CLÍNICA**

La realización de este proyecto tiene dos fases bien definidas: una de *investigación básica* que comprende el estudio ultraestructural de los tumores que aportará sin duda datos de interés

fundamentales en el conocimiento de la biología del cáncer oral y una segunda fase que aportará datos de enorme interés en el *diagnóstico precoz* de estas lesiones, ya que podremos:

1. Realizar un screening en Cáncer Oral, que sea capaz de discriminar a aquellos pacientes de riesgo que presentan lesiones potencialmente malignas y conocer el momento de probable malignización mediante el estudio de los Biomarcadores salivales.
2. Diagnosticar el COCE en estadios iniciales con la consecuente mejora en el pronóstico y supervivencia de los pacientes.
3. Desarrollar una herramienta para determinar el posible riesgo de recurrencia o recidiva de COCE en pacientes ya diagnosticados y tratados con anterioridad de carcinoma oral de células escamosas.

Por todo ello pensamos que la ejecución de este proyecto es de gran interés no sólo en el ámbito científico, sino que también sus resultados podrán ser aplicables en la práctica clínica.