



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA  
Departamento de Estomatoloxía

# **ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES INSTRUMENTOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS CITOLÓGICAS DE LA CAVIDAD ORAL: CYTOBRUSH, ORAL CDx Y CURETA DERMATOLÓGICA**

M<sup>a</sup> Dolores Reboiras López

Santiago de Compostela, Julio del 2010





UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA  
Departamento de Estomatoloxía

D. ABEL GARCÍA GARCÍA, Profesor Titular de Cirugía Oral y Maxilofacial de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela; D. JOSÉ MANUEL GÁNDARA REY, Catedrático de Medicina Oral de la Universidad de Santiago de Compostela; D. JOSÉ MANUEL SOMOZA MARTÍN, Doctor en Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela

**CERTIFICAN:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES INSTRUMENTOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS CITOLÓGICAS EN LA CAVIDAD ORAL: CYTOBRUSH, ORAL CDx Y CURETA DERMATOLÓGICA” ha sido elaborada, por Dña MARÍA DOLORES REBOIRAS LÓPEZ bajo nuestra dirección, y hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, se expide la presente certificación en Santiago de Compostela, a 12 Julio de 2010

Prof. Dr. D. Abel García García

Prof. Dr. D. José Manuel Gándara Rey

Dr. D. José Manuel Somoza Martín



## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas y los motivos por los que tengo que expresar mi agradecimiento, y estoy segura que no voy a poder ser capaz de resumirlos en palabras. Espero no olvidarme de nadie, en caso contrario perdonarme.

Al Profesor Abel García García, principal promotor de esta Tesis Doctoral, por su gran dedicación a la docencia y haber sabido contagiarme de su interés e ilusión por la investigación, por la confianza y amistad que me ha demostrado a lo largo de estos años.

Al Profesor José Manuel Gándara Rey, por su gran aportación docente a mi formación y por su apoyo incondicional, a lo largo de los años, tanto a nivel profesional como personal.

Al Dr. Manuel Somoza Martín, por haber insistido tantas veces en que hiciese la Tesis Doctoral y por tu ayuda constante para poder llevar a cabo este trabajo. Nuestra amistad empezó como compañeros de máster y ahora eres coodirector de este trabajo: eres para mí un ejemplo a seguir.

Al Dr. José Ramón Antúnez López, por su inestimable colaboración en el estudio citológico de esta investigación.

Al Dr Francisco Barros Angueira, por su apoyo y dedicación en el estudio molecular de esta Tesis Doctoral.

A Pilar Gayoso Diz por su ayuda en el estudio estadístico de este trabajo. Gracias por el tiempo que me has dedicado de una manera altruísta y por los ánimos que me has dado en los momentos difíciles.

A Mario Pérez Sayáns, que no para de darle vueltas a la “doble hélice”. Muchas gracias por tu apoyo incondicional a lo largo de este trabajo. Es para

mí un placer “investigar” contigo y espero que sigamos haciendo muchos trabajos juntos.

A Pilar Gándara Vila, compañera y amiga, por estar dispuesta a prestar ayuda de forma desinteresada y por haber asumido parte de mis funciones en el máster a lo largo de este año.

A María José Moreno, por ser como eres: una persona que se preocupa de que la gente que te rodea se sienta bien. Gracias por saber escuchar y aconsejarme en cada momento.

A los alumnos del Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología, en especial a Flavio, por la ayuda en la organización de la recogida de muestras citológicas y por comprender que no os haya dedicado el tiempo necesario en el máster a lo largo de este año.

A David, por tener la suerte de compartir mi vida con una persona que me comprende y me apoya día a día en mis decisiones.

A mi familia, por su comprensión y apoyo incondicional a lo largo de mi vida, tanto en este trabajo como en otros retos que he emprendido. Sin vuestra ayuda no hubiese sido posible. A mi padre, aunque ya no esté sé que me hubiese apoyado de la misma forma.

A JÓse y a Mili, porque sé que siempre estaréis ahí cuando os necesite.

A mis amigos, Lucía y Alberto, que han aguantado como campeones mis conversaciones “monotema” a lo largo de este último año y me han brindado su ayuda.

Muchas gracias a todos.

# ÍNDICE





II.3.1.3.2. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR): .....	84
II.3.2- CITOLOGÍA EXFOLIATIVA: .....	90
II.3.2.1-CONCEPTO .....	90
II.3.2.2 -EVOLUCIÓN HISTÓRICA: .....	91
II.3.2.3-CITOLOGÍA CERVICO-UTERINA .....	93
II.3.2.4- CITOLOGÍA EXFOLIATIVA ORAL:.....	96
II.3.2.4.1. TOMA DE MUESTRAS .....	98
II.3.2.4.2. ANALISIS CITOLÓGICOS: .....	102
II.3.2.5 CITOLOGÍA EXFOLIATIVA EN BASE LÍQUIDA:.....	106
II.4 - ANÁLISIS MOLECULAR EN CITOLOGÍA EXFOLIATIVA DEL COCE: .....	112
II.4.1- MARCADORES MOLECULARES CITOLÓGICOS:.....	112
II.4.2- ANÁLISIS DEL ARN: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA:.....	114
<b>III. MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>121</b>
III. 1 - POBLACIÓN DE ESTUDIO:.....	123
III. 2- TOMA DE MUESTRAS: .....	124
III.3.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS .....	127
III.3.1.- ANÁLISIS CITOLÓGICO: .....	127
III.3.2.- ANÁLISIS MOLECULAR:.....	129
III.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:.....	132
III.5.- ASPECTOS ÉTICOS:.....	133

<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>135</b>
IV. 1- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS:.....	137
IV.2- ANÁLISIS CITOLÓGICO .....	139
IV.3- ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS .....	141
IV.3.1- Valoración cualitativa:.....	141
IV.3.2: Valoración cuantitativa:.....	144
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>147</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>169</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>173</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>213</b>
ANEXO 1: Consentimiento Informado.....	215
ANEXO 2: Publicaciones .....	221



# **I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



El COCE (carcinoma oral de células escamosas) es la sexta neoplasia maligna más frecuente del mundo. Se diagnostican más de 500.000 nuevos casos anualmente y aproximadamente el 75% de los casos corresponden a los países desarrollados (1). A pesar de todos los avances en el tratamiento del cáncer oral combinando cirugías resectivas, quimioterapia y radioterapia, el ratio de supervivencia a los 5 años es menor del 50% (2).

Sin embargo el cáncer oral se puede curar si se detecta precozmente. La mayoría de los COCEs se desarrollan a partir de lesiones premalignas y pequeños cambios en la mucosa oral normal que son asintomáticas y que el dentista observa en la exploración oral como hallazgo casual. A pesar de que la cavidad oral es de fácil acceso, tanto visualmente como para realizar las pruebas complementarias necesarias para el diagnóstico, a menudo pasa mucho tiempo antes de que lesiones con displasia sean diagnosticadas (3).

Hasta el año 2000 la biopsia junto con el estudio histológico de las lesiones parecía ser el único método aceptado para evaluar definitivamente las lesiones orales sospechosas. Esta técnica presenta inconvenientes: la mayoría de los dentistas no tienen la suficiente habilidad quirúrgica para poder llevar a cabo una biopsia y necesitan remitir al paciente a un especialista lo que conlleva un retraso en el diagnóstico. Por otro lado se trata de una técnica invasiva que necesita anestesia y no es muy aceptada por el paciente, en algunos pacientes supone incluso cierto riesgo (por ejemplo los tratados con anticoagulantes). Además la literatura muestra una insuficiente reproductibilidad de los grados histológicos de displasia epitelial influyendo la subjetividad del anatomopatólogo (2).

Por estas razones se han intentado buscar métodos de diagnóstico que faciliten el diagnóstico precoz del carcinoma oral, como fue la aplicación de la citología convencional a la cavidad oral. Se trata de una técnica no

invasiva, muy aceptada por el paciente y de relativa facilidad para ser llevada a cabo por parte de los odontólogos generales. Actualmente se utiliza la citología en base líquida o monocapa que facilita al anatomopatólogo la interpretación de las muestras eliminando artefactos y proporcionando una mayor nitidez a la preparación.

Por otro lado, debido a la aceptación de que la etiología del carcinoma oral de células escamosas es la consecuencia de la adquisición de trastornos genómicos celulares que promueven la malignización, en las últimas décadas, la identificación de marcadores tumorales en el COCE con el objetivo de predecir su comportamiento y evolución clínica ha recibido un especial interés. Ciertamente, el conocimiento de los distintos mecanismos biológicos que participan en la carcinogénesis, como la proliferación y crecimiento celular y la capacidad de invasión del tumor pueden servir como métodos diagnósticos auxiliares y de base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Es por ello imperativo el estudio de los carcinomas epidermoides de la cavidad oral a un nivel genético, y caracterizar los cambios responsables de la carcinogénesis y de la conducta de estas neoplasias. Los recientes avances en el conocimiento del genoma humano, junto con el desarrollo de técnicas de exploración genética de alta capacidad, han revolucionado las vías mediante las que los investigadores pueden estudiar la patogénesis de las neoplasias.

En el año 2005 realizamos un estudio con el *microarray* de ADN “*Atlas Glass Human 3.8 I Microarray*” sobre la expresión genética diferencial entre el carcinoma oral de células escamosas y la mucosa oral normal. Con este *microarray*, que nos permitía estudiar más de 3.000 genes, observamos que existía un determinado número de genes que aparecían sobreexpresados en el COCE con respecto al tejido oral normal (4). Aplicando técnicas estadísticas muy restrictivas entre estos hallazgos se seleccionaron seis genes que mediante PCR cuantitativa en tiempo real se confirmó su sobreexpresión, siendo uno de ellos el gen ATP6V1C1 (5).

Seguidamente nos planteamos la posibilidad de valorar la expresión genética del gen ATP6V1C1 en citología oral, debido al reciente auge de esta técnica, y poder así establecer la sobreexpresión de este gen como índice de transformación maligna de ciertas lesiones de la cavidad oral.

Con esta finalidad obtuvimos muestras citológicas de la mucosa oral enfrentándonos con el problema de que el ARN que se podía extraer de estas muestras para el estudio de la expresión genética era insuficiente o de mala calidad. Nosotros creemos que esto es debido a que usando el Cytobrush como instrumento de cepillado sólo recogemos células de capas superficiales del epitelio donde el ARN ya está degradado.

### **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Nuestra hipótesis de trabajo es que usando técnicas o instrumentos para citología exfoliativa de la cavidad oral más abrasivos podemos llegar a obtener incluso células de la capa basal del epitelio con ARN más conservado y poder así llevar a cabo estudios de expresión genética del epitelio oral.

### **OBJETIVOS:**

- 1- Comparar la calidad de las muestras obtenidas con tres instrumentos de citología exfoliativa diferentes: Cytobrush (Med-Scand Medical, Malmo, Suiza), Cureta dermatológica (Stiefel, Madrid, España) y cepillo del kit Oral CDx (Cdx Laboratories, Suffern, Nueva York , USA) para el estudio citológico en base líquida.
- 2- Comparar la cantidad y calidad de ARN obtenido de las muestras con los tres instrumentos para el estudio de expresión genética.



## **II. INTRODUCCIÓN**



## **II.1- CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS:**

### **II.1.1- CONCEPTO:**

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo. Es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células, conocido como tumor, y la posterior adquisición por parte de las mismas de la capacidad invasiva, o sea, metastásica. Se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas; que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir los mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular (6).

El COCE o carcinoma oral de células escamosas oral es una neoplasia maligna que deriva del epitelio plano poliestratificado que tapiza la cavidad oral. Se trata de una enfermedad compleja con una gran heterogeneidad desde el punto de vista clínico, patológico, fenotípico y biológico (7). Se acepta actualmente que se trata de un proceso multiseccional que implica una serie de alteraciones irreversibles y complementarias en los genes que controlan el crecimiento, la muerte y la diferenciación celular (8).

La definición exacta de cáncer oral con respecto a su localización es una tarea difícil de llevar a cabo debido a la dificultad para definir los límites de la cavidad oral. En la mayoría de los trabajos los tumores de labio y glándulas salivales no se incluyen en el término de cáncer oral debido a que su origen histológico es distinto. En otros trabajos, el cáncer de orofaringe se estudia conjuntamente con el cáncer intraoral (9).

En la última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD) de la OMS, Moore y cols.,(10) sugieren que las lesiones asentadas en

la porción móvil de la lengua, suelo de boca, mucosa yugal, mucosa del reborde alveolar superior e inferior así como en paladar deben de ser agrupadas bajo la denominación de cáncer oral. Por lo tanto el cáncer de labio, orofaringe y glándulas salivales deben de ser analizados separadamente. En este trabajo, también serán éstas nuestras directrices a la hora de estudiar el cáncer oral.

### **II.1.2- EPIDEMIOLOGÍA:**

A pesar de los grandes avances en la investigación del COCE, esta enfermedad sigue representando un grave problema de salud pública en muchos países. Es la sexta neoplasia maligna que se diagnostica en le mundo, por lo que constituye un serio problema de salud pública (1). Su incidencia ha ido aumentando de forma progresiva desde el año 1970 (11). Se estima que más de 500.000 nuevos casos se diagnostican anualmente y el 75% se encuentran en los países desarrollados (12). Representa entre un 90 y un 95% de todas las lesiones malignas de la boca por lo que se puede considerar sinónimo de cáncer oral (13).

Pese a todos los esfuerzos de tratamiento con grandes cirugías, radioterapia y quimioterapia la supervivencia a los cinco años es menor del 50% (2). Además no sólo genera una mortalidad significativa sino que también provoca desfiguración extensa, pérdida de función, cambios conductuales y problemas económicos y sociológicos.

La OMS predice un aumento continuo de esta enfermedad en todo el mundo (14,15). Se ha visto en diversos estudios epidemiológicos que la incidencia del cáncer oral es muy variable en relación a la localización geográfica, observándose grandes diferencias entre diferentes regiones, incluso dentro del mismo país. Así, en Estados Unidos representa el 2-4% de todos los tumores malignos del organismo. En la zona del sur y sudeste de Asia, donde existe la costumbre de masticar nuez de betel o dejarla

depositada en el suelo de la boca, esta prevalencia aumenta hasta un 30 e incluso un 40% (16,17).

En España, la incidencia del cáncer oral es de 12 a 15 casos por 100.000 habitantes/año en varones y de 2 a 4 casos por 100.000 habitantes/año en mujeres. Estos datos suponen el 2 y el 3% de todas las muertes por cáncer en nuestro país (18).

Con respecto al sexo, es más frecuente en el sexo masculino aunque la relación varón/mujer es variable según las series mundiales consultadas, pudiendo oscilar la proporción 1-4:1. Sin embargo esta proporción está sufriendo modificaciones en los últimos años con una tendencia al equilibrio entre sexos, debido esto al aumento del consumo de tabaco y alcohol por parte de las mujeres (19).

Más del 90% de los pacientes con cáncer oral superan los 40 años (20), siendo la edad media de presentación alrededor de los 60 años (21).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han subrayado recientemente que se puede reducir un tercio de los 15 millones de casos de cáncer pronosticados en el futuro y gestionar de forma más eficaz otro tercio si se lleva a cabo una buena planificación en el control de esta enfermedad y estrategias eficaces de detección precoz (22). El COCE es una de las lesiones malignas que más se puede beneficiar de este planteamiento, ya que la cavidad oral es una parte del cuerpo de fácil inspección y además éste está precedido, en la mayor parte de los casos, de cambios de la mucosa oral de larga duración (15).

### II.1.3- ETIOPATOGENIA:

La etiología del COCE es multifactorial, influyen tanto fenómenos genéticos como ambientales, agentes físicos, químicos y virales.

De todas formas se considera que los factores de riesgo más importantes en el desarrollo del cáncer oral son el tabaco, en sus distintas formas de consumo, y el alcohol. Más del 70% de los pacientes con COCE presentan hábito tabáquico y alrededor del 80% de los casos están asociados al exceso de tabaco y alcohol (20). Aunque cada uno de ellos posee potenciales carcinogénicos independientes, ambos factores actúan sinérgicamente (23-25). Se estima que el 75% de los cánceres orales en países desarrollados están íntimamente relacionados con el consumo combinado de tabaco y alcohol (26).

Los componentes del tabaco dan lugar a un ADN mitocondrial de reparación (mtDNA) defectuoso que parece tener un papel potencial en el desarrollo del COCE (27). El hábito de fumar sigue siendo actualmente el principal factor de riesgo del cáncer oral, los fumadores presentan un riesgo relativo de padecerlo 7 veces más alto que los no fumadores y existen evidencias que sugieren que con el cese del consumo después de un período medio de 10 años este riesgo elevado de padecer cáncer oral se reduce a niveles cercanos a los de pacientes que nunca han fumado (28,29). La masticación de tabaco y, sobre todo, de la llamada “nuez de Betel” en la India es un elemento importante en la carcinogénesis oral. La aparición de tumores de la cavidad oral en pacientes jóvenes y en pacientes no fumadores sugiere el papel de una predisposición genética. En estos casos se han detectado mutaciones en genes supresores tumorales como *p53*, gen en el que con mayor frecuencia aparecen mutaciones asociadas con el cáncer (30,31).

Como se ha dicho con anterioridad la etiología del carcinoma oral es multifactorial y también afectan factores ambientales, como la radiación

ultravioleta de la luz solar, sobre todo en la localización del labio inferior. La luz ultravioleta favorece la formación de un enlace covalente entre dos bases de pirimidina en el ADN dando lugar a dímeros de pirimidina (32) .

Otros factores ambientales y la exposición a diversos virus como el virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) (33), el papilomavirus humano (PVH) y el virus de Epstein-Barr, pueden producir o promover el cáncer de la cavidad oral y de la nasofaringe. El virus de Epstein-Barr está asociado al linfocarcinoma de nasofaringe (carcinoma indiferenciado de nasofaringe), encontrándose títulos de IgA elevados frente a dicho virus en pacientes que padecen esta enfermedad.

En cuanto al PVH, se ha detectado su ADN en las células del carcinoma oral (9), del de amígdalas y de laringe. Los tipos más frecuentemente relacionados con estos tumores son PVH-16 y PVH-18 (20,34). Estos virus poseen entre sus genes oncogenes y un gen que codifica unas proteínas (E6 y E7) que bloquean la actividad reguladora del gen *p53* (30,35-37). D'Souza y cols., en un estudio caso-control han detectado ADN de PVH en el 72% de 100 carcinomas orofaríngeos, y el 64% de estos pacientes eran seropositivos para PVH-16 E6, PVH-16 E7 o ambos (38). Chuang y cols., han asociado la presencia de ADN de VPH-16 en muestras salivares con un significativo mayor riesgo de padecer recurrencia en el seguimiento de pacientes con COCE (39). Sin embargo existen ciertos elementos controvertidos en la asociación del VPH y el COCE como es conocer si la infección oral por este virus es temporal o persistente en estos pacientes (40). Recientemente Acha y cols., se han planteado la hipótesis de que el mejor pronóstico de muchos de los pacientes con COCE asociado a VPH se debe a que la infección es temporal. De esta forma, en ausencia de lesiones orales no se detecta ADN genómico de VPH en muestras citológicas de pacientes tratados previamente de COCE y que en el momento de la toma de muestra no presentaban ninguna lesión oral (41).

La infección crónica de los queratinocitos de la mucosa oral por *Cándida. albicans*, se cree que también tiene un papel en la carcinogénesis

oral. El hecho de que el hongo estimula la proliferación de las células epiteliales *in vitro* y que las lesiones orales de candidiasis muestran displasia epitelial (candidiasis hiperplásica crónica), estas células pueden sufrir degeneración maligna. Parece que el síndrome de APECED (poliendocrinopatía autoinmune PA, candidiasis, distrofia ectodérmica), enfermedad autosómica recesiva asociada a un defecto de linfocitos T y excepcionalmente común en Finlandia, parece favorecer el crecimiento de *C. Albicans* y predispone a la mucositis crónica y al COCE (27,42).

Se ha visto que la placa dental supragingival también puede ser un cofactor de riesgo en el desarrollo del COCE debido a la producción de acetaldehído por bacterias como *Streptococcus Mitis*, *Salivarius* e *Intermedius* (27,43).

Se han asociado también como factores de riesgo de esta enfermedad estados de inmunosupresión crónica por transplante de órganos o por trasplantes hematopoyéticos (20). También ha sido asociada la diabetes mellitus en las bases moleculares del COCE mediante estudios epidemiológicos que implican al receptor insulínico de sustrato-1 (IRS-1) y al factor quinasa de adhesión focal (FAK)(29,44).

Otro factor relevante en el desarrollo del cáncer oral es el nutricional, concretamente el posible papel de la ingestión de micronutrientes con un efecto antioxidante. Compuestos naturales de caroteno, selenio dietético, folato y las vitaminas A,C y D parecen ofrecer efectos protectores contra el desarrollo del cáncer (23,45,46).

De todo lo dicho anteriormente se puede deducir que, a pesar de que cada vez conocemos más los factores etiológicos, el desarrollo del COCE es un proceso multifactorial con gran variabilidad entre individuos debido a las múltiples alteraciones genéticas acumuladas. Parece claro que los factores genéticos y moleculares son decisivos en la carcinogénesis, por ello se supone que un mejor conocimiento de los determinantes moleculares de la

carcinogénesis oral mejore el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

#### **II.1.4- BASES MOLECULARES DEL COCE:**

Actualmente se acepta que el cáncer, en general, es la consecuencia de la adquisición sumatoria de una serie de trastornos genómicos celulares que promueven la malignización a través de la activación directa o de la inactivación de genes que resultan claves para el mantenimiento del equilibrio celular normal (4,5,47-49).

Este modelo multipaso de la carcinogénesis es ampliamente aceptado y requiere la suma de eventos oncogénicos que dotan a las células epiteliales de la cavidad oral, en el caso del COCE, de ventajas proliferativas e invasivas (50). Hanahan y Weinberg describieron 6 características distintivas que se repiten en todos los tumores y que denominaron "*Hallmarks of cancer*" (51):

- 1- Adquisición de señales estimuladoras del crecimiento autosuficientes: factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), factor de crecimiento hepatocítico (*c-Met*), oncogén *ras*, ciclina D1, proteínas STAT, factor nuclear kappa B (*NF- $\kappa$ B*), proteína activadora 1 (*AP-1*).
- 2- Anormalidades en las señales inhibitoras del crecimiento: gen del retinoblastoma (*Rb*), *p53*, *p21WAF1*, *p16INK4a*.
- 3- Evasión de la apoptosis.
- 4- Inmortalización.
- 5- Angiogénesis: factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*), interleukina-8 (*IL-8*).
- 6- Invasión y metástasis: E-cadherina, integrinas, metaloproteinasas de la matriz (*MMP*).

Es fundamental, para poder comprender las alteraciones que se producen en el proceso complejo de carcinogénesis, conocer previamente el ciclo de división celular en condiciones normales.

De acuerdo a la teoría celular establecida por el biólogo alemán Rudolf Virchoff en el siglo XIX, “las células sólo provienen de células”. Las células existentes se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular; en él la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y organelos), duplica su material genético y finalmente se divide. Así el período entre dos divisiones mitóticas de una célula define el ciclo de la célula (52,53).

### **CICLO CELULAR:**

El ciclo celular de las células eucariotas se divide tradicionalmente en cuatro fases. Cuando se examina la célula al microscopio, los dos acontecimientos más notables del ciclo celular consisten en la división del núcleo, proceso denominado mitosis, y la división de la célula en dos partes, proceso denominado citocinesis. Uno y otro constituyen la **Fase M** del ciclo celular, que se corresponde realmente con la mitosis visible. En una célula de mamífero típica, la fase M dura alrededor de una hora, lo cual representa sólo una pequeña fracción del tiempo total del ciclo celular.

El período entre una fase M y la siguiente se denomina **Interfase** (54). Aunque al examen microscópico se obtiene la falsa impresión de que en esta fase la célula sólo aumenta de tamaño, realmente esta fase es un período muy activo que comprende las tres fases restantes del ciclo celular:

**Fase S** o de Síntesis: ocurre la replicación del ADN nuclear, un requisito esencial para que pueda producirse la división celular. Esta fase es precedida y seguida, respectivamente de dos fases en las que la célula continúa su crecimiento.

Fase G1( “gap” intervalo): tiempo que media entre el final de la fase M y el comienzo de la fase S.

Fase G2: tiempo que media entre el final de la fase S y el comienzo de la fase M.

Así, un ciclo celular típico posee cuatro fases sucesivas: G1, S, G2 y M).

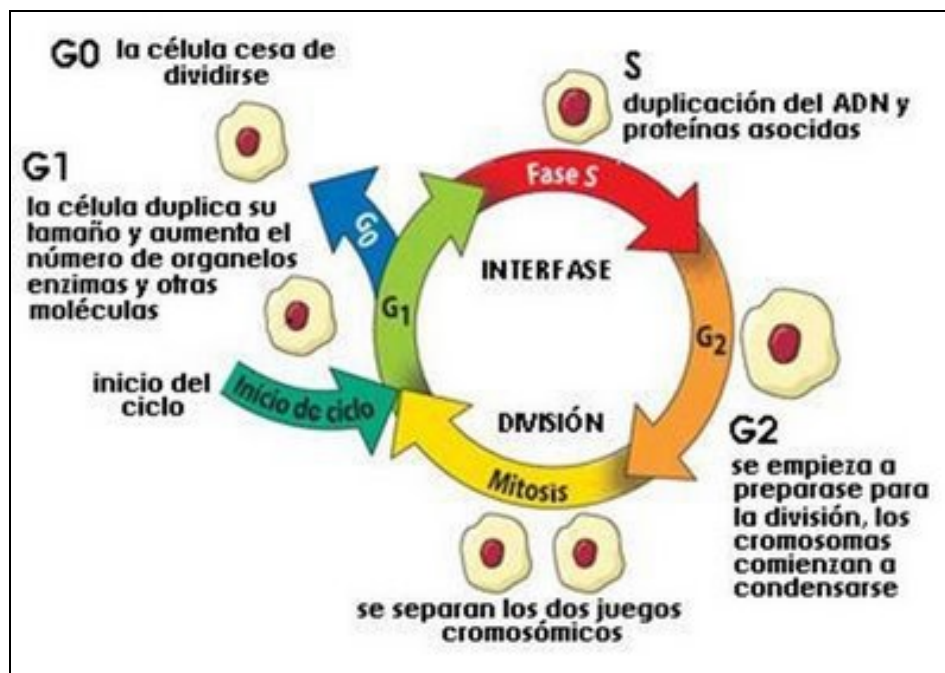


Figura 1: Ciclo celular.

Obtenida de [benitobios.blogspot.com/.../ciclo-celular.html](http://benitobios.blogspot.com/.../ciclo-celular.html)

Durante estos intervalos o fases G1 y G2 la célula debe decidir si pasa a la siguiente fase o efectúa una pausa que permita ganar tiempo para completar la preparación, la célula monitoriza los ambientes intra y extracelular para asegurarse de que las condiciones sean las adecuadas y se hayan completado los preparativos antes de pasar a la siguiente fase.

En la interfase continúa la transcripción de genes, la síntesis de proteínas y el crecimiento de la masa celular.

La duración del ciclo celular presenta variaciones de un tipo de célula a otra y entre especies. Existen básicamente tres tipos o clases de células en el organismo: la primera clase con una alta especialización como son las

células nerviosas, musculares y los eritrocitos que maduran y pierden su capacidad de división. La segunda clase, que normalmente no se dividen, pero que pueden iniciar un ciclo de división celular como respuesta a un estímulo apropiado; ejemplo de ellas son los hepatocitos o los linfocitos. La tercera clase de células, con un alto nivel de división celular, son las células epiteliales (53,55).

En un organismo multicelular es de vital importancia que los diferentes tipos celulares se dividan a velocidad suficiente como para producir todas las células que sean necesarias para el crecimiento y reemplazo únicamente de la cantidad de células que son eliminadas por el organismo, ya sea por muerte celular programada o por deterioro. Si en este proceso se crea un desequilibrio, por ejemplo un aumento exagerado en la división de una célula en particular cuando no es necesario, se ocasiona una interrupción en el funcionamiento normal del órgano y finalmente del organismo. Esto es lo que sucede normalmente en el cáncer, de ahí la importancia de que existan mecanismos de regulación del ciclo celular (54,56).

### **REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR:**

El sistema de control del ciclo celular gobierna la maquinaria responsable del ciclo celular mediante la activación e inactivación cíclicas de proteínas y complejos proteicos que inician o regulan la replicación del ADN, la mitosis y la citocinesis. La fosforilación seguida de la desfosforilación representa uno de los métodos más utilizados con mayor frecuencia por las células para estimular e inhibir la actividad de una proteína, y el sistema de control del ciclo celular utiliza este recurso de forma repetida. Estas reacciones de fosforilación son llevadas a cabo por un grupo específico de proteincinasas, enzimas que transfieren un grupo fosfato de una molécula de ATP a una cadena lateral de aminoácidos de la proteína diana.

Las proteincinasas que constituyen la parte principal del sistema de control del ciclo celular están presentes durante todo el ciclo celular en las células en proliferación. Sin embargo, estas proteínas sólo son activadas en momentos determinados del ciclo y luego pasan con rapidez al estado de desactivación.

La activación y la desactivación de esas cinasas en los momentos apropiados dependen en parte de un segundo grupo de componentes proteicos, las ciclinas, que no ejercen actividad enzimática por sí mismas, pero deben unirse a las cinasas para que éstas adquieran actividad enzimática. Esta es la razón por la cual las cinasas del sistema de regulación del ciclo celular se denominan proteincinasas dependientes de ciclinas o Cdk (cyclin-dependent protein Kinases).

Existen, en general, dos clases de ciclinas: las ciclinas mitóticas, que se unen a las Cdk's durante la fase G2 y forman el Factor Promotor de la fase M (FPM) que induce a la célula a entrar en mitosis; y la segunda clase son las ciclinas G1, las cuales se unen a las Cdk's durante G1 e inducen el paso de G1 a fase S.

La transición de una fase del ciclo celular a la siguiente es controlada en "puntos de control o restricción" antes de que el ciclo pueda progresar. Cuando existe un daño del ADN, los genes que controlan estos puntos de control detienen el ciclo celular para facilitar la reparación del ADN. La detención en la fase G1 previene la replicación del ADN dañado y la detención en la fase G2 permite la segmentación de los cromosomas dañados. Posterior al paso del punto de restricción, la progresión del ciclo celular es factor y nutriente dependiente. Debido a que la célula es dependiente de varios estímulos extracelulares durante la fase G1, esta fase es considerada un punto primario en la regulación del crecimiento (54).

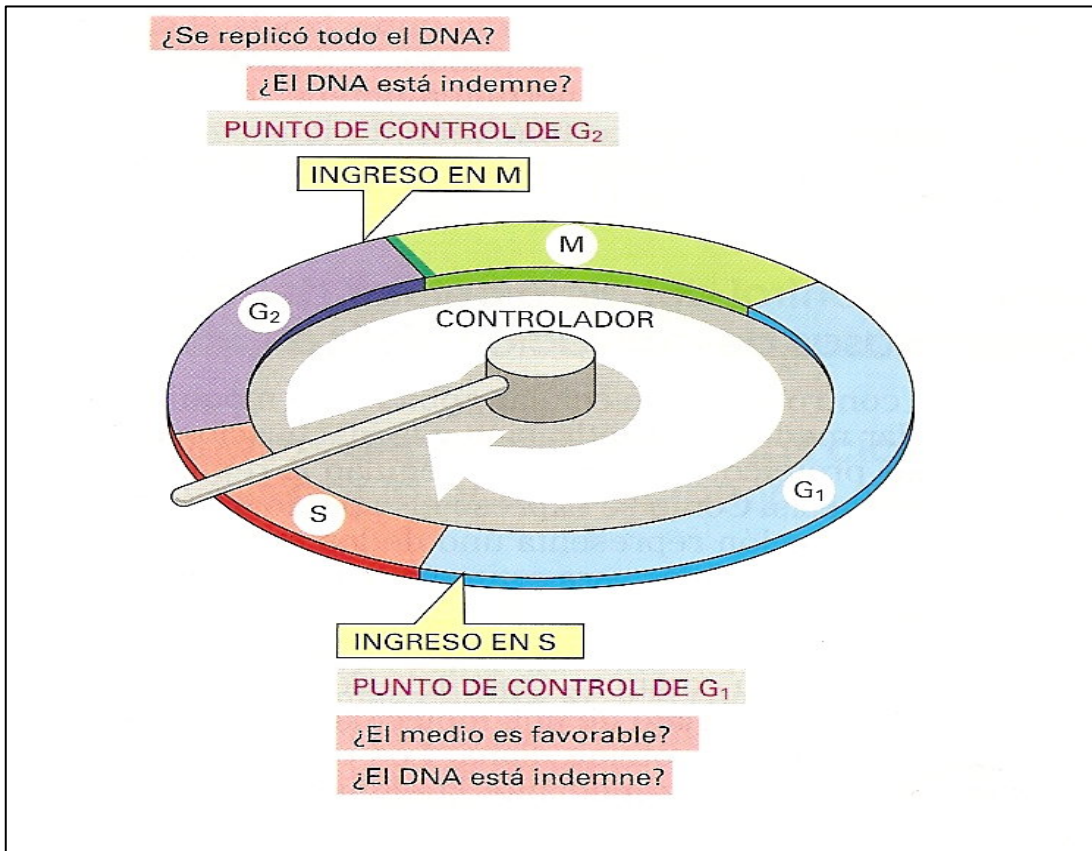


Figura 2: Puntos de control del ciclo celular. La retroalimentación de los procesos intracelulares del ciclo celular y las señales del medio intracelular determinan si el sistema de control permitirá el paso a través de ciertos puntos de control. Modificada de Alberts y cols. (54)

## REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y CANCER ORAL:

El epitelio de la mucosa oral constituye un tejido con intensa actividad mitótica con un proceso de maduración progresiva de los queratinocitos desde la membrana basal hasta las capas superficiales. En condiciones normales la división de los queratinocitos orales es estimulada por los factores de crecimiento epidérmicos (EFG), mediante la unión de éstos con los correspondientes receptores de factores de crecimiento epidérmicos (EFGR) situados en la membrana celular de los queratinocitos. Esta unión produce la activación en cascada de quinasas que dan la señal de replicación de ADN celular. La mayoría de estas proteínas que transmiten la

señal de crecimiento a partir de la membrana hacia el núcleo son codificadas por oncogenes.

### **Oncogenes:**

En las investigaciones sobre las bases genéticas del cáncer se han encontrado genes normales que afectan a la proliferación y diferenciación celular denominados proto-oncogenes. Si estos genes normales sufren alteraciones genéticas puntuales, deleciones, translocaciones o amplificación genética se convierten en oncogenes (9).

Los oncogenes son genes cuya activación genera un mecanismo molecular que colabora en la transformación maligna celular, prioritariamente a través de la promoción de la proliferación celular aberrante, la inactivación de la apoptosis celular o el establecimiento de mecanismos de supervivencia de las células en condiciones adversas (57). Debido a su capacidad para estimular el crecimiento de las células epiteliales han recibido una especial atención aquellos oncogenes que codifican los factores de crecimiento, concretamente la familia de los receptores ErbB y en especial el factor de crecimiento epidérmico (ErbB1 o Her-1). La familia de los receptores de membrana ErbB consta de 4 miembros: el factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ ErbB1/ Her-1), ErbB2 (Her-2/Neu), ErbB3 (Her-3) y ErbB4 (Her-4) (58).

El gen EGFR (erbB1) localizado en el cromosoma 7p13-q22, codifica un receptor involucrado en la señalización celular, el cual es un receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa específica y activa la señalización intracelular. Es importante, por lo tanto, en la transducción de la diferenciación, en el desarrollo y la emisión de la señal mitogénica en las células normales. Según Werkmeister y cols., este oncogén se encuentra sobreexpresado en un 20.2% de los carcinomas orales (59).

El oncogén ErbB-2 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y su sobreexpresión, en un 14.7% de los carcinomas orales, incrementa el potencial de metástasis (60). Las aberraciones de ErbB-1 y ErbB-2 son

marcas que indican que en la lesión puede producirse un proceso de carcinogénesis y conviene recordar que son muy frecuentes las alteraciones genéticas en lesiones orales premalignas histológicamente no displásicas (59).

Como se ha dicho anteriormente los receptores de membrana implicados en el crecimiento celular y en otros procesos que podrían colaborar en la oncogénesis, ejercen sus acciones a través de señales de la membrana de la célula al interior del núcleo mediante mediadores que se pueden alterar en algunos tipos de cánceres (8). Un ejemplo de esto son los genes de la familia *ras*, integrada por los oncogenes H-,K-,y N-*ras*. Se ha visto en modelos experimentales animales que la activación exclusiva de K-*ras* sería suficiente para desencadenar la aparición de cáncer oral. Sin embargo en humanos esta teoría todavía no está confirmada, y parece ser que existe una gran variedad geográfica: menos del 10% de mutaciones de K-*ras* en U.S.A. o Japón frente al 35% en la India (61).

Otros genes que se pueden comportar como oncogenes son aquellos que codifican la síntesis de proteínas ciclinas tan importantes en activación y desactivación de los mecanismos de regulación del ciclo celular. Las ciclinas tipo D, en respuesta a estímulos mitogénicos promueven la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) que es la causante del paso de la fase G a la fase S del ciclo celular. Concretamente la ciclina D1 se encuentra sobreexpresada en un 39.62% de los carcinomas de células escamosas de cavidad oral y faringe (62). El oncogén que la codifica, denominado CCND1, también se encuentra frecuentemente amplificado en el COCE. Las ciclinas A y B también se sobreexpresan en algunos carcinomas orales.

Un hecho importante para la progresión de un tumor es el fenómeno de producción de nuevos vasos sanguíneos preexistentes o angiogénesis, que dota al tumor de la capacidad de nutrirse y así proliferar. Entre los mecanismos que regulan este proceso cabe destacar el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). El gen que lo codifica puede comportarse como un oncogén en el COCE. Los estímulos del medio

hipóxico del tumor son los que aumentan la producción de VEGF para aumentar el aporte sanguíneo a la zona (8).

Otro mecanismo fundamental para el avance del tumor es la movilidad de las células tumorales que deben vencer la resistencia que ofrece el tejido sano que rodea al tumor. Para ello las células tumorales despliegan mecanismos controlados por las metaloproteinasas de la matriz o MMP, un grupo de enzimas ricas en zinc que degradan la matriz extracelular. Concretamente las MMP -2 y 9 se han relacionado con la progresión y capacidad de invasión ganglionar del COCE.

Los oncogenes, por lo tanto, codifican muchas de las proteínas transmisoras de señales por las cuales las células responden a señales de crecimiento externas. Las células normales con oncogenes normales no dan inicio a la replicación de ADN y división celular sin estímulos a señales externas que indiquen que deben hacerlo. Sin embargo cuando existen mutaciones en los oncogenes las oncoproteínas mutadas pueden enviar un estímulo de crecimiento en ausencia de señales externas. Así las células con oncogenes mutados están dotadas de una proliferación autógena que resulta en la aparición de tumores.

### **Genes supresores tumorales:**

No sólo los oncogenes con mutación pueden dar origen al inicio de la carcinogénesis. La inactivación de los llamados genes supresores tumorales se considera otra vía de iniciación de células neoplásicas, ya que se trata de genes que protegen a la célula de la adquisición de características malignas actuando a nivel de diferentes puntos de chequeo del ciclo celular (8).

### **Proteína del retinoblastoma (pRb):**

Es un factor clave en el punto de comprobación del paso de la fase G a la fase S en el ciclo celular. El estado hipofosforilado de pRb y de otros

miembros de su familia como p107 y p130, permite que activen al factor E2F que es determinante para este cambio de fase celular. Koontongkew y cols., han encontrado una sobreexpresión de esta proteína en un 58.49% de los carcinomas orales estudiados (62).

### **Inhibidores de la ciclina dependiente de la quinasa:**

Los genes que codifican las proteínas inhibidoras de las quinasas dependientes de las ciclinas (CDKIs) se comportan como importantes genes supresores tumorales. El gen CDKN2A , que codifica la proteína p16, es una de las áreas más vulnerables del genoma humano en el cáncer oral. En un altísimo porcentaje de carcinomas orales, más del 80%, se demuestra una falta de función de p16, de ahí su importancia en el mantenimiento de la homeostasis celular (63-65).

### **Gen p53:**

Es uno de los genes supresores tumorales más importante en el ser humano y constituye uno de los hallazgos más precoces en la historia natural del cáncer. El gen *p53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica una fosfoproteína de 53 kDA formada por 393 aminoácidos descubierta en 1970. Tiene un papel importante en el control del ciclo celular, actuando como factor de transcripción, de la estabilidad genómica, de la diferenciación celular y de la apoptosis (66). La proteína *p53* es capaz de detener el ciclo celular en respuesta a lesiones del ADN para establecer los mecanismos necesarios para su reparación, y en caso de lesiones irreparables del ADN, *p53* induce la apoptosis. Estos procesos mediados por el sistema *p53* eliminan la posibilidad de que se perpetúen estirpes celulares con ADN lesionado en las que nuevos eventos oncogénicos sumatorios puedan concluir con el desarrollo de un fenotipo maligno (8,60,67). En un estudio realizado por Schildt y cols., se ha encontrado que en un 63% de los

carcinomas orales se sobreexpresa *p53* y que en un 36% hay mutaciones (68).

Este gen no se detecta en el estudio inmunohistoquímico de células normales. Su detección en áreas adyacentes preinvasivas del COCE y de lesiones displásicas sugiere, por tanto, que puede constituir un avance en la historia natural del cáncer oral. En diferentes estudios se ha demostrado que la expresión de la proteína *p53*, en biopsias donde existen displasias orales y carcinomas *in situ*, es precedida de cambios histológicos malignos en semanas o meses. Pero a pesar de todo esto no es posible concluir de que se trate de un biomarcador intermedio de riesgo, ya que su mutación es relativamente tardía en el proceso carcinogénico (67,69).

### **APOPTOSIS:**

Todas las células animales nucleadas tienen la propiedad intrínseca de autodestrucción. Existen básicamente dos formas de muerte celular: apoptosis y necrosis. En la necrosis celular las células mueren como consecuencia de una agresión aguda que produce, en general, que aumenten de volumen y estallen. Esto implica que el contenido se derrama sobre las células vecinas. La apoptosis es un término griego que hace referencia a la caída de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles. Es un proceso que tarda en llevarse a cabo aproximadamente treinta minutos. Una célula en vía de apoptosis se retrae y se condensa, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura celular se desensambla y el ADN nuclear se fragmenta. El proceso de apoptosis altera la superficie celular de tal forma que atrae células fagocíticas que engloban a la célula apoptótica antes de que pueda derramar su contenido sobre las células vecinas. La eliminación rápida de la célula moribunda evita secuelas deletéreas de la necrosis celular y permite que el fagocito recicle los componentes de la célula apoptótica.

Las procaspasas inactivas de las células se mantienen en alerta y esperan la orden de destruir a las células si fuese necesario. Por lo tanto no debe sorprender que la actividad de estas caspasas esté rigurosamente regulada por genes para asegurarse que la apoptosis (muerte celular) se mantenga bajo control hasta que sea necesaria (54).

Las principales proteínas que regulan la activación de las procaspasas son los miembros de la familia Bcl-2 de proteínas intracelulares. Algunas facilitan la activación de las caspasas y la muerte celular y otras inhiben estos procesos.

Los miembros promotores de esta familia más importantes en el proceso de muerte celular son las proteínas llamadas Bax y Bak. Estas activan las procaspasas de forma indirecta mediante la liberación del citocromo C desde las mitocondrias al citosol, que activa la cascada de caspasas que conduce a la apoptosis. Las proteínas Bax y Bak son activadas por otros miembros promotores de la muerte celular de la familia Bcl-2 producidos o activados por diversas agresiones celulares como puede ser el daño de ADN.

Las señales de muerte pueden originarse a dos niveles: en algunas células se puede inducir apoptosis presentando el ligando de Fas en su membrana, el cual se une al receptor de muerte (Fas) en la superficie celular de la célula blanco, el agregado de Fas y su ligando recluta a los adaptadores que unen y activan a la procaspasa 8. Por otra parte la célula en respuesta a daño o estrés puede activar la apoptosis. Por ejemplo un daño severo al ADN puede inducirla mediante la p53, la cual activa la transcripción de genes que codifican proteínas que promueven la liberación del citocromo C de la mitocondria, en el citoplasma se une al factor promotor de la apoptosis 1 (Apaf1) el cual agrega y activa a la procaspasa 9 (70).

El denominador común de diversos procesos neoplásicos es el crecimiento anárquico y autónomo de las células. Este aumento celular se debe por un lado a la proliferación incontrolada de las células y por otro lado a una muerte celular insuficiente (71,72).

Se ha descubierto una amplia variedad de cambios genéticos que influyen en la apoptosis y que se han detectado en neoplasias malignas y benignas, como pueden ser mutaciones del gen p53, oncogén Bcl-2 u otros genes de la familia de Bcl-2, que apoyan la teoría de que las aberraciones en la apoptosis contribuyen a la transformación neoplásica celular (71,72).

Como se ha dicho en numerosas ocasiones a lo largo de este trabajo, el COCE es el resultado de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas en las células. Algunas de estas alteraciones genéticas también se producen en las moléculas o proteínas que juegan un papel crucial en la apoptosis celular. Los miembros de la familia Bcl-2 y Bax se expresan de forma diferente en el epitelio normal de la cavidad oral , displasia oral y en el carcinoma oral (73,74).

### **REPARACIÓN DEL ADN E INMORTALIZACIÓN:**

La exposición del ADN a agentes carcinógenos puede dar lugar a mutaciones que son habitualmente reparadas por enzimas que forman parte de sistemas biológicos intrínsecos de la célula. Si estos mecanismos fallan, las mutaciones persisten y se transmiten a las células hijas dando lugar al cáncer (75).

Gracias a la disección molecular de algunas neoplasias, se ha logrado identificar genes responsables de la reparación del ADN y de mantener la estabilidad genómica. Las mutaciones son el origen de condiciones que predisponen al cáncer. Revelar los genes implicados en trastornos de la reparación del ADN ha sido difícil; la determinación de sus funciones fisiológicas normales, así como su papel específico en la oncogénesis, ha resultado complicado (76).

Existe evidencia clínica y experimental que prueba el comportamiento de estos genes como supresores o antioncogenes, en distintos órganos del cuerpo humano, como el cáncer de colón o de mama. La capacidad de reparar lesiones en el material genético es diferente en cada individuo, lo que hace a unos más susceptibles al cáncer que a otros. La eficacia de este

sistema es una de las razones por las cuales el cáncer no aparece habitualmente en etapas tempranas de la vida y tienen que pasar varias décadas para que la acumulación de mutaciones logre generar un tumor en los tejidos expuestos a carcinógenos. El conocimiento profundo de estos sistemas de reparación puede servir para establecer pautas potenciales en la prevención del cáncer (77).

### **ANGIOGÉNESIS:**

La capacidad de un tumor para inducir la proliferación de vasos sanguíneos en el huésped tiene un efecto importante en el crecimiento del tumor y de la aparición de metástasis, ya que promueve la expansión rápida de las células tumorales. La observación de que el crecimiento tumoral depende de la inducción de la neovascularización se originó en los años 60 cuando células tumorales eran inoculadas en órganos. La ausencia completa de angiogénesis fue asociada a la restricción del crecimiento (6). La hipótesis de que el crecimiento tumoral es dependiente de la angiogénesis es consistente, sin embargo se ha visto que su ausencia puede limitar el crecimiento del tumor pero su presencia no garantiza su expansión (78). La mayoría de los tumores nacen sin actividad angiogénica, la neovascularización comienza cuando un subgrupo de células dentro del tumor cambia hacia el fenotipo angiogénico. Esta neovascularización proporciona el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos. Las células endoteliales liberan factores de crecimiento (PDGF, IGF, citoquinas, GM-CSF) que estimulan a las células tumorales (6).

Los mediadores moleculares de angiogénesis se dividen en dos grandes grupos (79):

### **Factores reguladores positivos:**

El bFGF y el VPF/VEGF son los más estudiados en los tumores humanos. El primero es un fuerte mitógeno (fibroblastos, células endoteliales

y células epiteliales) y quimiotáctico para las células endoteliales vasculares. La expresión de VPF/VEGF y de sus receptores es regulada por la hipoxia. Las áreas de isquemia aparecen normalmente en la fase vascular del crecimiento como consecuencia de la compresión vascular. El ARNm del VPF/VEGF es inducido en las células epiteliales y fibroblastos por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*TGT- $\beta$* ), lo que explica que la acción angiogénica de éste es mediada en gran parte por el VEGF.

#### **Factores reguladores negativos:**

Son mecanismos para la inhibición de la angiogénesis. Oligosacáridos específicos de bajo peso molecular, derivados del heparán-sulfato, el contacto cercano con otra célula y la liberación de interferón  $\beta$  (*INF- $\beta$* ) por fibroblastos en algunos tejidos. Entre otros se encuentran el interferón  $\alpha$  (*INF- $\alpha$* ), factor derivado de plaquetas, trombospondina, inhibidores tisulares de metaloproteinasas, un fragmento de 16 kDa, tetrahydrocortisol y algunos otros metabolitos del cortisol.

#### **INVASIÓN Y METÁSTASIS:**

El COCE se caracteriza por su alto grado de invasividad local así como por su alta tendencia a producir metástasis a los ganglios linfáticos cervicales y consecuentemente altas tasas de recidiva local y regional. El mecanismo de invasión y metástasis es complejo y consiste en múltiples pasos secuenciales (80). Para llevar a cabo el proceso de invasión y metástasis las células neoplásicas deben desprenderse del tumor primario e invadir la matriz extracelular. En este primer paso, la pérdida de adhesión intracelular y entre célula y matriz extracelular son requisitos para la progresión tumoral. Estudios recientes sugieren que la expresión aberrante de moléculas de adhesión intercelular, como la cadherina-E, y moléculas de adhesión entre célula y matriz extracelular, como laminina 5  $\gamma$ 2, se relacionan con el comportamiento biológico del tumor a través de la adquisición de un fenotipo invasivo, pudiendo ser útiles para la

determinación del pronóstico de los pacientes. Las moléculas de adhesión regulan el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales y juegan un importante papel en el mantenimiento de la integridad estructural y la organización del epitelio escamoso estratificado. La reducción de la integridad de la adhesión intercelular ha sido implicada en la pérdida de diferenciación celular, acompañada por una mayor movilidad e invasividad de las células epiteliales neoplásicas en diversos carcinomas humanos (81).

Tras la invasión local, se produce el desprendimiento y la diseminación vía linfática o hematológica de la célula cancerosa, la cual viaja a través del flujo venoso, hasta alojarse en un órgano donde dará origen a otros tumores. Se calcula que aproximadamente el 0,01 % de las células cancerosas llegan a establecerse en un sitio distante, pues no todas tienen los recursos para sobrevivir el recorrido hasta otra zona corporal. Una gran cantidad de células cancerosas en circulación mueren, dado que no están equipadas para superar todo el proceso de metástasis. Las células tumorales que llegan a su destino, tal vez no puedan reaccionar ante factores orgánicos específicos y esto también las elimina (76).

### **CARCINOGENÉISIS ORAL:**

Actualmente se acepta que el cáncer oral es la consecuencia de la adquisición sumatoria de una serie de trastornos genómicos celulares que promueven la malignización. Este modelo multipaso de la carcinogénesis oral es ampliamente aceptado y requiere la suma de eventos oncogénicos que dotan a las células epiteliales de ventajas proliferativas e invasivas (82). Dentro de estas alteraciones genéticas, como se ha comentado con anterioridad, están incluidos los oncogenes y mutaciones de genes supresores tumorales, pero además también se pueden producir aberraciones cromosómicas (ganancias o amplificaciones, pérdidas de heterocigosidad (LHO) o deleciones en determinados cromosomas. Todas estas mutaciones pueden influir en distintas fases del ciclo celular normal:

algunas aumentan la capacidad proliferativa de la célula, otras disminuyen la susceptibilidad de la célula a la apoptosis, otras producen un aumento de la tasa de mutación general de la célula, etc.

Actualmente sabemos que muchas mutaciones subyacen a la carcinogénesis, pero no sabemos si estas mutaciones surgen independientemente o si son el resultado de la lesión genética de uno o más “genes mutadores” clave.

El conocimiento actual de los mecanismos moleculares del cáncer oral ha permitido entender mejor la carcinogénesis y el avance del tumor. Las células cancerosas suelen distinguirse de las células normales que las rodean por la manifestación de una serie de cambios fenotípicos específicos: una tasa rápida de división, invasión de nuevos territorios celulares (a través del torrente sanguíneo), una tasa metabólica elevada y una morfología anormal. Así estas células neoplásicas presentan por tanto una autosuficiencia de las señales de crecimiento, una insensibilidad a los factores que detienen el crecimiento, escape de la muerte celular programada (apoptosis), una angiogénesis constante y una capacidad de invasión y metástasis (83).

Se ha visto de todas formas que sólo una minúscula fracción de células que sufren mutaciones son capaces de dar lugar a un cáncer:

1. La mayoría de las células que sufren una mutación, gracias a los mecanismos de control del ciclo celular, tienen una menor supervivencia que las células normales.
2. Debido a la síntesis de proteínas anormales en las células con mutaciones genéticas se activa el sistema inmunitario del paciente que destruye estas células.
3. Para que llegue a producirse un tumor se necesitan diferentes oncogenes activados al mismo tiempo.

A pesar de que para que se produzca un tumor maligno en el cuerpo humano deben de coexistir el fallo de numerosos mecanismos de protección, en la cavidad oral y en las vías aéreas-digestivas superiores se ha visto que

después de que aparezca el tumor primario existe una alta tendencia a que después de que se extirpe vuelva a recidivar y aparezcan nuevos tumores. Braakhuis y cols., (75) propusieron el modelo de progresión del COCE. En este modelo de progresión se sugiere que una célula precursora localizada en la capa basal del epitelio adquiere una o más alteraciones genéticas y por división crea una zona o “campo” formada por células hijas alteradas. Como resultado de progresivas alteraciones genéticas, la célula precursora escapa de los mecanismos de control del crecimiento y comienza a expandirse lateralmente a través del epitelio. A medida que esta población celular aumenta, se van acumulando más alteraciones genéticas que provocan nuevos subclones celulares que, finalmente provocan el desarrollo de un carcinoma.

Para poder explicar este fenómeno surge la teoría de cancerización de campo.

### **Teoría de cancerización de campo:**

Este concepto de cancerización de campo fue inicialmente propuesto por Slaughter en 1953 pero aún sigue vigente en la actualidad (84). El conocimiento actual de las bases moleculares del cáncer ha posibilitado dar una interpretación molecular a este fenómeno.

Los eventos oncogénicos moleculares más precoces en el desarrollo del cáncer oral son las mutaciones del gen *p53* y la pérdida de heterocigosidad (LHO) en los *loci* cromosómicos 3p, 9p y 17p (57). Estas regiones cromosómicas albergan importantes genes reguladores del ciclo celular. Como se ha dicho anteriormente, la consecuencia de las alteraciones genéticas precoces dota a la célula de ventajas proliferativas frente al resto de las células del epitelio de la mucosa oral. Se crea así un campo precanceroso expansivo que va progresivamente reemplazando al epitelio normal, y en el que todas las células de este campo comparten las mismas alteraciones genéticas.

Por definición estos campos precancerosos son expansivos aunque no invasivos, es decir, las células aún no han adquirido la capacidad de atravesar la membrana basal y acceder al corion. Como todavía no tienen acceso al torrente sanguíneo en esta fase no existe capacidad de metástasis.

La capacidad invasiva se adquiere presumiblemente por la suma de eventos oncogénicos más tardíos: alteraciones en los loci cromosómicos 8p, 13q y 18q. Se cree que además puedan existir otras alteraciones genómicas que afecten a la pérdida de expresión y función de las moléculas de adhesión para que puedan adquirir la capacidad de invasión (8,57)

La definición de las alteraciones oncogénicas de los campos precancerosos ha permitido conocer con más profundidad la naturaleza de esos tumores múltiples que aparecen en la cavidad oral y orofaringe en algunos pacientes. Así hay que diferenciar dos conceptos:

Segundos tumores primarios: serían aquellos que aparecen en la zona pero tienen un perfil genético completamente diferente al tumor inicial.

Segundos tumores de campo: son aquellos que comparten alteraciones genéticas precoces del campo precanceroso (P53 y LOH 3p,9p, 17P), pero no las alteraciones tardías.

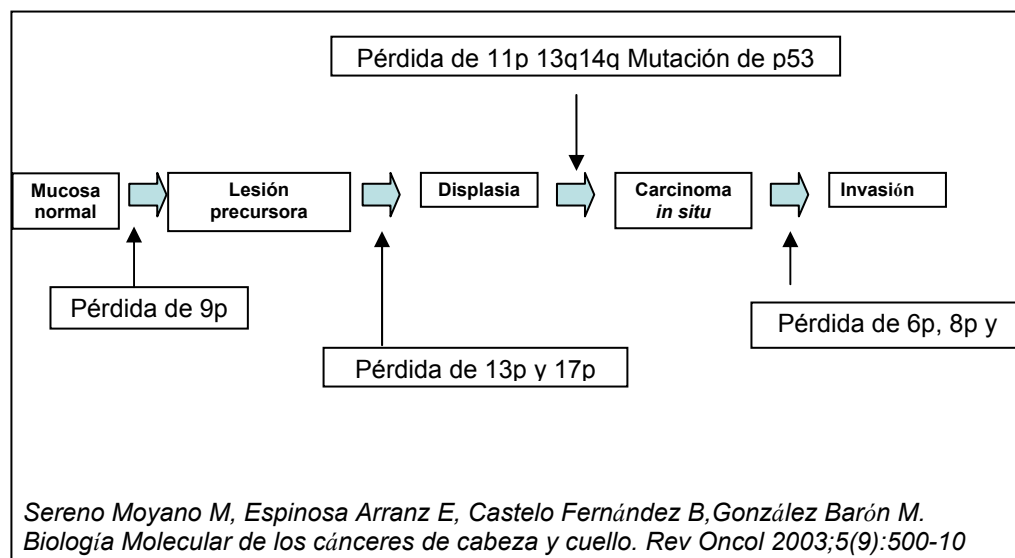


Figura 3: Modelo de progresión tumoral en los tumores de cabeza y cuello.

### II.1.5- HISTORIA NATURAL DEL COCE:

El carcinoma oral de células escamosas suele manifestarse clínicamente como una tumoración ulcerada e indurada o como una úlcera dolorosa o no, acompañada frecuentemente de adenopatías cervicales. El tamaño de las lesiones suele variar desde unos milímetros hasta varios centímetros. En estadios precoces el COCE se presenta clínicamente con un aspecto variado, asemejándose a una leucoplasia, eritroplasia o eritroleucoplasia que suelen pasar desapercibidas, ya que en muchas ocasiones son asintomáticas. De hecho aproximadamente un 50% de los COCE se desarrollan sobre un epitelio previamente alterado (17,85,86).

Con la evolución ésta tiende a ulcerarse, presentando un carácter infiltrativo, dando lugar a una lesión de bordes irregulares, mal delimitada, de superficie granulosa con fondo sucio y a la palpación se aprecia induración. Las lesiones avanzadas pueden presentarse bajo tres formas clínicas (9):

**Exofítico:** adquiere características de una formación cubierta por una superficie irregular y granulomatosa. Presenta poca tendencia a la invasión en profundidad debido a su exteriorización y su crecimiento exofítico.

**Ulceroso:** presenta una mayor malignidad debido a su tendencia a invadir planos profundos y a producir metástasis. Su característica clínica en este momento es la presencia de una pequeña úlcera redondeada con bordes indurados y fondo sucio.

**Verrucoso:** se presenta como una masa papilar asentada normalmente sobre una leucoplasia previa.

El COCE puede presentar por tanto un aspecto exofítico o mixto (87).

Se excluye el cáncer de labio inferior, ya que la localización en la que con más frecuencia se asientan las lesiones de COCE son la lengua con un

25-30%, el suelo de boca entre un 15 a 20%, mucosa yugal, gingival y finalmente por el velo del paladar (88).

Con el tiempo invade y destruye estructuras vecinas, como músculo, hueso o glándulas salivales. Este proceso de crecimiento y de invasión se desarrolla generalmente durante varios meses, desde un tumor localizado de pocos milímetros, hasta una masa de importantes dimensiones que destruye estructuras vecinas. Durante este período de crecimiento localizado, el tumor produce metástasis en los ganglios linfáticos cervicales, generalmente en los más próximos al drenaje linfático del tumor primario, extendiéndose progresivamente a otros ganglios linfáticos más alejados y rompiendo los límites anatómicos de dichos ganglios, afectando a las estructuras anatómicas del cuello. Cuanto mayor es el tumor primario y más larga su evolución, mayor es la probabilidad de que presente afectación de los ganglios linfáticos cervicales. Sin embargo, tumores pequeños y de corta evolución también pueden producir metástasis ganglionares. En ocasiones, la presencia de una metástasis en un ganglio cervical puede ser el primer síntoma de un carcinoma epidermoide de la cavidad oral, siendo esto más frecuente en tumores primarios de hipofaringe o nasofaringe (26,89). El COCE puede producir metástasis a distancia, a cualquier órgano del cuerpo, aunque ésta no es la causa más frecuente del fallecimiento de los pacientes. La muerte suele sobrevenir por la falta de control locorregional de la enfermedad, es decir, por la afectación local del tumor primario y la afectación regional a nivel del cuello (81).

### II.1.6- CLASIFICACIÓN TNM

Es importante en el momento del diagnóstico del carcinoma oral de células escamosas realizar un estadiaje para establecer el tratamiento adecuado y el pronóstico de ese paciente. El estadio del COCE depende del tamaño de la lesión primaria y de la diseminación regional o a distancia de la enfermedad (90).

El sistema de estadiaje TNM fue por primera vez presentado por Pierre Denoix en la década de los 40. La Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) adaptó el sistema y realizó la primera edición del sistema TNM en 1968 para 23 localizaciones del cuerpo humano. Se trata de un sistema de estadiaje simple que describe la extensión del tumor primario así como la implicación de nódulos linfáticos regionales y metástasis. A lo largo de los años se han ido realizando revisiones de esta clasificación basadas en un mejor conocimiento de la historia natural del tumor junto con avances en la tecnología que han permitido a los clínicos una mejor valoración de la extensión de los tumores (91,92).

La clasificación TNM propuesta por *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), en su sexta edición se explica a continuación (Tablas 1 y 2) (81,89,91).

---

## TAMAÑO DEL TUMOR PRIMARIO (T)

---

TX Tumor primario no puede ser valorado

---

T0 No existe evidencia de tumor primario

---

Tis Carcinoma in situ

---

T1 Lesión menor de 2 cm en su máximo diámetro

---

T2 Lesión mayor de 2 cm y menor de 4 cm en su máximo diámetro

---

T3 Lesión mayor de 4 cm en su máximo diámetro

---

T4 Lesión mayor de 4 cm que invade estructuras adyacentes (ej. seno maxilar, huesos maxilares, músculos pterigoideos, base de lengua o piel)

---

---

## GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)

---

NX Adenopatía cervical no puede ser valorada

---

N0 No hay adenopatías cervicales clínicamente positivas

---

N1 Un solo ganglio homolateral clínicamente positivo con 3 cm o menos de diámetro

---

N2 Un solo ganglio homolateral clínicamente positivo mayor de 3 cm y menor de 6 cm de diámetro; o múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos menores de 6 cm de diámetro; o ganglios bilaterales o contralaterales clínicamente positivos, ninguno mayor de 6 cm de diámetro

---

N2a Un solo ganglio homolateral clínicamente positivo mayor de 3 cm y menor de 6 cm de diámetro

---

N2b Múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos menores de 6 cm de diámetro

---

N2c Ganglios bilaterales o contralaterales clínicamente positivos, ninguno con más de 6 cm de diámetro

---

N3 Un ganglio clínicamente positivo con más de 6 cm de diámetro

---

**METÁSTASIS A DISTANCIA (M)**

MX Metástasis a distancia no puede ser valorada

M0 No existe metástasis a distancia

M1 Existe metástasis a distancia

Tabla 1: Clasificación TNM. Extensión del tumor primario (T); Ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales(N); Ausencia o presencia de metástasis a distancia (M)

<b>ESTADIOS</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Estadio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadio I</b>	T1	N0	M0
<b>Estadio II</b>	T2	N0	M0
<b>Estadio III</b>	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
<b>Estadio IVA</b>	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	Cualquier T	N2	M0
<b>Estadio IVB</b>	Cualquier T	N3	M0
<b>Estadio IVC</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 2: Estadaje clínico. Extensión del tumor primario (T); Ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N); Ausencia o presencia de metástasis a distancia (M)

El sistema de estadiaje TNM es una herramienta importante no sólo de información y comparación de los resultados de la terapia, sino también para mejorar el estadiaje de los pacientes para su inclusión en ensayos clínicos. En los próximos años con las nuevas revisiones, cabe esperar que incorporen temas relacionados con el paciente (sistema inmune) y con el tumor (por ejemplo, biológicos y marcadores moleculares). El reto en estos avances será mantener la facilidad de uso de este sistema de proporcionar un lenguaje común para la comunicación entre los clínicos y científicos de todas las especialidades a nivel mundial.

#### **II.1.7- PRONÓSTICO:**

A pesar de los grandes avances científicos en el tratamiento del COCE, tanto desde el punto de vista de las técnicas quirúrgicas como de radioterapia y quimioterapia, las tasas de mortalidad de este tumor no han sufrido mucha mejoría en las últimas décadas (2,3,23). La mayor parte de los COCEs están en el estadio avanzado (III y IV) en el momento del diagnóstico. A pesar de que la cavidad oral es de fácil acceso, tanto visualmente como a la palpación, el porcentaje de COCEs que se diagnostican cuando son localizados es similar al del cáncer de colón (36%) a pesar de que para realizar la exploración de la mucosa del colon es necesaria la realización de una endoscopia (93).

El pronóstico depende de varios factores en el momento del diagnóstico: la manifestación clínica, su localización, el grado histológico, la presencia o ausencia de metástasis. Pero hay que tener en cuenta que el pronóstico también depende de factores relacionados directamente con el paciente: edad, sexo, condición general y parámetros inmunológicos (94).

Estados avanzados de la clasificación TNM (III y IV) están relacionados con un peor pronóstico, así como la presencia de metástasis bilaterales en ganglios cervicales que se asocia con mayor probabilidad de

recidiva. Mientras que estadios tempranos TNM (I y II) presentan mayor porcentaje de supervivencia a los 5 años, 33% para el estadio I y un 16% para el estadio II (90).

Algunos autores consideran importante, para establecer el pronóstico del COCE, la correlación entre la clasificación TNM con la localización del tumor en la cavidad oral y con parámetros histopatológicos: grado de queratinización, pleomorfismo nuclear, patrón de invasión, etc (90,95,96). La localización anatómica de la lesión también debe de ser considerada como un indicador de pronóstico debido a que el comportamiento diferente de éstos depende de la localización anatómica. Así, lesiones T2 en lengua tienen más tendencia a la recidiva y provocan más frecuentemente metástasis en los nódulos linfáticos cervicales (90). El estudio histológico del tumor es también importante en el pronóstico, ya que aporta información indispensable para la elaboración de una forma de tratamiento que responda a los rasgos celulares y de comportamiento de la masa tumoral (81). Eckert y cols (97) consideran que el tamaño del tumor y las metástasis ganglionares, en el momento del diagnóstico son decisivas en el pronóstico, así encontraron que la tasa media de supervivencia, en general a los 5 años es del 57.3%, pero si se analiza en función del tamaño del tumor y los nódulos linfáticos observaron que para tumores en estadio T1 la supervivencia era del 80% y para tumores en estadio IV disminuye hasta el 16.2%. Si el tumor es estadio N0 el porcentaje es del 42% y si es N> 0 pasa a ser del 42.8%. Larsen y cols., han visto que la profundidad del tumor y el grado de diferenciación son factores pronósticos importantes para la existencia de metástasis nodulares independientemente de otros hechos histológicos (98).

La clasificación TNM incluye factores pronósticos importantes, sin embargo hay que tener en cuenta sus limitaciones ya que no puede ser usada para predecir las propiedades del tumor así como su comportamiento biológico. De ahí que uno de los objetivos actuales en la investigación del COCE sea proporcionar una precisión en el pronóstico así como establecer un diagnóstico precoz (2,99,100). La detección precoz en estadios

asintomáticos garantiza no sólo un aumento en las tasas de supervivencia, sino también una mejor calidad de vida, como consecuencia de tratamientos menos agresivos y mutilantes (23,101).

### **II.1.8- TRATAMIENTO**

En la actualidad, la cirugía y la radioterapia son las dos modalidades de tratamiento con potencial curativo usadas en el COCE. Pueden ser usadas individualmente o combinadas (102). El objetivo final del tratamiento del COCE debe incluir: la curación, preservar o restaurar el contorno y la función facial, minimizar la secuencia de tratamiento y prevenir las recidivas o aparición de múltiples cánceres primarios (103). La decisión del tipo de tratamiento a aplicar depende fundamentalmente de la localización del tumor, del estadio del tumor en el momento del diagnóstico, así como del estado de salud general del paciente (104). La base para establecer el tratamiento es la clasificación TNM complementada con el grado de diferenciación histológica, aunque se ha demostrado que no siempre es un indicador pronóstico satisfactorio (80,105). Estos resultados sugieren una necesidad imperiosa de investigar nuevos indicadores pronósticos para el cáncer oral valorando la agresividad biológica y estudios moleculares en cada paciente, y poder usar así tratamientos a base de inmunoterapia, terapia con citoquinas y terapia génica (103).

En general las lesiones en estadios precoces (I y II) son tratadas con cirugía y/o radioterapia, consiguiéndose una supervivencia del 80-90% a los 5 años (9). Hay que tener en cuenta que las localizaciones en suelo de boca y base de la lengua tienen un gran potencial de producir infiltración de ganglios cervicales y metástasis en pacientes que en el momento del diagnóstico no existía evidencia de afectación cervical. De ahí que en ocasiones aunque se haga un tratamiento temprano éste puede llegar a ocultar la afectación cervical que ya existía y resultar en una recidiva (106).

Los pacientes con COCE en estadios avanzados (III y IV), debido a las restricciones anatómicas y las consideraciones funcionales, en los que no se pueden realizar resecciones quirúrgicas tan amplias son generalmente tratados con tratamientos combinados de cirugía, radioterapia y/o quimioterapia con porcentaje de supervivencia del 34-35% a los 5 años (9,107).

El tratamiento quirúrgico del COCE implica la resección completa del tumor con un margen de seguridad de tejido normal adyacente que se comprueba con biopsia intraoperatoria. En caso de ganglios cervicales positivos se lleva a cabo a continuación la disección cervical radical o funcional (102,108). Esta cirugía oncológica producirá en el paciente grandes deformidades faciales, con cicatrices, comunicaciones entre cavidades orosinusales y/o oronasales que tendrán que ser reparadas posteriormente con cirugía reconstructiva.

En el tratamiento de radioterapia se puede incluir tanto el tumor primario como los ganglios en el campo de radiación. Se suele aplicar en tumores radiación-sensibles como linfomas, sarcomas, carcinomas pobremente diferenciados, en tumores orofaríngeos y COCE (107). Presenta la ventaja de preservación de los órganos, sin embargo no está libre de complicaciones orales como: mucositis, candidiasis, xerostomía e incluso puede llegar a tener afectación ósea por osteorradionecrosis (109). Cuando la radioterapia se combina con cirugía es preferible que sea postoperatoria ya que ésta produce fibrosis tisular que dificulta la cirugía. Las dosis necesarias varían en función del tipo de tumor y de la localización aunque la dosis total en tumores de cabeza y cuello oscila entre los 50 y los 70 Gy en un periodo entre 5 a 7 semanas (110).

La fracción proliferante (porcentaje de células de un tumor que está de manera constante en ciclos) es un concepto importante en la quimioterapia del cáncer; tumores con fracción proliferante elevada son, por lo general, más sensibles a quimioterapia que las células que están en reposo en la fase G0 del ciclo. Es útil clasificar los mecanismos

anticancerígenos como específicos del ciclo celular (CCS) o no específicos del ciclo celular (CCNS). Los primeros (que incluyen metotrexato, fluorouracilo y citarabina) actúan sobre células en multiplicación, en tanto que los últimos (por ejemplo, agentes alquilantes y cisplatino) actúan sin relación con el estado de proliferación celular. Los fármacos CCS pueden subdividirse en específicos de fase (por ejemplo, medicamentos que actúan en la fase S del ciclo (citarabina) o en la fase G2\_M (bleomicina). En toda terapéutica de cáncer, es vital diagnosticar y tratar el tumor pronto; de otro modo, la masa tumoral puede ser demasiado grande para que el tratamiento tenga éxito. Durante la terapéutica, es deseable eliminar todas las células clonogénicas ("Células precursoras de tumor"), dado que tienen el potencial para multiplicarse en forma ilimitada. En general, la terapéutica de dosis altas intermitentes tiene más probabilidad de lograr ésto que un tratamiento continuado con dosis bajas, debido a que expone las células tumorales a concentraciones más altas del fármaco. La quimioterapia combinada (combinación de 3 o 4 medicamentos) ha probado su éxito en varios cánceres, debido a que los compuestos actúan en forma sinérgica, el comienzo de la resistencia puede retardarse y con frecuencia su toxicidad es menor (48,106,108,111).

La quimioterapia en el tratamiento del COCE no ha tenido un gran éxito. De hecho sólo se usa como tratamiento paliativo en casos que no se puede eliminar totalmente el tumor, más que un tratamiento curativo y en combinación con la cirugía y la radioterapia. La quimioterapia puede dar como resultado una disminución del tumor, pero no ha aumentado las tasas de supervivencia a los 5 años (107,112). Estos fármacos antineoplásicos que actúan sobre diversas fases de la cinética celular presentan falta de selectividad, lo que conlleva una afectación también de las células normales con una alta tasa de replicación produciendo así alteraciones del sistema digestivo, hematológico, renal, neurológico y dermatológico del paciente.

Todavía queda mucho camino que andar en la investigación de la terapia del COCE. Se necesitan nuevas modalidades de tratamiento

dirigidas específicamente a las células tumorales y con daño mínimo a las células sanas (7).

Stanko y cols., (113) en un estudio con 663 pacientes de COCE, han visto que el tratamiento con quimioterapia, cirugía y radioterapia da lugar a las mejores tasas de supervivencia a los 5 años (23.5%), comparado con la combinación de cirugía + radioterapia o la quimioterapia + radioterapia (19.4%).

### **II.2- LESIONES PRECANCEROSAS:**

#### **II.2.1- CONCEPTO:**

Aunque el carcinoma oral de células escamosas puede aparecer en mucosa oral normal, la mayoría de los cánceres orales se desarrollan a partir de lesiones precursoras o condiciones potencialmente malignas (93,114-116).

La identificación de estos campos precancerosos en el epitelio de la mucosa oral que, precede la aparición del carcinoma, es la base de todos los programas de screening para la detección precoz de esta enfermedad y poder así disminuir la cantidad de muertes que se producen al año a causa del carcinoma oral de células escamosas (117,118).

#### **Concepto de precáncer:**

La manifestación clínica de un carcinoma oral de células escamosas está precedida por una serie de estadios precursores a nivel molecular y genético que finalmente dan lugar a cambios microscópicos en el epitelio que se traducen en lesiones detectables clínicamente (70). El concepto que

denota algunas lesiones o desórdenes de la mucosa oral como “precancerosas” está basado en las siguientes evidencias (119):

-Se ha visto en estudios longitudinales que áreas de tejido con ciertas alteraciones clínicas, identificadas en un primer momento como precancerosas, a lo largo del seguimiento se han presentado cierto grado de malignización.

-Algunas de estas alteraciones, sobre todo las placas blancas y rojas, coexisten en los márgenes de carcinomas orales de células escamosas. Una parte de estas lesiones pueden compartir características morfológicas y citológicas con lesiones epiteliales malignas, aunque sin invasión celular.

-Algunas de las alteraciones cromosómicas, genómicas y moleculares encontradas en tumores orales claramente invasivos, son detectadas en estas presuntas lesiones “pre malignas”.

La lesión precancerosa fue definida por la OMS como “aquella alteración morfológica del tejido en la que existe una mayor probabilidad de transformación cancerosa con respecto a su contrapartida normal”. Supone por tanto la presencia de una alteración clínica que tiene un real potencial de transformación maligna que se establece mediante: su incidencia en algún grupo humano más o menos determinado; su seguimiento a través de un tiempo significativo; su comportamiento biológico, es decir, su capacidad para ser “benigna antes” para ser “maligna después”; su evaluación histológica en la que se ha comprobado un proceso evolutivo histológico de malignización; su localización anatómica precisa y los factores etiológicos relacionados con su aparición (119-121).

La condición precancerosa se define como un estado general asociado a un aumento significativo en el riesgo de padecer cáncer, lo que se traduce en el hecho de que determinados tejidos de ciertas personas son más susceptibles a la acción de los agentes iniciadores del proceso carcinogénico (115,119-121).

Existe por tanto un estado, que podríamos llamar de “predisposición tisular”, que precedería a los eventos de la carcinogénesis en el cual sería importante establecer los cambios morfológicos a nivel microscópico que nos permitan una mayor objetividad en el diagnóstico histopatológico de las lesiones incipientes, ya que con las técnicas convencionales los criterios que se han enfatizado muchas veces dependen de la subjetividad del anatomopatólogo observador. Por este motivo en los últimos tiempos se están adoptando nuevas técnicas a nivel celular y molecular para llevar a cabo un diagnóstico precoz y para determinar el grado de agresividad de las células de este tejido (20,48,122-125).

### **II.2.2- EVOLUCIÓN HISTÓRICA:**

La OMS en 1978 define el término precáncer oral haciendo referencia tanto a las lesiones precancerosas como a las condiciones precancerosas, debido a que ambas implican un incremento del riesgo de desarrollo del cáncer oral aunque con connotaciones clínicas diferenciales como veremos a continuación (9,20,126).

Para la OMS una lesión precancerosa es un tejido morfológicamente alterado en el que el cáncer oral de células escamosas puede aparecer con más facilidad que en el tejido equivalente de apariencia clínica normal. Una condición precancerosa se trata de un estado general del organismo asociado a un riesgo significativo de desarrollo de cáncer oral. Esta definición implica que el cáncer puede desarrollarse en cualquier localización de la cavidad oral y no necesariamente sobre una lesión preexistente (127).

A lo largo de la historia se han ido realizando cambios en las clasificaciones de estas lesiones y estados precancerosas:

**Clasificación de la OMS de 1978 (126)**

Lesiones precancerosas:

Leucoplasia

Eritoplasia

Queratosis del paladar asociada al fumar invertido

Condiciones precancerosas:

Liquen plano oral

Lupus discoide crónico

Queilitis actínica

Fibrosis oral submucosa

Pindborg y cols., en 1980 señalan que tanto las lesiones precancerosas como las condiciones precancerosas implican un incremento del riesgo de que aparezca un carcinoma oral de células escamosas, pero con diferentes connotaciones clínicas (128).

Scully en 1993 propone una nueva clasificación (129):

Lesiones precancerosas:

Leucoplasia

Eritroplasia

Queilitis actínica

Lupus eritematoso

Liquen plano

Condiciones precancerosas:

Fibrosis oral submucosa

Síndrome de Plummer-Vinson

Sífilis

Deficiencias de vitamina A

Cirrosis hepática

Xeroderma pigmentoso

Disqueratosis congénita.

En 1994 en un simposio de lesiones orales en Upsala (Suecia) se obtuvo una nueva definición donde se destacan dos concepciones parcialmente diferentes de terminología descrita por la OMS y relacionada con el precáncer de la mucosa oral, en las que se modifican o suman distintos criterios (85):

Finalmente en el **Workshops de la OMS** en colaboración con el Centro para el Cáncer y Precancer Oral celebrado en Londres en 2005, se decide abandonar la tradicional distinción entre lesiones potencialmente malignas y condiciones precancerosas para usar el término “Desórdenes (Trastornos) potencialmente malignos” PMD, donde se incluyen las siguientes entidades (119,121):

- Leucoplasia oral
- Eritroplasia
- Lesiones palatinas producidas por el hábito de fumar invertido.
- Liquen plano oral
- Fibrosis submucosa oral
- Lupus eritematoso discoide
- Desórdenes hereditarios tales como: disqueratosis congénita y epidermolisis bullosa.

Estas lesiones potencialmente malignas, que la mayor parte de ocasiones se presentan como lesiones de aspecto blanco, presentan una prevalencia aproximada del 24.8%. Así no es raro que en la clínica diaria el profesional se encuentre con este tipo de lesiones que puedan plantear dificultades en el diagnóstico (85).

La tasa de transformación maligna de las lesiones y condiciones precancerosas varía ampliamente según los múltiples estudios realizados en este sentido (86,118,130-133). Napier y cols., han realizado una revisión de este tema y consideran que esta variación puede ser explicada debido al uso

de diferentes definiciones, criterios, diferentes poblaciones y con diferentes períodos de seguimiento (121). Los factores de riesgo de los desórdenes orales potencialmente malignos y del COCE han sido establecidos perfectamente: tabaco, abuso de alcohol y mascar nuez de Betel; sin embargo los factores de riesgo asociados a la transformación maligna de estas entidades no han sido tan bien definidos. El tipo de lesión, la edad, hábitos de vida y localización de la lesión parecen ser factores relacionados con su malignización (118). Aproximadamente el 25% de los desórdenes potencialmente malignos están localizados en la mucosa yugal, alrededor del 20% en la encía inferior y el 10% en suelo de boca y lengua. Se considera que alrededor del 40% de estas lesiones reducen su tamaño o llegan a desaparecer normalmente al eliminar el tabaco, aunque no siempre. La proporción general de éstos desordenes que desarrollan COCE es ciertamente baja, se sugieren datos de menos del 2% al año, sin embargo hay que tener en cuenta todos los factores relacionados comentados anteriormente ya que lesiones con displasia, pacientes jóvenes, fumadores y localizadas en la lengua, en suelo de boca o trígono retromolar tienen dos veces más probabilidades de transformación maligna (121).

El liquen plano oral, enfermedad mucocutánea crónica de etiología desconocida, aunque está considerado como un desorden potencialmente maligno existe una gran controversia en su capacidad de malignización. Hay autores que reflejan porcentajes variables entre el 0.09 y 10% de malignización y otros siguen presentando muchas dudas acerca de esta posibilidad. La controversia radica en el desconocimiento de si este aparente riesgo de que aparezca un COCE en pacientes con liquen plano oral se debe a la propia historia natural de evolución de esta enfermedad o es atribuible a una serie de factores de riesgo hasta hoy desconocidos (134-136). Debido a que el potencial de malignización del liquen plano oral continúa actualmente siendo controvertido, ya que no existen criterios universales aceptados de diagnóstico (118,134-136), en este trabajo nos

centraremos básicamente en las dos primeras entidades por su mayor capacidad de malignización (24,115,120,130,137-141).

### II.2.3- LEUCOPLASIA ORAL:

#### **Concepto:**

Schwimmer en 1887 definió, desde el punto de vista etimológico, el término de leucoplasia como un crecimiento o proliferación blanca. Se usó el término de leucoplasia con un sentido anatomo-clínico para distinguir una lesión blanca de las mucosas, sobre todo de la bucal, que presentaba un destacado pleomorfismo clínico, histológico y etiológico que en una pequeña proporción podía sufrir una transformación maligna (142). Siguiendo a Bernier en 1949 se impone un criterio puramente histológico y se restringe el uso del término de leucoplasia a aquellas lesiones que microscópicamente presentaran disqueratosis.

En 1967 Pindborg propone una nueva definición de leucoplasia que es aceptada por la OMS: “Placa blanca que no puede desprenderse por raspado y que no puede clasificarse como ninguna otra lesión” y añade además que “no es una entidad histopatológica, porque en ella puede observarse una gran variedad de alteraciones microscópicas” (86).

En el año 1983 en el Seminario Internacional sobre Leucoplasia Oral y Lesiones Relacionadas con los Hábitos Tabáquicos, el término de leucoplasia queda redefinido como “Placas blancas que no se pueden caracterizar clínica o histopatológicamente como ninguna otra enfermedad y que no están asociadas a ningún agente etiológico físico ni químico a excepción del tabaco” (143).

Se celebra el Symposium Internacional sobre Lesiones Blancas en Uppsala (Suecia) en el año 1994 dando lugar a una nueva redefinición de leucoplasia: “lesión predominantemente blanca de la mucosa oral que no

puede ser caracterizada como ninguna otra lesión definible”. Se propone así un diagnóstico provisional de leucoplasia basado en criterios exclusivamente clínicos, un diagnóstico definitivo para el que se requiere una eliminación de factores etiológicos y, ante lesiones persistentes, el examen histopatológico (85).

Era necesaria una definición exacta de esta lesión para facilitar el intercambio de información entre clínicos, epidemiólogos y anatomopatólogos y poder así valorar los resultados de los tratamientos, así como el pronóstico de esta lesión. Así en el Workshops de la OMS en colaboración con el Centro para el Cáncer y Precancer Oral del 2005 se define la leucoplasia oral como: “una placa blanca de riesgo cuestionable habiendo excluido otras enfermedades conocidas o alteraciones que no suponen un aumento del riesgo de cáncer” (119).

Hay que tener en cuenta que el término leucoplasia oral es puramente clínico y la lesión no se caracteriza por una histología específica, puede presentar atrofia o hiperplasia, con o sin displasia epitelial. Su patrón de comportamiento es variable aunque se ha demostrado su clara tendencia a la transformación maligna (86,119,120,130,131,137,141).

Actualmente se propone un diagnóstico provisional de leucoplasia basado en criterios clínicos y un diagnóstico definitivo para el que es necesaria la eliminación de los factores etiológicos y, si la lesión persiste, el examen histopatológico (144).

### **Epidemiología:**

Su incidencia en la población general oscila entre el 0.2% y el 17%. Este amplio rango de prevalencia probablemente sea debido por un lado a los distintos criterios de diagnóstico de leucoplasia aplicados en los distintos estudios publicados y por otro lado a las variedades de cada área geográfica con respecto al uso y tipo de tabaco. Petti en el 2003 estima que la prevalencia mundial de la leucoplasia es aproximadamente del 2% (145), sin

embargo otros autores consideran que presenta una prevalencia menor del 0.5% (120). Los datos publicados en la literatura difieren ampliamente entre estudios. Las discrepancias contables son debidas, principalmente, a la falta de homogeneidad del concepto aplicado por los diversos investigadores para realizar el diagnóstico, y también a las variadas particularidades de las muestras estudiadas: edad, etnia, hábitos tóxicos (en especial, el hábito tabáquico) y padecimientos concomitantes de algunas enfermedades.

Se trata de una lesión diagnosticada sobre todo en pacientes comprendidos entre los 40 y 70 años de edad, observándose una mayor prevalencia en la década de los 50 y 60 años (146). En estudios recientes se ha podido observar que en los países desarrollados suelen aparecer la leucoplasia cinco o diez años antes (121). En relación al sexo decir que la leucoplasia oral muestra una mayor incidencia en el hombre, aunque esta diferencia se va acortando en los países occidentales debido al aumento del consumo de tabaco y alcohol por parte de las mujeres, existiendo en el momento actual estudios que reflejan una proporción hombre-mujer de 3:2 (9).

### **Etiología:**

Los factores etiológicos relacionados con la aparición de leucoplasias orales a grandes rasgos coinciden con los implicados en la aparición de cáncer oral. Sin embargo existe un alto porcentaje de casos de leucoplasia oral en los que no es posible relacionarlos con ningún agente etiológico, son las denominadas leucoplasias idiopáticas.

Actualmente se admite el **tabaco** como el factor irritante más claramente relacionado con la aparición de leucoplasias, alrededor del 80% de ellas se asocian a este hábito. Se estima que es seis veces más común en pacientes fumadores que no fumadores (120,147). Además existe una relación directa entre la cantidad de cigarrillos consumidos al día y el tiempo que se lleva fumando con el riesgo de aparición de la lesión. En

comunidades aisladas de la India, Caribe y Sudamérica que presentan otras formas de consumo de tabaco con la “*candela p`dentro*” se ha observado una mayor prevalencia de leucoplasia y cáncer oral en el paladar debido al efecto térmico del tabaco. Existen numerosos estudios que demuestran que un porcentaje considerable de leucoplasias orales asociadas al tabaco remiten cuando se abandona el hábito tabáquico. Roed-Petersen y Pindborg, en un estudio en 168 fumadores con leucoplasia encontraron que al disminuir el consumo a menos de la mitad de cigarrillos durante tres meses en el 50% las lesiones mejoraban y en un 6.2% llegaban a desaparecer; en los que eliminaban totalmente el tabaco la lesión desaparecía en un 37% a los tres meses y en un 58.2% a los seis meses (148). Algunos estudios epidemiológicos también muestran un efecto sinérgico entre el tabaco y un consumo excesivo de alcohol en la aparición de leucoplasias orales, sin embargo actualmente se cree que el alcohol es un factor independiente (149).

También se incluyen como agentes etiológicos los factores **de tipo traumático**, aunque lo que producen realmente son queratosis friccionales: lesiones blancas que aparecen en áreas que son comúnmente traumatizadas como el borde lateral de la lengua, mucosa yugal a nivel del plano de oclusión o en crestas edéntulas por el traumatismo de la masticación. La exclusión de este tipo de lesiones del grupo de las leucoplasias se realizó debido a que al eliminar el factor traumático éstas desaparecían. Sin embargo la experiencia clínica nos demuestra que es frecuente que las lesiones blancas no regresen a pesar de suprimir los posibles factores desencadenantes, sobre todo en lesiones bien establecidas y con un largo tiempo de evolución. Por lo tanto en estos casos de persistencia de las lesiones debemos de considerarlas como leucoplasias. En este sentido Bagan y col., (150) en un estudio clínico - patológico de 110 leucoplasias no encuentran diferencias significativas entre la edad, extensión de la lesión, formas clínicas y presencia o no de displasia

epitelial entre las leucoplasias idiopáticas, las producidas por el tabaco y las relacionadas con factores traumáticos.

Hay que tener en cuenta también el **factor infeccioso** en las leucoplasias orales. Entre un 7 y un 50% de las leucoplasias están infectadas por *Cándida Albicans*. Si bien la mayoría de los casos se considera que son sobreinfecciones de leucoplasias preexistentes, existen datos que apoyan que la infección por *cándidas* pueda representar el agente etiológico de algunos tipos de leucoplasia, debido a la capacidad que tienen las especies de *cándidas* para catalizar la formación de N-nitrosobencilmetilamina. El papel que representan es desconocido, pero posiblemente tengan mucha influencia en la transformación maligna de la leucoplasia. De hecho, algunos investigadores han encontrado que existe fuerte relación entre la contaminación por hongos y la presencia de displasia epitelial moderada y severa en biopsias de lesiones precancerosas, incluida la leucoplasia (151). La posible implicación del virus del papiloma humano (HPV), en concreto el tipo 16 y 18, en la etiología y en el potencial de malignización de las lesiones precancerosas ha sido extensamente estudiado, no obteniéndose resultados concluyentes (152,153).

Ciertos estados generales o factores sistémicos se han relacionado con una mayor prevalencia de leucoplasias, en general cuando se produce una atrofia de la mucosa oral como es el caso de deficiencias de vitamina B12 y ácido fólico, la anemia sideropénica y otras carencias nutricionales (144).

### **Clínica:**

La forma de presentación clínica de las leucoplasias orales es muy variada: pueden aparecer como una lesión única, localizada, como lesiones difusas, ocupando extensas áreas de la mucosa oral o incluso como lesiones múltiples.

De igual forma el aspecto clínico puede variar desde áreas maculares, lisas y ligeramente blanquecinas y traslúcidas, o placas blancas elevadas, gruesas y firmes con superficie rugosa o fisurada.

Esta variedad de formas clínicas ha dado lugar a la aparición sucesiva de distintas clasificaciones clínicas, en un intento de caracterizar las lesiones y servir de orientación sobre su posible comportamiento. La última clasificación de consenso del Seminario de Upsala (1994) considera dos formas clínicas de leucoplasia: homogéneas y no homogéneas (85).

Las leucoplasias **homogéneas** se definen como lesiones predominantemente blancas, uniformes y de superficie lisa o arrugada. Son asintomáticas por lo que suelen ser un hallazgo casual y su riesgo de malignización es relativamente bajo (142).

Las leucoplasias **no homogéneas** muestran un riesgo de malignización más elevado y se caracterizan por presentar una superficie irregular y pueden producir cierta sensación de ardor. Estas variedades no homogéneas incluyen (119):

- Placas irregulares mixtas, blancas y rojas, predominando el color blanco.
- Nodular: pequeños crecimientos polipoides rodeados de excrecencias rojas o blancas.
- Verrucosa: placa blanca de apariencia arrugada. Esta forma es clínicamente indistinguible de un carcinoma verrucoso.

La leucoplasia verrucosa proliferativa es un subtipo de leucoplasia verrucosa que se caracteriza por una presentación multifocal, resistente al tratamiento y con una alta capacidad para la transformación maligna (119,120,154).

La localización más frecuente de las leucoplasias es la mucosa retrocomisural seguida de la mucosa yugal. También pueden presentarse en el paladar duro, rebordes alveolares, lengua y labio inferior. Es menos

frecuente la aparición en encía, paladar blando o cara ventral de lengua. Se han considerado como zonas de alto riesgo al suelo de la boca, la cara ventro-lateral de la lengua y al paladar blando, al ser áreas de mayor incidencia para el COCE y con una mayor exposición a los agentes carcinogénicos. Aunque algunos autores consideran que el potencial de malignización de la leucoplasia es independiente de su localización (155,156).

### **Histopatología:**

Desde el punto de vista histopatológico la leucoplasia oral puede presentar gran variedad de patrones, desde una hiperplasia epitelial con hiperqueratosis hasta una displasia severa, así es necesario hacer una distinción entre leucoplasias con displasia y sin displasia (120). Lo más importante en el análisis histopatológico de la leucoplasia oral es determinar la existencia o no de displasia epitelial y su grado.

Las leucoplasias sin displasia epitelial suponen el 80-90% de todas las leucoplasias. El rasgo histopatológico más constante es la hiperqueratosis, que puede ser una orto o paraqueratosis o bien conjugarse ambas formas de queratinización. Se suele acompañar de una hiperplasia epitelial debida a un aumento del estrato espinoso del epitelio y también es frecuente la papilomatosis. Normalmente en las leucoplasias sin displasia el infiltrado inflamatorio del corion suele ser escaso o nulo.

Las leucoplasias con displasia epitelial sólo representan el 10-20%. En éstas es frecuente la paraqueratosis y el infiltrado inflamatorio del corion.

La displasia epitelial se define literalmente como un crecimiento anormal del epitelio, representa por lo tanto alteraciones celulares individuales denominadas atipias celulares y por otro lado alteraciones de la estructura normal del epitelio observadas en la transición gradual hacia la malignidad (pre malignidad)(123).

Las alteraciones celulares más frecuentes son:

- Variación anormal en el tamaño nuclear.
- Variación anormal en la forma nuclear.
- Variación anormal en el tamaño celular.
- Variación anormal en la forma celular.
- Aumento de la relación núcleo/citoplasma.
- Aumento del tamaño nuclear.
- Mitosis atípicas.
- Aumento del número/tamaño nucleolos.
- Hiperchromatismo.

Los signos displásicos relacionados con una desestructuración del epitelio serían:

- Estratificación irregular.
- Pérdida de polaridad de las células basales.
- Crestas epiteliales anómalas (en gota, bulbosas...)
- Aumento del número de mitosis.
- Mitosis anormales superficiales.
- Queratinización prematura de las células aisladas.
- Perlas de queratina dentro de las crestas.

La OMS en 2005 reconoce cinco estados histopatológicos en las lesiones epiteliales precursoras (120,123):

- Hiperplasia escamosa: aumento del estrato espinoso y/o de las capas celulares basales o parabasales, con una estratificación regular y sin atipias celulares.

- Displasia leve: las alteraciones arquitecturales están limitadas al tercio inferior del epitelio acompañadas de atipias citológicas
- Displasia moderada: las alteraciones de la arquitectura se extienden al tercio medio del epitelio con atipias celulares.
- Displasia severa: las atipias celulares y alteraciones de la arquitectura epitelial implican más de los 2/3 del epitelio.
- Carcinoma in situ: todo o casi todo el espesor del epitelio está alterado junto con marcadas atipias celulares.

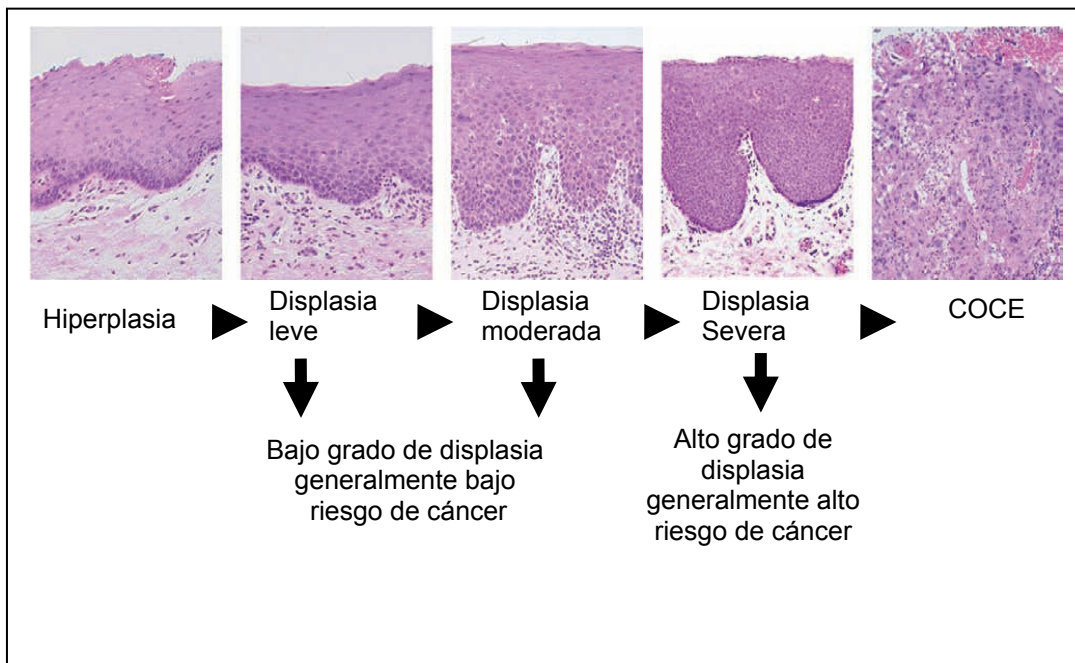


Figura 4: Fig: Progresión histológica del COCE. Adaptada de (177)

Existen algunos factores que pueden contribuir a aumentar el riesgo de malignización de una leucoplasia (121,130,138,146,157):

- Sexo: las mujeres tienden a presentar mayor riesgo de desarrollar una transformación maligna.
- Evolución de la lesión: si la lesión es resistente a los tratamientos y persiste a lo largo del tiempo tiene peor pronóstico que si es reciente.
- Localización de la lesión: las leucoplasias en el suelo de la boca, cara ventral de lengua y paladar blando presentan mayor riesgo de malignización.
- Las leucoplasias en pacientes no fumadores (idiopáticas) tienen mayor porcentaje de malignización que en fumadores.
- Las leucoplasias del tipo no homogéneo: las alteraciones blancas y rojas con color mixto, los aspectos exofíticos, papilomatosos o verrucosos son más resistentes al tratamiento y presentan mayor recurrencia, por lo tanto sufren con más frecuencia transformación maligna.
- Displasia epitelial: las leucoplasias orales con displasia severa o moderada tienen un mayor potencial de malignización que las que no presentan displasia o ésta es displasia epitelial leve.

### **Diagnóstico:**

El diagnóstico provisional se basa en un estudio clínico de la lesión: apariencia, consistencia al tacto y localización de la lesión, ya que la definición de leucoplasia oral es puramente clínica y su diagnóstico es por exclusión.

Así, con la inspección podremos clasificarla como homogénea o no homogénea. La palpación meticulosa nos dará información sobre la

presencia de induración o dolor que nos orientaría ya hacia una lesión maligna (142). Dentro de la valoración clínica es importante ya identificar posibles factores etiológicos, pudiendo así catalogar la leucoplasia como idiopática, relacionada con el tabaco o con algún agente traumático.

El diagnóstico definitivo se lleva a cabo, tras la eliminación de los agentes etiológicos, mediante el estudio histopatológico. Además de la confirmación del diagnóstico de leucoplasia es importante saber si existen signos de displasia y el grado de la misma (119).

### **Transformación maligna:**

Los factores de riesgo estadísticamente significativos para la transformación maligna de la leucoplasia son (120,121):

- Género femenino.
- Largo tiempo de evolución.
- Leucoplasia en paciente no fumador o idiopática.
- Localización en la lengua y/o suelo de boca.
- Tamaño mayor a 200 mm<sup>2</sup>.
- Tipo no homogéneo.
- Presencia de Cándida Albicans.
- Presencia de displasia epitelial.

Sin embargo se ha podido comprobar que algunas lesiones displásicas pueden desaparecer clínicamente y mostrar una total regresión, y que leucoplasias sin displasia se pueden acabar transformando en carcinomas. Existe sin embargo suficiente evidencia científica de su transformación maligna durante su evolución y no es raro encontrar leucoplasias orales cercanas o en los bordes de COCEs orales. De hecho se ha demostrado la existencia de cambios genéticos, sobre todo alteraciones

del cromosoma 3, en lesiones queratósicas no displásicas de la cavidad oral (155).

La tasa de transformación maligna de la leucoplasia es muy variable, según los estudios revisados y puede oscilar entre el 0.13-17.5%, probablemente debido al uso de criterios no estandarizados, diferencias geográficas, así como a la selección de los pacientes (24,116,130,137). Cambios ultraestructurales, incluyendo cambios fenotípicos (presencia de displasia severa), inestabilidad de ADN y pérdidas alélicas afectan al riesgo de desarrollo del carcinoma oral de células escamosas (158). El uso de test genéticos no invasivos, mediante citología exfoliativa o el estudio de marcadores tumorales de la saliva, supone un gran avance en la búsqueda de marcadores de pronóstico en este tipo de lesiones (159,160).

### **Tratamiento:**

El primer paso a considerar en el tratamiento de la leucoplasia es la supresión de de los posibles factores relacionados con su etiología: eliminar el tabaco y el alcohol, eliminar cualquier factor irritante...(144). Hay que recordar también la frecuente asociación con la *Cándida Albicans*, sobre todo en las leucoplasias retrocomisurales. Algunos autores realizan un tratamiento rutinario con antifúngicos antes de realizar la biopsia, aunque lo más indicado sería la toma de muestra para cultivo (161).

Antes de instaurar ningún tipo de tratamiento es necesario un estudio anatomopatológico de la lesión para descartar la existencia de malignidad y determinar si hay displasia y el grado de la misma. Así en leucoplasias con displasia severa o moderada el tratamiento quirúrgico es el recomendado (116). Lo ideal en el tratamiento quirúrgico de la leucoplasia sería la eliminación de toda la lesión que es posible llevar a cabo cuando la lesión es de tamaño reducido En el caso de lesiones de mayor tamaño la decisión terapéutica depende de varios factores: si es homogénea o no, localización

con más tendencia a malignizarse (suelo de boca) y sobre todo del grado de displasia (144).

Además de la extirpación quirúrgica existe un amplio abanico de posibilidades terapéuticas como la criocirugía, vaporización de la lesión con láser, administración de retinoides de forma tópica o sistémica, enjuagues bucales con atenuantes de adenovirus y la terapia fotodinámica (120,146,161). Las opciones de tratamiento más usadas son la excisión quirúrgica de la lesión o el tratamiento con láser. Los pacientes deben de ser revisados cada 6-12 meses aunque la lesión haya remitido totalmente, sobre todo en los casos en los que no hayamos sido capaces de controlar los factores etiológicos, ya que hasta el momento los ensayos randomizados controlados para el tratamiento no quirúrgico de las leucoplasias orales no demuestran evidencia de que el tratamiento no quirúrgico de esta lesión sea efectivo para prevenir la transformación maligna y la recidiva (146).

### **II.2.4- ERITROPLASIA ORAL:**

A lo largo de los años se han dado numerosas definiciones del término eritroplasia, según la OMS en 1978 se define como una “placa aterciopelada de color rojo intenso, que no se puede caracterizar ni clínica ni patológicamente como atribuible a ningún otro estado” (126). Las definiciones de eritroplasia se fueron desarrollando paralelamente a los de la leucoplasia.

En 1994 se celebra en Upsala un simposio internacional sobre leucoplasia y lesiones precancerosas y se vuelve a modificar el término de eritroplasia: “toda aquella lesión predominantemente roja de la mucosa oral, de aspecto aterciopelado, que no puede ser caracterizada como ninguna otra lesión definida” (85,120). Al igual que la leucoplasia, la eritroplasia no tendría connotaciones histológicas, sólo clínicas.

Se trata de una lesión que puede malignizarse en un alto porcentaje de casos, cerca del 90% (133,162,163), de hecho algunos autores consideran que esta entidad no debe de ser considerada una lesión precancerosa, sino como un auténtico carcinoma “in situ” (88,140,141).

### **Epidemiología:**

La eritroplasia de la cavidad oral es una lesión poco frecuente, razón por la cual no se dispone de grandes series descritas en la literatura. De hecho se considera que la leucoplasia es 13 veces más frecuente que la eritroplasia, sin embargo su importancia radica en su poder de transformación a COCE (141). En 1975 Waldron y Shafer han encontrado 58 casos de eritroplasia en un estudio en 65.354 biopsias realizadas, lo que representa el 0.09 % (162). Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios y ponen de manifiesto la baja incidencia de esta lesión. Recientes estudios en el sudeste de Asia muestran una prevalencia entre el 0.02 y 0.83% (163).

Con respecto al sexo decir que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre la afectación a hombres y mujeres, aunque existen autores que dicen que es un proceso exclusivo de los hombres. Afecta más entre la 5ª y 7ª década de la vida (120,163).

### **Etiopatogenia:**

Los factores etiopatogénicos de la eritroplasia son, en su mayoría desconocidos. Al igual que sucede con la leucoplasia se asocia a ciertos hábitos como son el consumo de tabaco y alcohol y también con estados de falta de higiene, sepsis oral y malnutrición. El tabaco y el alcohol se pueden considerar como los dos factores de riesgo más importantes en el desarrollo de esta lesión (147,163,164).

Algunos estados deficitarios de vitaminas, sobre todo las de capacidad de protección de las mucosas, como la vitamina A y el complejo B asociado a la anemia ferropénica (Síndrome de Plummer-Vinson) son considerados como factores predisponentes. También se ha encontrado que las lesiones eritroplásicas sobreinfectadas por *Cándida Albicans* tienen más tendencia a la displasia y a empeorar por lo tanto el pronóstico (157,165).

El HPV se considera como cofactor en la etiología de las eritroplasias al igual que ocurre en las leucoplasias. Nielsen y cols., (166) en sus estudios encontraron que en un 50% de las eritroplasias estudiadas estaban relacionadas con alguno de los tipos de HPV, sobre todo con el tipo 16, aunque algunos autores consideran que no está clara la implicación de la coinfección de HPV en el desarrollo de eritroplasias orales (163).

### **Clínica:**

La eritroplasia es una lesión normalmente asintomática y en la mayoría de los casos se trata de un hallazgo casual en la exploración rutinaria de la cavidad oral. En ocasiones aparecen placas blancas adyacentes a la lesión con signos algunos de induración a la palpación. Se trata de una lesión que puede aparecer en cualquier zona de la mucosa oral, aunque las zonas de mayor frecuencia de aparición son: mucosa yugal, paladar blando, trigono retromolar, lengua y suelo de boca siendo ésta la localización que con mayor frecuencia se maligniza (20,141,162-164).

La clínica de esta lesión se caracteriza por la presencia de una placa de color rojo vivo aterciopelado (mácula) o granular que puede elevarse ligeramente. Hay que tener en cuenta que para algunos autores esta coloración no es tan intensa. La eritroplasia tiene un tamaño variable y sus límites pueden ser nítidos o estar difuminados o imperceptibles al resto de la mucosa circundante normal. Shear (164) clasificó las lesiones de eritroplasia en tres categorías:

Forma homogénea: lesión de color rojo brillante de gran extensión localizada en cualquier zona de la mucosa oral.

Eritroleucoplasia: eritroplasia entremezclada con zonas de leucoplasia.

Forma no homogénea: lesiones blancas y rojas elevadas con un contorno irregular o superficie moteada denominada eritroplasia moteada.

### **Diagnóstico:**

El diagnóstico de la eritroplasia es en un primer momento clínico, y debe de ser confirmado posteriormente mediante el estudio anatomopatológico. Ese color rojizo que presenta clínicamente esta lesión se debe a la ausencia de una capa superficial de queratina y es consecuencia de la aproximación de las papilas de tejido conectivo, que contienen capilares, a la superficie de la mucosa. A diferencia de la leucoplasia, la eritroplasia no presenta hiperqueratosis lo que explica la diferente coloración entre ambas (164). El estudio anatomopatológico muestra:

- Disminución del grosor del epitelio y atrofia.
- Queratinocitos multinucleados.
- Atipias celulares.
- Crecimiento desordenado de algunos clones celulares.
- Infiltrado inflamatorio en la basal con predominio plasmocitario.

Algunos autores consideran esta lesión un verdadero *carcinoma in situ*, en el que el epitelio muestra transformaciones malignas en todo su espesor, en forma de anaplasia celular manifiesta, pérdida de polarización del epitelio, disqueratosis, aumento del ritmo mitótico con presencia de mitosis anormales y otras alteraciones. Alrededor del 90% de las eritroplasias presentan alteraciones de displasia grave, de éstas cerca de la

mitad ya son carcinomas y el otro 10% restante corresponde a displasia leve o moderada (88,141,162). La membrana basal no está afectada y la afectación del corion adyacente es muy variable, pudiéndose encontrar tanto un intenso infiltrado inflamatorio, como por el contrario, un infiltrado casi inexistente (120).

### **Tratamiento:**

En general la eritroplasia debe de ser tratada debido a su alto riesgo de malignización. El tratamiento de la eritroplasia consiste en eliminar los posibles factores etiológicos: tabaco, alcohol, sepsis oral y espinas irritativas de cualquier tipo (147,165). Si la lesión no desaparece debe de ser eliminada quirúrgicamente. Toda lesión roja en la mucosa oral nos debe de poner en alerta ante la alta incidencia de COCEs que se asientan sobre leucoplasias, especialmente las localizadas en suelo de boca y en las superficies ventral y lateral de la lengua (157). El tratamiento debe de ser siempre guiado por el diagnóstico histopatológico obtenido mediante biopsia. Las lesiones que presenten displasia moderada o severa o en las que ya asiente un carcinoma in situ deben de ser extirpadas quirúrgicamente en su totalidad, no está recomendada la utilización del láser, debido a su gran potencial de malignización debemos asegurarnos de que eliminamos totalmente la lesión. Esta técnica además presenta la ventaja sobre otras técnicas como la criocirugía, el láser, etc. que nos permite analizar histológicamente la lesión en su totalidad (163).

Una vez eliminada la lesión debemos seguir controlando al paciente periódicamente, puesto que sabemos que es un paciente de alto riesgo y en cualquier momento puede recidivar la lesión. Podemos administrar otros tratamientos coadyuvantes como pueden ser la vitamina A, retinoides, etc (9).

Es necesaria todavía la realización de estudios a cerca de la incidencia y prevalencia de esta lesión, así como de su comportamiento biológico y tratamiento.

### **II.3- DIAGNÓSTICO DEL COCE:**

El carcinoma oral de células escamosas presenta, como hemos visto anteriormente, un aspecto clínico bastante característico. Sin embargo, aunque las lesiones son bastante significativas, debido a la existencia de otros muchos procesos similares en la cavidad oral, es necesario confirmar el diagnóstico mediante un estudio anatomopatológico.

Para ello la biopsia convencional, mediante bisturí o punch, sigue siendo la técnica más aceptada, aunque en la actualidad se están llevando a cabo estudios con técnicas menos invasivas como la citología exfoliativa (convencional o en base líquida) y la biopsia transepitelial por cepillado (3,12,101,160,167-174). El objetivo de estas pruebas es encontrar una prueba de “screening” para el COCE, es decir, un test para evaluar la presencia de esta enfermedad en individuos asintomáticos que aparentemente no la padecen, así como la detección más precoz posible de casos (175).

#### **II.3.1 BIOPSIA CONVENCIONAL:**

El examen histopatológico sigue siendo el pilar principal del diagnóstico tisular, y es la técnica más aceptada para determinar de un modo fiable la naturaleza de las lesiones de la mucosa oral (167,176). El diagnóstico de certeza de lesiones potencialmente malignas y malignas orales depende de la calidad de la biopsia, de una información clínica adecuada y de una adecuada interpretación de los resultados (175).

La biopsia consiste en la extracción y el examen de tejidos u otras materias procedentes del organismo vivo con finalidad diagnóstica. La toma de la muestra debe de ser representativa de la lesión: debe de incluir por lo tanto tejido sano, margen tumoral y tejido tumoral. La biopsia oral debe de

tener por lo menos 3mm de diámetro y 2mm de profundidad, aunque en lesiones premalignas o de sospecha de carcinoma oral de células escamosas es aconsejable que lleguen a los 4mm de profundidad debido a la hiperqueratosis que se produce en este tipo de lesiones (177). Existe controversia entre la decisión de tomar biopsia excisional o incisional de las lesiones a estudio así como en la elección del instrumento quirúrgico de toma de biopsia utilizado en el intento de evitar artefactos. Parece que el punch muestra algunos beneficios pero éstos no han podido ser confirmados bajo condiciones experimentales controladas (175,178). La utilización del láser de CO2 para la toma de biopsia, en el intento de disminuir la posibilidad de diseminación de células tumorales de COCE después de la biopsia incisional, ha sido estudiada. Sin embargo se ha visto que produce artefactos térmicos citológicos especialmente críticos en la evaluación del grado de los cambios displásicos, ya que los daños térmicos inducidos a lo largo de los márgenes de la biopsia simularían atipias celulares (179).

Una decisión importante, en el momento de llevar a cabo una biopsia es decidir la localización de la toma de muestra, sobre todo en lesiones de gran extensión, para que sea representativa de la lesión (180,181). Existen técnicas que nos pueden ayudar a seleccionar la zona donde tomar la biopsia como son la tinción azul de toluidina y los sistemas de detección por luz.

La utilización del azul de toluidina como ayuda en el diagnóstico del COCE ha sido evaluado en numerosos estudios que sugieren que esta técnica proporciona información a cerca de los márgenes de la lesión y nos guía en la selección del sitio donde realizar la toma de muestra (182-184). La técnica consiste en colocar sobre la lesión una solución de azul de toluidina al 1%, después de 1-2 minutos se retira con ácido acético al 2%. El azul de toluidina es absorbido por los núcleos de las células, de tal forma que donde hay mayor proliferación celular y los núcleos son de mayor tamaño se absorbe más, con lo cual aparece teñida la zona de azul más intenso (100). En estudios recientes Lingen y cols., (185) sugieren que la sensibilidad de

esta técnica en la detección del COCE varía entre el 78 y el 100% y la especificidad entre el 31 y el 100%.

Los sistemas de detección por luz se basan en la producción de ácido 5-aminolevulínico por parte de las células, al colocar sobre la mucosa oral con displasia de forma tópica este ácido aumenta la producción y la acumulación intracelular de protoporfirina IX que es fluorescente al aplicar una luz con longitud de onda de 405nm (100). El sistema más conocido basado en la quimioluminiscencia es el Vizilite® (Zila Pharmaceuticals, Phoenix, AZ,USA) con una alta sensibilidad (100%), sin embargo su especificidad es baja (0-14.2%) con unos valores positivos predictivos muy bajos (186). El VELscope® system (Visually Enhanced Lesion Scope; LED Dental Inc., White Rock, BC, Canada) detecta la pérdida de fluorescencia en lesiones orales visibles y no visibles que pueden tener riesgo de malignización. Este sistema presenta una sensibilidad del 97 al 100% y una especificidad de 94-100% (187,188).

La muestra recogida debe de fijarse, generalmente se usa formol al 10% y se coloca en un envase hermético debidamente identificado. Hay que tener en cuenta que para determinados estudios es necesario enviar la muestra en fresco, como es el caso de estudios de inmunofluorescencia, así se transportan envueltas en una gasa humedecida en suero fisiológico. Es importante que el anatomopatólogo conozca cual es el medio de fijación y transporte empleado para poder así realizar el procesamiento de la muestra más adecuado. La remisión al anatomopatólogo debe de acompañarse de un breve informe realizado por el clínico donde se indiquen datos del paciente (identificación, sexo y edad), diagnóstico de presunción clínica con los datos más importantes de la historia clínica así como información sobre la lesión biopsiada: forma, tamaño, localización, color, tipo de crecimiento y su tiempo de evolución (177,189).

### II.3.1.1. HISTOLOGÍA:

El estudio con microscopía de luz sigue siendo la base fundamental del diagnóstico histopatológico de la mayoría de las lesiones orales, incluido el COCE, sin embargo sus limitaciones son considerables. Su principal limitación es la escasa capacidad de magnificación: permite observar la morfología de las células y sus estructuras principales (núcleo, citoplasma...) pero no se pueden estudiar estructuras más reducidas. Podemos observar por tanto los signos de displasia típicos (190):

- Estratificación irregular del epitelio.
- Pérdida de polaridad de las células basales.
- Aumento del número de figuras mitóticas.
- Mitosis no limitadas a la capa basal o suprabasal.
- Disqueratosis...

También nos permite determinar el grado de invasión tumoral, según haya atravesado o no la membrana basal (carcinoma *in situ* o carcinoma invasivo), así como la diferenciación celular. El grado de diferenciación del tumor también se puede clasificar con la microscopía óptica: carcinomas que producen grandes cantidades de queratina y muestran algún signo de maduración desde la capa basal a la capa córnea se denominan bien diferenciados. Aquellos carcinomas que coproducen queratina pero sí se puede reconocer cierto grado de estratificación aunque no siguen exactamente la estructura normal se denominan moderadamente diferenciados. Y finalmente aquellos que no producen queratina, su aspecto a penas se parece al epitelio normal y además presentan anomalías celulares frecuentes se denominan poco diferenciados (9).

### II.3.1.2 INMUNOHISTOQUÍMICA:

El estudio de un tumor no debe centrarse exclusivamente en el análisis morfológico de las células y de sus componentes. Existen otros muchos factores importantes que deben de ser estudiados para su diagnóstico y tratamiento. Es fundamental para el diagnóstico de neoplasias indiferenciadas conocer su extirpe celular mediante la identificación de proteínas y antígenos de superficie con técnicas de inmunohistoquímica (77).

Se denomina inmunohistoquímica a las técnicas de inmunotinción que permiten demostrar la presencia de una gran variedad de antígenos en las células mediante el uso de anticuerpos marcados previamente con sustancias que absorben o emiten luz. Son técnicas por tanto que se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a sus correspondientes antígenos.

Hay que tener en cuenta que para realizar estudios inmunohistoquímicos las muestras deben de enviarse en fresco o congeladas en vez de ser fijadas de forma convencional debido a la sensibilidad de los antígenos a estas sustancias (191). Permite la identificación de marcadores pronósticos de neoplasias o también denominados marcadores tumorales. Es posible así la identificación de los productos de oncogenes y de genes supresores tumorales con anticuerpos monoclonales, como *c-erbB-2*, *bcl-2*, *p21*, *Rb1* y *p53*, aunque todavía queda mucho por investigar en este campo (192).

La aplicación de la inmunohistoquímica para el diagnóstico del COCE, mediante marcadores para citoqueratinas puede ser útil a la hora de distinguir tumores pobremente diferenciados o indiferenciados de otras lesiones malignas de la cavidad oral (87).

La mayor dificultad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico precoz del COCE radica en que no existe un único marcador presente en todas las lesiones malignas y que no esté presente en la mucosa oral normal.

### II.3.1.3: TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR:

La capacidad de investigar y estudiar el ADN de las propias células del tejido tumoral en comparación con el tejido normal ha sido gracias a las técnicas de biología molecular. Existen numerosas técnicas que nos permiten estudiar directamente el ADN tumoral, tanto en el propio tejido, como mediante la manipulación previa del mismo. Entre las más utilizadas encontramos la hibridación *in situ*, la técnica de *Southern Blot* (precursora de los *microarrays*), *Northern Blot*, PCR, SSCP y las técnicas de secuenciación automática (192).

La hibridación *in situ* es una técnica que se basa en la unión específica o hibridación de fragmentos, previamente marcados, de ADN monocatenario o de ARN con sus secuencias complementarias. Para ello se utilizan sondas complementarias de un fragmento de ADN conocido que se marcan con un isótopo radioactivo. La importancia de que la técnica se realice *in situ*, es decir que se visualice la reacción en las células del tejido original, radica en que de esta forma es posible ver la localización exacta en el tejido de un determinado gen o qué tipos celulares lo expresan. Se utiliza primordialmente para la detección de bajo número de copias de virus, tanto infecciosos (Citomegalovirus) como carcinogénicos (152,153,193).

La técnica de *Southern Blot* consiste en el estudio del ADN genómico o fragmentos definidos después de la digestión con enzimas o endonucleasas de digestión (193). Previamente a su hibridación el ADN se aísla del resto de los componentes celulares y una vez digerido por las enzimas adecuadas, se separan los fragmentos mediante electroforesis. Las membranas con el ADN se exponen a una sonda marcada, que hibridará

con aquellas secuencias que presenten compatibilidad con ellas, haciendo así posible su visualización en función del tipo de marcaje de la sonda. Esta técnica se utiliza para el diagnóstico y detección de portadores de enfermedades monogénicas, cuando se conoce la mutación responsable de la enfermedad (194).

La técnica de *Northern Blot* es el mismo procedimiento que la anterior pero en vez de utilizar ADN se emplea ARN. Se puede con esta técnica estudiar si un determinado gen se expresa o no en el tejido estudiado basándose en la detección del ARNm correspondiente (195). En este método, el ARN purificado es separado por electroforesis en gel de agarosa y luego identificado con sondas de ADN específicas. Aunque esta técnica se sigue utilizando para investigar la expresión genética celular su principal desventaja es la exigencia de cantidades relativamente grandes de ARN, impidiendo su uso cuando las cantidades de ARNm son limitadas (196).

Sin duda el avance más significativo en las técnicas de biología molecular fue el descubrimiento en los años 80 por Kary Mullis de la técnica denominada: reacción en cadena de la polimerasa o PCR( *polymerase chain reaction*). Esta técnica será descrita con detalle en el siguiente apartado de este trabajo.

Durante la segunda mitad del siglo XX, los biólogos moleculares se han concentrado básicamente en la realización de estudios sobre un gen concreto o una proteína concreta. Sin embargo, a medida que entramos en la “era genómica”, este tipo de investigaciones ha ido evolucionando desde el estudio de sistemas de una sola variable hasta el estudio de interacciones mucho más complejas y con multitud de variables a la vez. Así, en lugar de estudiar la expresión de genes individuales, las nuevas tecnologías permiten investigar la expresión de una parte o incluso todos los genes de una célula o un tejido, es decir, su perfil de expresión génica (77).

La nueva tecnología de *arrays*, también denominados chips o matrices de ADN, proporciona por primera vez, la capacidad de analizar los

niveles de expresión de decenas de miles de genes en un tejido concreto y en un momento determinado. Además, los *arrays* no sólo proporcionan información estática sobre la expresión génica (en qué tejido se está expresando el gen), sino también información dinámica (la relación de los patrones de expresión de un gen determinado con el resto de genes del *array*) (197).

Un *array* de ADN es un montaje ordenado de decenas, centenas o miles de moléculas individuales de ADN, con una secuencia conocida, sobre un soporte físico. Los experimentos por medio de *arrays* consisten en analizar la interacción resultante de la combinación de un grupo de moléculas, como fragmentos de ARN, ADN, proteínas, anticuerpos, etc., con otro grupo predeterminado y conocido de moléculas diana. Los *arrays* se fundamentan en una propiedad del ADN: el emparejamiento complementario de sus bases. El ADN consta de cuatro bloques de construcción, reconocidos por la primera letra de sus bases químicas: A (adenina), C (citosina), G (guanina) y T (timina). En una cadena de ADN la base adenina sólo se emparejará con timina (su complementaria) de otra cadena y la base citosina sólo lo hará con guanina. Por tanto, si una molécula de ADN de una muestra de tejido se une a una sonda con una secuencia conocida, conoceremos también la secuencia de la muestra (puesto que será la complementaria). Cada una de las sondas de ADN se dispone en un lugar determinado de la rejilla o micromatriz, parecida a un tablero de ajedrez, y las moléculas de ADN que se vierten sobre la plantilla, portan un marcador fluorescente que puede detectarse con un *scanner*. Una vez leída la micromatriz por el *scanner*, los datos se convierten en una impresión con un código de colores (4,48,192).

Esta técnica supone actualmente una herramienta fundamental para la investigación genética, permitiendo el estudio de decenas de miles de genes al mismo tiempo.

### **II.3.1.3.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):**

Sin duda el gran avance en las técnicas de biología molecular se produce con el desarrollo de la técnica denominada “reacción en cadena de la polimerasa” o PCR ( polimerase chain reaction). Desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80, fue galardonada con la nominación de “molécula del año” en 1992 y supuso Premio Nobel de Química en 1992. Conceptualmente, la PCR reproduce en el tubo de ensayo el fenómeno natural de replicación del ADN, pero en condiciones tales que sólo es necesario disponer de una única célula para poder llevarla a cabo (198,199). La región de ADN es acotada mediante dos ologonucleótidos (primers) sintéticos que se aparean con las hebras monocatenarias de ADN una vez que la configuración doble hélice de éste se rompe por calor. En presencia de abundantes desoxinucleótidos trifosfato y magnesio, la enzima ADN - polimerasa sintetiza, empezando por el extremo 3 ' del primer hibridado, una nueva hebra de ADN usando la molécula madre como molde. Por tanto, a partir de unas pocas moléculas de ADN es posible conseguir cantidades suficientes de un segmento del mismo para el análisis bioquímico. Este concepto de “amplificar” una porción de ADN ya estaba en la comunidad científica desde hace años, pero no se había podido materializar como una técnica automatizable debido a que la ADN polimerasa de la que se disponía era obtenida de E. Coli. El posterior descubrimiento de que la ADN polimerasa de bacterias de fuentes termales (*Thermofilus aquaticus*), de ahí el nombre de la enzima que se utiliza actualmente Taq-polimerasa, resiste altas temperaturas permitió el desarrollo automatizado de esta técnica (191).

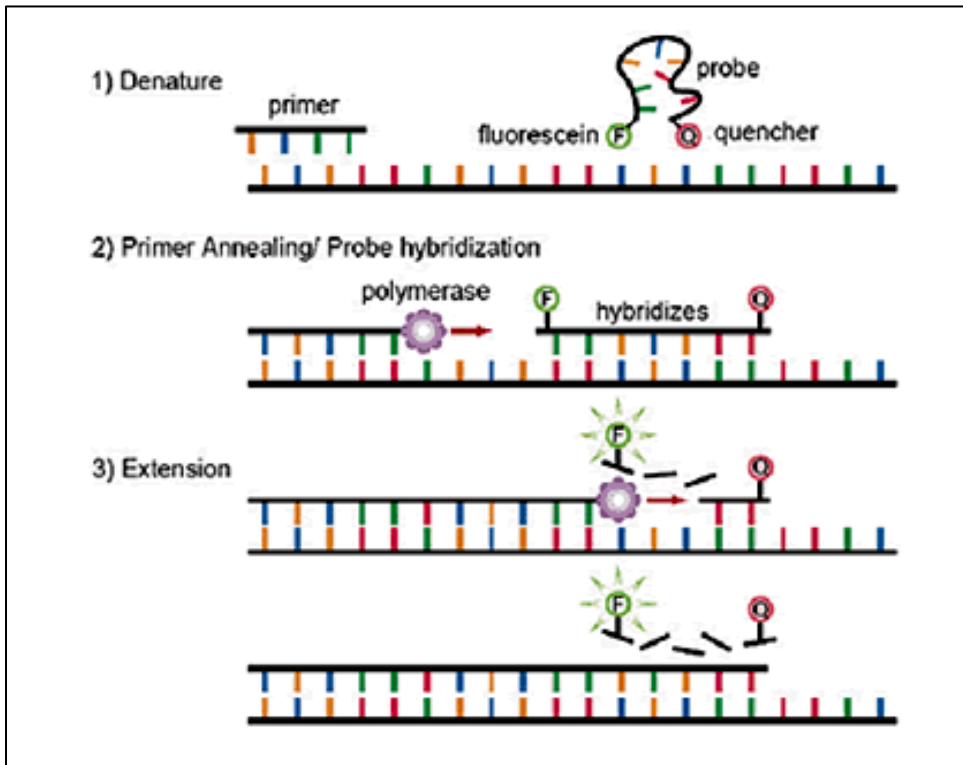


Figura 5: Esquema de la PCR. Obtenido de [www.udg.edu/.../language/es-ES/Default.aspx](http://www.udg.edu/.../language/es-ES/Default.aspx)

Es una técnica con múltiples aplicaciones, ya que se utiliza como paso previo a cualquier otra técnica que requiera utilizar cantidades importantes de ADN: detección de expresión de oncogenes y genes supresores tumorales, identificación de agentes infecciosos como virus y bacterias, estudio de mutaciones (200,201).

### II.3.1.3.2. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR):

En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real “RT- qPCR” ha surgido como una metodología extensamente utilizada en la investigación biológica, ya que permite identificar y cuantificar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos (ADN y ARN) de manera específica. La PCR en tiempo real puede generar amplicones muy pequeños (desde 60 pb) lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos

en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como para la cuantificación de niveles de ARNm en muestras de tejidos con ARN parcialmente degradado. Esta metodología se basa en la reacción en cadena de la polimerasa desarrollada por Kary Mullis en los años 80, que permitió a los investigadores amplificar grandes cantidades de ADN en forma específica (198,199).

La RT-qPCR surgió en los años 90 cuando Higuchi y cols.,(202,203) realizaron la primera PCR en tiempo real utilizando como marcador fluorescente de la reacción el bromuro de etilo, que aumenta su fluorescencia al unirse con el ADN y pudieron seguir el procedimiento mediante una videocámara.

Mediante esta técnica los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea dentro del mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna reacción posterior, disminuyendo por tanto el riesgo de contaminación de la reacción. Además mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. En esta prueba el producto de la PCR se mide al final de cada ciclo. Los datos pueden ser analizados con un software informático, así el número de copias de ARNm o la expresión génica relativa entre varias muestras puede ser calculada (202,203).

Una limitación de la PCR en tiempo real es que se debe utilizar ADN como secuencia diana, ya que las ADN polimerasas no pueden amplificar ARN de una manera similar. Este problema se solventa generando un ADNc a partir de una plantilla de ARN mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa (204).

Existen varias transcriptasas inversas que se pueden utilizar, entre ellas tenemos la transcriptasa inversa del virus aviar de mioblastosis y la transcriptasa inversa del virus de leucemia murina, siendo la primera la más

usada. También es posible usar mezclas de transcriptasas inversas, pudiendo éstas dar lugar a una mejor eficiencia de la transcripción inversa que las enzimas de componente individual (205).

Por esta razón la PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR) se ha convertido en el método de elección para realizar un examen rápido y cuantitativo de la expresión de genes específicos, lo que no sería posible con anteriores metodologías (206).

Se han desarrollado varios métodos para cuantificar el producto de la PCR. Sin embargo la PCR se ha aplicado principalmente como un método cualitativo, ya que para llevar a cabo la cuantificación en los productos de estas reacciones se necesita mucho tiempo. Además debe tenerse en cuenta que en los últimos ciclos de la reacción de la PCR, la cantidad de producto no guarda relación con la cantidad inicial de ADN o ADNc en las muestras a estudiar.

Por el contrario y en contraste con los métodos anteriores en los que se necesitan componentes adicionales, una de las más importantes ventajas de la PCR en tiempo real es que el proceso completo se realiza en el termociclador. Esta característica ayuda a disminuir el riesgo de posterior contaminación en el laboratorio y permite aumentar el rendimiento de la prueba en tiempo real, como ya se ha comentado anteriormente (204). Para obtener estos resultados, el sistema incluye dos componentes: elementos ópticos integrados al termociclador y marcadores fluorescentes que proporcionan información acerca de amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR .

Existen dos sistemas de detección de la fluorescencia en la RT-qPCR:

Agentes intercalantes: son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN. El más empleado es el SYBR Geen I que aumenta más de 1000 veces su fluorescencia al unirse al ADN. La principal limitación de estos marcadores es que al unirse al total de ácidos nucleicos en la reacción de la PCR, emiten

una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son (207,208).

Sondas de hibridación específicas: que están marcadas con fluorocromos en sus extremos. Es importante mencionar que la mayoría de estas sondas usan el fenómeno FRET (fluorescent resonance energy transfer) para emitir las señales luminosas que se van a medir en el termociclador a medida que se obtenga el producto de la PCR.

La más usada es la Taqman, la actividad 5' nucleasa de la polimerasa de ADN Taq se utiliza para escindir la sonda TaqMan durante la PCR. La sonda TaqMan se hibrida con un segmento de ADN distinto al iniciador de la PCR. La sonda contiene un marcador fluorescente en el extremo 5' (*reporter*) y un inhibidor de la fluorescencia en el extremo 3' (*quencher*). Durante la PCR se sintetiza una cadena de ADN complementaria y la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa de ADN Taq libera la molécula fluorescente de la sonda (*reporter*), emitiendo fluorescencia como resultado del alejamiento del inhibidor (*quencher*) (192,201).

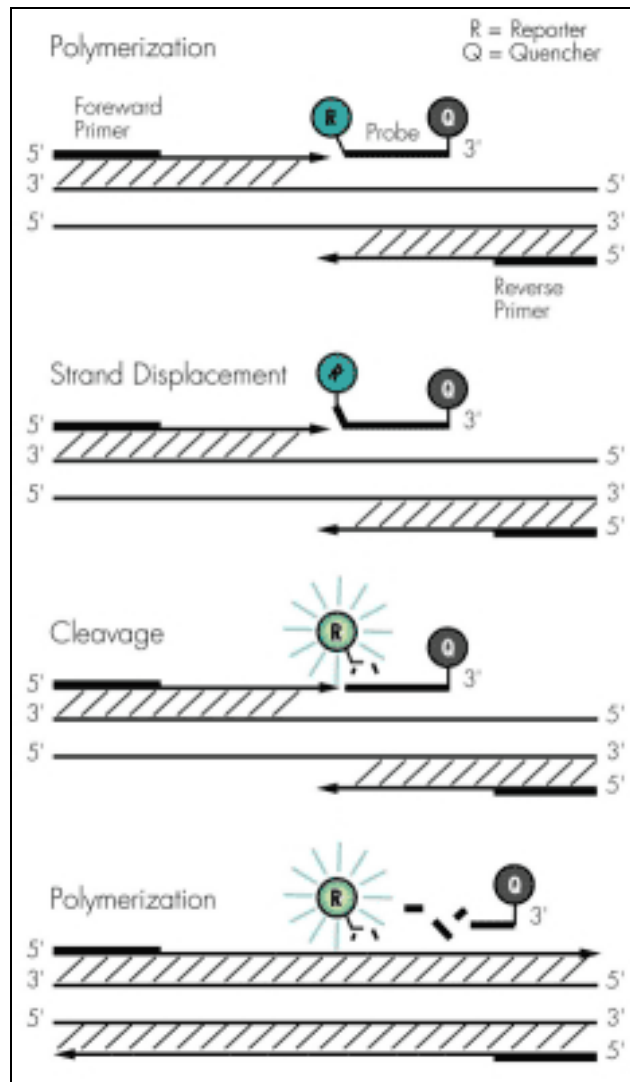


Figura 6: Representación del proceso bioquímico de la RT-qPCR, utilizando una sonda TaqMan. La sonda contiene un marcador fluorescente en el extremo 5' (*reporter*) y un inhibidor de la fluorescencia en el extremo 3' (*quencher*). La actividad 5' nucleasa de la polimerasa de ADN Taq se utiliza para escindir la sonda TaqMan durante la PCR, liberando la molécula fluorescente de la sonda (*reporter*), emitiendo fluorescencia como resultado del alejamiento del inhibidor (*quencher*). Imagen cedida por el Dr. Baylor

Como se ha descrito, los resultados de la RT-qPCR se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento

significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADNc en estudio (206).

Para obtener estos resultados, el operador debe de fijar un punto significativamente por encima de la línea base en las curvas de cinética obtenidas en cada ciclo, denominado valor umbral de ciclo (Ct por sus siglas en ingles: *cycle threshold*). Los valores Ct son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR .

Por lo tanto, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido y es, por tanto, el primer ciclo de la PCR donde se detecta producto amplificado (205). Es importante considerar que un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos. En la actualidad hay programas que pueden determinar valores Ct mediante un análisis matemático de la curva de crecimiento pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en las pruebas de PCR en tiempo real.

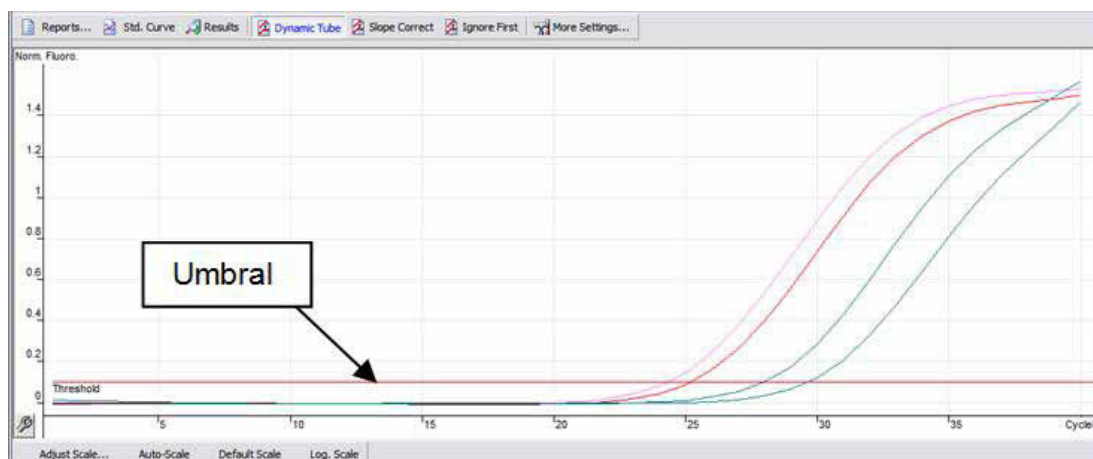


Figura 7: Umbral (threshold) fijado con anterioridad para la determinación de los valores Ct. Figura generada con Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.0.

La RT-qPCR presenta una serie de ventajas importante frente a las técnicas convencionales. En primer lugar se trata de una técnica rápida que no necesita ningún proceso adicional de detección. Además al utilizar sistemas cerrados el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Una ventaja adicional de esta técnica es que para poderla llevar a cabo es necesario contar con una pequeña cantidad de muestra (205).

Uno de los campos de mayor aplicación de esta técnica es la investigación de cambios en la expresión genética de células a través de la cuantificación de su ARNm, permitiendo asociar dichos cambios a estados fisiológicos celulares, carcinogénesis, presencia de fármacos, agentes infecciosos, etc. (205)

### **II.3.2- CITOLOGÍA EXFOLIATIVA:**

#### **II.3.2.1-CONCEPTO**

La citología exfoliativa se define como el estudio de las alteraciones morfológicas microscópicas de las células desprendidas de forma natural o artificial de los epitelios de revestimiento o extraídas de distintas zonas del cuerpo humano. De forma genérica estas células se pueden obtener por:

- Exfoliación forzada mediante el frotamiento o raspado del epitelio con diversos instrumentos.
- Aprovechando los líquidos que transportan los elementos descamados de forma espontánea (esputo, orina...)
- Mediante instrumentos de exploración o punción que extraen el componente líquido con células en suspensión procedente de zonas orgánicas internas.
- PAAF...

Así los territorios orgánicos que con mayor frecuencia se estudian mediante la citología exfoliativa son el aparato genital femenino, el árbol respiratorio, aparato digestivo, vías urinarias y próstata, piel y cavidades orgánicas (peritoneal, pleural, pericárdica, raquídea y articular) (191).

### **II.3.2.2 -EVOLUCIÓN HISTÓRICA:**

La historia de la citología está íntimamente relacionada con la aparición de dos grandes creaciones, por un lado la aparición del microscopio y por otro lado la definición del concepto de célula (209).

Al parecer, el nombre de “microscopio” fue acuñado por los miembros de la primera “Academia dei Lincei”, Sociedad Científica a la que pertenecía Galileo, y su historia se inicia con la moderna reinención de lentes mononucleares para anteojos, alrededor de 1280-1285 en Italia; aunque se sabe que la invención de los lentes proviene de épocas muy remotas, tal como lo evidencia el descubrimiento por Lanyard de lentes que datan de 721-705 AC. Fueron Hans y Zacharías Janssen quienes en Holanda construyeron el primer microscopio compuesto, al montar dos lentes en un tubo, una bicóncava para el ocular y otra biconvexa para el objetivo, se trataba de una adaptación del telescopio de Galileo. A partir de este momento el conocimiento sobre el microscopio se difundió rápidamente por el mundo convirtiéndose así en uno de los símbolos de la ciencia: en 1660 Malpighi lo usó para ver los capilares, Antoni van Leeuwenhoek en 1673 perfeccionó el diseño de Jassen combinando lentes para obtener aumentos cercanos a 275 veces. Por otro lado en la evolución histórica de la citología otro pilar fundamental fue el descubrimiento y definición de célula que no se produjo hasta mediados del siglo XIX, Max Schultze en 1861 definió la célula como un protoplasma dotado de las propiedades de vida con un núcleo. Se considera el fisiólogo alemán Johannes Muller como el verdadero iniciador de la citología clínica, publicando en 1838 su monografía sobre “la

naturaleza y las características del cáncer”. Señaló que, en el cáncer, las células estaban libres y separadas unas de otras; así mismo diferenció los carcinomas de los sarcomas (209-211).

Julius Voguel, en 1843, fue el primero en hacer diagnóstico por medio de lo que se conocería un siglo después como citología exfoliativa; tomando muestras de un tumor ulcerado de mama observó la presencia de células diferentes al pus y a los glóbulos rojos.

En 1855 Rudolf Virchow trasladó la teoría celular al campo de la patología defendiendo su teoría de que toda enfermedad expresa en definitiva una disfunción celular. Lambi en 1856 reconoció un cáncer de vejiga en una muestra de orina y en 1861 Lionel Beale, usando citología exfoliativa para diagnosticar un tumor faríngeo, descubrió células cancerosas exfoliadas comparándolas con aquellas obtenidas del tumor en la autopsia. Fue Friendlander quien en 1886 recomendó usar pequeños trozos de tejido en caso de duda en el momento del diagnóstico, procedimiento que actualmente se conoce como biopsia (209-211).

La citología exfoliativa vaginal fue introducida por Papanicolau en 1943, de hecho se considera el padre de la citología ginecológica. Dedicó cuarenta y cinco años al estudio de la citología exfoliativa; desde 1923 la propuso como método para el diagnóstico de cáncer uterino, sin embargo el método no tuvo aceptación. El Dr Papanicolau continuó estudiando y mejorando las técnicas de extendido vaginal y cervical así como las técnicas de conservación de células. Fue en el año 1942 cuando publicó la técnica de tinción que conocemos actualmente y finalmente en 1943 junto con el ginecólogo Traut publicó su trabajo “Diagnóstico de cáncer uterino mediante frotis vaginal”, trabajo que significó el reconocimiento internacional de la citología ginecológica (212). El gran mérito de George Papanicolau y su escuela fue haber sistematizado una técnica de diagnóstico con métodos de toma de muestra, fijación en fresco, tinción y nomenclatura de los diferentes tipos de alteración citológica relacionados con el cáncer cervicouterino (213).

### II.3.2.3-CITOLOGÍA CERVICO-UTERINA

A partir de este momento se utiliza la técnica de Papanicolau en los programas de detección precoz de cuello uterino, suponiendo un gran avance en la disminución de la mortalidad del cáncer cervicouterino de hasta un 70%. El éxito de la citología como método de screening para la detección del cáncer de cuello uterino se debe a su relativa simplicidad y bajo coste del examen (214).

El procedimiento para la citología vaginal requiere de una serie de pasos que deben de llevarse a cabo de manera sistemática para que el resultado final de diagnóstico sea el adecuado: solicitud del examen, toma de las muestras y finalmente procesamiento e interpretación por parte del laboratorio anatomopatológico.

Es necesario cumplimentar una hoja de solicitud de examen citológico teniendo en cuenta que ésta es la principal comunicación entre el laboratorio y el profesional médico, por lo tanto debe de rellenarse con todos los campos requeridos y con letra legible antes de realizar la toma de la muestra.

La toma de muestra también ha sido estandarizada con una serie de procedimientos que deben de tenerse en cuenta:

- Rotulación de la lámina: previo a la toma de la muestra es necesario rotular el portaobjetos con los datos identificativos de la paciente.
- Visualización del cuello uterino.
- Recolección de la muestra: existe una gran variedad de instrumentos para obtener la muestra que incluyen cepillos endocervicales, espátulas de madera y plásticas.
- Realización del extendido: la muestra obtenida debe extenderse en el portaobjetos, debe fijarse inmediatamente con spray fijador para evitar

el secado al aire que provoca distorsión celular y altera la evaluación de las células.

Envío al laboratorio de citología en cajas especiales junto con el formulario de petición.

El procesamiento de las muestras consiste en una serie de pasos, que incluye la tinción con la técnica de Papanicolau, que permiten su observación al microscopio. La tinción de Papanicolau es un método de tinción policrómico en el que se busca obtener contraste entre el núcleo y el citoplasma de las células. Se introducen los portas de una manera secuencial y por tiempo determinado en diferentes soluciones de agua, alcohol en determinadas concentraciones, colorantes, acetona y xilitol; con el propósito de hidratar las células y prepararlas para la tinción. Se utiliza hematoxilina-eosina para la tinción lo que permite diferenciar posteriormente en el microscopio los distintos componentes celulares (215-218).

En términos generales el resultado de una citología cervical ofrece información sobre tres componentes básicos: calidad de la muestra, categorización de los resultados y por último la interpretación y el diagnóstico descriptivo de los hallazgos (214-216,219,220).

Con respecto a la calidad de la muestra se han establecido dos categorías:

- Satisfactoria: cuando la hoja de solicitud está debidamente cumplimentada, el portaobjetos está bien identificado, la muestra contiene un número adecuado de células escamosas y además está representada en la muestra la zona de transformación del cervix.
- Insatisfactoria: cuando la muestra no viene acompañada de la hoja de solicitud bien cumplimentada, el porta no está con su correspondiente identificación y la celularidad de la muestra es escasa o bien existen artefactos o células inflamatorias que impiden realizar una buena interpretación del material obtenido.

La categorización de los resultados se establece de la siguiente manera:

- No útil o frotis inadecuado: cuando la muestra es insatisfactoria.
- Negativo para malignidad: el frotis no presenta alteraciones morfológicas de neoplasia maligna o de lesión premaligna. (displasia)
- Sospechosa para malignidad: existen alteraciones celulares en cuanto a la morfología pero no son concluyentes.
- Positivo para malignidad: alteraciones morfológicas en células epiteliales escamosas o glandulares que incluyen:
  - Neoplasia intraepitelial cervical grado I (NIC I) displasia leve
  - NIC II: displasia moderada
  - NICIII: displasia severa o carcinoma in situ
  - Carcinoma de células escamosas
  - Adenocarcinoma.

Para fomentar la comunicación entre el laboratorio y el médico en 1988 un grupo de expertos en Citología, Histopatología y Ginecología han elaborado el Sistema Bethesda para la interpretación de los resultados obtenidos mediante citología cervical, que ha sufrido varias revisiones hasta el 2001(221,222).

A pesar de que la citología cervical de Papanicolau (Pap) se ha utilizado como test de muestreo en el cáncer de cuello uterino durante más de 50 años, está limitada por resultados falsos positivos y falsos negativos. Hay varios factores que influyen en la obtención de falsos negativos: errores en la toma y procesamiento de las muestras o bien en el momento de identificar células malignas. Se ha cuestionado a lo largo de los años la especificidad y sensibilidad de la técnica donde se han obtenido datos tan

específicos como que el porcentaje de falsos negativos en los distintos estudios varía entre 0-29.7% (223,224). Estos falsos negativos se deben principalmente a limitaciones que presenta esta técnica, se calcula que el 65% de éstos se producen por error en la recolección de la muestra (225).

### **II.3.2.4- CITOLOGÍA EXFOLIATIVA ORAL:**

Como se ha comentado con anterioridad, los métodos diagnósticos clásicos para las lesiones precancerosas y cancerosas de la cavidad oral han sido, desde hace mucho tiempo, el examen clínico y el estudio histopatológico y más actualmente molecular, del material obtenido por biopsia (167,176).

Aunque la biopsia es de una técnica relativamente sencilla, se trata de una prueba cruenta que implica actuar quirúrgicamente, que presenta limitaciones para algunos profesionales, así como un posible rechazo en el primer momento por parte de algunos pacientes. Además en algunas situaciones puede ser difícil escoger el lugar o lugares más apropiados para la toma de biopsia. Cuando una biopsia se realiza en una lesión sospechosa el ratio de falso negativo puede llegar a ser del 23% si ésta no es representativa de la lesión (180). Existe además en el estudio de las muestras una gran subjetividad por parte del patólogo observador (123-125).

Todos estos condicionantes apoyan la necesidad de buscar y desarrollar nuevos métodos diagnósticos para la enfermedad neoplásica oral. Es importante que las nuevas metodologías sean sencillas, poco cruentas y fiables, y que permitan tanto un diagnóstico como un seguimiento satisfactorios (100). Sería útil establecer un primer nivel de test que pudiese identificar lesiones orales en función de características morfológicas y/o genéticas, seguido de un segundo nivel donde estaría la biopsia para aquellas lesiones que en el primer test existiese duda, tal como ocurre en el cáncer cervicouterino (12).

En este sentido, ha resurgido en los últimos tiempos el interés por la citología oral en el precáncer y cáncer oral como metodología complementaria para el diagnóstico precoz de estos procesos.

La citología exfoliativa se aplica al diagnóstico de las enfermedades orales desde que Papanicolaou y Traut demostraron su validez para el diagnóstico de las neoplasias del cervix uterino. Se ha utilizado clásicamente en el diagnóstico de infecciones micóticas, como es el caso de las candidiasis bucales, micosis profundas como la paracoccidiodomicosis, en el estudio de la infección epitelial por el virus Epstein-Barr en las lesiones de leucoplasia vellosa, así como en la orientación del diagnóstico de lesiones vesículo-ampollares (226). En los últimos años ha despertado un especial interés el uso de esta técnica en la detección precoz del cáncer oral debido a que es una técnica fiable, rápida, no invasiva, sin complicaciones, indolora y que puede ser usada para las lesiones pequeñas múltiples o de mayor tamaño (3,139,172,227,228).

La citología exfoliativa oral se define como el estudio de la morfología de las células que se descaman de forma natural o artificialmente de la mucosa oral. Esta técnica consiste en observar al microscopio la morfología de los distintos componentes de las células después de la toma de la muestra, fijación y tinción. Se valora así el tamaño y bordes de los núcleos, relación núcleo/citoplasma, queratinización, cromatismo, es decir parámetros que nos indiquen irregularidades en las células y posible malignidad (169,229).

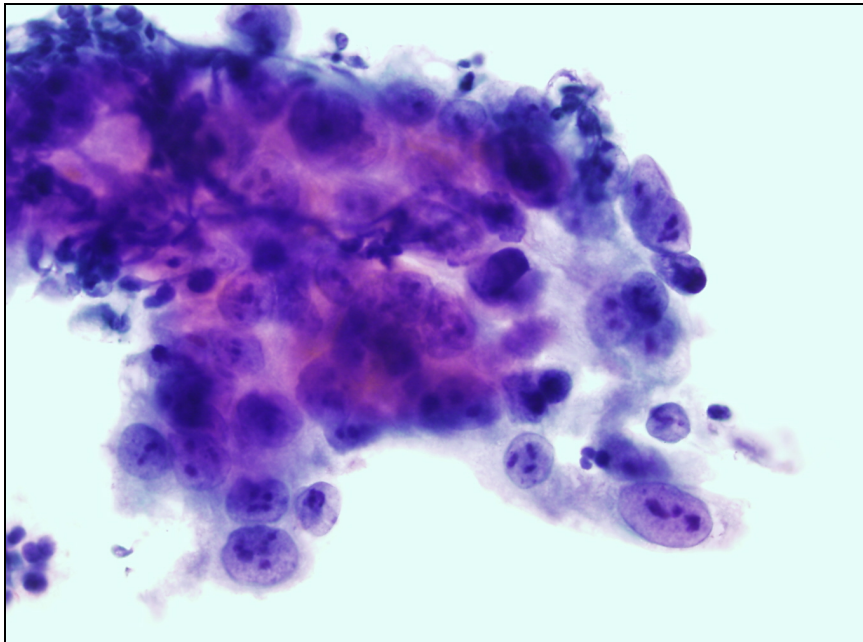


Figura 8: Citología exfoliativa de COCE en base líquida. Se observan elementos celulares atípicos: núcleos grandes e irregulares, con nucleolo prominente y en ocasiones múltiples. Papanicolaou 400X.

Las células bucales que se van a analizar tras su extendido y tinción pueden ser obtenidas por distintos sistemas físicos: enjuagues de la cavidad oral, aspiración con aguja fina o a través del raspado de la superficie de la mucosa.

La técnica por la cual se obtiene un mejor material es la de raspado, que se realiza a expensas de la separación mecánica del epitelio mucoso (230-232).

#### **II.3.2.4.1. TOMA DE MUESTRAS**

Se han usado distintos métodos para la obtención de muestras de la cavidad oral a lo largo de la evolución de la citología exfoliativa: raspado de la mucosa con distintos instrumentos como espátulas de madera, algodón, enjuagues bucales o incluso la obtención de una toma de muestra de la saliva del paciente (124,230). Sin embargo se ha visto que la mejor técnica

para obtener un material de mejor calidad es el método físico por raspado del epitelio oral con distintos instrumentos (167,230,233). Se considera que las características necesarias que debe de presentar el instrumento ideal para la citología exfoliativa son: fácil manejo en cualquier localización, que no sea molesto para el paciente y que aporte una celularidad adecuada de células epiteliales para su estudio (232). Estos estudios realizados demuestran que Cytobrush® (Med-Scand Medical, Malmo, Suiza) aumenta el número de células recogidas en la muestra y es por tanto el instrumento más utilizado para la toma de muestras de citología exfoliativa (100). El Cytobrush es un cepillo cónico se utiliza en citología ginecológica desde hace muchos años, y su uso se ha extrapolado a la cavidad oral (2,169,230,234).

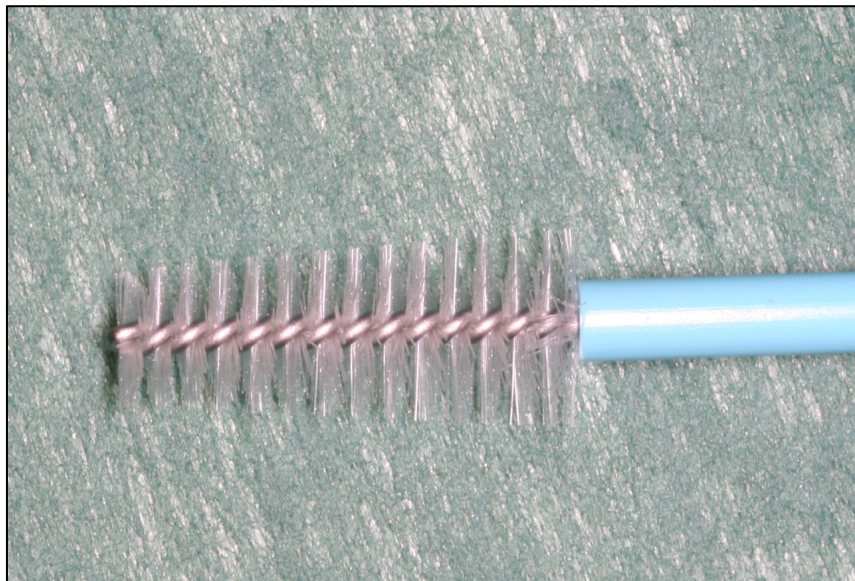


Figura 9: Detalle del instrumento de toma de muestra Cytobrush

A pesar de la evolución de los métodos de recogida del material citológico oral, esta metodología sigue presentando problemas en el diagnóstico del cáncer oral debido principalmente a la existencia de falsos negativos originados por la toma de muestra no representativa de la lesión. Así, en los últimos años, se ha intentado solucionar este problema con el desarrollo de un procedimiento de diagnóstico de lesiones orales malignas denominado “brush biopsy”. Se realiza la toma con un cepillo de diseño

particular que permite penetrar en el espesor de la mucosa y recoger el material representativo de la lesión; por lo tanto se recogen células desde la capa superficial hasta la basal del epitelio (12,229,235). Actualmente la importancia de esta técnica ha sido demostrada en un estudio multicéntrico donde se han tomado muestras mediante esta técnica de lesiones aparentemente benignas y confirmadas posteriormente con biopsia y análisis anatomopatológico, donde se han encontrado cambios epiteliales displásicos o carcinoma invasivo (236).

El Oral CDx® (Cdx Laboratories, Suffern, NY, USA) es un método asistido por ordenador para el análisis de las muestras citológicas recogidas mediante biopsia transepitelial. El kit incluye un cepillo circular diseñado especialmente para la toma de muestras transepiteliales, un portaobjetos de cristal precodificado, fijador, formulario con los datos del paciente y un recipiente para enviar la muestra al laboratorio CDx (167,171,172,174,235,237). La toma de la muestra se realiza, en función de la accesibilidad de la lesión, rotando la parte plana o circular del cepillo del Oral CDx entre 5 y 10 veces sobre la lesión, ejerciendo una determinada presión hasta conseguir un ligero sangrado o enrojecimiento de la mucosa.



Figura 10: Detalle del cepillo del kit Oral CDx. Se puede observar su diseño circular.

Navone y cols., recientemente han usado para la toma de muestras de citología exfoliativa una cureta dermatológica desechable (Acu-Dispo Curete, Acuderm Inc., Ft.Lauderdale, FL, USA) hasta producir un ligero sangrado en la mucosa para confirmar que se había llegado a la capa basal del epitelio, consideran que con esta técnica además se consiguen pequeños fragmentos de tejido que se pueden analizar como si se tratase de una “microbiopsia” (228). La cureta dermatológica consta de un mango de plástico con una hoja en anillo extremadamente afilada insertada en él. Esta cureta se utiliza en dermatología con la finalidad de extirpar una alteración cutánea causando el daño mínimo al tejido circundante. Presenta una hoja extremadamente afilada, mango ergonómico que permite una buena visibilidad del campo operatorio y su forma de presentación es en envases individuales estériles.



Figura 11: Detalle de la cureta dermatológica. Se puede observar su borde inferior cortante.

#### II.3.2.4.2. ANALISIS CITOLÓGICOS:

##### **Citomorfometría:**

Las técnicas citomorfométricas permiten el estudio cuantitativo de diversos componentes celulares, como los ácidos nucleicos y las proteínas. La citometría de flujo consiste en el análisis rápido de células, y por extensión partículas biológicas individualizadas en suspensión, dentro de un sistema de flujo laminar sobre el que incide un haz de luz, que proporciona información a cerca de sus características físico-químicas (191).

El planímetro fue usado por Johnston en 1952 en el intento de medir el tamaño celular, citoplasmático y la relación núcleo/citoplasma en el estudio de la morfología de células obtenidas mediante citología exfoliativa. En 1963 Goldsby y Staats sugieren que el estudio del área del núcleo (AN), área del citoplasma (AC) y la relación entre ellos (AN/AC) es fundamental para el estudio de muestras citológicas orales (238).

Cowpe en 1985 ha demostrado que la citología exfoliativa es capaz de detectar cambios celulares de malignidad en frotis de la cavidad oral teñidos con la técnica de Papanicolau, basándose en la determinación del área del núcleo y citoplasma celular usando el planímetro. Estos estudios concluyen que 50 células son suficientes para proporcionar una valoración coherente del estudio morfológico de células obtenidas de varias localizaciones de la cavidad oral. A partir de este momento se hicieron numerosos estudios utilizando esta técnica (169,238,239).

EL planímetro fue sustituido posteriormente por métodos de análisis semiautomáticos de imágenes, como la citometría estática, que aumentan la velocidad, exactitud y reproductibilidad de los resultados (240,241).

En posteriores estudios se ha visto que la disminución del área del citoplasma (AC) se produce antes que el aumento del área del núcleo (AN) en tejidos que sufren una transformación maligna en comparación con la mucosa sana del mismo paciente como control. Ramaesh y cols., (242)

estudian, mediante técnicas citométricas, los diámetros de los núcleos y de los citoplasmas de células exfoliadas de la cavidad oral en mucosa normal, lesiones displásicas y carcinomas orales. Observan que el diámetro del citoplasma disminuye a partir de células orales normales hacia las lesiones con mayor grado de displasia, hasta la mayor reducción que se observa en las lesiones de carcinoma oral de células escamosas. El tamaño del núcleo sufre la transformación contraria, es decir va aumentando hacia las lesiones de mayor malignidad.

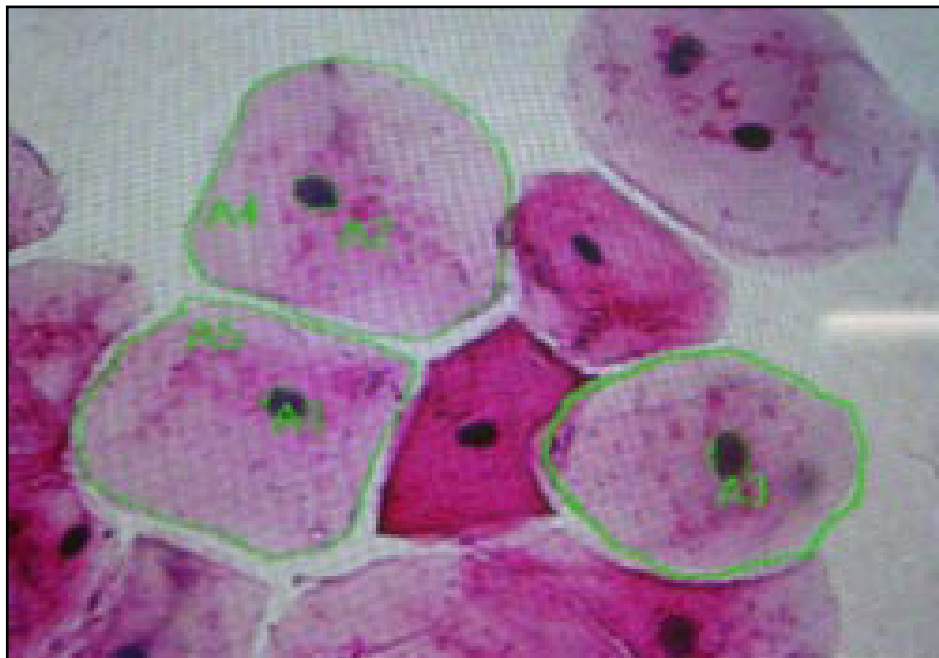


Figura 12: Estudio citomorfométrico. Cuantificación del área del núcleo y del citoplasma con un sistema de análisis digital de imagen (Micro Image 3.0.1), en células del epitelio oral teñidas por Papanicolau. Imagen obtenida de (169)

Por lo tanto el estudio morfológico de las células obtenidas mediante citología exfoliativa permite ya observar cambios que nos indican que una lesión es maligna o está en camino de malignizarse. Pektaş y cols., demuestran la existencia de diploidía celular en el 83,3% de las lesiones malignas, con resultados estadísticamente significativos en relación al grupo control. Concluyen que el análisis citomorfométrico mediante citología oral es una técnica de gran valor junto con la biopsia para la identificación de

lesiones premalignas y lesiones orales cancerosas en estadíos precoces, con una elevada especificidad y sensibilidad (243). Sin embargo Saiz y cols., describen que los parámetros de índice de proliferación celular, índice mitótico, poliploidía y fase S, no pueden ser utilizados como factor pronóstico en el COCE, por no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas con la aparición de recidiva loco-regional, metástasis a distancia ni con la supervivencia (244).

### **Contenido del ADN nuclear:**

La citometría estática permite la cuantificación del contenido de ADN en las células obtenidas mediante citología exfoliativa oral. Desde que se reconoció la importancia del contenido de ADN para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades tumorales, en estos casos se utiliza cada vez más el análisis de imagen de ADN. Hay que tener en cuenta que para poder realizar estos estudios la tinción hematoxilina-eosina, utilizada normalmente en la tinción de muestras citológicas, no es válida ya que no permite evaluar que la cantidad de ADN es proporcional a la cantidad de tinción. El método de tinción utilizado en estos casos es la Reacción de Feulgen, ya que se trata de un método esquiométrico. Cada molécula fijada de reactivo Schiff se corresponde con una porción constante y equivalente de molécula de ADN, por lo tanto permite conocer la cantidad de ADN que contiene cada célula (2,191).

El contenido de ADN de un núcleo celular depende del número de cromosomas presentes en él. En una célula humana somática normal existen 23 pares de cromosomas, por lo tanto es diploide. La citometría de flujo es una técnica que combina los conocimientos adquiridos de la microespectrofotometría, la producción de anticuerpos monoclonales, el desarrollo de los fluorocromos y el procesamiento computerizado de datos y los utiliza para conocer una serie de parámetros celulares. Se trata por tanto de un método de medición, objetivo y automatizado, del contenido de ADN.

Refleja por tanto anomalías cromosómicas, siendo la aneuploidía un parámetro de gran especificidad y sensibilidad (238,244).

Cowpe, (239) ha demostrado que la mucosa clínicamente normal de pacientes sanos muestra este perfil de ADN diploide y un perfil anormal de ADN está asociado con enfermedades malignas. Sin embargo hay que tener en cuenta que, aunque la mayoría de las lesiones malignas orales presentan unos perfiles de ADN alterados, en algunos casos pueden ser diploides. Remmerbach y cols.,(2) proponen la combinación de la cuantificación del contenido de ADN con la morfometría celular y nuclear para la distinción de lesiones malignas mediante la citología exfoliativa, alcanzando así valores de una sensibilidad del 98.2% y una especificidad del 100% al combinar las dos técnicas.

Parece ser que la combinación del estudio de la cuantificación del contenido de ADN y la morfometría celular y nuclear proporciona información discriminatoria entre lesiones premalignas y malignas (122).

### **Identificación de marcadores tumorales inmunohistoquímicos:**

La identificación de la expresión de marcadores tumorales en células exfoliadas de la cavidad oral mediante inmunohistoquímica ha recibido un gran interés. Entre ellos uno de los más estudiados ha sido la expresión de las citoqueratinas. Ya ha sido estudiado en células cultivadas, PAFF y muestras citológicas. Los primeros estudios sobre la expresión de las citoqueratinas en citología exfoliativa comparando mucosa normal y lesiones malignas se remonta a 1993 (245). El patrón de expresión de las citoqueratinas proporciona una información útil con respecto al estado de diferenciación celular. Se ha encontrado que las citoqueratinas 16 y 19 aparecen más expresadas en el tejido sano de pacientes con cáncer de tracto superior digestivo y carcinoma de cabeza y cuello que en el grupo control. Sin embargo la citoqueratina 16 no es significativa de malignidad en mucosa oral ya que también aparece expresada en otros procesos

proliferativos benignos. Sin embargo las citoqueratinas K8 y K19 pueden representar un importante indicador de malignidad siempre y cuando esté asociada a otros marcadores como el perfil de ADN (169,171,238,245,246).

La mutación del gen supresor tumoral *p53* es la mutación más frecuente encontrada en el cáncer humano (8,60,68). No es detectada en mucosa oral normal, pero puede ser demostrada a través de inmunohistoquímica en el COCE y lesiones premalignas de la cavidad oral. De la misma forma ha sido identificada en células de tumores malignos mediante citología, pero no en mucosa normal (169,238).

Algunos autores han estudiado, y en algunos casos demostrado, la potencial aplicación clínica de la citología exfoliativa para la detección de las mutaciones en *p53* como marcador neoplásico específico del carcinoma oral de células escamosas. No obstante algunos autores consideran que el elevado número de mutaciones puntuales que se pueden encontrar en *p53* restringe su potencial aplicación clínica en la detección precoz de COCE (124,247-249).

Sigue existiendo actualmente una limitación en los marcadores inmunohistoquímicos en el diagnóstico del COCE, ya que no existe un único marcador existente en todas las lesiones malignas orales y que no esté presente en lesiones benignas o incluso en la mucosa oral normal (76).

### **II.3.2.5 CITOLOGÍA EXFOLIATIVA EN BASE LÍQUIDA:**

Desde 1940 en que el Dr Papanicolaou introdujo su técnica, que todos conocemos como Citología Convencional o Pap Test, para el diagnóstico precoz del cáncer uterino, científicos y clínicos han intentado desarrollar un sistema que pudiera mejorar la calidad de las muestras, aumentando así la especificidad y sensibilidad de la técnica (223,224,250). Revisiones como las de Hutchinson y cols. (251) y Kristensen y cols. (252) demostraron que las limitaciones del frotis de Papanicolaou, más que a error humano o de los

laboratorios, se debían a otros factores propios del procedimiento mismo. La técnica convencional de Papanicolau presenta una serie de limitaciones: se calcula que sólo del 10 al 20% de las células recolectadas en la toma de muestra son colocadas en el portaobjetos, la lámina debe de ser fijada entre 15 a 30 segundos después de realizar el extendido para evitar artefactos y además se produce una dispersión irregular de las células sobre una gran área, junto con moco, leucocitos, eritrocitos...(225).

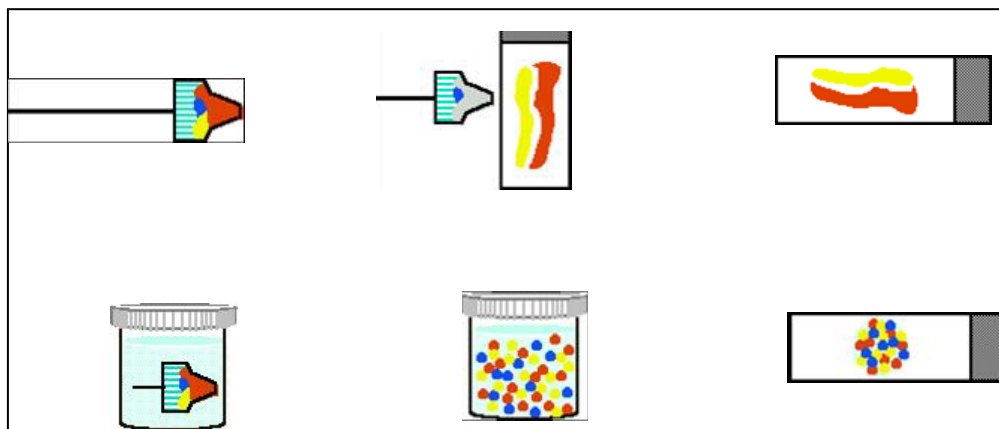


Figura 13: Representación esquemática de las diferencias entre citología exfoliativa convencional y en base líquida.

Con el propósito de reducir los falsos negativos y mejorar la prueba de Papanicolau como examen diagnóstico para cáncer de cuello uterino y sus precursores, en la década de los 90 se han desarrollado nuevas técnicas como la Citología en Base Líquida ( Liquid based cytology, LBC) o también llamada en monocapa, así como la revisión computerizada de las muestras (253). Son el Sure Path (Surepath®, Tripath Imaging®) y el ThinPrep (ThinPrep®, Cytoc®) los sistemas de procesamiento más utilizados (254), el primero se basa en la sedimentación y el segundo en la centrifugación.

En 1996, después de años de trabajo e investigación en Cytoc Corporation, el United States Food and Drug Administration aprobó el ThinPrep Pap Test. Se trata de una nueva técnica de citología en base líquida o monocapa para el procesamiento de las muestras de citología

cervical (255). En esta técnica, a diferencia de la citología convencional donde las células se extienden en un porta y luego se fijan, se introduce el instrumento de toma de muestra en un medio líquido (PreservCyt®). Este líquido permite la fijación inmediata de la muestra evitando la degeneración por aire, conserva además las células en condiciones óptimas, a temperatura ambiente, durante semanas. Además en el procesado de las muestras se eliminan elementos perturbadores que dificultan la correcta visualización como son la sangre, moco, células inflamatorias... Mediante el procesado de las muestras con esta técnica, como veremos a continuación, se soluciona el problema de la mala calidad de las muestras ginecológicas debido a su grosor, permitiendo así un extendido uniforme de la muestra en monocapa. Además es posible la conservación del material recolectado para realizar estudios simultáneos o posteriores de biología molecular (256).

Para el procesamiento de las muestras se desarrollaron dos procesadores:

**Autocyte Prep™**: somete a la muestra a un mezclado para luego separar por capas en gradiente. Posteriormente centrifuga separando las células inflamatorias y la sangre de las células epiteliales. Una pipeta automatizada traslada la muestra libre de elementos perturbadores a un portaobjetos por gravedad obteniendo así una capa delgada.

**ThinPrep™**: mezcla la muestra en un cilindro el cual posee una membrana en un extremo por donde aspira el medio líquido y elementos perturbadores basado en el tamaño de los poros (filtro Trancyt). Luego se transfieren las células obtenidas en la membrana a un portaobjetos.



Figura 14: Representación esquemática del funcionamiento del Thinprep. Modificada de [www.wcpl.com/physician\\_thinprep.asp](http://www.wcpl.com/physician_thinprep.asp)

En ambos sistemas se obtienen muestras finales con un gran número de células, entre 50.000 a 75.000, en una monocapa extendidas en zonas circulares que delimitan el área a estudiar (mucho menor que en la citología convencional). El fondo claro que así se obtiene aumenta la sensibilidad y la calidad de la muestra (257).

A lo largo de los años estos procesadores han ido evolucionando sus características y el tiempo de trabajo. El ThinPrep 2000 sólo podía procesar una muestra cada vez, con la aparición del Thinprep 3000 se pueden procesar 80 muestras a la vez.

El Sure Path (Surepath®, Tripath Imaging®) a diferencia del Thinprep el procedimiento se basa en la centrifugación y sedimentación de las células por diferencia de gradiente (254).

Teniendo en cuenta que todo este proceso tecnológico aumenta el coste considerablemente de la detección del cáncer uterino en la sanidad pública con respecto a la utilización de la técnica clásica de Papanicolau, se han realizado numerosos estudios comparativos entre la citología convencional y la citología en base líquida. Diversos autores mencionan una disminución del número de preparaciones insatisfactorias o satisfactorias pero limitadas. Sin embargo otros estudios no encuentran una diferencia

estadísticamente significativa entre las dos técnicas en el diagnóstico de neoplasias cérvico-uterinas; la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron semejantes con ambos métodos. Reflejan, sin embargo, como ventajas de la citología en base líquida una disminución del tiempo de interpretación de las muestras por parte de los anatomopatólogos y la posibilidad de usar la misma muestra para estudios del papilomavirus humano y para estudios moleculares (257-260,260-268).

En las preparaciones de base líquida, la muestra y el dispositivo de recolección se transportan en un recipiente que contiene un líquido conservador. Esto permite la inmediata fijación de las células, con lo cual todo el material recolectado puede usarse. Esa técnica permite obtener preparaciones con abundancia de células dispersas en una capa fina y homogénea. Sangre, moco e inflamación queda distribuido por toda la muestra (250,269).

Se han realizado numerosos estudios en la última década para valorar si con la citología en base líquida aumentaba considerablemente la especificidad y sensibilidad de la técnica con respecto a la citología vaginal. Algunos datos reflejan una especificidad y sensibilidad alta de la citología en base líquida frente a la citología convencional, sin embargo otros autores concluyen que las diferencias obtenidas no son estadísticamente significativas y que por tanto no justifica el uso de esta técnica debido al aumento de coste que supone para ser utilizada como método de screening del cáncer de cuello uterino (262,265,266,270).

Actualmente se ha planteado la aplicación de la citología en base líquida, tal como ocurrió en la citología cervico-uterina, a la citología oral. Con el afán de reducir los problemas de de la citología oral convencional como preparaciones insatisfactorias, baja especificidad y sensibilidad de la técnica, se han comenzado a hacer estudios de citología oral en base líquida. Basándose en los estudios de su aplicación en ginecología se obtendrían preparaciones dispersas y homogéneas en una sola capa, sobre

un fondo claro que supone una mayor facilidad para el anatomopatólogo en su interpretación.

Kujan y cols., (271) han realizado un estudio a cerca del uso de la citología en base líquida en mucosa oral normal, han visto que con esta técnica se reducen los falsos negativos ya que, a diferencia de la citología convencional, casi la totalidad de la muestra recogida es fijada al introducirla en el medio líquido. Esta técnica presenta además la ventaja de poder disponer de suficiente material celular para la realización de estudios inmunohistoquímicos, detección de papilomavirus y estudios moleculares.

En el 2005, Hayama y cols., (253) comparan el uso de la citología convencional y en base líquida para el diagnóstico de lesiones orales, comparando la espesura de la muestra, distribución celular, microbiota e inflamación. Han observado que realmente la citología en base líquida proporcionaba unas preparaciones más uniformes, con una distribución delgada y sobre un fondo claro.

El primer estudio publicado usando cytobrush y citología en base líquida en carcinomas epidermoides orales fue realizado por Navone y cols., (3) en el 2007, encontrando una especificidad del 99% y una sensibilidad del 95.1% en muestras con citología en base líquida. Las muestras inadecuadas fueron del 8.8%.

Estos resultados sugieren una esperanza para la utilización de la citología exfoliativa en base líquida en la detección precoz del carcinoma oral de células escamosas. Permite el estudio morfológico de las células en mayor cantidad y calidad, así como la obtención de suficiente material celular para poder realizar gran variedad de estudios inmunohistoquímicos, virales y sobre todo moleculares. Es necesaria todavía la realización de más estudios con esta técnica ya que su aplicación a la citología oral es muy reciente.

#### **II.4 - ANÁLISIS MOLECULAR EN CITOLOGÍA EXFOLIATIVA DEL COCE:**

En gran medida el reciente interés por el estudio de la citología oral en la patología cancerosa oral, se ha debido a la aplicación de nuevas técnicas moleculares. Mientras que la evaluación citológica oral clásica requiere una labor intensa y un elevado grado de experiencia para la identificación y valoración de células con morfología sospechosa, el análisis de las alteraciones moleculares es objetivo y trata de identificar anomalías génicas específicas no sólo a nivel oral (272) sino también cervical (273).

##### **II.4.1- MARCADORES MOLECULARES CITOLÓGICOS:**

El estudio genético de marcadores tumorales de muestras citológicas permite detectar alteraciones moleculares antes de que se produzcan cambios en la morfología celular y de que esos cambios sean visibles clínicamente. La evaluación citológica clásica mediante microscopio es una labor intensa que requiere un elevado grado de experiencia por parte del observador con importantes variaciones subjetivas por parte de los anatomopatólogos, mientras que el análisis de las alteraciones moleculares es un método objetivo. Los cambios moleculares en la progresión del carcinoma oral de células escamosas suponen alteraciones en los cromosomas que producen alteraciones en el ARN y por tanto en la síntesis proteica (139,167,274).

La utilización de la citología exfoliativa en la cavidad oral para el diagnóstico de lesiones premalignas y malignas sólo mediante el análisis morfológico clásico no es suficiente para obtener una alta sensibilidad de la técnica. Además el análisis citológico clásico necesita que el patólogo tenga elevada experiencia en la determinación de fenómenos patológicos, sin

embargo el análisis molecular es más objetivo e identifica anomalías genéticas específicas (122,275).

Se ha aplicado el estudio de marcadores moleculares en citología exfoliativa oral como alteraciones epigenéticas (hipermetilación de regiones promotoras) e inestabilidad genómica como la pérdida de heterocigosidad (LHO) y la inestabilidad de microstélites (124).

Rosas y cols., (276) estudiaron la hipermetilación de los genes p16, MGMT y DAP-K en saliva empleando una PCR específica de metilación y se encontraron con patrones anormales de hipermetilación en pacientes con carcinoma.

Huang y cols., (277) emplearon técnicas de PCR para amplificar el ADN de células tumorales orales obtenidas mediante citología exfoliativa, para el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Encontraron que un 66% de los casos estudiados presenta LHO en el gen p53 en un punto y 50% presentó pérdida de heterocigosidad en otro punto.

La PCR y la RFLP también fueron utilizadas para el análisis de marcadores de microsatélite. Las mutaciones genéticas, LHO o desequilibrio en los microsatélites (MI), son características de los carcinomas orales de cabeza y cuello por lo que pueden ser usadas como marcadores tumorales de malignidad. Nunes y cols. (278) utilizando el análisis de microsatélite en células orales obtenidas mediante citología exfoliativa y enjuagues bucales, encontraron pérdida de heterocigosidad en un 84% de los casos estudiados. Por tanto sugieren que esta técnica puede ser útil en el diagnóstico precoz del COCE.

En estudios realizados por Remmerbach y cols., donde utilizaron el análisis citométrico para evaluar la sensibilidad de la citología exfoliativa de la cavidad oral en el diagnóstico precoz de COCE, han encontrado una sensibilidad del 94.6% y una especificidad del 99.5%. El valor predictivo positivo fue del 100% y el negativo del 99.5% (2).

El uso de marcadores moleculares en citología exfoliativa oral permitirá el diagnóstico precoz de lesiones premalignas y malignas de la cavidad oral antes de que éstos sean visibles clínicamente, así como una valoración objetiva de la progresión de la enfermedad y su respuesta a diferentes tratamientos (122).

### **II.4.2- ANÁLISIS DEL ARN: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA:**

La actividad de un gen comienza con la transcripción, proceso que consiste en la síntesis de una molécula de ARN mediante el copiado de una porción de una de las hebras de ADN. Esta reacción es catalizada por una ARN *polimerasa* y supone una serie de eventos complejos aún no bien conocidos. El término expresión genética abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se ha localizado en el lugar adecuado y realiza su función, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular. Este proceso puede ser estudiado mediante técnicas de análisis de proteínas (RIA, ELISA, Western-blot, inmunohistoquímica...); si además la proteína es un enzima se puede estudiar su grado de expresión titulando su actividad enzimática. Sin embargo, es un hecho ampliamente aceptado que la abundancia de un ARNm y el número de moléculas por célula de éste se correlaciona con el nivel de síntesis de la proteína correspondiente. Por esta razón, en la práctica, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante la detección y/o cuantificación de los ARNm funcionales en el citoplasma, así los métodos de estudio utilizados se basan en la capacidad de detectar ARNm específicos y no los productos proteicos (279).

Actualmente se ha demostrado que se puede extraer ARN a partir de células obtenidas mediante citología exfoliativa de la cavidad oral y así poder estudiar la expresión genética y realizar un diagnóstico precoz de lesiones premalignas y malignas orales (280). Se han realizado recientemente

estudios del análisis del ARN en saliva debido a su facilidad para la toma de muestra en la cavidad oral, sin embargo se ha visto que no proporciona una medición directa de la expresión genética del tejido, debido a que éste mide el ARN estable extracelularmente identificando marcadores derivados de la enfermedad y no los relacionados con la etiología de la misma (281,282). El análisis del ARN de las células obtenidas mediante citología exfoliativa permite estudiar cambios genéticos en células vivas obtenidas de zonas con riesgo de enfermedad.

La posibilidad de aislar ADN de células epiteliales para el estudio de expresión genética es un hecho demostrado, sin embargo el aislamiento de ARN no ha sido validado tan fehacientemente ya que las ribonucleasas presentes en la saliva degradan rápidamente el ARN durante la recolección de la muestra citológica (122). Existen estudios piloto que demuestran la posibilidad de aislar ARN de células obtenidas por citología exfoliativa oral y cuantificar el ARNm mediante RT-PCR o análisis mediante microarrays (273,274,283,284).

Spira y cols. demuestran la utilización de ARN obtenido de mucosa oral con distintos instrumentos para su análisis mediante PCR y espectrometría de masas (285).

### **Extracción del ARN celular:**

La posibilidad de aislar ARN lo más intacto posible es esencial para el análisis de la expresión genética. El éxito de la extracción de ARN de las células es totalmente dependiente de la eliminación de toda posible contaminación de ribonucleasas (ARNasas) que degradan el ARN durante y después de la extracción (284,286).

Las ribonucleasas son enzimas muy resistentes y de gran actividad catalítica: son resistentes al calor, manteniendo incluso una considerable actividad tras un ligero calentamiento, y además son activas dentro de un amplio rango de pH. Existen las ARNasas endógenas que varía según el tipo

de tejido que estamos estudiando. Hay que tener en cuenta que la misma molécula de ARNm puede traducirse muchas veces y que el tiempo que perdure en la célula afecta a la cantidad de proteína sintetizada. Así las diferentes vidas medias de estos ARNm están controladas por estas RNAsas que ayudan a la célula a especificar el nivel de cada proteína que se sintetiza (279). Además existen las exógenas que proceden del material utilizado, soluciones, manos del operador etc.

A diferencia del ADN, el ARN es muy inestable una vez obtenida la muestra citológica o el tejido a estudiar, debido a la presencia de estas enzimas, por ello resulta crítica la congelación de la muestra o su rápida homogeneización en una solución para desnaturalizar todas las proteínas celulares, incluyendo las RNAsas (284,286-288).

Una vez homogeneizada la muestra y llevada a cabo la desproteinización del ARN con agentes desnaturizantes se procede a aislar físicamente el ARN del resto de los componentes celulares. Para llevar a cabo esta separación existen dos procedimientos fundamentales (289):

**Ultracentrifugación en gradiente de densidad:** basada en la mayor densidad del ARN respecto al resto de los componentes celulares al someter a la muestra a un centrifugado de alta velocidad en un gradiente de cloruro de cesio (CICs). Así los distintos componentes celulares van quedando a distintas alturas en el tubo, mientras que el ARN forma un pelet en el fondo.

**Extracción fenólica:** basada en la propiedad de los ácidos nucleicos de ser más solubles en soluciones acuosas que en solventes orgánicos, para lo que se suele utilizar fenol. En primer lugar se efectúa la homogeneización de la muestra, después se añade un volumen de fenol, se centrifuga la mezcla que origina la separación en dos fases. Una fase inferior orgánica que contiene lípidos, proteínas y fragmentos subcelulares varios; y una fase superior acuosa que contiene polisacáridos, ácidos nucleicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles.

Para la extracción del ARN a partir de tejidos se recomienda actualmente una combinación de extracción orgánica con Trizol Reagent (Invitrogen,18) seguido de una purificación en columna. La elección de la extracción de ARN mediante este método se debe a que esta técnica facilita el tratamiento posterior de destrucción de ADN, el cual se realizaba tras la extracción del ARN. Este paso es fundamental en este protocolo, ya que evita la contaminación genómica de la muestra, mediante la digestión del ADN presente, consiguiendo mantener únicamente el ARN (287,290). Bajo condiciones ácidas el ARN permanece en la fase acuosa superior mientras que el ADN y las proteínas están en la interfase o en la fase orgánica inferior (289).

### **Cuantificación de ARN:**

Existen cuatro métodos más comúnmente utilizados para la cuantificación de la transcripción: Northern Blot, hibridación *in situ*, ensayo de protección de la RNAsa (RPA) y la transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa. El análisis Northern es el único método que proporciona información sobre el tamaño del ARN y la integridad de éste en la muestra. El ensayo de la protección de RNAsa es el método más adecuado para el mapeo de la iniciación de la transcripción y para diferenciar distintos ARNm de tamaño similar. La hibridación *in situ* es el método más complejo de todos, sin embargo es el único que permite la localización de transcritos para células específicas sin un tejido. La principal limitación de estas técnicas es su baja sensibilidad comparativa. La RT-PCR es un método *in vitro* para la amplificación enzimática de secuencias definidas de ARN y permite el análisis de diferentes muestras procedentes incluso de una única célula en el mismo experimento (288).

En los últimos años, el desarrollo de la química y las plataformas de nuevos instrumentos que permitan la detección de productos de la PCR en

tiempo real ha dado lugar a la adopción generalizada de ésta como el método de elección para cuantificar los cambios en la expresión génica. Por otra parte, real time PCR se ha convertido en el método preferido para la validación de los resultados obtenidos de los análisis de la microarrays. Es el método más accesible para realizar mediciones lo más exactas posibles en células individuales (288,291).

Una limitación de la PCR en tiempo real es que necesita utilizar ADN como secuencia diana, ya que las ADN polimerasas no pueden amplificar ARN de una manera similar. Este problema se solventa mediante la transcripción inversa de ARN a ADNc, por tanto la técnica recibe el nombre de RT-PCR cuantitativa, RT-PCR en tiempo real o RT-Q-PCR. Para poder realizar una cuantificación de ARN es necesario por tanto usar este método. RT-PCR (transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa) es la técnica más sensible para la detección y cuantificación de ARNm actualmente disponible (204,205,288).

Para la cuantificación se mide en cada ciclo la cantidad de amplicón producido. La cuantificación del producto se produce mediante al adición de fluorocromos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, así a mayor producto mayor fluorescencia se emite. Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es directamente proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores (292).

Los dos métodos más comunes para analizar los datos obtenidos con RT-qPCR son la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa. La absoluta relaciona la señal obtenida con la PCR al número de copias fijo de una secuencia estándar utilizando una curva de calibración. Las curvas de calibración son altamente reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles. La cuantificación relativa no requiere estándares con

concentraciones determinadas ya que se utiliza la comparación de los datos obtenidos del gen en estudio con uno o más genes controles o housekeeping (288,292).



### **III. MATERIAL Y MÉTODO**



### III. 1 - POBLACIÓN DE ESTUDIO:

La población de estudio en este trabajo son muestras de citología exfoliativa de la cavidad oral, concretamente de la mucosa yugal, obtenidas con tres instrumentos diferentes. Para los estudios de adecuación de la toma de muestras, éstas presentan un comportamiento independiente de si se recogen en el mismo o en diferentes individuos. Por ello, se toma como población de estudio las muestras recogidas. Se estimó el tamaño muestral necesario para cada uno de los dos objetivos planteados. Para una situación en que la proporción de muestras obtenidas con material suficiente sea del 50% en el caso del instrumento con peor rentabilidad y del 90% en el caso del instrumento con mayor rentabilidad, con un nivel de seguridad ( $1 - \alpha$ ) del 95% y una potencia ( $\beta$ ) del 90%, el número de muestras citológicas necesario es de 31 con cada instrumento, lo cual requiere un tamaño muestral de 93 muestras. Se incrementó este número hasta 104 muestras. Esto supone un total de 208 muestras estudiadas, 104 para llevar a cabo el estudio de expresión genética y 104 para el estudio citológico. Estas muestras han sido tomadas en 29 individuos sanos voluntarios estudiantes de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. Su edad está comprendida entre los 21 y 34 años (media  $23,3 \pm 2,94$ ). El conjunto de individuos está formado por 9 varones y 20 mujeres.

A todos los sujetos se les realiza una historia clínica y una exploración de la cavidad oral para confirmar la ausencia de patología oral. Se excluyen del grupo aquellos sujetos que presentaban alguna enfermedad sistémica y/o patología de la cavidad oral.

Considerando que el tabaco puede influir en la queratinización y por tanto el grosor del epitelio bucal, vamos a incluirlo como una variable de estudio. Para ello recogimos la variable “si fuma” y “no fuma”. Según este criterio la muestra de estudio está formada por 18 no fumadores y 11 fumadores.

### III. 2- TOMA DE MUESTRAS:

Las muestras citológicas de la cavidad oral se obtuvieron, siempre por el mismo profesional, por raspado superficial de la mucosa yugal con tres instrumentos diferentes:

- Cepillo cervical Cytobrush (Med-Scand Medical, Malmo, Suiza).
- Cureta dermatológica de 7mm (Stiefel, Madrid, España).
- Cepillo del Kit Oral CDx® (Cdx Laboratories, Nueva York , USA).

No fue necesaria la aplicación de anestesia tópica y los sujetos no mostraron incomodidad en la toma de muestras con ninguno de los instrumentos empleados.

#### **Toma de muestra con Cytobrush :**

La toma de muestra se obtiene realizando un raspado vigoroso con el cepillo sobre la mucosa yugal, rotando el cepillo entre 10-15 veces.

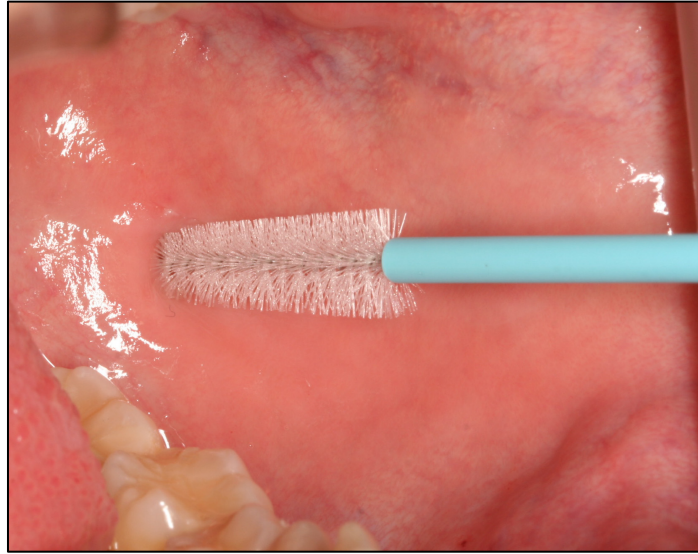


Figura 15: Toma de muestra en mucosa yugal con Cytobrush

**Toma de muestra con cureta dermatológica:**

Para realizar la toma de muestra con la cureta dermatológica se utiliza la “técnica del lápiz” que consiste en sujetar la cureta con los dedos pulgar, índice y corazón como si se tratase de un lápiz. A continuación se realiza un raspado superficial de la mucosa yugal.

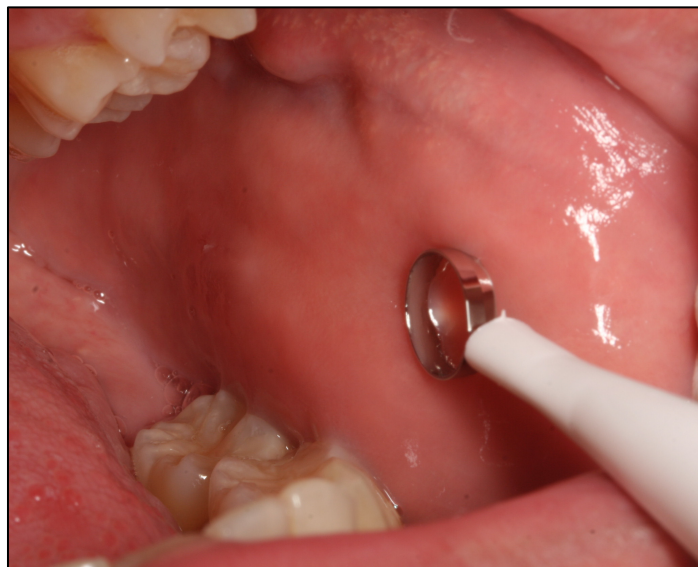


Figura 16: Toma de muestra en mucosa yugal con Cureta.

### **Toma de muestra con cepillo Oral CDx:**

El cepillo del Kit Oral CDx es un cepillo circular especialmente diseñado para la toma de muestras citológicas en la cavidad oral. Aunque el kit contiene un portaobjetos y fijador para realizar citología convencional asistida por ordenador, nosotros solamente usamos el cepillo para la toma de muestras. Se aplica el cepillo usando la parte plana en la mucosa yugal y se realiza entre 5-15 rotaciones ejerciendo determinada presión hasta obtener una zona rojiza.

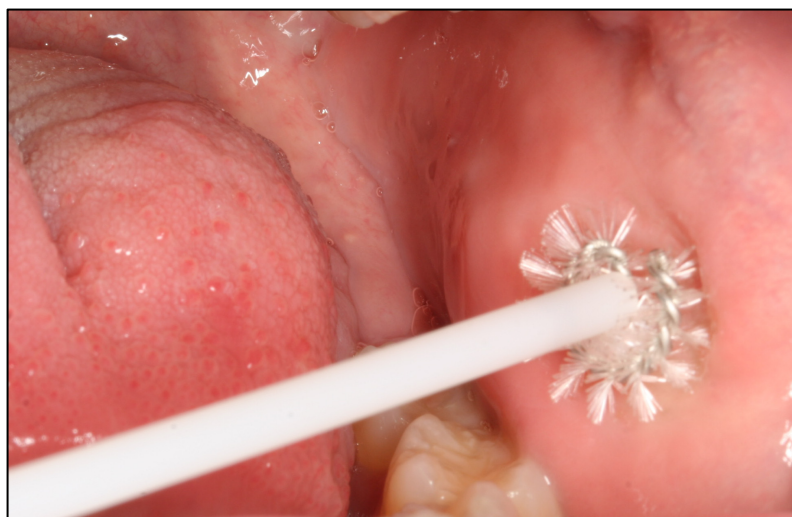


Figura 17: Toma de muestra en mucosa yugal con el cepillo del Oral CDx

Una muestra obtenida con cada instrumento se utiliza para el estudio de citología en base líquida mediante el ThinPrep®2000. Utilizamos como medio de transporte y conservación de las muestras el PreservCyt®. Introducimos el instrumento con la muestra recolectada dentro de este vial, se agita enérgicamente y se rota varias veces en sentido contrario a las agujas del reloj hasta que la mayor parte de la muestra queda suspendida en el medio líquido. Para su análisis se utiliza el protocolo que recomienda el fabricante para el ThinPrep®2000.

Otra muestra obtenida con cada instrumento se utiliza para el estudio molecular, concretamente para el estudio del ARN obtenido mediante la citología exfoliativa. En este caso el medio de transporte y conservación de las muestras que usamos es el RPMI-1640 MEDIUM (Microvet, Madrid), formulado para mantener numerosas líneas celulares. Para su conservación debe de mantenerse entre 2-10°C y protegerlo de la exposición de la luz.

### **III.3.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS**

#### **III.3.1.- ANÁLISIS CITOLÓGICO:**

##### **Procesado de las muestras:**

Se utilizó el protocolo estándar recomendado por el fabricante para la preparación en monocapa de las muestras mediante el procesador ThinPrep®2000 (Cytoc. Corporation, Boxborough, Mass., USA). Para ello se coloca el vial en el procesador, éste realiza un paso de dispersión/agitación de la muestra mediante el cual disgrega sangre, moco y material no diagnóstico para homogeneizar la muestra. Seguidamente el procesador genera una presión negativa dentro del filtro (CMT, “Controlled Membrane Transfer™ technology”) haciendo fluir la muestra a través de éste donde se deposita por tanto una capa fina y homogénea de material celular para diagnóstico. El procesador controla constantemente el flujo a través del filtro evitando así que la cantidad de células que quedan en éste sea demasiado escasa o con una concentración demasiado elevada. Finalmente el ThinPrep®2000 transfiere el material celular al portaobjetos y se fija. Los portaobjetos resultantes son teñidos mediante la tinción de Papanicolaou convencional.

### **Evaluación de la calidad de las muestras:**

Se realiza una evaluación citológica de la calidad de las preparaciones obtenidas con cada instrumento por parte del anatomopatólogo. Los parámetros estándar utilizados para la valoración fueron: celularidad de la muestra, distribución en el portaobjetos, calidad de la preparación y tipos de células presentes.

Se consideran muestras inadecuadas, siguiendo las pautas de la Sociedad Británica para la Citología Clínica del 2002, aquellas que presentaban algunas de las siguientes características: baja celularidad, fijación pobre (secado) y/o capa gruesa (271,293).

La celularidad de las muestras fue evaluada, como si se tratase de un frotis cervical, usando el Sistema Bethesda 2001 (271,294,295) y con el microscopio Eclipse™ 6.400X (Nikon). Se considera que la citología en base líquida es aceptable cuando contiene un mínimo aproximado de al menos 5.000 células escamosas bien conservadas. La cantidad promedio de células que tiene que contener un campo para que el resultante de la muestra sea mayor de 5.000 se calcula teniendo en cuenta el diámetro de la preparación, que en el caso del Thinprep es de 20 mm, y el ocular empleado. Se dibujó con un rotulador una línea en el centro de cada preparación. Usando ocular FN20/10X aumentos se evaluaron las células del epitelio escamoso que se visualizaban correctamente en diez campos discontinuos en el diámetro medio de cada preparación. Se requiere por tanto una media de al menos 50 células por campo para conseguir la preparación mínima de 5.000 células/preparación como recomienda el Sistema Bethesda para que la muestra sea clasificada como adecuada. Si alguna muestra contiene áreas vacías o espacios, se calcula el porcentaje de las zonas hipocelulares y esa proporción es reflejada en los campos incluidos en el cálculo (294).

### **III.3.2.- ANÁLISIS MOLECULAR:**

El método que hemos utilizado en el procesado de las muestras para el análisis molecular implica el aislamiento de ARNm de cada muestra, preparación del cADN mediante transcriptasa inversa y amplificación del cADN específico de un gen que se expresa de forma constante en todos los tejidos (housekeeping). En este sentido, en el laboratorio se ha empleado un procedimiento para la cuantificación de la expresión génica del gen ABL (Albeson) mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) a partir de células obtenidas con los tres instrumentos.

Los pasos a seguir son los siguientes:

#### **A- Extracción del ARN total**

Para la extracción del ARN total se procede inicialmente a una centrifugación a 12000 rpm durante 1 minuto de las muestras. Tras desechar el sobrenadante, el pellet de células se procesó con el kit RNeasy minikit (Quiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. El procedimiento se basa en la retención en membrana del ARN y posterior elución. La integridad del ARN se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **B- Obtención del cADN**

El ARN obtenido se convierte en cADN mediante la reacción de retrotranscripción empleando la transcriptasa reversa AMV (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y "random primers" (Roche). La reacción se realiza en un volumen final de 20 microL siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. La mezcla se incuba a 37°C durante una hora y tras la desnaturalización de la transcriptasa a 65°C durante 10 minutos el cADN obtenido se almacena a -20°C hasta su utilización.

La integridad y calidad del cADN obtenido se comprueba mediante PCR en tiempo real como se indica en el siguiente paso.

### **C- Cuantificación por RT-qPCR**

Se escogieron un diseño de olidos y sondas, es decir, secuencias de nucleótidos del gen "housekeeping" ABL. Para el análisis de PCR, se mezclaron 5µl de la reacción de transcripción inversa con 15µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), conteniendo 250nM de los cebadores , junto con 125nM de la sonda TaqMan, específicos del gen ABL. Los cebadores y sonda del gen ABL son suministrados por la casa comercial.

El método está basado en la propiedad 5'-exonucleasa que posee la Taq polimerasa. La sonda TaqMan está marcada con un fluoróforo marcador en el extremo 5' (reporter) y otro fluoróforo en el extremo 3' (quencher). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el marcador es apantallada por el quencher de tal manera que no se observa fluorescencia alguna. Conforme se va produciendo la reacción PCR debido a la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, se van liberando moléculas del fluoróforo marcador, lo que permite la emisión de fluorescencia. Dicha fluorescencia se mide con un equipo ABI 7300 (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems), capaz de detectar los productos de PCR conforme se van acumulando durante la reacción, lo cual permite la cuantificación precisa y reproducible de ADN. Esta fluorescencia es proporcional al número de moléculas de ADN presentes en la muestra, es decir, a la expresión del gen de interés.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- 10 min a 95°C, para la activación del enzima.
- 40 ciclos de dos pasos: 15seg. a 95°C., · 1min. a 60°C.

Todas las muestras se analizaron por duplicado. Para la cuantificación se empleó una curva standard comercial de ABL (ABL FusionQuant Standards, Ipsogen, New Haven USA). Los valores para determinar el ciclo umbral (Ct) (porcentaje a partir del cual se obtiene respuesta) se midieron con el sistema de PCR en tiempo real ABI 7300 empleándose el software instalado (7300 System SDS Software, Applied Biosystems) y se transformaron en número de copias de ABL utilizando las curvas standard obtenidas el mismo día del experimento.

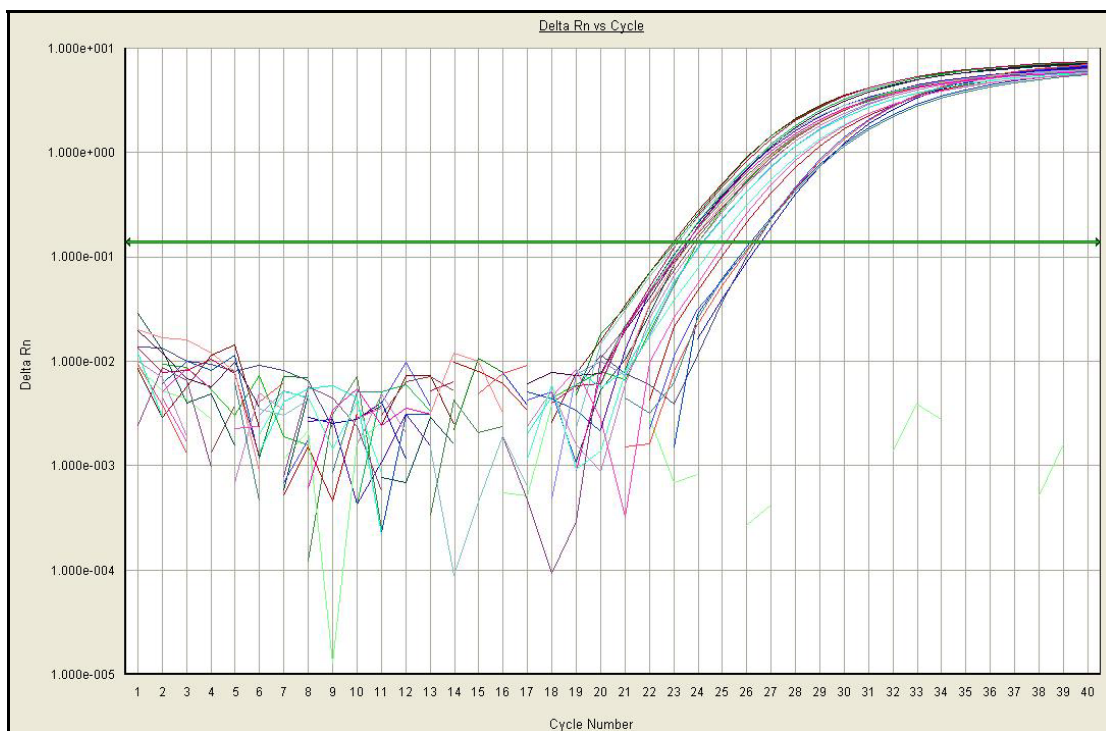


Figura 18: Determinación de la expresión del gen ABL. Gráfica correspondiente a la RT-qPCR para ABL, donde la línea horizontal verde se corresponde con el Ct: ciclo en el que la intensidad de la emisión de una muestra sobrepasa la línea de base (ruido de fondo).

### **Evaluación de la validez de las muestras:**

Para el estudio de utilidad en la obtención de muestras citológicas, para poder llevar a cabo estudios de expresión genética, con cada uno de los instrumentos de citología exfoliativa utilizados, se consideraron dos fases consecutivas.

Una primera valoración cualitativa, analizando la obtención de muestra suficiente con cada instrumento. Se considera muestra suficiente para poder llevar a cabo estudios de expresión genética mediante citología exfoliativa aquella que presenta valores de cuantificación de ARN > de 0 y muestra insuficiente con valores 0.

Y una segunda valoración cuantitativa en aquellas muestras consideradas suficientes. En éstas se analizó la cuantificación de la expresión genética de ABL en relación al tipo de instrumento utilizado.

### **III.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Se realizó la recogida de las variables de estudio en una base diseñada al efecto, con comprobación repetida de la calidad de los datos. En todo caso, no se recogieron datos que permitieran la identificación de las personas participantes, garantizando su confidencialidad. Como primera etapa se describe la muestra. Para la descripción de las variables cuantitativas se emplea media o mediana y desviación estándar (SD) o rango intercuartílico. Para variables categóricas se emplea frecuencia y porcentaje. En el análisis univariante, se utilizan las siguientes pruebas: para comparación de medias, la prueba U de Mann Withney o la H de Kruskall Wallis, según condiciones de aplicación; para comparación de proporciones, la Ji cuadrado o la prueba exacta de Fisher según condiciones de aplicación.

Para estudiar la capacidad de obtención de muestras suficientes con cada instrumento, se realizó un análisis de regresión logística binomial,

siendo la variable dependiente la obtención de muestra suficiente para el estudio de expresión genética y como variable independiente la técnica utilizada. Se tomó como técnica de referencia el Cytobrush®.

Para el análisis estadístico se empleó el paquete SPSS versión 15.0.

### **III.5.- ASPECTOS ÉTICOS:**

Este estudio ha obtenido el visto bueno del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia.

Los alumnos fueron informados de la naturaleza del estudio en el que iban a participar y dieron su autorización por escrito firmando el correspondiente consentimiento informado, según modelo detallado en anexo 1.

Todas las muestras citológicas recogidas son anonimizadas para su posterior conservación y utilización para futuros estudios en esta línea de investigación. No se recogieron datos que permitieran la identificación de las personas participantes, garantizando su confidencialidad.



## **IV. RESULTADOS**



#### IV. 1- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS:

##### Sexo y edad

La población de estudio está formada por 9 varones y 20 mujeres. La media de edad de los 9 sujetos varones es de  $22.56 \pm 1.67$  años con un rango de 21- 25 años. En cuanto al grupo de las mujeres que está formado por 20 la media de edad es de  $23.60 \pm 3.33$  años con un rango de 21-34 años. No existen diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.18$ ).

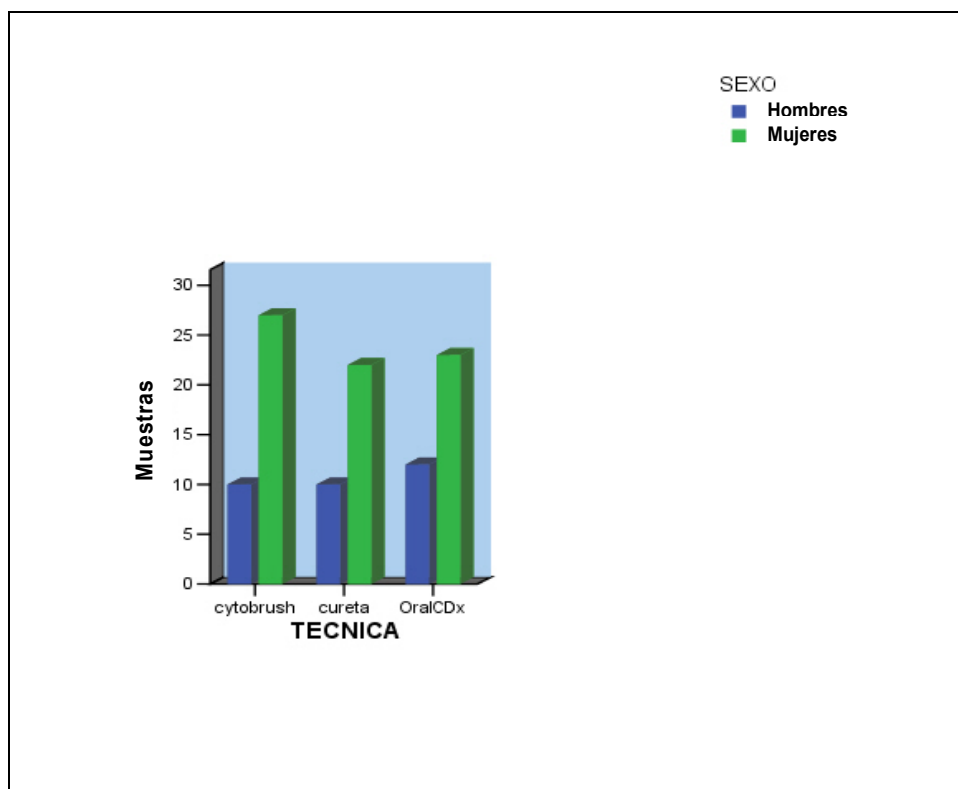


Figura 19: Distribución de las muestras según el sexo e instrumento utilizado

**Consumo de tabaco:**

Con respecto al consumo de tabaco, el 33,3% de los varones (n=3) y el 40% de las mujeres (n =8) son fumadores, no existiendo diferencias significativas ( $p= 0.732$ ) en el hábito tabáquico según el sexo (Tabla 3).

Sexo	Hombres	Mujeres	
Edad	22.56±1.67	23.6±3.33	TOTAL
Fumador	3 (33,3%)	8 (40%)	11(37,9%)
No fumador	6(66,7%)	12(60%)	18 (62,1%)

Tabla 3: Características clínicas y demográficas de la población a estudio. No existen diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y el consumo de tabaco ( $p= 0.732$ ).

Analizando cada una de las técnicas en relación al consumo de tabaco, se observa que el 35.1% de las muestras obtenidas con Cytobrush procedían de sujetos fumadores, el 34.4% para las obtenidas mediante cureta y un 34.3% para las recogidas con OralCdx. No se encuentran estadísticamente significativas, por lo que la distribución de muestras obtenidas de sujetos fumadores no es diferente según la técnica de obtención de muestras (figura 20).

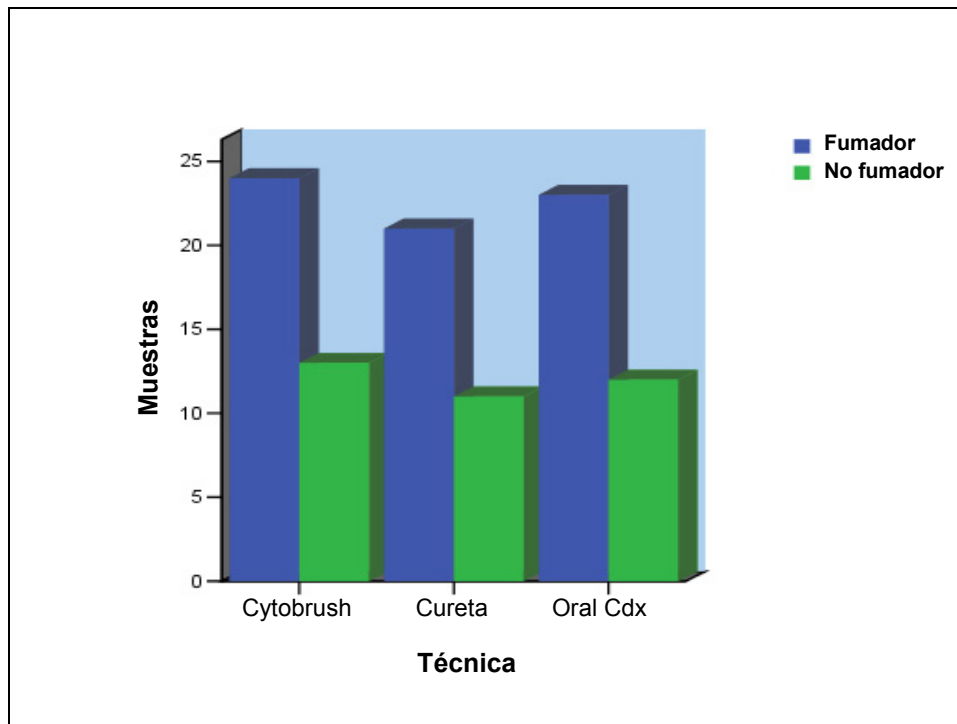


Figura 20: Distribución de las muestras según el hábito tabáquico e instrumento utilizado

## IV.2- ANÁLISIS CITOLÓGICO

No encontramos diferencias entre la celularidad de las preparaciones y el instrumento utilizado para la toma de muestras. Todas las preparaciones de citología en base líquida procesadas con el ThinPrep®2000 mostraron una calidad de preparación adecuada, con más de 50 células por campo. En todos los frotis estudiados las células estaban distribuidas de manera uniforme y sin presencia de moco, sangrado, exudado inflamatorio ni artefactos. No se encontró correlación entre el número medio de células por muestra y el tipo de instrumento utilizado para la recogida de las muestras (Figura 21).

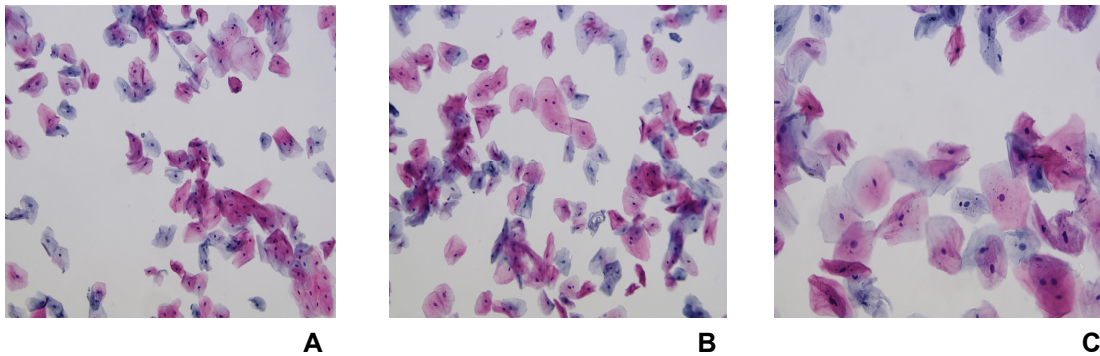


Figura 21: A: citología en base líquida con Cytobrush, B: citología en base líquida con Cureta, C: citología en base líquida con Oral CDx. Se observa que en citología en base líquida no se aprecian diferencias en la calidad de las muestras en relación al tipo de instrumento utilizado. Papanicolaou (20X, 40X).

Con respecto al tipo de células observadas decir que todas las muestras estaban constituidas en general por dos tipos de células: superficiales e intermedias, no encontrando diferencias entre las preparaciones citológicas de los tres instrumentos. No observamos células basales en ninguna de las 104 muestras analizadas. Hemos observado signos de queratinización de forma aislada, así en 20 muestras existía algún signo de disqueratosis, en 6 muestras hemos visto paraqueratosis y también se han documentado 3 perlas de queratina. Estos hallazgos tampoco mostraron correlación con el tipo de instrumento utilizado para la toma de muestra (Figura 22).

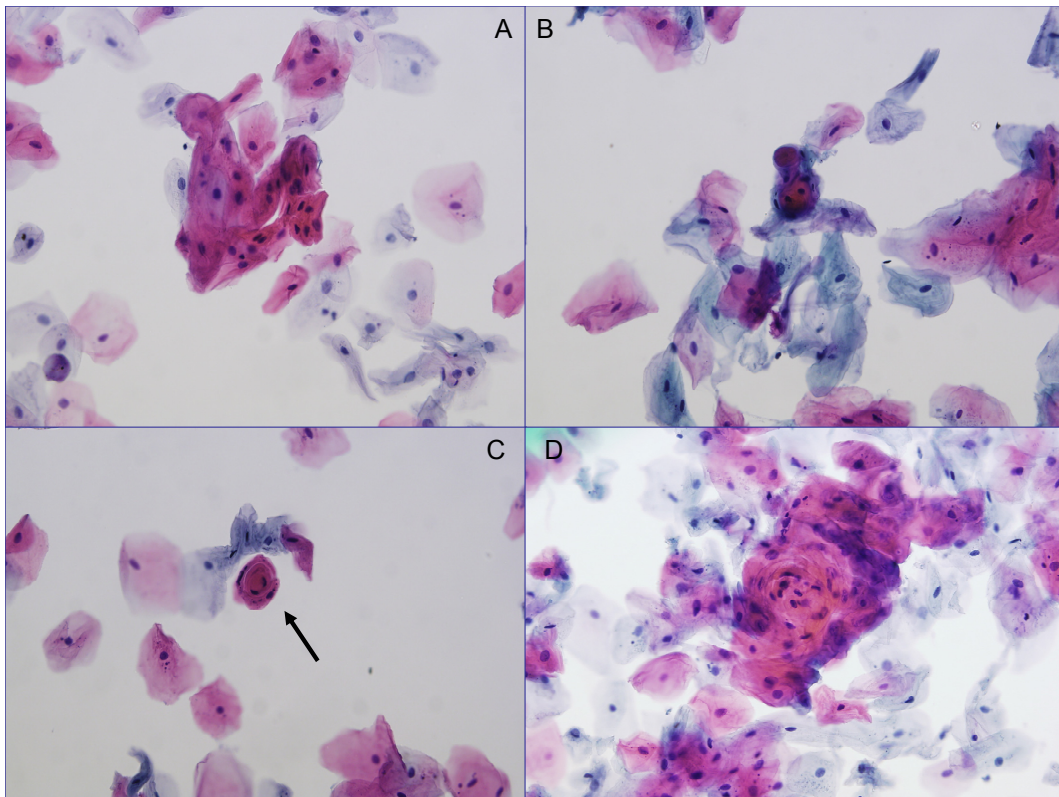


Figura 22 : Alteraciones en el patrón de queratinización del epitelio oral normal en citología en base líquida. A:Paraqueratosis,B: Disqueratosis, C y D:perlas de queratina.Papanicolaou (40X).

### IV.3- ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS

#### IV.3.1- Valoración cualitativa:

En una valoración cualitativa el 72.1% (n=75) de las muestras estudiadas aportaron suficiente material celular (ó ARNm) para el estudio de la expresión genética del gen ABL. En un estudio comparativo de los tres instrumentos utilizados para la toma de muestras citológicas, se observa que con el Cytobrush sólo el 48.6% de las muestras fueron suficientes frente al 90.6% tomadas con cureta y al 80% de las obtenidas con el Oral CDx, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 16.6$  y  $p < 0.001$ ) (Tabla 4 y Fig 23)

Instrumento	n	Suficiente		Insuficiente	
		n	%	n	%
Cytobrush	37	18	48.6	19	51.4
Cureta	32	29	90.6	3	9.4
Oral Cdx	35	28	80	7	20
Total	104	75	72.1	29	27.9

Tabla 4: Número y porcentaje de muestras adecuadas (válidas) e inadecuadas según técnica de obtención de ARN. Las diferencias son estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 16.6$  y  $p < 0.001$ )

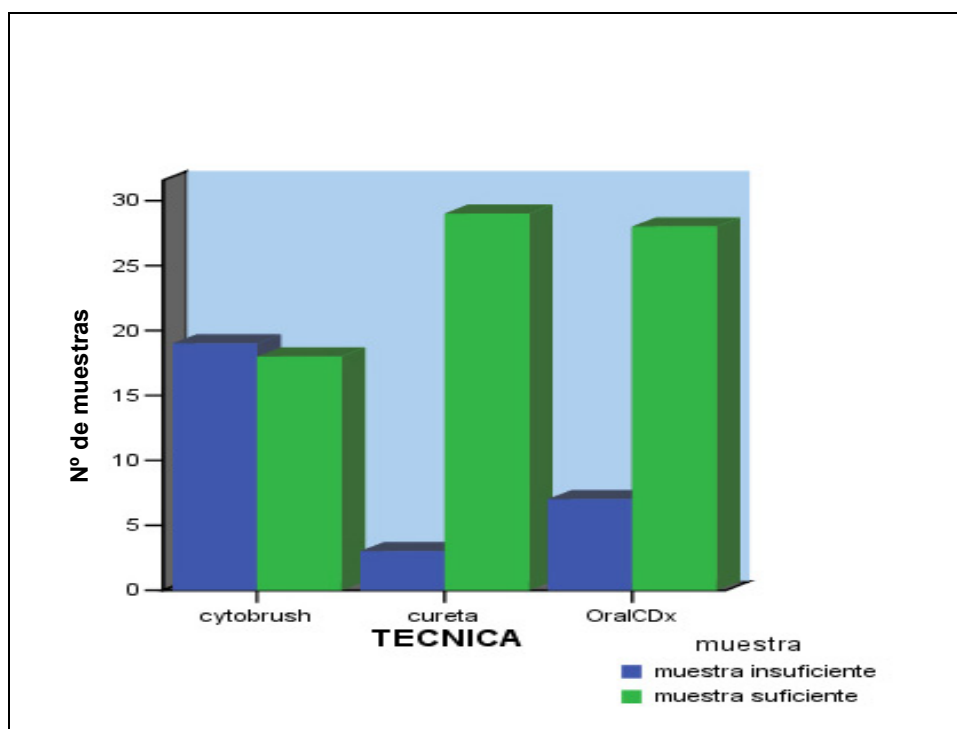


Figura 23: Distribución de las muestras suficientes e insuficientes en relación al tipo de instrumento.

Al realizar un análisis de la validez de las muestras en relación a las variables clínicas y demográficas de la población (tabla 5) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y edad y la obtención de muestra suficiente o insuficiente ( $\chi^2 = 0.195$ ,  $p = 0.65$ ).

	Muestras suficientes(75)*	Muestras insuficientes (29)*	p
<i>Sexo</i>			
Hombres (32)*	68.82% (22)	31.3% (10)	0.6
Mujeres (72)*	73.6% (53)	26.4% (19)	
<i>Tabaco</i>			
Fumador (36)*	69.4% (25)	30.6% (11)	0.6
No Fumador(68)*	73.5% (50)	26.5% (18)	
Edad	23.5±3.2	24.4±3.2	0.108

Tabla 5: Relación entre las variables clínicas y demográficas y la obtención de muestras válidas y no válidas. No se observan diferencias estadísticamente significativas. \* Entre paréntesis se recoge el número de muestras en la categoría respectiva. Los datos son en porcentaje (frecuencia) o media ± DS.

Evaluando la validez de las muestras en relación al consumo de tabaco, se observa un 30.6% de muestras insuficientes en sujetos fumadores y un 26.5% en sujetos no fumadores. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el consumo de tabaco y la obtención de muestra suficiente o insuficiente. ( $\chi^2 = 0.195$ ,  $p = 0.65$ )

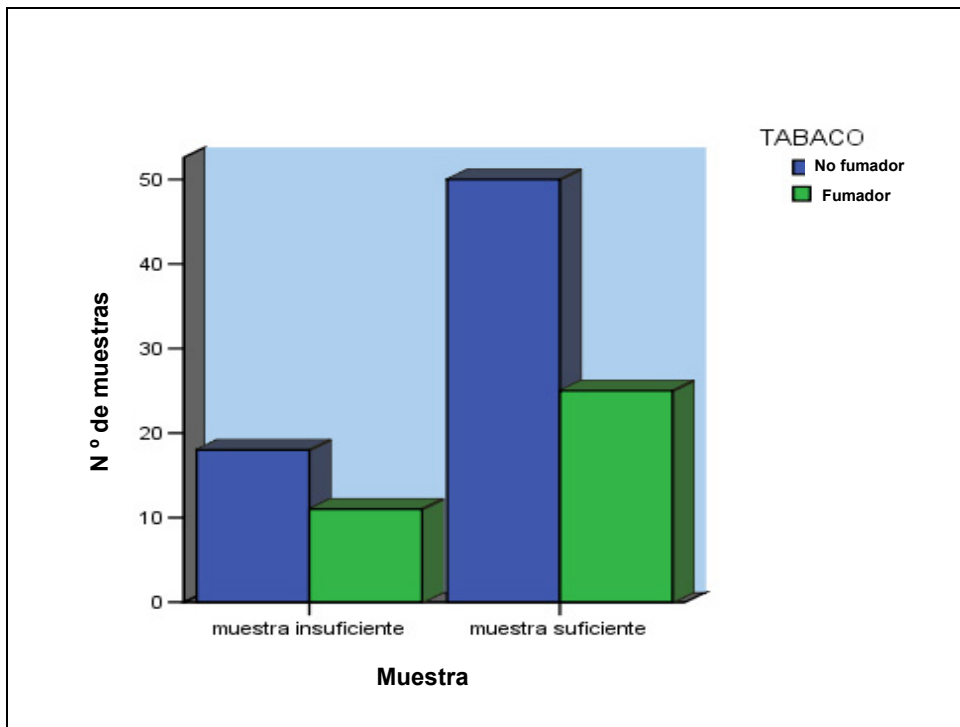


Figura 24: Distribución de la validez de las muestras en relación al tabaco.

### IV.3.2: Valoración cuantitativa:

En la cuantificación de ARN del gen ABL según el instrumento utilizado para la toma de muestra nos hemos encontrado con dos casos, ambos con cureta, que presentaban niveles de expresión anormalmente elevados, mayores de 600, mientras que el resto de los casos presentan cantidades de ARN del gen ABL por debajo de 200. Por tanto para el análisis de utilidad de técnica de toma de muestras en citología exfoliativa oral hemos utilizado 73 de las 75 muestras, excluyendo estos dos casos. Así, observamos que en las muestras citológicas recogidas con el Cytobrush se obtiene una cuantificación de  $6.82 \pm 6.71$ , para la cureta la cuantificación fue de  $17.64 \pm 21.10$ , y para el Oral Cdx de  $16.04 \pm 15.81$  (Kruskal Wallis = 8.64,  $p= 0.013$ ) (Tabla 6 y fig 25)

Técnica	n	Media $\pm$ SD	IC 95%	Rango	
				Máximo	Mínimo
Cytobrush	18	6.82 $\pm$ 6.71	3.48-10.15	20.09	0.34
Cureta	27	17.64 $\pm$ 21.10	9,29-25.99	109.79	0.67
Oral CDx	28	16.04 $\pm$ 15.81	9.91-25,99	59.39	0.42

Tabla 6: Cuantificación de ARN del gen ABL según técnica de toma de muestra en citología exfoliativa oral. Las diferencias son estadísticamente significativas (Kruskal Wallis = 8.64,  $p=0.013$ )

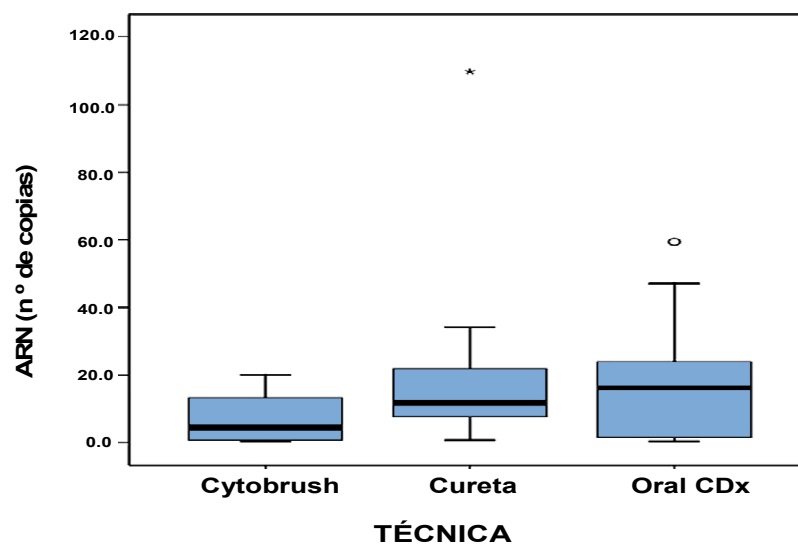


Figura 25: Distribución cuantificación del ARN (n° de copias) del gen ABL con cada instrumento. \*Valor por encima de 1.5 veces el percentil 75. °Valor por encima de 3 veces el percentil 75.

Tomando como referencia de instrumento para la toma de muestras de citología oral el cytobrush, mediante un análisis de regresión logística, encontramos que la probabilidad de obtener muestras válidas para poder realizar estudios genéticos es 10 veces mayor con cureta y cuatro veces mayor con Oral CDx (Tabla 7)

Técnica	OR	IC 95%
Cureta	10.2	2.64- 39.4
Oral CDx	4.22	1.48-12.1
Cytobrush	-	-

Tabla 7: Probabilidad de obtención de muestra válida según instrumento. OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza

## **V. DISCUSIÓN**



El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la sexta neoplasia maligna más frecuente del mundo (1). Se estima que más de 500.000 nuevos casos se diagnostican anualmente y el 75% se encuentran en los países desarrollados (12). A pesar de todos los avances en el tratamiento del cáncer oral combinando cirugías resectivas, quimioterapia y radioterapia, el ratio de supervivencia a los 5 años es menor del 50% (2), que no ha mejorado en los últimos 25 años. Sin embargo, el pronóstico del COCE, mejora significativamente si se realiza un diagnóstico precoz. La mayoría de los cánceres orales se desarrollan a partir de lesiones premalignas y pequeños cambios en la mucosa oral normal que son asintomáticas y se diagnostican casualmente. A pesar de que la cavidad oral es de fácil acceso, tanto visualmente como para realizar las pruebas complementarias, a menudo pasa mucho tiempo antes de que lesiones con displasia sean diagnosticadas (3).

Los métodos diagnósticos clásicos para las lesiones precancerosas y cancerosas de la cavidad oral han sido, desde hace mucho tiempo, el examen clínico y el estudio histopatológico y más actualmente molecular, del material obtenido por biopsia. Aunque la biopsia es una técnica relativamente sencilla, se trata de una prueba cruenta que implica actuar quirúrgicamente, que presenta limitaciones para algunos profesionales, así como un posible rechazo en el primer momento por parte de algunos pacientes. Además en algunas situaciones puede ser difícil escoger el lugar o lugares más apropiados para la toma de biopsia sobre todo en lesiones de gran tamaño. Existe además en el estudio de las muestras una gran subjetividad por parte del patólogo observador (123-125,181).

Todos estos condicionantes apoyan la necesidad de buscar y desarrollar nuevos métodos diagnósticos para la enfermedad neoplásica oral. Es importante que las nuevas metodologías sean sencillas, poco cruentas y fiables, que permitan un diagnóstico y seguimiento satisfactorios (100).

En este sentido, ha resurgido en los últimos tiempos el interés por la citología exfoliativa en el precáncer y cáncer oral como metodología complementaria para el diagnóstico precoz de estos procesos debido a que es una técnica fiable, rápida, no invasiva, sin complicaciones, indolora y que puede ser usada para las lesiones pequeñas múltiples o también las de mayor tamaño (3,139,172,227,228). Recientemente se ha visto que los programas de screening del COCE, basados en un examen objetivo de la cavidad oral con citología exfoliativa, pueden reducir la mortalidad (296).

En los últimos años se ha planteado la aplicación de la citología en base líquida o en monocapa en la cavidad oral, tal como ocurrió en la citología cervico-uterina, en el intento de mejorar la distribución y espesor de la muestra, facilitando así la identificación de células anormales para reducir el número de falsos negativos encontrados con la citología convencional. La citología en base líquida ha sido aplicada con buenos resultados en citología exfoliativa de pulmón, tracto urinario, tracto gastrointestinal así como en la evaluación de derrames serosos (297). Esta técnica permite numerosas mejoras en el tratamiento de las muestras citológicas desde su recolección: todo el material obtenido está disponible para la evaluación citológica, fijación inmediata de la muestra, una capa fina de células se extiende sobre un área fija y de fondo claro, se pueden realizar estudios del HPV y además las láminas obtenidas pueden ser analizadas por el anatomopatólogo o mediante un análisis automatizado (250,264,298).

Por otro lado, actualmente se acepta que el COCE es la consecuencia de la adquisición de trastornos genómicos celulares que promueven la malignización. Estos cambios moleculares en la progresión del COCE dan lugar a alteraciones genéticas que afectan a la síntesis proteica (139,167,274). El estudio de estas alteraciones, va a permitir el diagnóstico precoz de lesiones premalignas y malignas antes de que éstas sean visibles clínicamente, así como la valoración de la progresión de la enfermedad y la respuesta de ésta a los tratamientos (122). Se han llevado a cabo estudios citomorfométricos en muestras citológicas de COCE y lesiones premalignas

llegando a la conclusión de que estos análisis permiten un diagnóstico precoz, mediante una técnica no invasiva (2,243,299), con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97.4% (300). El análisis molecular puede identificar entre células normales una población clonal de células cancerígenas que posean mutaciones puntuales específicas del tumor (301). En este sentido, diversos autores, han estudiado, y en algunos casos demostrado la potencial aplicación clínica de la citología oral para la detección de: mutaciones puntuales en *p53* (247-249,301), alteraciones epigenéticas (hipermetilación de regiones promotoras), inestabilidad genómica como la pérdida de heterocigosidad y la inestabilidad de microsatélites (243,276,302). Pentenero y cols., en un estudio reciente, mediante citología en desórdenes potencialmente malignos de la cavidad oral llegan a la conclusión de que la aneuploidía ocurre en estadios tempranos de la carcinogénesis oral y que probablemente este dato pueda ser usado en un futuro como marcador del riesgo de malignización de estos desórdenes, sin embargo son necesarios todavía más trabajos en esta línea de investigación (299).

El grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante la detección y/o cuantificación de los ARNm funcionales en el citoplasma. Así los métodos de análisis más efectivos, se basan en la capacidad de detectar ARNm específicos y no los productos proteicos (279). El epitelio oral es el lugar donde se producen las alteraciones genéticas más tempranas que dan lugar a la aparición del COCE (280). Por tanto, el análisis de la expresión de ARN en los queratinocitos orales, puede ser usado para detectar estadios incipientes de esta enfermedad e incluso para la monitorización de los pacientes y valoración de la efectividad de diferentes tratamientos empleados (124,169). La posibilidad de poder obtener ARN de células orales de manera no invasiva, mediante citología exfoliativa, sin necesidad de realizar una biopsia sería la forma ideal para poder llevar a cabo multitud de estudios genéticos del COCE facilitando así el diagnóstico precoz (274,280,285).

Se han usado distintos métodos para la obtención de muestras de la cavidad oral a lo largo de la evolución de la citología exfoliativa: raspado de la mucosa con distintos instrumentos como espátulas de madera, algodón, enjuagues bucales o incluso la obtención de una toma de muestra de la saliva del paciente (124,230,303). Sin embargo se ha visto que la mejor técnica para obtener un material de mejor calidad es el método físico por raspado del epitelio oral con distintos instrumentos (167,230,233). Se considera que las características necesarias que debe presentar el instrumento ideal para la citología exfoliativa son: fácil manejo en cualquier localización, que no sea molesto para el paciente y que aporte una celularidad adecuada de células epiteliales para su estudio (167,232,253).

Por todas estas razones nos hemos planteado en este trabajo comparar tres instrumentos diferentes para la toma de muestras de citología exfoliativa de la cavidad oral. Valorar por un lado, la validez de las muestras obtenidas con cada uno de ellos para llevar a cabo estudios citomorfológicos en citología en base líquida y por otro lado, su validez para estudios de expresión genética analizando el ARN de un gen housekeeping.

En cuanto a la **elección del instrumento** para la toma de muestras, existen trabajos publicados en citología cervical convencional y en base líquida que han utilizado distintos instrumentos: espátula Ayres, cureta, Cytobrush y sus variantes. Los resultados de estos estudios son controvertidos (304-309).

Estudios demuestran que Cytobrush aumenta el número de células recogidas en la muestra y es por tanto el instrumento más utilizado para la toma de muestras de citología exfoliativa (100). Se trata de un cepillo cónico que se utiliza en citología ginecológica desde hace muchos años y su uso se ha extrapolado a la cavidad oral (2,169,230,234).

En el intento de llegar a recoger células basales y parabasales del epitelio oral para su estudio surge el Oral Cdx. Es un método asistido por

ordenador para el análisis de las muestras citológicas recogidas mediante biopsia transepitelial. El kit incluye un cepillo circular diseñado especialmente para la toma de muestras orales (167,171,172,174,235,237).

Sciubba y cols., en un estudio con 945 lesiones han encontrado una sensibilidad y especificidad de este método del 100%, todas las lesiones malignas y premalignas diagnosticadas por la biopsia convencional también lo fueron con Oral CDx (172). En otro estudio donde se utilizó el sistema Oral CDx para el estudio de lesiones orales observadas por un grupo de dentistas e higienistas, se encontraron valores positivos o atípicos en 7 de 93 lesiones con un aspecto clínico benigno. De éstas, tres fueron posteriormente diagnosticadas por biopsia convencional como lesiones precancerosas. Estos resultados sugieren que la biopsia por cepillado podría ser utilizada en el diagnóstico precoz del COCE para determinar la importancia y naturaleza de las lesiones orales (168).

Scheifele y cols., en un trabajo publicado donde estudiaban 103 casos con lesiones orales compatibles con lesiones orales premalignas y COCE, han encontrado una sensibilidad del Oral CDx para detectar displasia y COCE del 92.3% y una especificidad del 94%. Estos resultados avalan el uso de esta técnica como herramienta en el screening de lesiones orales (310).

Sin embargo Poate y cols., (311) en un estudio realizado en 112 pacientes con sospecha clínica de lesiones orales potencialmente malignas, a los que se les había realizado biopsia convencional y biopsia por raspado con Oral CDx, observaron una sensibilidad de la técnica para detectar displasia oral epitelial del 71.4% y una especificidad del 32%. El valor positivo predictivo de los resultados considerados anormales con biopsia por cepillado fue del 44%, mientras que el valor predictivo negativo fue del 60%.

Aunque las técnicas de biopsia por cepillado parecen presentar una mayor sensibilidad y especificidad que la citología convencional, estas diferencias no son significativamente altas (171). Trabajos recientes como el

realizado por Hohlweg-Majert y cols., han encontrado una sensibilidad de la biopsia oral por cepillado asistida por ordenador (oral CDx) del 52%, una especificidad del 29% y un valor predictivo positivo del 63%. Según estos autores el uso de la biopsia oral por cepillado como método de screening de lesiones orales debe de ser reconsiderado (312). Boopathi y cols., consideran que la técnica del Oral CDx sobreestima las lesiones orales displásicas y da lugar a un número elevado de resultados falsos positivos (313).

Navone y cols., recientemente han usado para la toma de muestras de citología exfoliativa una cureta dermatológica desechable, hasta producir un ligero sangrado en la mucosa para confirmar que se había llegado a la capa basal del epitelio, considerándose incluso esta técnica como una “microbiopsia”, ya que es posible obtener pequeños fragmentos de epitelio que se pueden analizar histológicamente. Comparando sus resultados con otros autores que utilizaron la biopsia por cepillado (311), se observa una reducción de los falsos negativos con una sensibilidad del 71.4% y un valor predictivo negativo del 60% (228). Pentenero y cols., también han usado la cureta para la toma de muestras citológicas en estudios de aneuploidía de ADN en lesiones con displasia en desórdenes potencialmente malignos de la cavidad oral (299).

La selección del **método de validación** se lleva a cabo apoyándonos en la revisión bibliográfica de las publicaciones realizadas hasta la fecha, y también en el asesoramiento técnico por parte del Servicio de Anatomía Patológica del Servio Gallego de Saúde (SERGAS) para el análisis de las muestras orales en citología en base líquida y de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica del Servicio Galego de Saúde (SERGAS) para el análisis de expresión genética de las muestras. Para la valoración de la calidad de las muestras desde el punto de vista citomorfológico usamos, al igual que otros autores, los criterios de celularidad de la Clasificación de Bethesda 2001 (222,271,294). Para el análisis de expresión genética, de acuerdo con la mayoría de los autores, tanto en otros tipos de cáncer como

en el COCE y en tumores de glándulas salivales (192,205,291,314), la RT-qPCR es el método más frecuentemente utilizado. Estudios piloto demuestran que el aislamiento de ARN a partir de citología exfoliativa es posible y que el ARNm puede ser detectado usando RT-qPCR o análisis mediante *microarrays* (274,280,315). Como gen a estudio, al tratarse de mucosa oral normal, hemos utilizado un gen *housekeeping* que se expresa siempre de una manera constante en todas las células. Otero y cols.,(192) utilizaron el gen GUS como gen control en estudios de expresión de genética diferencial, Perez-Sayans y cols., (48) en el estudio de expresión genética de ATP6V1C1 en muestras citológicas de COCE emplearon el gen ABL. Schwart y cols., (280) en estudios sobre un modelo hamster utilizaron el programa Norm-Finder para identificar los genes controles óptimos. Nosotros en este trabajo hemos decidido utilizar el gen ABL ya que cumple las funciones necesarias de un gen *housekeeping* y es el que se utiliza de rutina en el laboratorio en el que realizamos el estudio, tras haber verificado su tasa de expresión constante en los queratinocitos orales.

En cuanto a las características de la **población de estudio**, está formada por 29 individuos sanos, voluntarios y estudiantes reclutados en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela, por facilidad de acceso a la toma de muestras. Su edad está comprendida entre los 21 y 34 años (media  $23,3 \pm 2.94$ ). Estas características coinciden con el único estudio que hemos encontrado en la literatura de Kujan y cols., (271) en el cual también se llevan a cabo estudios de citología en mucosa oral normal de sujetos sanos. El conjunto de individuos está formado por 9 varones y 20 mujeres. La selección es aleatoria y la existencia de una mayor proporción de mujeres representa, única y exclusivamente, la distribución de los estudiantes en el ámbito universitario. No existen diferencias estadísticamente significativas entre el instrumento utilizado para la toma de muestra y el sexo o la edad.

Hemos recogido el dato de fumador o no fumador por el posible aumento de la queratinización del epitelio oral en los individuos fumadores.

El tabaco puede afectar el fino epitelio plano normalmente no queratinizado induciendo un engrosamiento excesivo de la capa de queratina. Parece ser que el aumento de producción de células queratinizadas en fumadores sería provocado por la exposición directa al calor del cigarrillo y por la acción química de los productos volátiles del tabaco, con el fin de protegerse de estos agentes injuriantes para la mucosa oral (316). En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el consumo de tabaco y la obtención de muestra válida para el estudio citomorfológico ni para el estudio de expresión genética. Existe controversia en los resultados de diversos estudios sobre el tipo de células observadas en individuos fumadores y no fumadores, algunos autores encuentran diferencias en el porcentaje de células superficiales en individuos fumadores, sin embargo estas diferencias no parecen ocurrir de forma igual en todos los sitios de la cavidad oral (148,316,317). Estudios genéticos (mutaciones genéticas, polimorfismos del ADN, aberraciones cromosómicas) de mucosa oral en relación al tabaco tampoco han encontrado diferencias (318).

Por lo que respecta al **tamaño muestral**, como nos hemos referido en la metodología, consideramos que para estudios de adecuación de la toma de muestras, éstas presentan un comportamiento independiente si se recogen en el mismo o en diferentes individuos. Sin embargo consideramos importante que la toma de muestras sea realizada por el mismo profesional para no introducir posibles errores derivados de la habilidad del mismo. Por todo ello se estimó el tamaño muestral necesario para cada uno de los dos objetivos planteados. Para una situación en que la proporción de muestras obtenidas con material suficiente sea del 50% en el caso del instrumento con peor rentabilidad y del 90% en el caso del instrumento con mayor rentabilidad, con un nivel de seguridad del 95% y una potencia del 90%, el número de muestras citológicas necesario es de 31 con cada instrumento, lo cual requiere un tamaño muestral de 93 muestras. Se incrementó este número hasta 104 muestras un total de 208 muestras estudiadas, 104 para llevar a cabo el estudio de expresión genética y 104 para el estudio

citológico. A pesar de tener suficiente poder estadístico con 93 muestras, hemos incrementado en torno al 10% el tamaño muestral (de 93 a 104) en previsión de posibles problemas en el transporte y procesado de las muestras.

En cuanto a **localización de la toma de muestra**, tal y como se expone en material y métodos, ha sido realizada en mucosa yugal. Esta zona de la cavidad oral, por su amplitud, nos permite tomar muestras con los tres instrumentos en la misma localización. Kujan y cols.,(271) en su estudio sobre citología oral en base líquida en individuos sanos utilizaron dos instrumentos diferentes en la toma de muestra en dos localizaciones distintas en función de la facilidad de uso en cada zona. Consideramos que esto puede influir en los resultados si el objetivo del estudio es comparar las muestras adecuadas obtenidas con distintos instrumentos.

### **ANÁLISIS CITOLÓGICO:**

Desde 1940, cuando el Dr Papanicolau introdujo su técnica, que todos conocemos como Citología Convencional o Pap Test, para el diagnóstico precoz del cáncer uterino, ésta ha sido utilizada en los programas de screening de esta patología. Sin embargo esta técnica presenta limitaciones: se calcula que sólo del 10 al 20% de las células recolectadas son colocadas en la lámina, ésta debe de ser fijada adecuadamente entre 15 a 30 segundos después del extendido para evitar artefactos y además se obtiene una dispersión irregular de las células sobre una gran área junto con moco, leucocitos, etc. La sensibilidad de la citología vaginal convencional oscila entre el 30 y el 70% y su especificidad entre el 86 y 100%, la incidencia reportada de falsos negativos con esta técnica oscila del 25 al 50% (225,306). Koch y cols., han llevado a cabo recientemente un estudio sobre 186 muestras citológicas de lesiones sospechosas de la cavidad oral cotejadas con sus correspondientes biopsias y han visto que la sensibilidad y

especificidad de la técnica varía desde el 88.5% al 95.2% y del 94.9% al 82% respectivamente en función de la definición citopatológica de malignidad y en función del tamaño de las lesiones (319).

Científicos y clínicos han intentado desarrollar un sistema que pudiera mejorar la calidad de las muestras, aumentado así la especificidad y sensibilidad de la técnica (223,224,250). Se han desarrollado así nuevas técnicas como la citología en base líquida o también llamada en monocapa, así como la revisión computerizada de las muestras. En las preparaciones de base líquida, la muestra y el dispositivo de recolección se transportan en un recipiente que contiene un líquido conservador. Esto permite la inmediata fijación de las células, con lo cual todo el material recolectado puede usarse. Esa técnica permite obtener preparaciones con abundancia de células dispersas en una capa fina y homogénea. Sangre, moco e inflamación queda distribuido por toda la muestra (250,269).

Se han realizado numerosos estudios en la última década para valorar si con la citología en base líquida aumentaba considerablemente la especificidad y sensibilidad de la técnica con respecto a la citología convencional de cérvix. Algunos datos reflejan una especificidad y sensibilidad alta de la citología en base líquida frente a la citología convencional, sin embargo otros autores concluyen que las diferencias obtenidas no son estadísticamente significativas y que por tanto no justifica el uso de esta técnica, debido al aumento del coste que supone para ser utilizada como método de screening del cáncer de cuello uterino (262,265,266,270).

Existen trabajos publicados en citología cervical convencional y en base líquida que han utilizado distintos instrumentos para la toma de muestras: espátula Ayres, cureta, Cytobrush y sus variantes. Los resultados de estos estudios son controvertidos (304-309).

La citología exfoliativa oral se ha utilizado clásicamente en el diagnóstico de infecciones micóticas, como es el caso de las candidiasis

bucales, micosis profundas como la paracoccidiodomicosis, en el estudio de la infección epitelial por el virus Epstein-Barr en las lesiones de leucoplasia vellosa, así como en la orientación del diagnóstico de lesiones vesículo-ampollares (226). En los últimos años ha despertado un especial interés esta técnica en la detección precoz del cáncer oral debido a que se trata de una técnica fiable, rápida, no invasiva, sin complicaciones, indolora y que puede ser usada para las lesiones pequeñas múltiples o de mayor tamaño (3,139,172,227,228). Existen diferentes controversias en el uso de esta técnica en la detección precoz del cáncer oral ya que se ha señalado la existencia de falsos positivos demostrando una alta sensibilidad (90%) pero una baja especificidad (3%) (320). Sin embargo estos datos han sido discutidos por otros autores, Remmerbach y cols., estudiaron la fiabilidad de la citología oral por raspado y su análisis citométrico en el diagnóstico precoz del cáncer oral encontrando una sensibilidad de la técnica del 94,6% y una especificidad del 99,5% (2). Potter y cols., en una serie de 115 casos de COCE confirmados histológicamente, encontraron 4 casos de falsos negativos en citología (3.5%) dando lugar a un retraso en el diagnóstico definitivo. Los autores consideran que la causa más probable de que esto ocurriera es que la técnica no tenga la sensibilidad adecuada para detectar todas las lesiones displásicas (321).

En el 2005, Hayama y cols.,(253) analizan el uso de la citología convencional y en base líquida para el diagnóstico de lesiones orales, comparando la espesura de la muestra, distribución celular, microbiota e inflamación. Observaron que realmente la citología en base líquida proporcionaba resultados estadísticamente mejores que la citología convencional en cuanto a la delgadez de las muestras (41%) y a la distribución de las células.

Scott y cols., han llevado a cabo estudios de inmunocitoquímica en lesiones displásicas de la cavidad oral, comparando la citología convencional y la citología en base líquida. Estos autores concluyen que MCMs (minichromosome maintenance proteins) en citología oral representan una

gran promesa como prueba mínimamente invasiva en el diagnóstico precoz si se llevan a cabo en base líquida, ya que aumenta la uniformidad de la tinción y ofrece una fácil interpretación por parte de los anatomopatólogos con respecto a las muestras de citología convencional (303).

Kujan y cols., (271) desarrollaron un estudio sobre el uso de la citología en base líquida en mucosa oral normal, comprobando que con esta técnica se reducen los falsos negativos ya que, a diferencia de la citología convencional, casi la totalidad de la muestra recogida es fijada al introducirla en el medio líquido. Esta técnica presenta además la ventaja de poder disponer de suficiente material celular para la realización de estudios inmunohistoquímicos, detección de papilomavirus y estudios moleculares.

El primer estudio publicado usando Cytobrush y citología en base líquida en carcinomas epidermoides orales fue realizado por Navone y cols. (3) en el 2007 encontrando una especificidad del 99% y una sensibilidad del 95.1% en muestras con citología en base líquida. Las muestras inadecuadas fueron del 8.8%.

El mismo grupo de investigación, ha llevado a cabo recientemente un estudio en 500 pacientes con lesiones potencialmente malignas y COCE. Se realizó citología convencional en 89 casos y citología en base líquida en 411 mediante el procesador Thinprep. Las tomas de muestras de citología fueron realizadas con Cytobrush y con cureta. Los resultados de este trabajo muestran una sensibilidad para la citología convencional del 86%, una especificidad del 94.3% y un valor predictivo positivo del 95.7% con un 12% de muestras inadecuadas. La citología en base líquida obtuvo una sensibilidad del 94% para lesiones de alto grado y carcinomas, una especificidad del 98.9%, un valor predictivo positivo del 95.9% y un 8.8% de muestras inadecuadas (12).

A pesar de que el valor de la biopsia por cepillado o la citología en base líquida han sido ampliamente estudiados recientemente, los resultados obtenidos son diversos en cuanto a la sensibilidad y especificidad de la

técnica. No en todos estos estudios han sido confirmados los resultados con biopsia, además en los casos en los que se hicieron las dos técnicas, éstas no han sido realizadas simultáneamente en la misma zona (174). Todos los trabajos de citología oral en base líquida han sido realizados utilizando como instrumento de toma de muestras el Cytobrush, y sus variantes y la cureta dermatológica. Deleverian y cols., han sido los primeros en realizar un estudio para la evaluación del valor diagnóstico de la citología en base líquida en la detección precoz de lesiones premalignas y malignas de la cavidad oral, utilizando el cepillo Oral CDx® Brush. Estos autores han encontrado una sensibilidad de la técnica del 88.8%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 80%. Todas las muestras contenían células representativas de todas las capas epiteliales y consideran que gracias al diseño de las cerdas de este cepillo, con una mayor rigidez, se solucionan los problemas de falsos negativos y muestras inadecuadas, aumentando así la sensibilidad de la técnica (174).

No existen trabajos publicados hasta el momento en los que se comparen el Cytobrush, la cureta y el Oral CDx en citología oral en base líquida, para poder analizar si la calidad de la muestra varía en función del instrumento utilizado para el raspado de la mucosa oral.

Kujan y cols. (271) han sido los primeros en realizar un estudio sobre citología oral en base líquida en mucosa oral de individuos sanos. En este trabajo los autores han utilizado como instrumentos para la toma de muestra CervexBrush® (Rovers, Oss, Holanda) en mucosa yugal y el Cytobrush Plus GT® (Medscand, Medical AB, Suecia) para la toma de muestras en la lengua. El medio de transporte usado es el SurePath™ (Medical Solutions PLC, Reino Unido) y el procesador SurePath. Estos autores encontraron que la mayor parte de las preparaciones en base líquida presentaron calidad adecuada, sólo el 1.3% fueron inadecuadas, sin embargo en nuestro estudio el 100% de las muestras fueron adecuadas para llevar a cabo análisis citológico, independientemente del instrumento utilizado para la obtención de

la muestra. En nuestro trabajo hemos utilizado el ThinPrep. Aunque existen diferencias en el procesado de las muestras entre ambos procesadores, ya que el SurePath se basa en la centrifugación y sedimentación de las células por diferencia de gradiente y el ThinPrep en cambio mezcla la muestra en un cilindro el cual posee una membrana CMT( "Controlled Membrane Transfer™ technology") en un extremo por donde aspira el medio líquido y elementos perturbadores basado en el tamaño de los poros, están perfectamente definidos los criterios para calcular la celularidad de las muestras en cada uno de ellos (295,322,323).

Con respecto al tipo de células observadas, decir que todas las muestras estaban constituidas en general por dos tipos de células: superficiales e intermedias, no encontrando diferencias entre las preparaciones citológicas de los tres instrumentos. Hemos observado productos de queratina de forma aislada, así en 20 muestras existía algún signo de disqueratosis, en 6 muestras hemos visto paraqueratosis y también se han documentado 3 perlas de queratina. Estos hallazgos tampoco mostraron correlación con el tipo de instrumento utilizado para la toma de muestra, coincidiendo con Kujan y cols., que tampoco encontraron relación entre el número medio de células y la localización de la toma de muestra o el tipo de cepillo usado (271).

No observamos células basales en ninguna de las 104 muestras analizadas. Kujan y cols., sólo encontraron células basales y parabasales en 6 de 150 muestras estudiadas (271). Nuestros resultados no coinciden con los reportados por Delavairan y cols., que afirman que en las muestras obtenidas con Oral Cdx y tratadas en base líquida contienen células representativas de todas las capas basales, incluyendo células basales y parabasales (174). Probablemente estas diferencias puedan ser debidas a la distinta metodología de procesamiento de las muestras. En nuestro trabajo hemos empleado el Thinprep 2000 donde después de la agitación la muestra ésta pasa, por presión negativa, a través de un filtro el cual recoge una fina

capa de material celular. Sin embargo Delavairan y cols., centrifugan la muestra y extienden el sedimento celular en el portaobjetos (174).

Coincidimos con otros autores, en que en la actualidad la citología exfoliativa oral podría ser la herramienta más efectiva en el screening del COCE y lesiones precancerosas debido a la reducción de falsos negativos o positivos en el desarrollo por un lado de instrumentos específicos para la toma de muestras en la cavidad oral y por otro lado a la aplicación de la citología en base líquida (12,271,298). Sin embargo consideramos que es necesaria la realización de estudios de expresión genética de las muestras de citología oral para detectar cambios precoces que no son todavía visibles en estudios citomorfológicos.

La principal ventaja de la citología en base líquida es que aumenta la cantidad de muestras adecuadas para el análisis citológico. El procesador Thinprep® 2000 realiza una dispersión de la muestra que posteriormente pasa a través de un filtro dando lugar a una capa homogénea de material celular. Por tanto las muestras son homogeneizadas independientemente de la celularidad de la muestra presente en el medio de transporte. Por esta razón no hemos encontrado diferencias en la calidad de las muestras tomadas con Cytobrush, Cureta o Cepillo del Oral CDx a pesar de tratarse de instrumentos más o menos agresivos con el epitelio oral. Cuando nuestro objetivo en la citología exfoliativa oral es hacer estudios citomorfológicos en citología en base líquida no existen diferencias en función del instrumento utilizado.

## **ANÁLISIS MOLECULAR**

La posibilidad de poder obtener ARN de células orales de manera no invasiva, mediante citología exfoliativa, sin necesidad de realizar una biopsia sería la forma ideal para poder llevar a cabo multitud de estudios genéticos del COCE facilitando así el diagnóstico precoz (280). Se han realizado estudios donde se analiza el ARN en orina y saliva por la facilidad de la obtención de la muestra, sin embargo éstas no son mediciones realizadas en el propio tejido, por lo que su exactitud no es del todo adecuada (281,282,324). Por el contrario, las muestras obtenidas por cepillado o raspado, presentan la ventaja de que el análisis genético se realiza sobre ARN de células vivas obtenido directamente del epitelio oral sospechoso de malignización o ya malignizado en vez de fragmentos de ARN celulares estables en el ambiente celular. Recientemente se ha constatado la posibilidad de aislar ARN de células obtenidas por citología exfoliativa oral y que éste puede ser utilizado para determinar la susceptibilidad de padecer cáncer en la población general y detectar marcadores tumorales de forma precoz (48,274).

La posibilidad de aislar ADN de células epiteliales para el estudio de expresión genética es un hecho demostrado, sin embargo el aislamiento de ARN no ha sido validado tan fehacientemente ya que las ribonucleasas presentes en la saliva degradan rápidamente el ARN durante la recolección de la muestra citológica (122). Existen estudios piloto que demuestran la posibilidad de aislar ARN de células obtenidas por citología exfoliativa oral y cuantificar el ARNm mediante microarrays o análisis con RT-PCR (273,274,283). Klaassen y cols., han demostrado la posibilidad de detectar ARNm de genes con moderada o baja expresión en el epitelio oral de células exfoliadas de la cavidad oral mediante RT-PCR (284). Toyoshima y cols., han estudiado la expresión de la citoqueratina 17 (CK 17) mediante el estudio de ARNm, de células orales obtenidas mediante citología exfoliativa, con RT-

qPCR demostrando la posibilidad de aplicación de esta técnica para estudios de expresión genética del epitelio oral (315).

Todos los estudios hasta ahora publicados en el estudio de expresión genética del epitelio oral mediante citología exfoliativa, han utilizado como instrumento de toma de muestra el Cytobrush (2,48,280,284), el Oral CDx (283) y la cureta (228). Pentenero y cols., en un estudio reciente de contenido de ADN con citometría de flujo en desórdenes orales potencialmente malignos (PMDs), ha utilizado también la cureta dermatológica para la toma de muestras citológicas (299). Sin embargo, no existe ningún trabajo donde se haya comparado la cantidad de ARN obtenido con estos instrumentos.

Habis y cols., han sido los primeros en valorar la cantidad y calidad de ARN obtenido por citología exfoliativa cervical y demostrar su uso para el análisis con microarrays (286). Schwartz y cols., examinan la posibilidad de usar ARN de células orales obtenidas mediante cepillado, para examinar la expresión genética en tumor y tejido normal usando un modelo de cáncer oral en hámster (280). Los resultados de este estudio avalan el concepto de que el ARN obtenido de células orales por cepillado puede ser usado como marcador de medida reproducible de la expresión genética en este tejido. Estos autores además han visto que las diferencias en la expresión genética del ARN de células obtenidas mediante citología exfoliativa eran mayores en comparación con las recogidas mediante biopsias. Consideran que la citología por cepillado de la mucosa oral da lugar a muestras de células epiteliales homogéneas y que cuando se utiliza la biopsia convencional para la toma de la muestra ésta contiene una mezcla de tejido epitelial, estroma y tejido subestromal que no representa un problema cuando se llevan a cabo estudios inmunohistoquímicos, ya que permite estudiar la expresión proteica en regiones individuales de la muestra (280). Así, las muestras por cepillado presentan la ventaja de que el análisis del ARN se lleva a cabo en células directas de tumores o lesiones premalignas y por tanto es más apto para identificar genes funcionalmente involucrados en el proceso de

carcinogénesis (274). Los resultados de este estudio avalan la hipótesis de que cuanto más superficial sea el raspado en la toma de muestras sólo se recogen células de las capas superficiales del epitelio donde el ARN ya está degradado. Por ello cuando empleamos un instrumento más agresivo como la Cureta, que incluso permite la toma de “microbiopsias” (227,228,12,3), las muestras válidas para poder llevar a cabo estudios de expresión genética aumentan considerablemente con respecto al Cytobrush que es el instrumento menos agresivo. El cepillo del Oral CDx, que está diseñado especialmente para citología oral con una mayor dureza y una forma específica (23,101,172), es el instrumento que seguido de la cureta nos ofrece mayor posibilidad de obtener muestra válida.

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación de ARN del gen a estudio en relación al consumo de tabaco, debido probablemente a que hemos estudiado la expresión genética de un housekeeping. Sin embargo consideramos la posible existencia de estas diferencias en relación a la agresividad del instrumento utilizado para la toma de muestras y la queratinización de la mucosa en fumadores. Smith y cols., en un estudio piloto han sido capaces de identificar 113 genes con microarrays a partir de ARN extraído de células epiteliales orales obtenidas mediante citología exfoliativa con Oral CDx con una expresión genética (sub y sobreexpresados) diferente estadísticamente significativa entre fumadores y no fumadores (283). Spivack y cols., en un estudio sobre la interacción genética entre el gen y el ambiente mediante perfiles de ARNm cuantitativos en citología exfoliativa oral, han encontrado mayor cuantificación en los genes AhR, CYP1A1, CYP1B1, GSTM1, GSTM3, GSTP1 y GSTT1 directamente relacionados con el tabaco (274).

La citología exfoliativa oral es una técnica sencilla y no invasiva que permite obtener ARN de los queratinocitos orales para poder llevar a cabo estudios de expresión genética. El hecho de poder utilizar marcadores tumorales citológicos supondrá un gran avance en los intentos de diagnosticar precozmente el COCE, así como el seguimiento de desórdenes

potencialmente malignos de la cavidad oral y la evaluación de las recidivas del COCE después del tratamiento. Es importante, sin embargo, a la hora de realizar citologías exfoliativas de la cavidad oral, tener en cuenta el instrumento utilizado para la toma de muestra. Este trabajo demuestra que, aunque cuando las muestras son válidas para el estudio molecular y todos los instrumentos permiten un análisis genético satisfactorio, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas de muestras suficientes o insuficientes en relación al instrumento utilizado.



## **VI. CONCLUSIONES**



- 1.- No hemos encontrado diferencias en la calidad de las muestras tomadas con Cytobrush, Cureta dermatológica o cepillo del OralCDx en estudios citomorfológicos en base líquida
  
- 2.- Los tres instrumentos proporcionaron muestras citológicas que permiten obtener ARN para llevar a cabo estudios de expresión genética. Sin embargo la probabilidad de conseguir una muestra adecuada con Cureta es 10 veces mayor y con Oral CDx es 4 veces mayor que con Cytobrush.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- (1) Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis.* 2000 Mar; 6(2):65-74.
- (2) Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, et al. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal.Cell.Pathol.* 2001; 22(4):211-221.
- (3) Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, et al. The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology* 2007 Dec; 18(6):356-360.
- (4) Somoza-Martin JM, Garcia-Garcia A, Barros-Angueira F, Otero-Rey E, Torres-Espanol M, Gandara-Vila P, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2005 Jun;63 (6):786-792.
- (5) Otero-Rey EM, Somoza-Martin M, Barros-Angueira F, Garcia-Garcia A. Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via over-expression of the ATP6V1C1 gene. *Oral Oncol.* 2008 Feb; 44(2):193-199.
- (6) Meza-Junco J, Montano-Loza A, Aguayo-Gonzalez A. Molecular basis of cancer. *Rev.Invest.Clin.* 2006 Jan-Feb; 58(1):56-70.
- (7) Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N.Engl.J.Med.* 2008 Sep 11; 359(11):1143-1154.
- (8) González Moles MA, Gil Montoya JA, Ruiz Ávila I. Bases moleculares de la cancerización de la cavidad oral. *Avances en Odontestomatología* 2008; 24(1):55-60.
- (9) García A, Gándara J, Ceballos A. Cáncer oral. In: Ceballos A, Bullón P, Gándara J, Chimenos E, Blanco A, Martínez-Sahuquillo A, et al, editors. *Medicina Bucal Práctica*. Santiago de Compostela: Editorial Danú, S.L.; 2000. p. 355-368.

- (10) Moore SR, Pierce AM, Wilson DF. 'Oral cancer'--the terminology dilemma. *Oral Dis.* 2000 May; 6(3):191-193.
- (11) Parkin DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int.J.Cancer* 1988 Feb 15; 41(2):184-197.
- (12) Navone R. Cytology of the oral cavity: a re-evaluation. *Pathologica* 2009 Feb; 101(1):6-8.
- (13) Wood NK S, Goaz PW editor. Diagnóstico diferencial de las lesiones orales y maxilofaciales. Madrid: Handcourt Brace de España; 1998.
- (14) Macfarlane GJ, Boyle P, Evstifeeva TV, Robertson C, Scully C. Rising trends of oral cancer mortality among males worldwide: the return of an old public health problem. *Cancer Causes Control* 1994 May;5(3):259-265.
- (15) Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L. The World Cancer Report and the burden of oral cancer. *Eur.J.Cancer Prev.* 2004 Apr; 13(2):139-142.
- (16) Bagán JV, Ceballos A, Aguirre JM, Peñarrocha M. Tumores Malignos de la mucosa oral. *Medicina Oral Barcelona: Masson;* 1995. p. 186-201.
- (17) Pindborg JJ. Clinical relevance of precancerous lesions of oral mucosa. *Recent Results Cancer Res.* 1994; 134:9-16.
- (18) Serra Majén L., Ramón Torrel J.L. Cáncer Oral: Epidemiología y prevención. In: Cuenca Sala E., Manau Navarro C., Sierra Majen R., editor. *Odontología preventiva y comunitaria Barcelona: Masson;* 2003. p. 173-93.
- (19) Junquera LM AJ., Precancer y cáncer oral. In: López JS, Vicente JC, Junquera LM, editor. *Patología Quirúrgica Maxilofacial Madrid: Síntesis;* 1998. p. 262-278.

- (20) Epstein JB, Gorsky M, Cabay RJ, Day T, Gonsalves W. Screening for and diagnosis of oral premalignant lesions and oropharyngeal squamous cell carcinoma: role of primary care physicians. *Can.Fam.Physician* 2008 Jun;54 (6):870-875.
- (21) Silverman S.Jr, Melrose RJ.Oral cancer: a self-assessment quiz. *J.Calif.Dent.Assoc.* 2001 Aug; 29(8):608-17, 625.
- (22) Eaton L. World cancer rates set to double by 2020. *BMJ* 2003 Apr 5; 326(7392):728.
- (23) Sciubba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. *J.Am.Dent.Assoc.* 2001 Nov; 132 Suppl: 12S-18S.
- (24) Pindborg JJ, Kiaer J, Gupta PC, Chawla TN. Studies in oral leukoplakias. Prevalence of leukoplakia among 10,000 persons in Lucknow, India, with special reference to use of tobacco and betel nut. *Bull.World Health Organ.* 1967; 37 (1):109-116.
- (25) De Stefani E, Oreggia F, Rivero S, Fierro L. Hand-rolled cigarette smoking and risk of cancer of the mouth, pharynx, and larynx. *Cancer* 1992 Aug 1;70 (3):679-682.
- (26) La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997 Sep; 33(5):302-312.
- (27) Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology 2007: imaging, treatment and treatment outcomes. *Oral Oncol.* 2008 Mar;44(3):211-215.
- (28) Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int.J.Cancer* 1989 Jun 15; 43(6):992-1000.

- (29) Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol.* 2008 Feb; 44(2):103-108.
- (30) Balz V, Scheckenbach K, Gotte K, Bockmuhl U, Petersen I, Bier H. Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res.* 2003 Mar 15; 63(6):1188-1191.
- (31) Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head Neck* 2002 Sep; 24(9):841-849.
- (32) Baker SR. Risk factors in multiple carcinomas of the lip. *Otolaryngol.Head.Neck.Surg.* 1980 May-Jun;88(3):248-251.
- (33) Cox M, Maitland N, Scully C. Human herpes simplex-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa. *Eur.J.Cancer.B.Oral Oncol.* 1993 Jul;29B(3):215-219.
- (34) Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect.Agent Cancer.* 2009 Nov 25;4:16.
- (35) Hoffmann M, Kahn T, Mahnke CG, Goeroegh T, Lippert BM, Werner JA. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta Otolaryngol.* 1998 Jan; 118(1):138-144.
- (36) Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, et al. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin.Cancer Res.* 2003 Jul;9(7):2620-2626.

- (37) Agrawal Y, Koch WM, Xiao W, Westra WH, Trivett AL, Symer DE, et al. Oral human papillomavirus infection before and after treatment for human papillomavirus 16-positive and human papillomavirus 16-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 2008 Nov 1; 14(21):7143-7150.
- (38) D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N.Engl.J.Med.* 2007 May 10; 356(19):1944-1956.
- (39) Chuang AY, Chuang TC, Chang S, Zhou S, Begum S, Westra WH, et al. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2008 Oct; 44(10):915-919.
- (40) Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, et al. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol.* 2008 Mar; 44(3):242-250.
- (41) Acha A, Ruesga MT, Aguirregaviria JI, Aguirre JM. Infección por VPH y carcinogénesis oral. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal (Ed. esp)* 2010; 15(1):1-2.
- (42) Rautemaa R, Hietanen J, Niissalo S, Pirinen S, Perheentupa J. Oral and oesophageal squamous cell carcinoma--a complication or component of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED, APS-I). *Oral Oncol.* 2007 Jul; 43(6):607-613.
- (43) Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Gronroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol.* 2007 Feb; 43 (2):181-186.
- (44) Goutzanis L, Vairaktaris E, Yapijakis C, Kavantzas N, Nkenke E, Derka S, et al. Diabetes may increase risk for oral cancer through the insulin receptor substrate-1 and focal adhesion kinase pathway. *Oral Oncol.* 2007 Feb;43 (2):165-173.

- (45) Miller EG, Peacock JJ, Bourland TC, Taylor SE, Wright JM, Patil BS, et al. Inhibition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. *Nutr.Cancer* 2008 Jan-Feb; 60 (1):69-74.
- (46) Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, et al. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Int.J.Cancer* 2008 May 15; 122(10):2330-2336.
- (47) Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May; 45 (4-5):335-339.
- (48) Perez-Sayans M, Reboiras-Lopez MD, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Gayoso Diz P, Gandara Rey JM, et al. Measurement of ATP6V1C1 expression in brush cytology samples as a diagnostic and prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.Biol.Ther.* 2010 Jun 25; 9(12): 1-8
- (49) Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez MD, Gandara Rey JM, Garcia-Garcia A. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). *Oncol.Rep.* 2009 Dec; 22(6):1277-1282.
- (50) Campo-Trapero J, Cano-Sanchez J, Palacios-Sanchez B, Sanchez-Gutierrez JJ, Gonzalez-Moles MA, Bascones-Martinez A. Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr; 28(2B):1197-1205.
- (51) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7; 100(1):57-70.
- (52) Walter V. Brown, Eldridge M. Bertke. *La mitosis y sus variaciones.* Barcelona: Omega; 1979. p. 394.
- (53) Lewin B. *Ciclo de la célula y regulación del crecimiento.* Lewin B. Genes VII Madrid: Marbán; 2001. p. 835-874.

- (54) Alberts B, Bray D, Hopkin K, Jonhson A, Lewis J, Raff M, et al. Control del ciclo celular y muerte celular. In: Alberts ,B., Bray, D., Hopkin K, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al, editors. Introducción a la biología celular. 2ª ed.: Panamericana; 2007. p. 611-636.
- (55) Aguirre A. Guía práctica del cico celular y mitosis. 8 edición ed.: Norma cali; 2000. p. 651-76.
- (56) Kohn EA, Ruth ND, Brown MK, Livingstone M, Eastman A. Abrogation of the S phase DNA damage checkpoint results in S phase progression or premature mitosis depending on the concentration of 7-hydroxystaurosporine and the kinetics of Cdc25C activation. *J.Biol.Chem.* 2002 Jul 19; 277(29):553-564.
- (57) Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007 Jul; 43(6):523-534.
- (58) Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006 Jan 17; 366(1):2-16.
- (59) Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol.* 2000 Jan;36(1):100-105.
- (60) Chimenos Küster E., Font-Costa I, López López J. Riesgo de cancer oral y marcadores moleculares. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2004;9:377-84.
- (61) Caulin C, Nguyen T, Longley MA, Zhou Z, Wang XJ, Roop DR. Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5054-5058.
- (62) Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P. Alterations of p53, pRb, cyclin D(1) and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas.*Oral Oncol.* 2000 Jul; 36(4):334-339.

- (63) Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol.* 1998 Sep;34(5):396-403.
- (64) Kupferman ME, Myers JN. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol.Clin.North Am.* 2006 Apr; 39(2):229-247.
- (65) Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996 Aug 15; 56(16):3630-3633.
- (66) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 Mutations in Human Cancers. *Science* 1991 Jul 5; 253(5015):49-53.
- (67) Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Prognostic significance of p53 and p63 immunolocalisation in primary and matched lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Acta Histochem.* 2007; 109(5):388-396.
- (68) Schildt EB, Nylander K, Eriksson M, Hardell L, Magnusson A, Roos G. Expression of p53, PCNA, Ki-67 and bcl-2 in relation to risk factors in oral cancer - a molecular epidemiological study. *Int.J.Oncol.* 2003 Apr; 22(4):861-868.
- (69) Cruz I, Napier SS, van der Waal I, Snijders PJ, Walboomers JM, Lamey PJ, et al. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J.Clin.Pathol.* 2002 Feb; 55(2):98-104.
- (70) García V, González Moles MA, Bascones A. Bases moleculares del cáncer oral.Revisión bibliográfica. *Avances en Odontostomatología* 2005; 21(6):287-295.
- (71) Levine AJ. P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 1997 Feb 7; 88(3):323-331.

- (72) Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 2000 Nov; 22(11):1007-1017.
- (73) Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J.Oral Pathol.Med.* 2003 Mar;32(3):125-138.
- (74) Singh BB, Chandler FWJr, Whitaker SB, Forbes-Nelson AE. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 1998 Jun; 85(6):692-698.
- (75) Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J.Oral Pathol.Med.* 2004 Jul; 33(6):317-322.
- (76) M. Pérez-Sayáns. Determinación del ATP6V1C1 en muestras de citología exfoliativa de la cavidad oral: implicación en el diagnóstico del carcinoma oral de células escamosas.Un estudio preliminar. Universidad de Santiago de Compostela: Servicio de Publicacións e Intercambio Científico; 2010.
- (77) Binelfa LF,García JCS. Bases genéticas y moleculares del cáncer. 2ªparte. *Gaceta Mexicana de Oncología.Sociedad Mexicana de Oncología* 2005; 4(3):76-81.
- (78) Dass CR. Tumour angiogenesis, vascular biology and enhanced drug delivery. *J.Drug Target.* 2004 Jun; 12(5):245-255.
- (79) McColl BK, Stacker SA, Achen MG. Molecular regulation of the VEGF family -- inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS* 2004 Jul-Aug; 112(7-8):463-480.
- (80) Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J.Oral Pathol.Med.* 2000 Aug; 29(7):291-298.

- (81) Diniz-Freitas M. Carcinoma oral de células escamosas: evaluación pronóstica de variables clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas. Universidad de Santiago de Compostela: Servicio de Publicación e Intercambio Científico; 2005.
- (82) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 Jun 1; 61 (5):759-767.
- (83) Guyton A HJ. Control genético de la síntesis proteica, de la función celular y de la reproducción celular. In: Guyton A HJ, editor. *Tratado de Fisiología Médica*. 9ª edición ed.: McGraw-Hill interamericana España; 1996. 29-42.
- (84) Slaughter DP, Soutchek HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953 Sep; 6(5):963-968.
- (85) Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J. Oral Pathol. Med.* 1996 Feb; 25(2):49-54.
- (86) Pindborg JJ, Jolst O, Renstrup G, Roed-Petersen B. Studies in oral leukoplakia: a preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. *J. Am. Dent. Assoc.* 1968 Apr; 76(4):767-771.
- (87) Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JM. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2002. p. 295-303
- (88) Regezi JA, Sciubba JJ. *Patología Bucal Correlaciones clinicopatológicas*. 2ª ed. Mexico, DF: McGrawHill Interamericana; 2000.
- (89) Fleming ID, Phillips JL, Menck HR, Murphy GP, Winchester DP. The National Cancer Data Base report on recent hospital cancer program

- progress toward complete American Joint Committee on Cancer/TNM staging. *Cancer* 1997 Dec 15; 80(12):2305-2310.
- (90) de Araujo RF, Jr, Barboza CA, Clebis NK, de Moura SA, Lopes Costa Ade L. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2008 Jun 1;13(6):E344-7.
- (91) Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer.J.Clin.* 2005 Jul-Aug;55(4):242-58; quiz 261-2, 264.
- (92) Gospodarowicz MK, Miller D, Groome PA, Greene FL, Logan PA, Sobin LH. The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer* 2004 Jan 1; 100(1):1-5.
- (93) Fedele S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. *Head.Neck.Oncol.* 2009 Jan 30; 1(1):5.
- (94) Nemeth Z, Velich N, Szabo G, Suba Z. Significance of prognostic factors in oral squamous carcinoma. *Orv.Hetil.* 2004 Mar 28;145(13):661-666.
- (95) Costa Ade L, Araujo Junior RF, Ramos CC. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. *Braz J.Otorhinolaryngol.* 2005 Mar-Apr; 71(2):181-187.
- (96) Arduino PG, Carrozzo M, Chiecchio A, Broccoletti R, Tirone F, Borra E, et al. Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2008 Aug; 66(8):1570-1579.
- (97) Eckert AW, Lautner MH, Dempf R, Schubert J, Bilkenroth U. Prognostic factors for oral squamous cell carcinoma. *Chirurg* 2008 Nov 22.

- (98) Larsen SR, Johansen J, Sorensen JA, Krogdahl A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* 2009 Sep; 38(8):657-662.
- (99) Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur.J.Cancer.B.Oral Oncol.* 1994 Sep; 30B(5):323-328.
- (100) Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Muller-Richter U, Kosmehl H, et al. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J.Dtsch.Dermatol.Ges.* 2007 Dec;5(12):1095-1100.
- (101) Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am.J.Clin.Dermatol.* 2001;2(4):239-251.
- (102) Spencer KR, Ferguson JW, Wiesenfeld D. Current concepts in the management of oral squamous cell carcinoma. *Aust.Dent.J.* 2002 Dec; 47(4):284-9; quiz 351.
- (103) Yu GY. Oral cancer: the current status and strategies of its management. *Chin.Med.J.(Engl)* 2008 Oct 5;121(19):1859-1860.
- (104) Day TA, Davis BK, Gillespie MB, Joe JK, Kibbey M, Martin-Harris B, et al. Oral cancer treatment. *Curr.Treat.Options Oncol.* 2003 Feb; 4(1):27-41.
- (105) Howaldt HP, Kainz M, Euler B, Vorast H. Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *DOSAK. J.Craniomaxillofac.Surg.* 1999 Oct; 27(5):275-288.
- (106) Ferlito A, Silver CE, Rinaldo A. Elective management of the neck in oral cavity squamous carcinoma: current concepts supported by prospective studies. *Br.J.Oral Maxillofac.Surg.* 2009 Jan; 47(1):5-9.
- (107) Zheng JW, Qiu WL, Zhang ZY. Combined and sequential treatment of oral and maxillofacial malignancies: an evolving concept and clinical protocol. *Chin.Med.J.(Engl)* 2008 Oct 5;121(19):1945-1952.

- (108) Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer - Surgery. *Oral Oncol.* 2008 Jul 30.
- (109) Hancock PJ, Epstein JB, Sadler GR. Oral and dental management related to radiation therapy for head and neck cancer. *J.Can.Dent.Assoc.* 2003 Oct;69(9):585-590.
- (110) Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit.Rev.Oral Biol.Med.* 2003; 14(3):199-212.
- (111) Sudbo J. Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. *Clin.Med.Res.* 2004 Nov; 2(4):233-242.
- (112) Andreadis C, Vahtsevanos K, Sidiras T, Thomaidis I, Antoniadis K, Mouratidou D. 5-Fluorouracil and cisplatin in the treatment of advanced oral cancer. *Oral Oncol.* 2003 Jun; 39(4):380-385.
- (113) Stanko P, Satko I, Czako L, Beno M, Danko J, Zmeko S. Squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Bratisl.Lek.Listy* 2007; 108(7):292-296.
- (114) Scheifele C, Reichart PA. Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? *Oral Oncol.* 2003 Jul;39(5):470-475.
- (115) González Moles MA, Rodríguez Archilla A., Morales García P. Precancer oral. *Medicina Bucal Práctica.* Editorial Danú S.L.; 2000. p. 317-353.
- (116) Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit.Rev.Oral Biol.Med.* 2003;14(1):47-62.
- (117) Bremmer JF, Braakhuis BJ, Brink A, Broeckaert MA, Belien JA, Meijer GA, et al. Comparative evaluation of genetic assays to identify oral pre-cancerous fields. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Nov;37(10):599-606.

- (118) Ho PS, Chen PL, Warnakulasuriya S, Shieh TY, Chen YK, Huang IY. Malignant transformation of oral potentially malignant disorders in males: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 2009 Jul 30;9:260.
- (119) Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J.Oral Pathol.Med.* 2007 Nov; 36(10):575-580.
- (120) van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2008 Jul 30.
- (121) Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Jan;37(1):1-10.
- (122) Perez-Sayans M, Somoza-Martin J, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez M, Gandara-Vila P, Rey JG, et al. Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. *Biotech.Histochem.* 2009 Aug 25:1-11.
- (123) Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Mar;37(3):127-133.
- (124) Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol.Cancer.* 2006 Mar 23; 5:11.
- (125) Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol.* 2007 Mar; 43(3):224-231.
- (126) World Health Organization Collaborating Centre for Oral Precancerous lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46:518-539.

- (127) Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1978 Oct; 46(4):518-539.
- (128) Kramer IR, Pindborg JJ, Bezroukov V, Infirri JS. Guide to epidemiology and diagnosis of oral mucosal diseases and conditions. World Health Organization. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 1980 Feb; 8(1):1-26.
- (129) Scully C., editor. Precancerous Lesions of the Oral Mucosa. Symposium of Oral Medicine London; 26-28 Nov 1993.
- (130) Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol.* 1998 Jul; 34(4):270-275.
- (131) Silverman S, Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984 Feb 1; 53(3):563-568.
- (132) Hsue SS, Wang WC, Chen CH, Lin CC, Chen YK, Lin LM. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. *J. Oral Pathol. Med.* 2007 Jan; 36(1):25-29.
- (133) Scully C, Sudbo J, Speight PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J. Oral Pathol. Med.* 2003 May; 32(5):251-256.
- (134) Eisenberg E. Oral lichen planus: a benign lesion. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2000 Nov; 58(11):1278-1285.
- (135) Gonzalez-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis.* 2008 Apr; 14(3):229-243.
- (136) Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2008 Jan; 46(1):15-21.

- (137) Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, Pindborg JJ, Bhonsle RB, Jainawalla PN, et al. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent.Oral Epidemiol.* 1980; 8(6):283-333.
- (138) van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.* 1997 Sep; 33(5):291-301.
- (139) Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J.Can.Dent.Assoc.* 2002 Nov; 68(10):617-621.
- (140) Gandara JM, Garcia A, Gandara P, Blanco A, Somoza JM, Gallas M. Precancerous lesions of the oral cavity. *Med.Oral* 1999 Nov-Dec; 4(5):588-606.
- (141) Laphanasupkul P, Poomsawat S, Punyasingh J. A clinicopathologic study of oral leukoplakia and erythroplakia in a Thai population. *Quintessence Int.* 2007 Sep ;38(8):448-55.
- (142) Martínez-Sahuquillo A, Martínez-Sahuquillo JM, Velasco E. Leucoplasia oral. *Medicina Bucal práctica: Editorial Danú SL; 2000.* p. 205-218.
- (143) Axell T, Holmstrup P, Kramer I, Pindborg JJ, Shear M. International Seminar on Oral Leukoplakia and associated lesiones related to tobacco habits. *Community Dent.Oral Epidemiol.* 1984;12(3):145-212.
- (144) Martínez-Sahuquillo A, Gallardo I, Cobos MJ, Caballero J, Bullón P. La leucoplasia oral. Su implicación como lesión precancerosa. *Av. Odontoestomatol* 2008;24(1):33-44.
- (145) Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003 Dec;39(8):770-780.

- (146) Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the non surgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent.* 2010;2010: 186018. Epub 2010 Feb 23. 2010.
- (147) Thomas G, Hashibe M, Jacob BJ, Ramadas K, Mathew B, Sankaranarayanan R, et al. Risk factors for multiple oral premalignant lesions. *Int.J.Cancer* 2003 Nov 1;107(2):285-291.
- (148) Banoczy J, Gintner Z, Dombi C. Effect of smoking on the development of oral leukoplakia. *Fogorv.Sz.* 2001 Jun;94(3):91-96.
- (149) Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2006 Apr; 15(4):774-781.
- (150) Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J, et al. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* 2003 Aug;32(7):379-382.
- (151) Bascones A, Esparza G, Cerero R, Campo J. Leucoplasia Oral. In: Bascones A, Seoane JM, Aguado A, Suárez JM, editors. *Cáncer y precáncer oral.Bases clínico-quirúrgicas y moleculares.* Madrid: Ediciones Avances Médico-Dentales,SL; 2003. p. 111-129.
- (152) Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2001 Jun; 91(6):622-635.
- (153) Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Gavalda C, Poveda R, Scully C, et al. Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2007 Jan; 65(1):46-49.

- (154) van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010 Jun; 46(6):423-425.
- (155) Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol.* 2006 May;42(5):461-474.
- (156) Scheifele C, Reichart PA, Dietrich T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol.* 2003 Sep;39(6):619-625.
- (157) van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May; 45(4-5):317-323.
- (158) Zhang L, Cheung KJ,Jr, Lam WL, Cheng X, Poh C, Priddy R, et al. Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management. *Cancer* 2001 Jun 1;91(11):2148-2155.
- (159) Bremmer JF, Braakhuis BJ, Ruijter-Schippers HJ, Brink A, Duarte HM, Kuik DJ, et al. A noninvasive genetic screening test to detect oral preneoplastic lesions. *Lab.Invest.* 2005 Dec; 85(12):1481-1488.
- (160) Bremmer JF, Graveland AP, Brink A, Braakhuis BJ, Kuik DJ, Leemans CR, et al. Screening for oral precancer with noninvasive genetic cytology. *Cancer.Prev.Res.(Phila Pa)* 2009 Feb;2(2):128-133.
- (161) Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Feb; 37(2):63-69.
- (162) Shafer WG, Waldron CA. Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer* 1975 Sep; 36(3):1021-1028.
- (163) Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia--a review. *Oral Oncol.* 2005 Jul; 41(6):551-561.

- (164) Gándara-Rey JM, Gandara-Vila P, Blanco-Carrion A, Garcia-Garcia A. Eritroplasia oral. In: Bascones-Martinez A, Seoane-Lestón JM, Aguado-Santos A, Suarez-Quintanilla JM, editors. *Cáncer y precáncer oral* Madrid: Ediciones Avances Medico-Dentales, S.L.; 2003. p. 133-144.
- (165) Melrose RJ. Premalignant oral mucosal diseases. *J.Calif.Dent.Assoc.* 2001 Aug; 29(8):593-600.
- (166) Nielsen H, Norrild B, Vedtofte P, Praetorius F, Reibel J, Holmstrup P. Human papillomavirus in oral premalignant lesions. *Eur.J.Cancer.B.Oral Oncol.* 1996 Jul; 32B(4):264-270.
- (167) Acha A, Ruesga MT, Rodriguez MJ, Martinez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2005 Mar-Apr; 10(2):95-102.
- (168) Christian DC. Computer-assisted analysis of oral brush biopsies at an oral cancer screening program. *J.Am.Dent.Assoc.* 2002 Mar;133(3):357-362.
- (169) Diniz-Freitas M, Garcia-Garcia A, Crespo-Abelleira A, Martins-Carneiro JL, Gandara-Rey JM. Applications of exfoliative cytology in the diagnosis of oral cancer. *Med.Oral* 2004 Aug-Oct; 9(4):355-361.
- (170) Eisen D. The oral brush biopsy: a new reason to screen every patient for oral cancer. *Gen.Dent.* 2000 Jan-Feb; 48(1):96-99.
- (171) Mehrotra R, Hullmann M, Smeets R, Reichert TE, Driemel O. Oral cytology revisited. *J.Oral Pathol.Med.* 2009 Feb; 38(2):161-166.
- (172) Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J.Am.Dent.Assoc.* 1999 Oct; 130(10):1445-1457.

- (173) Svirsky JA, Burns JC, Carpenter WM, Cohen DM, Bhattacharyya I, Fantasia JE, et al. Comparison of computer-assisted brush biopsy results with follow up scalpel biopsy and histology. *Gen.Dent.* 2002 Nov-Dec;50(6):500-503.
- (174) Delavarian Z, Mohtasham N, Mosannen-Mozafari P, Pakfetrat A, Shakeri MT, Ghafoorian-Maddah R. Evaluation of the diagnostic value of a Modified Liquid-Based Cytology using OralCDx (R) Brush in early detection of oral potentially malignant lesions and oral cancer. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2010 Apr 11.
- (175) Seoane Leston J, Diz Dios P. Diagnostic clinical aids in oral cancer. *Oral Oncol.* 2010 Apr 3.
- (176) Hullmann M, Reichert TE, Dahse R, von Eggeling F, Pistner H, Kosmehl H, et al. Oral cytology: historical development, current status, and perspectives. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2007 Jan;11(1):1-9.
- (177) Poh CF, Ng S, Berean KW, Williams PM, Rosin MP, Zhang L. Biopsy and histopathologic diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J.Can.Dent.Assoc.* 2008 Apr; 74(3):283-288.
- (178) Moule I, Parsons PA, Irvine GH. Avoiding artefacts in oral biopsies: the punch biopsy versus the incisional biopsy. *Br.J.Oral Maxillofac.Surg.* 1995 Aug; 33(4):244-247.
- (179) Pogrel MA, McCracken KJ, Daniels TE. Histologic evaluation of the width of soft tissue necrosis adjacent to carbon dioxide laser incisions. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1990 Nov; 70(5):564-568.
- (180) Pentenero M, Carrozzo M, Pagano M, Galliano D, Broccoletti R, Scully C, et al. Oral mucosal dysplastic lesions and early squamous cell carcinomas: underdiagnosis from incisional biopsy. *Oral Dis.* 2003 Mar; 9(2):68-72.

- (181) Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? *J.Oral Pathol.Med.* 2007 May; 36(5):262-266.
- (182) Epstein JB, Guneri P. The adjunctive role of toluidine blue in detection of oral premalignant and malignant lesions. *Curr.Opin.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 2009 Apr; 17(2):79-87.
- (183) Epstein JB, Silverman S,Jr, Epstein JD, Lonky SA, Bride MA. Analysis of oral lesion biopsies identified and evaluated by visual examination, chemiluminescence and toluidine blue. *Oral Oncol.* 2008 Jun; 44(6):538-544.
- (184) Epstein JB, Sciubba J, Silverman S,Jr, Sroussi HY. Utility of toluidine blue in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma: continuing research and implications for clinical practice. *Head Neck* 2007 Oct; 29(10):948-958.
- (185) Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol.* 2008 Jan;44(1):10-22.
- (186) Farah CS, McCullough MJ. A pilot case control study on the efficacy of acetic acid wash and chemiluminescent illumination (ViziLite) in the visualisation of oral mucosal white lesions. *Oral Oncol.* 2007 Sep; 43(8):820-824.
- (187) Huber MA. Assessment of the VELscope as an adjunctive examination tool. *Tex.Dent.J.* 2009 Jun; 126(6):528-535.
- (188) Patton LL, Epstein JB, Kerr AR. Adjunctive techniques for oral cancer examination and lesion diagnosis: a systematic review of the literature. *J.Am.Dent.Assoc.* 2008 Jul; 139(7):896-905; quiz 993-4.
- (189) Chimenos E, Finestres F, Piulachs P, Viñals H. Pruebas diagnósticas complementarias. In: Ceballos A, Bullón P, Gándara J, Chimenos E,

- Blanco A, Martínez-Sahuquillo A, et al, editors. *Medicina Bucal Práctica*: Editorial Danú S.L.; 2000. p. 47-79.
- (190) Gale N, Pilch BZ, Sidransky D. Epithelial precursors lesions. In: Barnes L, Evenson J, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Health Organisation classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the head and neck* Lyon: IARC; 2005. p.143.
- (191) Viquer JM, García del Moral R. *Laboratorio y atlas de citología*. Madrid: Interamericana McGraw-Hill; 1995.
- (192) E. M. Otero Rey. Validación y estudio de la implicación de los genes AFRBK2, ADRB1, ADRA2B, AXIN 2 ATPV6V1C1 y ATP6VOE en el carcinoma oral de células escamosas mediante PCR cuantitativa en tiempo real; 2006.
- (193) Loning T, Henke RP, Reichart P, Becker J. In situ hybridization to detect Epstein-Barr virus DNA in oral tissues of HIV-infected patients. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.* 1987; 412(2):127-133.
- (194) Dawkins HJ, Robbins PD, Sarna M, Carrello S, Harvey JM, Sterrett GF. c-erbB-2 amplification and overexpression in breast cancer: evaluation and comparison of Southern blot, slot blot, ELISA and immunohistochemistry. *Pathology* 1993 Apr; 25(2):124-132.
- (195) Lin SL. Single-cell mRNA library analysis by Northern blot hybridization. *Methods Mol.Biol.* 2003; 221:169-178.
- (196) McGuire K, Manuja A, Russell GC, Springbett A, Craigmile SC, Nichani AK, et al. Quantitative analysis of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in *Theileria annulata*-infected cell lines derived from resistant and susceptible cattle. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 2004 May; 99(1-2):87-98.
- (197) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat.Genet.* 1999 Jan; 21(1 Suppl):10-14.

- (198) Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci.Am.* 1990 Apr; 262(4):56-61, 64-5.
- (199) Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155:335-350.
- (200) Oste C. Polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1988 Feb;6(2):162-167.
- (201) Markham AF. The polymerase chain reaction: a tool for molecular medicine. *BMJ* 1993 Feb 13; 306(6875):441-446.
- (202) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y)* 1993 Sep; 11(9):1026-1030.
- (203) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y)* 1992 Apr; 10(4):413-417.
- (204) Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv.Physiol.Educ.* 2005 Sep; 29(3):151-159.
- (205) Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin.Sci.(Lond)* 2005 Oct;109(4):365-379.
- (206) Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 2002 Apr 19; 296(5567):557-559.
- (207) Giglio S, Monis PT, Saint CP. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res.* 2003 Nov 15; 31(22):e136.
- (208) Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 1997 Jan; 22(1):130-1, 134-8.

- (209) Bruce A, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Introducción a las células. Introducción a la biología celular: Panamericana; 2007. p. 1-30.
- (210) Maillet M. Manual de citología. : Masson; 1978.
- (211) Walter V. EM. Técnicas citológicas. Citología: Omega; 1979. p. 1-35.
- (212) Traut HF, Papanicolaou GN. Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. Cal West.Med. 1943 Aug; 59(2):121-122.
- (213)Saumann A.The origins of the Papanicolaou test. Rev.Chil.Obstet.Ginecol. 1992; 57(6):461-463.
- (214) Ojeda Ortiz J, Munoz Molina R, Pardo Lopez M, Guevara Cruz M, Hernandez Quijano T, Valencia Elizondo C, et al. Acceptable quality cervical cytology taking: comparison of Cervex-brush and Cervex-mex methods. Ginecol.Obstet.Mex. 2008 Jul;76(7):381-385.
- (215) Amaral RG, Manrique EJ, Guimaraes JV, Sousa PJ, Mignoli JR, Xavier Ade F, et al. Influence of adequacy of the sample on detection of the precursor lesions of the cervical cancer. Rev.Bras.Ginecol.Obstet. 2008 Nov; 30(11):556-560.
- (216) Christe DM, Mohanambal M, Ramamurthy V, Snehaa NB. A study of cervical cancer screening for prevention of carcinoma cervix.J.Indian Med.Assoc. 2008 Dec; 106(12):779-80, 782.
- (217) Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. Arch.Pathol.Lab.Med. 1997 Mar; 121(3):211-224.
- (218) Carns B, Fadare O. Papanicolaou Test in the Detection of High-Grade Cervical Lesions: A Re-evaluation Based on Cytohistologic Non-correlation Rates in 356 Concurrently Obtained Samples. Int.J.Clin.Exp.Pathol. 2008 Jan 1; 1(3):285-290.
- (219) Zhao C, Florea A, Onisko A, Austin RM. Histologic follow-up results in 662 patients with Pap test findings of atypical glandular cells: results

- from a large academic womens hospital laboratory employing sensitive screening methods. *Gynecol.Oncol.* 2009 Sep; 114(3):383-389.
- (220) Apgar BS, Kittendorf AL, Bettcher CM, Wong J, Kaufman AJ. Update on ASCCP consensus guidelines for abnormal cervical screening tests and cervical histology. *Am.Fam.Physician* 2009 Jul 15; 80(2):147-155.
- (221) Jordan J, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Schenck U, Baldauf J, Da Silva D, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical managemet or abnormal cervical cytology, part 1. *Cytopathology* 2008 December; 19(6):342-354.
- (222) Thrall MJ, Pambuccian S, Stelow EB, Mckeon DM, Miller L, Savik K, et al. Impact of the moes restrictive definition of atypical squamous cells introduced by the 2001 Bethesda Systeem on the sensivity and specificity of the Papanicolaou Test. *Cancer Cytopathology* 2008 march:171-179.
- (223) Koss LG. Cervical (Pap) smear. New directions. *Cancer* 1993 Feb 15; 71(4 Suppl):1406-1412.
- (224) Moroney JW, Zahn CM, Heaton RB, Crothers B, Kendall BS, Elkas JC. Normal endometrial cells in liquid-based cervical cytology specimens in women aged 40 or older. *Gynecol.Oncol.* 2007 Jun; 105(3):672-676.
- (225) Kirschner B, Simonsen K, Junge J. Comparison of conventional Papanicolaou smear and SurePath liquid-based cytology in the Copenhagen population screening programme for cervical cancer. *Cytopathology* 2006 Aug;17(4):187-194.
- (226) Sugeran PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust.Dent.J.* 1996 Apr; 41(2):71-74.

- (227) Navone R, Marsico A, Reale I, Pich A, Broccoletti R, Pentenero M, et al. Usefulness of oral exfoliative cytology for the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Minerva Stomatol.* 2004 Mar; 53(3):77-86.
- (228) Navone R, Pentenero M, Rostan I, Burlo P, Marsico A, Broccoletti R, et al. Oral potentially malignant lesions: first-level micro-histological diagnosis from tissue fragments sampled in liquid-based diagnostic cytology. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Jul; 37(6):358-363.
- (229) Mehrotra R, Singh MK, Pandya S, Singh M. The use of an oral brush biopsy without computer-assisted analysis in the evaluation of oral lesions: a study of 94 patients. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2008 Aug; 106(2):246-253.
- (230) Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. *Acta Cytol.* 1992 Sep-Oct; 36(5):706-710.
- (231) Jones AC, Migliorati CA, Stewart CM. Oral cytology: indications, contraindications, and technique. *Gen.Dent.* 1995 Jan-Feb; 43(1):74-7; quiz 79-80.
- (232) Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1994 Jan; 77(1):95-99.
- (233) Chandler JR. The nonvalue of oral cytology. *Arch.Otolaryngol.* 1966 Nov;84(5):527-533.
- (234) Mollaoglu N, Wilson MJ, Cowpe JG. Extraction of DNA from oral cytological samples by scraping and smear method suitable for restriction site mutation analysis: a pilot study. *Diagn.Cytopathol.* 2001 Aug;25(2):83-85.

- (235) Kosicki DM, Riva C, Pajarola GF, Burkhardt A, Gratz KW. OralCDx brush biopsy--a tool for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.* 2007;117(3):222-227.
- (236) Ahmed HG, Idris AM, Ibrahim SO. Study of oral epithelial atypia among Sudanese tobacco users by exfoliative cytology. *Anticancer Res.* 2003 Mar-Apr; 23(2C):1943-1949.
- (237) Trullenque-Eriksson A, Munoz-Corcuera M, Campo-Trapero J, Cano-Sanchez J, Bascones-Martinez A. Analysis of new diagnostic methods in suspicious lesions of the oral mucosa. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2009 May 1; 14(5):E210-6.
- (238) Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J.Oral Pathol.Med.* 1997 May; 26(5):201-205.
- (239) Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J.R.Soc.Med.* 1985 Dec; 78(12):995-1004.
- (240) Cowpe JG, Ogden GR, Green MW. Comparison of planimetry and image analysis for the discrimination between normal and abnormal cells in cytological smears of suspicious lesions of the oral cavity. *Cytopathology* 1993; 4(1):27-35.
- (241) Cowpe JG, Green MW, Ogden GR. Quantitative cytology of oral smears. A comparison of two methods of measurement. *Anal.Quant.Cytol.Histol.* 1991 Feb; 13(1):11-15.
- (242) Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* 1998 Feb;27(2):83-86.
- (243) Pektas ZO, Keskin A, Gunhan O, Karslioglu Y. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and

- review of methods for cytomorphometric measurements. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2006 Apr; 64(4):628-635.
- (244) Saiz R, Corchero G, García B, González T, Sánchez S. Oral squamous cell carcinoma, cytometric parameters of prognostic interest. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:462-467.
- (245) Ogden GR, McQueen S, Chisholm DM, Lane EB. Keratin profiles of normal and malignant oral mucosa using exfoliative cytology. *J.Clin.Pathol.* 1993 Apr; 46(4):352-356.
- (246) Ogden GR, Cowpe JG, Chisholm DM, Lane EB. DNA and keratin analysis of oral exfoliative cytology in the detection of oral cancer. *Eur.J.Cancer.B.Oral Oncol.* 1994 Nov; 30B(6):405-408.
- (247) Scheifele C, Schlechte H, Bethke G, Reichart PA. Detection of TP53-mutations in brush biopsies from oral leukoplakias. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2002 Nov; 6(6):410-414.
- (248) Lopez M, Aguirre JM, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, et al. Use of cytological specimens for p53 gene alteration detection in oral squamous cell carcinoma risk patients. *Clin.Oncol.(R.Coll.Radiol)* 2004 Aug;16(5):366-370.
- (249) Liao PH, Chang YC, Huang MF, Tai KW, Chou MY. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2000 May; 36(3):272-276.
- (250) Song LH, Goh ES, Phang LC, Poh WT, Tay SK. Technical aspect of ThinPrep. *Singapore Med.J.* 2000 Dec; 41(12):575-578.
- (251) Hutchinson ML, Cassin CM, Ball HG. The efficacy of an automated preparation device for cervical cytology. *Am.J.Clin.Pathol.* 1991 Sep; 96(3):300-305.
- (252) Kristensen GB, Skyggebjerg KD, Holund B, Holm K, Hansen MK. Analysis of cervical smears obtained within three years of the

- diagnosis of invasive cervical cancer. *Acta Cytol.* 1991 Jan-Feb; 35(1):47-50.
- (253) Hayama FH, Motta AC, Silva Ade P, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2005 Mar-Apr; 10(2):115-122.
- (254) Weynand B, Berliere M, Haumont E, Massart F, Pourvoyeur A, Bernard P, et al. A new, liquid-based cytology technique. *Acta Cytol.* 2003 Mar-Apr; 47(2):149-153.
- (255) Ricci A, Perucca P, Koljanin VB, T. Citología en base líquida: revisión de la historia y los estudios al respecto. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 2004; 69(3):256-262.
- (256) Karnon J, Peters J, Platt J, Chilcott J, McGoogan E, Brewer N. Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis. *Health Technol.Assess.* 2004 May; 8(20):iii, 1-78.
- (257) Nuovo J, Melnikow J, Howell LP. New tests for cervical cancer screening. *Am.Fam.Physician* 2001 Sep 1; 64(5):780-786.
- (258) Treacy A, Reynolds J, Kay EW, Leader M, Grace A. Has the ThinPrep method of cervical screening maintained its improvement over conventional smears in terms of specimen adequacy? *Diagn.Cytopathol.* 2009 Apr; 37(4):239-240.
- (259) van Hemel BM, Buikema HJ, Groen H, Suurmeijer AJ. Accuracy of a low priced liquid-based method for cervical cytology in 632 women referred for colposcopy after a positive Pap smear. *Diagn.Cytopathol.* 2009 Aug; 37(8):579-583.
- (260) Beerman H, van Dorst EB, Kuenen-Boumeester V, Hogendoorn PC. Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in

- a population-based cervical cancer screening program. *Gynecol.Oncol.* 2009 Mar; 112(3):572-576.
- (261) Canda MT, Demir N, Sezer O, Doganay L, Ortac R. Clinical results of the liquid-based cervical cytology tool, Liqui-PREP, in comparison with conventional smears for detection of squamous cell abnormalities. *Asian Pac.J.Cancer.Prev.* 2009 Jul-Sep; 10(3):399-402.
- (262) Siebers AG, Klinkhamer PJ, Arbyn M, Raifu AO, Massuger LF, Bulten J. Cytologic detection of cervical abnormalities using liquid-based compared with conventional cytology: a randomized controlled trial. *Obstet.Gynecol.* 2008 Dec; 112(6):1327-1334.
- (263) Maccallini V, Angeloni C, Caraceni D, Fortunato C, Venditti MA, Di Gabriele G, et al. Comparison of the conventional cervical smear and liquid-based cytology: results of a controlled, prospective study in the Abruzzo Region of Italy. *Acta Cytol.* 2008 Sep-Oct; 52(5):568-574.
- (264) Thrall MJ, Russell DK, Bonfiglio TA, Hoda RS. Use of the ThinPrep(R) Imaging System does not alter the frequency of interpreting Papanicolaou tests as atypical squamous cells of undetermined significance. *Cytojournal* 2008 Apr 24; 5:10.
- (265) Schledermann D, Ejersbo D, Hoelund B.Improvement of diagnostic accuracy and screening conditions with liquid-based cytology. *Diagn.Cytopathol.* 2006 Nov; 34(11):780-785.
- (266) Chacho MS, Mattie ME, Schwartz PE.Cytohistologic correlation rates between conventional Papanicolaou smears and ThinPrep cervical cytology: a comparison. *Cancer* 2003 Jun 25; 99(3):135-140.
- (267) Bishop JW, Bigner SH, Colgan TJ, Husain M, Howell LP, McIntosh KM, et al. Multicenter masked evaluation of AutoCyte PREP thin layers with matched conventional smears.Including initial biopsy results.*Acta Cytol.* 1998 Jan-Feb; 42(1):189-197.

- (268) Vassilakos P, Cossali D, Albe X, Alonso L, Hohener R, Puget E. Efficacy of monolayer preparations for cervical cytology: emphasis on suboptimal specimens. *Acta Cytol.* 1996 May-Jun;40(3):496-500.
- (269) Ronco G, Cuzick J, Pierotti P, Cariaggi MP, Dalla Palma P, Naldoni C, et al. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. *BMJ* 2007 Jul 7; 335(7609):28.
- (270) Lerma E, Quintana MJ, Quilez M, Esteva E, Carreras A, Bonfill X, et al. Effectiveness of liquid-based cytology and papanicolaou tests in a low risk population. *Acta Cytol.* 2007 May-Jun; 51(3):399-406.
- (271) Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P. Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncol.* 2006 Sep; 42(8):810-818.
- (272) Spafford MF, Koch WM, Reed AL, Califano JA, Xu LH, Eisenberger CF, et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin.Cancer Res.* 2001 Mar; 7(3):607-612.
- (273) Steinau M, Lee DR, Rajeevan MS, Vernon SD, Ruffin MT, Unger ER. Gene expression profile of cervical tissue compared to exfoliated cells: impact on biomarker discovery. *BMC Genomics* 2005 May 5; 6(1):64.
- (274) Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, Kumar SV, Aldous KM, Gierthy JF, et al. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Res.* 2004 Sep 15; 64(18):6805-6813.
- (275) Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, Kleinsasser N, Staudenmaier R, Muller-Richter U, et al. Performance of conventional oral brush biopsies. *HNO* 2008 Feb; 56(2):205-210.

- (276) Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):939-942.
- (277) Huang MF, Chang YC, Liao PS, Huang TH, Tsay CH, Chou MY. Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. *Oral Oncol.* 1999 May; 35(3):296-301.
- (278) Nunes DN, Kowalski LP, Simpson AJ. Detection of oral and oropharyngeal cancer by microsatellite analysis in mouth washes and lesion brushings. *Oral Oncol.* 2000 Nov; 36(6):525-528.
- (279) Alberts B, Bray D, Hopkin K, Jonhson A, Lewis J, Raff M, et al. Del DNA a la proteína: cómo leen las células el genoma. In: Alberts B, Bray D, Hopkin K, Jonhson A, Lewis J, Raff M, et al, editors. . 2ª ed.: Editorial médica Paramericana S.A.; 2007. p. 229-266.
- (280) Schwartz JL, Panda S, Beam C, Bach LE, Adami GR. RNA from brush oral cytology to measure squamous cell carcinoma gene expression. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Feb; 37(2):70-77.
- (281) Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr.Opin.Oncol.* 2006 May; 18(3):228-233.
- (282) Ballantyne J. Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin.Cancer Res.* 2007 Feb 15; 13(4):1350; author reply 1351.
- (283) Smith RV, Schlecht NF, Childs G, Prystowsky MB, Belbin TJ. Pilot study of mucosal genetic differences in early smokers and nonsmokers. *Laryngoscope* 2006 Aug; 116(8):1375-1379.
- (284) Klaassen I, Copper MP, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Snow B, J.M. Exfoliated oral cells messenger RNA: suitability for biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Jun; 7:469-472.

- (285) Spira A, Beane J, Schembri F, Liu G, Ding C, Gilman S, et al. Noninvasive method for obtaining RNA from buccal mucosa epithelial cells for gene expression profiling. *BioTechniques* 2004 Mar; 36(3):484-487.
- (286) Habis AH, Vernon SD, Lee DR, Verma M, Unger E. Molecular quality of exfoliated cervical cells: implications for molecular epidemiology and biomarker discovery. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Mar; 13(3):492-6.
- (287) Peirson S, Butler J. RNA extraction from mammalian tissues. *Methods Mol Biol* 2007; 362:315-327.
- (288) SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* 2000 Oct; 25(2):169-193.
- (289) Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guaninium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006; 1(2):581-585.
- (290) Bird M. Extraction of RNA from cells and tissue. *Methods Mol Med* 2005; 108:139-148.
- (291) Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 2006; 1(3):1559-1582.
- (292) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18; 3(7):RESEARCH0034.
- (293) Slater DN, Rice S, Stewart R, Melling SE, Hewer EM, Smith JH. Proposed Sheffield quantitative criteria in cervical cytology to assist the grading of squamous cell dyskeratosis, as the British Society for Clinical Cytology definitions require amendment. *Cytopathology* 2005 Aug; 16(4):179-192.

- (294) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287(16):2114-9.
- (295) Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, Colgan TJ, Styer PE, Mody DR. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 2004 Nov; 128(11):1224-1229.
- (296) Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G, Muwonge R, Thara S, Mathew B, et al. Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet* 2005 Jun 4-10; 365(9475):1927-1933.
- (297) Rossi ED, Mule A, Russo RM, Pierconti F, Fadda G. Application of liquid-based preparation to non-gynaecologic exfoliative cytology. *Pathologica* 2008 Dec; 100(6):461-465.
- (298) Kahn MA. Oral exfoliative cytology procedures: conventional, brush biopsy and ThinPrep. *J.Tenn.Dent.Assoc.* 2001 Winter;81(1):17-20.
- (299) Pentenero M, Giaretti W, Navone R, Demurtas A, Rostan I, Bertolusso G, et al. DNA aneuploidy and dysplasia in oral potentially malignant disorders: association with cigarette smoking and site. *Oral Oncol.* 2009 Oct;45(10):887-890.
- (300) Maraki D, Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J.Oral Pathol.Med.* 2004 Aug;33(7):398-404.
- (301) Boyle JO, Mao L, Brennan JA, Koch WM, Eisele DW, Saunders JR, et al. Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am.J.Surg.* 1994 Nov; 168(5):429-432.
- (302) El-Naggar AK, Mao L, Staerckel G, Coombes MM, Tucker SL, Luna MA, et al. Genetic heterogeneity in saliva from patients with oral

- squamous carcinomas: implications in molecular diagnosis and screening. *J.Mol.Diagn.* 2001 Nov; 3(4):164-170.
- (303) Scott IS, Odell E, Chatrath P, Morris LS, Davies RJ, Vowler SL, et al. A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Br.J.Cancer* 2006 Apr 24;94(8):1170-1175.
- (304) Whitaker CJ, Stamp EC, Young W, Greenwood LA. Comparison of the efficacy of the cervix brush and the extended-tip wooden spatula with conventional cytology: a longitudinal study. *Cytojournal* 2009 Jan 19; 6:2.
- (305) Agoff SN, Dean T, Nixon BK, Ingalls-Severn K, Rinker L, Grieco VS. The efficacy of reprocessing unsatisfactory cervicovaginal ThinPrep specimens with and without glacial acetic acid: effect on Hybrid Capture II human papillomavirus testing and clinical follow-up. *Am.J.Clin.Pathol.* 2002 Nov;118 (5):727-732.
- (306) Celik C, Gezginc K, Toy H, Findik S, Yilmaz O. A comparison of liquid-based cytology with conventional cytology. *Int.J.Gynaecol.Obstet.* 2008 Feb;100 (2):163-166.
- (307) Boardman LA, Meinz H, Steinhoff MM, Heber WW, Blume J. A randomized trial of the sleeved cytobrush and the endocervical curette. *Obstet.Gynecol.* 2003 Mar; 101 (3):426-430.
- (308) Baer A, Kiviat NB, Kulasingam S, Mao C, Kuypers J, Koutsky LA. Liquid-based Papanicolaou smears without a transformation zone component: should clinicians worry? *Obstet.Gynecol.* 2002 Jun;99 (6):1053-1059.
- (309) Risberg B, Andersson A, Zetterberg C, Nordin B. Cervex-Brush vs. spatula and Cytobrush. A cytohistologic evaluation. *J.Reprod.Med.* 1997 Jul;42 (7):405-408.

- (310) Scheifele C, Schmidt-Westhausen AM, Dietrich T, Reichart PA. The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol.* 2004 Sep; 40 (8):824-828.
- (311) Poate TW, Buchanan JA, Hodgson TA, Speight PM, Barrett AW, Moles DR, et al. An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral Medicine unit. *Oral Oncol.* 2004 Sep; 40(8):829-834.
- (312) Hohlweg-Majert B, Deppe H, Metzger MC, Schumm S, Hoefler H, Kesting MR, et al. Sensitivity and specificity of oral brush biopsy. *Cancer Invest.* 2009 Mar;27 (3):293-297.
- (313) Bhoopathi V, Kabani S, Mascarenhas AK. Low positive predictive value of the oral brush biopsy in detecting dysplastic oral lesions. *Cancer* 2009 Mar 1;115(5):1036-1040.
- (314) Gonzalez HE, Gujrati M, Frederick M, Henderson Y, Arumugam J, Spring PW, et al. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch.Otolaryngol.Head.Neck.Surg.* 2003 Jul;129 (7):754-759.
- (315) Toyoshima T, Koch F, Kaemmerer P, Vairaktaris E, Al-Nawas B, Wagner W. Expression of cytokeratin 17 mRNA in oral squamous cell carcinoma cells obtained by brush biopsy: preliminary results. *J.Oral Pathol.Med.* 2009 Jul;38 (6):530-534.
- (316) Winn DM. Tobacco use and oral disease. *J.Dent.Educ.* 2001 Apr;65 (4):306-312.
- (317) Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martinez ME, Lobos-James-Freyre N, Ortega-Pinto AV. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Med.Oral* 2004 May-Jul;9(3):197-203.
- (318) Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and

- their association with oral cancer--a review. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2006 Jun; 15(6):1061-1077.
- (319) Koch FP, Kunkel M, Biesterfeld S, Wagner W. Diagnostic efficiency of differentiating small cancerous and precancerous lesions using mucosal brush smears of the oral cavity-a prospective and blinded study. *Clin.Oral Investig.* 2010 Jul 1.
- (320) Rick GM. Oral brush biopsy: the problem of false positives.*Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2003 Sep ;96 (3):252.
- (321) Potter TJ, Summerlin DJ, Campbell JH. Oral malignancies associated with negative transepithelial brush biopsy. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2003 Jun; 61(6):674-677.
- (322) Belsley NA, Tambouret RH, Misdraji J, Muzikansky A, Russell DK, Wilbur DC.Cytologic features of endocervical glandular lesions: comparison of SurePath, ThinPrep, and conventional smear specimen preparations. *Diagn.Cytopathol.* 2008 Apr; 36(4):232-237.
- (323) Thiryayi SA, Marshall J, Rana DN.An audit of liquid-based cervical cytology screening samples (ThinPrep and SurePath) reported as glandular neoplasia. *Cytopathology* 2009 Oct 15.
- (324) Laine ML, Farre MA, Crusius JB, van Winkelhoff AJ, Pena AS. The mouthwash: a non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J.Periodontol.* 2000 Aug; 71(8):1315-1318.



## **VIII. ANEXOS**



**ANEXO 1:**  
**Consentimiento Informado**



Título del estudio: ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES INSTRUMENTOS DE CITOLOGÍA ORAL PARA LA TOMA DE MUESTRAS CITOLÓGICAS DE LA CAVIDAD ORAL: CYTOBRUSH, ORAL CDx Y CURETA DERMATOLÓGICA

Se le ha pedido que participe en un estudio de investigación. Antes de decidir si va a participar es importante que entienda por qué se hace esta investigación, cómo se utilizará su información, qué implicaciones tiene el estudio y los posibles beneficios, riesgos y molestias que conlleva. Tómese el tiempo necesario para leer con detenimiento la siguiente información y hable de ello con su dentista.

### **Información general y finalidad del estudio**

Se le ha ofrecido la posibilidad de participar en este estudio por tratarse de estudiante de la Facultad de Medicina y Odontología sin ninguna patología oral ni sistémica diagnosticada. Se ha seleccionado la población de estudio estudiantes de dicha facultad porque suelen reunir los criterios de inclusión (sujetos jóvenes sin patología oral ni general) y por su mayor accesibilidad para la toma de muestras ya que éstas se tomarán en la propia Facultad de Medicina y Odontología.

Se pretende con este estudio comparar la utilidad de tres instrumentos para la toma de muestras de células de la cavidad oral y poder así utilizar el mejor instrumento para conseguir un diagnóstico precoz en posibles lesiones premalignas y/o malignas de la cavidad oral.

En la cavidad oral existen múltiples lesiones con aspecto ulcerado, y a pesar de que muchas de ellas son de carácter benigno (liquen plano erosivo, aftas, etc), es necesario establecer el diagnóstico diferencial con el carcinoma oral de células escamosas (COCE). El COCE es una entidad relativamente frecuente, con una elevada morbi mortalidad cuando se diagnostica en estadios avanzados, y con un mejor pronóstico si se diagnostica precozmente. Las lesiones que aparecen en el COCE pueden ser visualizadas fácilmente en la inspección de la cavidad oral que realizan tanto los médicos de atención primaria como dentistas. Por su aspecto clínico, los COCE son difícilmente distinguibles de las lesiones benignas.

Para el diagnóstico se requiere biopsia con confirmación anatomopatológica, lo que implica una prueba cruenta e invasiva y hace necesaria la participación de otro personal especializado. En caso de que la citología fuese una prueba eficaz en el diagnóstico del COCE, tal como es la pretensión de este estudio, los profesionales de la atención primaria y los dentistas dispondrían de una prueba de fácil ejecución y no cruenta, con la que poder cribar a los pacientes con lesiones sospechosas en la boca,

enviando a estos pacientes con resultado positivo a las unidades hospitalarias de referencia.

Si acepta participar debe de saber que en el estudio participarán alrededor de 30 personas más como usted .

### **La participación es voluntaria**

La decisión de participar o no en el estudio es sólo suya. Si decide no participar en el estudio, debe saber que no se verá perjudicado de ningún modo. Si acepta participar tendrá que firmar este formulario de consentimiento informado. Si decide participar podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin que la atención que reciba en el futuro se vea afectada y sin necesidad de dar ningún tipo de explicación.

De la misma manera, el médico responsable del estudio (Prof. Dr. Abel García García) podría decidir en algún momento que seguir participando en el estudio no redunda en su interés y podrá retirarle del mismo. Así mismo, será informado si sale a la luz cualquier nueva información sobre el/los producto(s) del estudio que pueda influir en su decisión de continuar en él. Cuando deje de participar en el estudio tendrá que someterse a todos los procedimientos de retirada del mismo que el médico del proyecto considere necesarios para su seguridad.

### **¿Qué pasará si decido participar?**

Que le tomaremos unas muestras citológicas para realizar un análisis citopatológico y molecular de sus células, para realizar un diagnóstico citológico y evaluar los niveles de expresión, mediante cuantificación de ARN, de un gen control (ABL) que se expresa de forma constante en todas las células.

### **Posibles efectos secundarios, riesgos y molestias**

Los efectos secundarios que puede presentar son los derivados de la toma de muestra citológica mediante cepillos o curetas. Puede presentar algún disconfort durante el raspado, y ligero enrojecimiento de la mucosa.

### **¿Obtendré algún beneficio por participar?**

La participación en este estudio no representa ninguna ventaja para usted de forma directa, pero su participación en el estudio aportará información para mejorar el diagnóstico citológico del cáncer oral que podría beneficiar a otras personas o a usted en el futuro.

### **Tratamiento de los datos personales y los resultados**

Durante el estudio, recogeremos algunos datos personales suyos, como la fecha de nacimiento, el sexo y datos sobre su estado de salud o sus enfermedades (pasadas y actuales, etc.), así como los resultados de las evaluaciones del estudio.

En ningún caso esta información se vinculará a datos que permitan su identificación (nombre, DNI....)

Sus datos serán tratados conforme a la Ley Orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal.

El médico del estudio comunicará los datos personales recogidos durante el estudio (“datos del estudio”) a las unidades encargadas del análisis de las muestras. Sólo el médico del estudio y su personal podrán acceder a sus datos del estudio. En la Unidad de Medicina Oral, sus datos se almacenarán y analizarán manualmente y con medios informáticos. Sus respuestas y resultados se tratarán de modo que no puedan acceder a ellos personas no autorizadas.

A fin de supervisar la correcta ejecución del estudio, representantes autorizados o las autoridades supervisoras nacionales o extranjeras podrán revisar los datos del estudio y compararlos con los datos que figuran en su historia clínica. Para acceder a su historia clínica, estos representantes deberán contar primero con la autorización del médico del estudio.

La recogida y tratamiento de sus datos del estudio servirá para investigar y desarrollar el o los objetivos descritos en este formulario de consentimiento informado. Los resultados también serán publicados en revistas científicas, pero sin revelar su identidad.

La Unidad de Medicina Oral podrá compartir sus datos del estudio con otras unidades de su especialidad, quiénes emplearán sus datos del estudio sólo para los fines descritos arriba. La Unidad podrá transferir sus datos del estudio a países de la Unión Europea y en todo caso siguiendo lo establecido en la Ley de Protección de datos (Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal)

Tiene derecho a solicitar información sobre los datos personales que el médico del estudio podrá conservar sobre usted. También tiene el derecho a solicitar la rectificación de cualquier error en sus datos personales. Si desea realizar una petición, póngase primero en contacto con el médico del estudio. Las señas de contacto del médico del estudio aparecen al final de este formulario.

Si retira su consentimiento, el médico del estudio dejará de recoger sus datos del estudio. No obstante, la Unidad podrá seguir utilizando la información obtenida sobre usted antes de la retirada de su consentimiento.

En cuanto a las muestras biológicas obtenidas durante el estudio, éstas serán destruidas una vez terminado el mismo.

### **Contactos del estudio**

Si tiene alguna pregunta sobre el mismo, o el procedimiento que se va a llevar a cabo, póngase en contacto con:

Médico responsable del estudio: Prof Abel García, nº teléfono 981563100  
Ext. 12357

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

### Sujeto participante en la investigación

He sido informado verbalmente sobre el estudio y he leído la información escrita adjunta. He tenido la oportunidad de comentar el estudio y de plantear preguntas acerca de él. He tenido tiempo suficiente para reflexionar sobre mi participación y tomar una decisión. Acepto:

- Participar en el estudio.
- Que se recojan y procesen mis datos, del modo descrito en este formulario, incluida la comunicación de mis datos a la Unidad de Medicina Oral y a las entidades supervisoras.
- Que una persona designada por la Unidad o un representante de las autoridades acceda a mi historia clínica para comparar la información comunicada en el estudio con la información contenida en mi historia clínica.

Sé que mi participación en el estudio es totalmente voluntaria y que puedo retirarme en cualquier momento sin que ello influya en la atención médica que pueda recibir en el futuro.

\_\_\_\_\_  
Fecha (a rellenar por el participante)

\_\_\_\_\_  
Firma del participante

\_\_\_\_\_  
Nombre impreso del participante (EN MAYÚSCULAS)

### Investigador

He explicado el diseño y la finalidad del estudio al paciente participante en la investigación arriba indicado.

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del investigador

\_\_\_\_\_  
Nombre impreso del investigador (EN MAYÚSCULAS)

**El participante recibe una copia firmada de este consentimiento informado**

**ANEXO 2:**  
**Publicaciones**



## Gene Expression Profile in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Pilot Study

*José Manuel Somoza-Martín, DDS, PhD\**

*Abel García-García, MD, PhD,† Francisco Barros-Angueira, PhD,‡*

*Eva Otero-Rey, DDS,§ María Torres-Español,||*

*Pilar Gándara-Vila, DDS,¶ María Dolores Reboiras-López, DDS,\*\**

*Andrés Blanco-Carrión, MD, DDS, PhD,†† and*

*José Manuel Gándara-Rey, MD, DDS, PhD‡‡*

**Purpose:** To study the gene expression profile of oral squamous cell carcinomas.

**Materials and Methods:** Gene expression profile was investigated in oral squamous cell carcinomas in 5 patients using the Atlas Glass Human 3.8 I Microarray (which detects cDNA obtained from cellular total RNA) (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). Data were normalized by the LOWESS method. Statistical significances of deviations from a 1:1 ratio were evaluated by t tests, with  $P < .05$ .

**Results:** Of the 3,757 genes analyzed, 322 (8.6%) were significantly overexpressed in tumoral tissue with respect to normal tissue, while 104 (2.8%) were significantly underexpressed. The affected genes fell into a wide range of functional categories.

**Conclusion:** We consider that cDNA microarrays are of clear value for investigating the biology of these tumors, and that this technology may help in the molecular classification of oral squamous cell carcinomas and in the identification of targets for gene therapy.

© 2005 American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

*J Oral Maxillofac Surg 63:786-792, 2005*

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an aggressive malignancy. The 5-year survival rate has remained largely unchanged for the past 40 years. Early diagno-

sis based on cytologic changes has been shown to correlate with increased survival. To improve treatment strategies, it is necessary to improve our understanding of the genetic and molecular patterns underlying this disease.

Preliminary molecular level models of the carcinogenesis of OSCC have been proposed by Califano et al<sup>1</sup> in 2000 and Ha et al<sup>2</sup> in 2003. However, the precise molecular pathways leading to these tumors remain unknown. Califano et al<sup>3</sup> in 1996 and Mao<sup>4</sup> in 1997 showed that the appearance of OSCC is associated with chromosome structural alterations. However, only a small group of genes, including *p53*, *p16*, and *APC*, have been consistently implicated in the promotion and progression of oral cancer.

In 2000, Scully et al<sup>5-7</sup> published a very detailed review of the genetic and molecular factors associated with OSCC and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), with consideration of metabolic pathways of carcinogenesis, factors involved in DNA repair, cell cycle alterations and chromosomal anomalies, and clinical applications derived from the identification of these anomalies.

In oncology research, approaches based on DNA microarrays are increasingly used for diverse purposes. This technology was introduced little more than 10 years ago, with the earliest references to its

Received from the Universidad de Santiago de Compostela, Complejo Hospitalario, Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain.

\*Assistant Professor.

†Head of Section, Department of Maxillofacial Surgery; Professor of Maxillofacial Surgery, School of Dentistry.

‡Biologist, Molecular Medicine Unit.

§Postgraduate Student, Oral Surgery Unit, School of Dentistry.

||Biologist, Molecular Medicine Unit.

¶Assistant Professor.

\*\*Assistant Professor.

††Professor of Oral Medicine, School of Dentistry.

‡‡Professor of Oral Medicine, School of Dentistry.

This work was partially financed by the Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento (Xunta de Galicia), project reference PGIDT01PXI20804PR.

Address correspondence and reprint requests to Prof Garcia: Facultad de Odontología, C/ Entrerriños s/n, 15782 - Santiago de Compostela, Spain; e-mail: ciabelgg@usc.es

© 2005 American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

0278-2391/05/6306-0013\$30.00/0

doi:10.1016/j.joms.2005.02.014

use appearing in the 1990s.<sup>8,9</sup> Currently, one of its principal applications is in the identification of clusters of genes associated with the clinical development of different types of cancer.

In 1998, Chang et al<sup>10</sup> reported for the first time the application of microarrays in the identification of genes that undergo transformations during the development of oral cancer. In 2000, a number of articles were published on the use of DNA microarrays in the study of OSCC/HNSCC.<sup>11-14</sup> Leethanakul et al<sup>11</sup> found a 2- to 20-fold reduction in the expression of cytokeratins in HNSCC tumoral tissue with respect to normal tissue, as well as overexpression of 58 genes belonging to diverse functional groups. In 2001, Alevizos et al<sup>15</sup> analyzed tumoral and normal oral tissue in 5 OSCC patients, using an Affymetrix array (Santa Clara, CA) with probes for 7,000 human genes. These authors reported 600 genes to be associated with oral cancer, including oncogenes, tumor suppressor genes, transcription factors, xenobiotic enzymes, metastatic proteins, and other genes not previously associated with oral cancer. In 2002, Al Moustafa et al<sup>16</sup> reported changes in the expression of 213 genes in HNSCC, with 91 genes overexpressed in tumoral tissue and 122 underexpressed. Kuo et al<sup>17</sup> used a microarray with probes for 4,324 human genes, and identified 210 genes associated with OSCC; of these, some (*CKS1*, *TSPY*, *CBK*, *TLE-4*, and *BCHE*) had previously been associated with other types of cancer but not oral cancer. Méndez et al<sup>18</sup> investigated gene expression in 26 OSCCs, 2 premalignant lesions, and 18 samples of normal tissue from the oral cavity; they found 314 genes showing differences in expression between normal and tumoral tissue, 239 being overexpressed and 75 being underexpressed. However, these 314 genes did not show differences in expression among tumors at different developmental stages, or between metastatic and nonmetastatic tumors, except for the ribosomal protein S13. The authors suggested that these results indicate that changes in gene expression occur during the initial stages of tumor development. In 2003, Ibrahim et al<sup>19</sup> studied gene expression in tumoral and normal tissues of 11 black patients from Sudan and 11 white patients from Norway. They found marked differences in gene expression between tumoral and normal tissue in both populations: 181 genes (31% of the total analyzed) in the Sudanese patients, and 195 genes (33% of the total analyzed) in the Norwegian patients. A total of 123 genes showed altered expression in both groups, despite the ethnic and environmental differences between the 2 populations. González et al<sup>20</sup> studied gene expression in HNSCC patients, and emphasized 9 genes showing marked expression differences between

tumoral and normal tissues: *CAGB*, *CD24*, *LEKT1*, *ZNF-185*, *TGM3*, *EHF*, *beadpin*, *ABCG1*, and *periostrin*. Sok et al<sup>22</sup> analyzed gene expression in 9 HNSCC patients, finding expression differences in 227 genes, 46 of which had not been studied previously. Nagata et al<sup>22</sup> studied the expression of 57 genes previously related with cancer in 15 OSCC patients; they found that 7 genes (*MMP-1*, *MMP-3*, *upA*, *integrin-alpha3*, *paxillin*, *tenascin C*, and *IL-6*) were overexpressed in metastatic tumors.

Here we report an exploratory study of differences in gene expression between tumoral and healthy oral tissues in patients with OSCC.

## Materials and Methods

### ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA SELECTION CRITERIA

Five patients with OSCC (4 men, 1 woman; mean age, 67.6 years; range, 53–83 years) were included in the study. OSCC diagnosis was by biopsy and histopathology. The 5 patients were consecutive OSCC diagnoses over the period January 2002–February 2002 at the Maxillofacial Surgery Service of the Santiago de Compostela University Hospital Complex (Spain). All patients were smokers. In all 5 cases the tumor was a primary intraoral tumor: 3 were on the tongue, 1 on the soft palate, and 1 on the retromolar trigone. At the moment of diagnosis, all the tumors were at an advanced stage (3 in stage III, 2 in stage IV). All patients were informed of the nature of the study and gave written consent.

### RNA EXTRACTION

Thirty milligrams of freshly excised oral tissue (tumor and normal mucosa) was frozen and stored in liquid nitrogen until ready for processing. The frozen tissue was ground into a fine powder using a mortar and pestle, under liquid nitrogen, after which 0.6 mL of lysis buffer (RNeasy mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) was added. All steps were performed according to the manufacturer's instructions. The integrity of the RNA was verified following electrophoresis on 1% agarose gels. All equipment (eg, homogenizers, mortar, pestle) was pretreated with RNase and rinsed with diethyl pyrocarbonate-treated water before use.

### PREPARATION OF FLUORESCENT cDNA PROBES

Double-stranded cDNA was synthesized from total RNA using the SuperScript double-stranded cDNA synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Antisense RNA (aRNA) was then obtained from the double-stranded cDNA using the T7 MEGAscript kit (Ambion, Austin, TX); aliquots of each reaction mixture were electrophoresed on a 1% agarose gel

to determine aRNA yield; aRNA was purified using the RNeasy Mini protocol. Finally, fluorescent cDNA probes were obtained by reverse transcription from the aRNA using the CyScribe first-strand cDNA labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), with cyanine 5-dCTP (Cy5) for tumor aRNA, or cyanine 3-dCTP (Cy3) for normal aRNA.

#### cDNA HYBRIDIZATION

Atlas Glass Human 3.8 I Microarrays containing long cDNA oligos of 3,500 human genes were purchased from Clontech. Slides were hybridized with 80  $\mu$ L of the Cy5- and Cy3-labelled cDNA probes in 2 mL of GlassHyb hybridization solution (Clontech) at 50°C in an Atlas Glass Hybridization Chamber. After 16 hours of hybridization, washing steps were performed in accordance with the manufacturer's instructions. Following the final wash with distilled water, the slides were dried by centrifugation at 1,500  $\times$  g for 5 minutes.

#### SCANNING AND IMAGE ANALYSIS

Hybridization signals were read using an Afymetrix 418 dual-laser fluorescent scanner (GMS 418). Scanned image files were visually inspected for false-positive signals because of apparent artifacts, then analyzed with Imagen 4.1 (Biodiscovery, El Segundo, CA). The intensity of each spot on the array was calculated after subtraction of background. For each data point (ie, spot on the array), the hybridization signals from the image analysis yielded values for Cy5 (tumoral tissue) and Cy3 (normal tissue). Data normalization and statistical analysis were performed using the SOLAR system (ALMA Bioinformatics SL, Madrid, Spain). Signal intensities for the Cy3 and Cy5 channels were normalized by the LOWESS method, and ratios of the data to the control channels were then calculated. Finally, the base-2 logarithm of each Cy3/Cy5 ratio was calculated. Statistical significances of deviations from a 1:1 ratio were evaluated by *t* tests, with *P* less than .05.

### Results

Of the 3,757 genes analyzed, 426 (11.3%) showed statistically significant differences in expression between tumoral and normal tissue. Of these 426 genes, 322 (75.6%) were overexpressed in tumoral tissue, and 104 (24.4%) were underexpressed. Those genes for which the difference in expression was more than 3-fold are listed in Tables 1 and 2. The results are also summarized in graphical form in Figure 1. Each point, corresponding to a gene in the array, represents the base-2 logarithm of the

LOWESS-normalized Cy3: Cy5 ratio for that gene. Vertical bars show standard deviations (*n* = 5 patients). Red points are those for which a statistically significant difference was observed between tumoral and normal tissue (426 test genes, 86 control genes).

Of the 322 significantly overexpressed genes, 68 (21.1%) were code metabolism proteins; 36 (11.2%) were intracellular transducers, effectors, or modulators; 33 (10.2%) were transcription factors; and 33 (10.2%) were cell receptors.

Of the 104 significantly underexpressed genes, 19 (18.3%) were code transcription factors; 17 (16.3%) were intracellular transducers, effectors, or modulators; 12 (11.5%) were metabolism proteins; and 11 (10.6%) were trafficking/targeting proteins.

Numbers and percentages of overexpressed and underexpressed genes in each functional category are listed in Table 3.

### Discussion

Microarrays have become a key tool for the study of differential gene expression in cancer. This technology allows identification of genes that show altered expression in tumoral tissue that may be used in the future as specific markers for each tumor type and that are also candidates for use as therapeutic targets or for vaccine development. To date, over 2,000 genes with known or unknown function have been reported to be associated with OSCC.<sup>19</sup> In the present study, we used the Atlas Glass Human 3.8 I Microarray to study differences in the expression of 3,757 genes between tumoral and normal tissues from patients with OSCC. Schena et al<sup>23</sup> has pointed out the great precision of glass-based microarray studies of gene expression, even by comparison with Northern blotting and other approaches involving assessment of RNA levels.<sup>23,24</sup>

Of the 3,757 genes studied, 426 (11.3%) showed a significant difference in expression between tumoral and normal tissue, suggesting that a relatively small number of genes are involved in the promotion and progression of squamous cell carcinomas of the oral cavity. In related studies (bearing in mind some differences in type of microarray and method), the number of genes found to be associated with OSCC was 600 (Alevizos et al<sup>15</sup>), 213 (Al Moustafa et al<sup>16</sup>), 314 (Méndez et al<sup>18</sup>), 508 (Hasina et al<sup>25</sup>), and 227 (Sok et al<sup>21</sup>). Méndez et al<sup>18</sup> showed that most genetic alterations in OSCC appear during the initial stages of the tumor, with no major changes during tumor progression. In our patients, we likewise did not observe any significant differences between the 3 stage III tumors and the 2 stage IV tumors. With regard to the total

**Table 1. GENES UPREGULATED IN THE OSCCS. FOLDCHANGE >3**

Gene Code	Genbank	Gene/Protein Name	Fold Change
A1c6	NM_001610	Acid phosphatase 2, lysosomal	4.81
A1c8	NM_001099	Acid phosphatase, prostate	3.45
A1d6	NM_001103	Actinin, alpha 2	3.10
A1e8	NM_001110	A disintegrin and metalloproteinase domain 10	4.88
A1e9	NM_001109	A disintegrin and metalloproteinase domain 8	6.80
A1g8	NM_001125	ADP-ribosylarginine hydrolase	3.02
A1h3	NM_000682	Adrenergic, alpha-2B-, receptor	3.04
A1h5	NM_000684	Adrenergic, beta-1-, receptor	3.23
A1h7	NM_005160	Adrenergic, beta, receptor kinase 2	7.59
A1h9	NM_001126	Adenylosuccinate synthase	6.37
A1i2	NM_001128	Adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	3.73
A1i7	NM_000027	Aspartylglucosaminidase	3.67
A2f4	NM_004305	Bridging integrator 1	3.16
A2f7	NM_001145	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	6.97
A2g3	NM_001149	Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	3.10
A2g5	NM_001152	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 5	6.97
A2h8	NM_001159	Aldehyde oxidase 1	3.07
A2h9	NM_005503	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 (X11-like)	3.27
A2i2	NM_001639	Amyloid P component, serum	3.16
A3i3	NM_005100	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	4.79
A4f9	NM_001177	ADP-ribosylation factor-like 1	3.03
B1f3	NM_001690	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), alpha polypeptide, 70kD, isoform 1	3.58
B1f8	NM_001695	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) 42kD	3.71
B1g1	NM_004047	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) 21kD	3.20
B1g4	NM_005177	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) non-catalytic accessory protein 1A	3.05
B1h4	NM_000490	Arginine vasopressin (neurophysin II, antidiuretic hormone, diabetes insipidus, neurohypophyseal)	3.49
B1h8	NM_004655	Axin 2 (conductin, axil)	4.86
B1i2	NM_003783	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2	3.68
B2g6	NM_000057	Bloom syndrome	3.29
B3e9	NM_000128	Coagulation factor XI (plasma thromboplastin antecedent)	3.41
C1d8	NM_000798	Dopamine receptor D5	3.01
C1i1	NM_000851	Glutathione S-transferase M5	5.60
C2h5	NM_001303	COX10 (yeast) homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (heme A: farnesyltransferase)	3.90
C4h6	NM_005327	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	4.27
D3h5	NM_004941	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 8 (RNA helicase)	3.47
E2h6	NM_001757	Carbonyl reductase 1	3.18
E4f9	NM_006495	Ecotropic viral integration site 2B	3.49
F1h6	NM_000213	Integrin, beta 4	3.22
F2f2	NM_000628	Interleukin 10 receptor, beta	3.16
F2f5	NM_000860	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	3.13
F2g2	NM_000871	5-Hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6	3.05
F2i4	NM_001543	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	3.43
F3i4	NM_002238	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 1	3.22
F4f5	NM_002318	Lysyl oxidase-like 2	3.47
G4h3	NM_005551	Kallikrein 2, prostatic	3.27
G4h6	NM_005963	Myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult	5.52
H1i4	NM_000938	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B (140kD)	6.05
H2f8	NM_002557	Oviductal glycoprotein 1, 120kD (mucin 9, oviductin)	3.88
I2g4	NM_006031	Pericentrin	3.13
I2h2	NM_006163	Nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kD	4.42
I2i5	NM_006190	Origin recognition complex, subunit 2 (yeast homolog)-like	3.40
I4g9	NM_001010	Ribosomal protein S6	3.12
I4h1	NM_001011	Ribosomal protein S7	5.04
I4h8	NM_001019	Ribosomal protein S15a	4.51
J2h9	NM_003115	UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1	4.17

Somoza-Martín et al. Gene Expression Profile in OSCC. J Oral Maxillofac Surg 2005.

**Table 1. GENES UPREGULATED IN THE OSCCS. FOLDCHANGE >3 (Cont'd)**

Gene Code	Genbank	Gene/Protein Name	Fold Change
J4h2	NM_004604	Syntaxin 4A (placental)	4.05
K1h8	NM_005990	Serine/threonine kinase 10	3.05
L2i7	NM_003678	Gene from NF2/meningioma region of 22q12	4.17
L4h6	NM_004645	Coilin	4.17

Somoza-Martín et al. Gene Expression Profile in OSCC. J Oral Maxillofac Surg 2005.

number of genes that were significantly overexpressed or underexpressed, our results coincide very closely with those of Méndez et al<sup>18</sup>, and the observed ratio of overexpressed to underexpressed genes (approximately 3:1) was likewise very similar; we found 322 overexpressed genes versus 104 underexpressed genes (3.1:1), while Mendez et al found 239 overexpressed genes and 75 underexpressed genes (3.2:1). Like Villaret et al<sup>12</sup>, we observed slight overexpression of the *plakophilin 1* gene. In contrast, we observed underexpression of

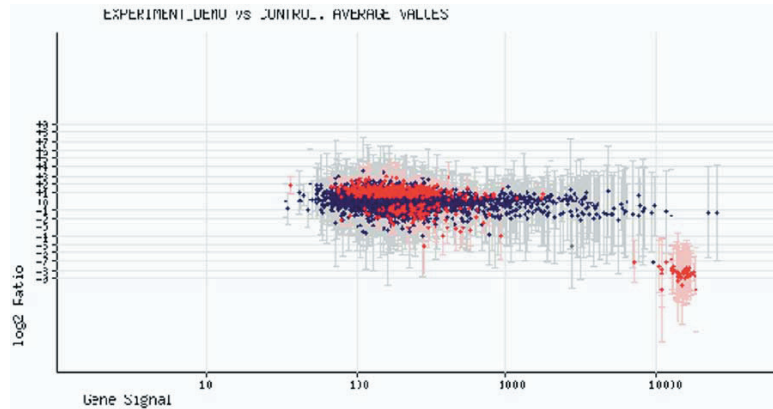
the *keratin 6* and *keratin 16* genes. Leethanakul et al<sup>11</sup> reported that most cytokeratins (namely 2E, 2P, 6 A-F, 7, 13, 14, 15, 17, 18, and 19) showed reduced expression. In the present study, underexpression in tumoral tissues was observed for 10 (83.3%) of the 12 cytokeratins included in the microarray used, although in no case was the reduction in expression statistically significant. The only cytokeratin gene for which we obtained a result different from those of Leethanakul et al was *keratin 7*, which was underexpressed in their study but

**Table 2. GENES DOWNREGULATED IN THE OSCCS. FOLDCHANGE >3**

Gene Code	Genbank	Gene/Protein Name	Fold Change
A3a2	NM_000384	Apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	-6.22
B3a2	NM_000063	Complement component 2	-3.48
B4i3	NM_000726	Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	-5.37
C4i2	NM_002097	General transcription factor IIIA	-8.36
D1b8	NM_001510	Glutamate receptor, ionotropic, delta 2	-3.36
D4b2	NM_001970	Eukaryotic translation initiation factor 5A	-3.09
D4c2	NM_001855	Collagen, type XV, alpha 1	-4.01
E1a2	NM_001973	ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)	-4.38
E1a9	NM_002078	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	-3.76
E2a2	NM_004467	Fibrinogen-like 1	-4.87
E3g5	NM_002003	Ficolin (collagen/fibrinogen domain-containing) 1	-4.21
E4i2	NM_000770	Cytochrome P450, subfamily IIC (mephenytoin 4-hydroxylase), polypeptide 8	-8.30
E4i3	NM_000776	Cytochrome P450, subfamily IIIA (nifedipine oxidase), polypeptide 3	-5.51
F3a2	NM_001550	Interferon-related developmental regulator 1	-8.62
G1a2	NM_002386	Melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor)	-5.58
G2a2	NM_004515	Interleukin enhancer binding factor 2, 45kD	-3.40
G2a4	NM_004520	Kinesin heavy chain member 2	-3.86
G2a6	NM_004522	Kinesin family member 5C	-4.16
G3a5	NM_005546	IL2-inducible T-cell kinase	-4.82
H3a3	NM_002597	Phosducin	-3.32
I1a8	NM_002897	RNA binding motif, single-stranded interacting protein 1	-3.03
I1c6	NM_004159	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional protease 7)	-4.33
I4i2	NM_001021	Ribosomal protein S17	-3.14
J4i2	NM_004616	Transmembrane 4 superfamily member 3	-9.99
L1a2	NM_003419	Zinc finger protein 10 (KOX 1)	-9.00
L1b3	NM_003433	Zinc finger protein 132 (clone pHZ-12)	-3.59
L1b5	NM_003435	Zinc finger protein 134 (clone pHZ-15)	-4.14
L2a2	NM_003566	Early endosome antigen 1, 162kD	-37.17
L3a2	NM_003680	Tyrosyl-tRNA synthetase	-4.67
L4i2	NM_004651	Ubiquitin specific protease 11	-3.67

Somoza-Martín et al. Gene Expression Profile in OSCC. J Oral Maxillofac Surg 2005.

**FIGURE 1.** Plot of  $\log_2$  Cy3/Cy5 ratio (following LOWESS normalization) against signal intensity for each spot in the microarray; red spots (426 test genes, 86 control genes) represent genes whose expression differed significantly (t tests;  $P < .05$ ) between tumoral and normal tissue. Vertical bars represent interpatient standard deviations.



Somoza-Martín et al. Gene Expression Profile in OSCC. *J Oral Maxillofac Surg* 2005.

slightly overexpressed (1.4-fold increase) in the present study. Thus, the cytokeratins show a clear tendency for alteration of normal expression, indicating dedifferentiation of the tumoral tissue during progression of the cancer.

It should be stressed that the present study has considered only 5 patients, and thus we can have only limited statistical confidence in our conclusions. Nevertheless, in our opinion, exploratory studies of the type presented here will constitute a key basis for the development of medical practice over the coming

decades. The identification of the genes responsible for different disorders, notably cancers, will bring about radical changes in both diagnosis and treatment. The availability of microarray technologies (whether of DNA, mRNA, peptides and proteins, other small molecules, or cells or tissues), together with developments in other technological areas including computing, allows us to hope that our understanding of the functions of genes and proteins will increase dramatically over coming decades; that this increased understanding will enable us to disentangle

**Table 3. NUMBER AND PERCENTAGES OF GENES IN EACH FUNCTIONAL CATEGORY SHOWING SIGNIFICANT DIFFERENCES IN EXPRESSION (t TESTS,  $P < .05$ ) BETWEEN NORMAL AND TUMORAL TISSUE**

Function	n Total	% Total	n° Up-regulated	% Up-regulated	n° Down-regulated	% Down-regulated
Cell surface antigens	8	1.87	5	1.55	3	2.88
Transcription factors	52	12.20	33	10.24	19	18.26
Cell cycle proteins	3	0.70	3	0.93	0	0
Cell adhesion receptors/proteins	22	5.16	19	5.90	3	2.88
Immune system proteins	8	1.87	5	1.55	3	2.88
Extracellular transport/carrier proteins	17	3.99	11	3.41	6	5.76
Oncogenes and tumor suppressors	11	2.58	8	2.48	3	2.88
Stress response proteins	14	3.28	10	3.10	4	3.84
Membrane channels and transporters	27	6.33	19	5.90	8	7.69
Extracellular matrix proteins	8	1.87	5	1.55	3	2.88
Trafficking/targeting proteins	39	9.15	28	8.69	11	10.57
Metabolism proteins	80	18.77	68	21.11	12	11.53
Post-translational modification/protein folding	18	4.22	13	4.03	5	4.80
Translation	26	6.10	17	5.27	9	8.65
Apoptosis-associated proteins	6	1.40	4	1.24	2	1.92
RNA processing, turnover, and transport	11	2.58	11	3.41	0	0
DNA binding and chromatin proteins	5	1.17	4	1.24	1	0.96
Cell receptors	38	8.92	33	10.24	3	2.88
Cell signaling, extracellular communication proteins	19	4.46	14	4.34	5	4.80
Intracellular transducers/effectors/modulators	53	12.44	36	11.18	17	16.34
Protein turnover	22	5.16	15	4.65	7	6.73
Cytoskeleton/motility proteins	25	5.86	22	6.83	3	2.88
DNA synthesis, recombination, and repair	11	2.58	5	1.55	6	5.76
Functionally unclassified	17	3.99	14	4.34	3	2.88

Somoza-Martín et al. Gene Expression Profile in OSCC. *J Oral Maxillofac Surg* 2005.

the etiologic mechanisms of many diseases, and thus to design appropriate strategies for cure and possibly prevention.

## References

1. Califano A, Stolovitzky G, Tu Y: Analysis of gene expression microarrays for phenotype classification. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 8:75, 2000
2. Ha PK, Benoit NE, Yochem R, et al: A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 9:3058, 2003
3. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al: Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. *Cancer Res* 56:2488, 1996
4. Mao L: Leukoplakia: Molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. *Mol Med* 3:442, 1997
5. Scully C, Field JK, Tanzawa H: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 36:256, 2000
6. Scully C, Field JK, Tanzawa H: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma. 2: Chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 36:311, 2000
7. Scully C, Field JK, Tanzawa H: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma. 3: Clinico-pathological applications. *Oral Oncol* 36:404, 2000
8. Barinaga M: Will "DNA chip" speed genome initiative? *Science* 253:1489, 1991
9. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, et al: Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5022, 1994
10. Chang DD, Park NH, Denny CT, et al: Characterization of transformation related genes in oral cancer cells. *Oncogene* 16:1921, 1998
11. Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, et al: Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene* 19:3220, 2000
12. Villaret DB, Wang T, Dillon D, et al: Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* 100:374, 2000
13. Shillitoe EJ, May M, Patel V, et al: Genome-wide analysis of oral cancer—Early results from the Cancer Genome Anatomy Project. *Oral Oncol* 36:8, 2000
14. Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, et al: Gene expression profiles in squamous cell carcinomas of the oral cavity: Use of laser capture microdissection for the construction and analysis of stage-specific cDNA libraries. *Oral Oncol* 36:474, 2000
15. Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, et al: Oral cancer in vivo expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 20:6196, 2001
16. Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, et al: Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 21:2634, 2002
17. Kuo WP, Hasina R, Lingen MW: Classification of oral squamous cell carcinomas based on gene expression patterns. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 93:415, 2002 (abstr)
18. Mendez E, Cheng C, Farwell DG, et al: Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 95:1482, 2002
19. Ibrahim SO, Aarsaether N, Holsve MK, et al: Gene expression profile in oral squamous cell carcinomas and matching normal oral mucosal tissues from black Africans and white Caucasians: The case of the Sudan vs. Norway. *Oral Oncol* 39:37, 2003
20. Gonzalez HE, Gujrati M, Frederick M, et al: Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129:754, 2003
21. Sok JC, Kuriakose MA, Mahajan VB, et al: Tissue-specific gene expression of head and neck squamous cell carcinoma in vivo by complementary DNA microarray analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129:760, 2003
22. Nagata M, Fujita H, Ida H, et al: Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 106:683, 2003
23. Schena M, Shalon D, Davis RW, et al: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467, 1995
24. Xie L, Xu L, He Z, et al: Identification of differentially expressed genes in nasopharyngeal carcinoma by means of the Atlas human cancer cDNA expression array. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:400, 2000
25. Hasina R, Hulett K, Bicciato S, et al: Plasminogen activator inhibitor-2: A molecular biomarker for head and neck cancer progression. *Cancer Res* 63:555, 2003



## Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer

M Pérez-Sayáns, JM Somoza-Martín, F Barros-Angueira, MD Reboiras-López, P Gándara-Vila, JM Gándara Rey, A García-García

*School of Dentistry, Entrerriós s/n, Santiago of Compostela C.P. 15782, Spain*

Accepted June 22, 2009

### Abstract

Exfoliative cytology is a minimally invasive technique for obtaining oral cell specimens from patients for diagnostic purposes. Classical applications of oral cytology studies, such as oral candidiasis, have been extended to include oral precancerous and cancerous lesions. A number of analytical methods are available for studying cytology specimens. The development of molecular analysis techniques, the oral cancer etiopathogenic process, and improvements in liquid-based exfoliative cytology are leading to renewed interest in exfoliative cytology. Results sometimes are disputed, so the aim of our review was to clarify the applicability of exfoliative cytology to the diagnosis of oral precancerous and cancerous lesions.

**Key words:** *liquid-based cytology, molecular analysis, oral cancer, oral cytology, quantitative cytomorphology*

Classical diagnostic methods for precancerous and cancerous oral lesions include clinical examinations and histopathological studies of biopsied material (Acha et al. 2005, Hullmann et al. 2007). Obtaining a sample by biopsy is invasive and involves both technical difficulties and psychological implications for the patient. When the lesions are extensive, the most representative areas must be selected to avoid diagnostic errors. Biopsy has poor sensitivity owing to the subjectivity of the pathologist (Epstein et al. 2002).

It is important to simplify diagnostic techniques to enhance their reliability and to reduce their invasiveness to improve diagnosis and follow-up for patients with precancerous and cancerous oral lesions. In recent times we have witnessed a growing interest in different kinds of oral cytology methods (Acha et al. 2005).

### Concept

Exfoliative oral cytology is the study and interpretation of the characteristics of cells that flake off, whether naturally or artificially, from the oral mucosa. After the cells have been collected, fixed and stained, the morphology of surface epithelial cells is observed under a microscope (Langlois et al. 1993). The technique is simple, non-aggressive, relatively painless and tolerated well by patients (Driemel et al. 2007). It can be used for diagnosis of predictive methodology and identification of recurrent oral squamous cell carcinoma (SCC) (Moralis et al. 2007).

Papanicolaou and Traut (1941) first demonstrated the validity of cytology for diagnosing neoplasms of the uterine cervix. Oral cytology soon came to be used for diagnosis of diseases of the oral cavity, although with little success (Sandler 1963). The presence of histological changes in the oral mucosa (lining, and special masticatory mucosa) sometimes creates difficulties for diagnostic pathologists who do not specialize in oral tissues.

Cells are obtained from the oral cavity using physical procedures such as surface scraping or brushing, rinses, or saliva specimens. The gold standard is exfoliation by mechanical separation of epithelium using different instruments to which

Correspondence: Mario Pérez-Sayáns, DDS, Facultad de Odontología, Entrerriós s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782, Spain. Tel: 0034626233504. Fax: 0034986295424. e-mail: perezsayans@gmail.com  
© 2009 Biological Stain Commission  
*Biotechnic & Histochemistry* 2009, 1–11, iFirst article.

the term, exfoliative cytology, alludes (Chandler 1966). To obtain oral cells with brushes, we can whisk with a moderately stiff brush (may not reach the basal cells) and the "cytobrush," which gently excavates down to some of the basal cells. The presence of basal cells is important to RNA collection and analysis, and for diagnostic accuracy.

A number of studies have been undertaken to evaluate the use of different instruments for obtaining cytology specimens (Ogden et al. 1992, Jones et al. 1994, Navone et al. 2008). The basic requirements for a useful technique are that it is easy to use, minimizes patient discomfort and collects sufficient cells (Jones et al. 1994). Most of these studies concluded that the brush is suitable for obtaining a sufficient number of good quality cells (Driemel et al. 2007). It appears that sampling with dermatological curettes, however, yields better quality and larger amounts of cellular and molecular material for cytopathological study (Fig. 1) (Navone et al. 2008).

Despite improvements in sampling, exfoliative cytology has a high false negative rate because of nonrepresentative sampling and individual subjectivity (Nichols et al. 1991). Liquid-based cytology is an improvement toward resolving this problem and is discussed further below (Hayama et al. 2005, Navone et al. 2007). In brush biopsies, samples are collected using special brushes that penetrate the lesions to ensure that representative material is obtained. The aim is to collect both surface and basal cells, which make the sample more representative (Jones et al. 1994). Evaluation is either visual or computer-assisted (Sciubba 1999). This technique, however, should complement the biopsy, not replace it. Acha et al. (2005), for



**Fig. 1.** Curette sampling is carried out on the entire surface area of the lesion including those with a low suspicion index. From Navone et al. (2008).

example, believe that the term, brush biopsy, should be replaced by the term, oral brush cytology.

Classical applications of oral cytology studies, such as oral candidiasis, have been extended to include epithelial infection in oral hairy leukoplakia lesions associated with the Epstein-Barr virus (Walling et al. 2003). The percentage of apoptotic cells also has been measured in cytological studies of the saliva of patients treated for oral SCC (Cheng et al. 2004) and could be useful for monitoring reactions to chemotherapy. Remmerbach et al. (2003b) defended both the usefulness of cytology for diagnosing suspect lesions and the routine application of the AgNOR (nucleolar organizer regions) analysis to determine the nucleolar activity of oral cancer.

### Liquid-based cytology

Exfoliative cytology in the form of the cytological smear originally was used for early detection of cancerous cervical cells. Smears also have been used to diagnose certain kinds of oral lesions, mostly in diseases caused by a virus or fungus. Developments in cytology have led to the use of liquid-based preparations, which has stimulated new interest in this method for assisting in the diagnosis of oral mucosa lesions (Sugerman and Savage 1996). In liquid-based cytology, the specimen and the collection device are placed in a receptacle containing a preservative fluid, which generates a suspension of cells that subsequently are deposited as a thin layer on a slide. The technique produces preparations consisting of abundant cells dispersed in a thin, homogenous layer. Blood, pus and mucus are reduced and distributed throughout the preparation. The clear background that results enhances sample sensitivity and quality (Linder and Zahniser 1997, Nasuti et al. 2001).

Compared to conventional smears, liquid-based cell preparations reduce the number of unsatisfactory or "satisfactory-but-limited-by" preparations and this reduces the number of false negative results (Bishop et al. 1998).

### Cytological analysis

Cytology specimens can be studied using quantitative cytomorphology, nuclear DNA content analysis, immunohistochemical tumor marker identification or molecular analysis.

### Quantitative cytormorphology

Several authors have suggested that quantitative techniques that are objective, accurate, reproducible and based on evaluation of parameters such as variations in the size of the nucleus and cytoplasm, and alterations in the nucleus:cytoplasm ratio may enhance the diagnostic sensitivity of exfoliative cytology for early diagnosis of oral cancer (Fig. 2) (Ogden et al. 1997).

Cowpe et al. (1985) demonstrated that exfoliative cytology can detect malignant changes by determining the area of the nucleus and cytoplasm in Papanicolaou stained smears. Their study was based on calculating the areas of the nucleus and the cytoplasm using the planimeter method, and the nucleus:cytoplasm ratio for cells taken from the oral cavity. They concluded that 50 cells were sufficient to provide a coherent evaluation of various locations in the oral cavity. They found that a reduction in the cytoplasmic area preceded an increase in the area of the nucleus in tissues developing malignancy. In another study, these investigators suggested that in the absence of normal cytology values, the healthy mucosa of the same patient could serve as a satisfactory control (Cowpe et al. 1988). More recent studies have been based on this technique to evaluate the influence of several systemic and external factors on the parameters to be measured. The planimeter has been replaced by semi-automated image-based analytical methods that are faster, more accurate and ensure better reproducibility (Cowpe et al. 1985, 1993).

Ramaesh et al. (1998) used cytometric techniques to determine the diameters of the nuclei and



**Fig. 2.** Quantitative cytormorphology. Nuclear and cytoplasmic measurements of Papanicolaou stained oral epithelial cells. From Freitas et al. (2004).

cytoplasm of cells from normal oral mucosa, dysplastic lesions and oral SCC. They found that the cytoplasm diameter was reduced progressively from normal mucosa cells to lesions with greater dysplasia and was smallest in oral SCC lesions. The opposite was true for nuclear diameters; they increased progressively from normal mucosa cells to lesions with greater dysplasia and were the greatest in oral SCC lesions.

### Nuclear DNA content analysis

Static quantitative cytormorphology allows DNA content to be quantified for cells obtained by exfoliative cytology. Nonetheless, routine hematoxylin and eosin staining is inappropriate for analysis of DNA content, so special stains are needed to ensure that the quantity of DNA is proportional to the quantity of the stain. The Feulgen reaction meets this criterion, because it is a stoichiometric staining procedure in theory, each molecule stained with Schiff reagent corresponds to a constant and equivalent portion of the DNA molecule. This could make it possible to determine the quantity of DNA contained in the different cells in the sample. The great advantage of the procedure is that the information can be objectified by using spectrophotometric or digital analysis of images obtained using DNA densitometry (García del Moral et al. 1993).

Cowpe et al. (1985) demonstrated that clinically normal mucosa in healthy patients has a diploid DNA profile, whereas an abnormal profile is associated with malignancy. Nonetheless, while most oral malignant lesions have abnormal DNA profiles, some, in fact, are diploid.

The combination of DNA content quantification with nuclear and cytoplasm morphometry seems to be the best approach to distinguishing pre-malignant from malignant lesions.

### Immunohistochemical tumor marker identification

Determining tumor marker expression in cells exfoliated from the oral cavity has raised considerable interest and the expression of cytokeratins has received special attention. The cytokeratin expression pattern provides useful information about the state of cell differentiation (Lane and Alexander 1990), but its diagnostic potential for early detection of oral cancer is limited, because there is no keratin marker in the malignant lesions that is not present also in normal oral mucosa (Ogden et al. 1993). Identification of some

cytokeratins, however, such as keratins 8 and 19 (Ogden et al. 1993), may represent an important indicator of a malignant lesion, particularly if associated with other markers (Ogden et al. 1994). According to Bongers et al. (1996), identifying cytokeratins 16 and 19 allows early changes in the cancer development process to be detected, so these cytokeratins could be used for screening or monitoring possible secondary tumors.

Kujan et al. (2006) demonstrated the usefulness of liquid-based cytology specimens for determining immunocytochemically the fragile histidine triad as a molecular marker for oral cancer.

Mutation of the tumor suppressor gene p53 is one of the most frequent genomic changes in human cancers. According to most studies, p53 is not detected in normal oral mucosa, but it can be demonstrated immunohistochemically in oral SCC and in potentially malignant lesions of the oral mucosa. It also has been identified in malignant tumor cells obtained using exfoliative cytology, but not in normal mucosa (Freitas et al. 2004). Mutation of p53 occurs in only 50% of oral SCC cases. Furthermore, p53 expression in oral tumors is detected only at advanced stages of carcinogenesis. Exfoliative cytology aimed at p53 detection cannot determine tumors at an early stage, because this technique is inappropriate for obtaining basal cell samples from intact epithelium (Ogden et al. 1992, 1996).

Recently, Szelachowska et al. (2008) found that an increase in metallothioneins detected by immunohistochemistry is associated with poor tumor prognosis; however, these investigators did not find a relationship with proliferative activity.

It appears that the histo-blood group antigen H (ABH) type 2 chain, even more than the cytokeratins, is an excellent marker for monitoring premalignant lesions or for following up malignant lesions (Bongers et al. 1996). The main difficulty is that there is no single marker present in all the malignant lesions that is not present also in benign lesions and normal oral mucosa (Ogden et al. 1997).

### **Molecular analysis**

Recent interest in studying cytology applied to oral cancers has arisen because of the application of innovative molecular techniques. Genetic analysis of molecular markers permits alterations to be detected prior to clinical manifestations and changes in cell morphology (Epstein et al. 2002). According to Driemel et al. (2008), the use of exfoliative cytology and classical morphological analysis using

hematoxylin and eosin is insufficiently sensitive. When combined with molecular techniques, however, the results are more predictive and can be used not only for diagnosis but also to monitor patients (Mehrotra et al. 2006). Classical cytological analysis requires substantial experience to determine pathologies, whereas molecular analysis is more objective in terms of identifying specific genetic anomalies in both the oral cavity (Spafford et al. 2001) and the cervix (Steinau et al. 2005).

The possibility of extracting RNA from exfoliated cells was demonstrated recently and created interest in the approach for early diagnosis of oral premalignant and cancerous lesions. Establishing the validity of these measurements for quantifying gene expression remains a major objective (Schwartz et al. 2008). Analysis of RNA in saliva has the advantage that the sample is obtained easily. It has the disadvantage, however, that it does not provide direct measurement of tissue gene expression (Ballantyne 2007), because it measures stable RNA extracellularly and identifies markers derived from the disease itself, but not the etiology of the disease (Brinkman and Wong 2006). Analysis of RNA obtained by exfoliative cytology has the advantage of enabling live cells to be isolated from sites at risk of disease. Early changes in the progression of the disease that affect gene expression can be detected with a minimally invasive technique. There are two potential problems, however: the contribution to the RNA sample of dead or nearly dead cells and differences in sampling that accentuate differences in the type and number of isolated cells (Schwartz et al. 2008). Pilot studies have demonstrated that RNA isolation based on exfoliative cytology is possible and that messenger RNA can be detected using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) microarray analysis (Steinau et al. 2005, Spivack et al. 2004, Smith et al. 2006).

Although isolation of DNA from epithelial cells has been demonstrated in several studies, isolation of RNA has not been validated to the same degree because of the ribonucleases in saliva that rapidly degrade cellular RNA during collection. Spira et al. (2004) were the first to analyze RNA obtained from the oral mucosa using PCR and mass spectrometry.

In their analyses of gene expression in cytology specimens, Spivack et al. (2004) also proposed using RNA obtained by exfoliative cytology to determine susceptibility to cancer among healthy populations, detect early markers of carcinogenesis and evaluate the efficacy or toxicity of chemopreventative and chemotherapeutic agents.

### Cytological molecular markers

Cancer is considered a process resulting from the accumulation of many alterations, typically acquired (somatic), but occasionally inherited. The activation of proto-oncogenes, the inactivation of tumor suppressor genes and the involvement of DNA repair enzymes cause the neoplastic transformation (Acha et al. 2005).

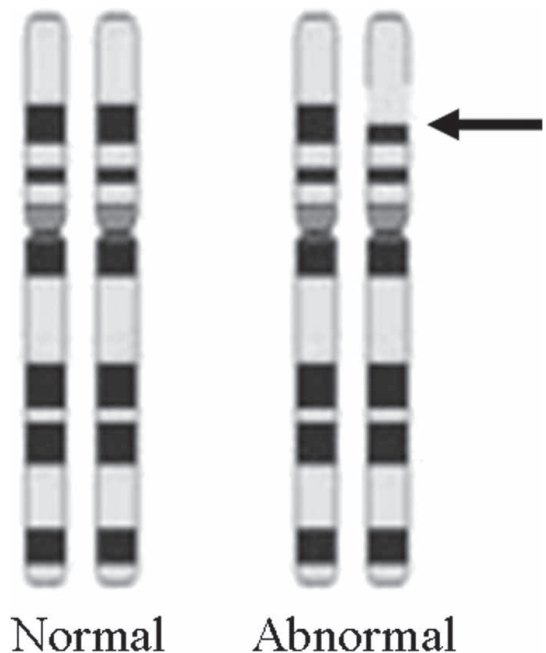
The most important oral carcinogens include chemical (tobacco), physical (radiation) and infectious agents (papillomavirus, *Candida*), which, as mutagens, can cause changes in the genetic and chromosomal structure in the form of point mutations, deletions, insertions or rearrangements (Boyd and Reade 1988). These alterations can be used as diagnostic and therapeutic targets (Spafford et al. 2001, Ogden et al. 1991, Boyle et al. 1994).

As mentioned above, mutations of the p53 tumor suppressor gene are the most frequently occurring genetic alterations in human cancers and also are variables in oral cancer. Given the large number of such mutations that might occur, the detection of point mutations in p53 as a specific marker for oral SCC does not appear to be very useful (Boyle et al. 1994, Scheifele et al. 2002).

Epigenetic alterations (promotor hypermethylation), genomic instability and loss of heterozygosity (LOH) (Fig. 3), microsatellite instability (MSI) (El-Naggar et al. 2001, Rosas et al. 2001) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Huang et al. 1999) are other molecular markers that are used.

The main epigenetic alteration in tumors is methylation Rosas et al. (2001). Often associated with loss of genetic expression, it contributes to tumor progression by inactivating DNA repair genes. Hypermethylation of the normally unmethylated CpG islands located in gene promoter regions can be determined by using exfoliative cytology (Baylin et al. 1998). Rosas et al. (2001) studied methylation patterns for the p16, MGMT and DAP-K genes in carcinomas and saliva samples and detected aberrant hypermethylation patterns in both kinds of specimens using methylation-specific PCR. They concluded that the technique was highly sensitive for detecting tumor DNA and for evaluating recurrences. Martone et al. (2007) confirmed these results by determining hypermethylated patterns in surgical margins with no histological evidence of malignancy.

Califano et al. (1996) studied microsatellite markers and demonstrated that alterations of



**Fig. 3.** Loss of heterozygosity showing loss of chromosomal region containing tumor suppressor genes (arrow). Adapted from Epstein et al. (2002).

specific regions of chromosomes 3p, 9p, 17p and 18q are associated with head and neck SCC. Alterations in the microsatellite regions are used as clonal markers and for detecting tumor cells (Sidransky 1995). Analysis of these regions can reveal LOH and MSI (Spafford et al. 2001, Okami et al. 2002). Huang et al. (1999) used PCR to amplify DNA for cells obtained by exfoliative cytology for analysis of RFLP in oral carcinomas. PCR and RFLP analysis also were used to evaluate microsatellite markers, which are small repeated sequences of DNA. The genetic mutations, LOH and MSI, are characteristic of head and neck SCC and can be used as molecular markers of malignancy. Nunes et al. (2000), in a microsatellite analysis of cells collected from the oral cavity using exfoliative cytology and mouth rinsing, identified LOH in 84% of the cases studied, although identification of the alterations was independent of tumor stage. They suggested that the technique could be useful for early diagnosis and for following patients with oral cancer.

More recently, Driemel et al. (2007) studied extracellular matrix molecule expression in cytology specimens and observed messenger RNA expression for laminin-5 and tenascin-C in oral SCC. The usefulness of this technique for early

detection of oral SCC is disputed, however (Fist 2003) (Fig. 4). Some studies suggest that the false positives demonstrate high sensitivity (90%), but low specificity (3%) (Rick 2003).

Remmerbach et al. (2001) analyzed DNA-image cytometry to determine the reliability of cytology for early diagnosis of oral cancer, and obtained sensitivity and specificity values of 94.6% and 99.5%, respectively. Sensitivity and specificity for DNA-aneuploidy were 96.4% and 100%, respectively. The combination of both techniques increased the positive and negative predictive values to 100% and 99.5%, respectively. Potter et al. (2003) found four false negatives among 115 cases analyzed; although this level of false negatives was low, the average time to diagnosis was 117.25 days.

Detection of dysplasia using cytology has been studied widely. According to Warnakulasuriya et al. (2008), there is great inter- and intra-examiner variability in assessment of the presence or absence of oral epithelial dysplasia. Because there are many stages of dysplasia, this study endeavoured to standardize dysplasias in an attempt to minimize variability of interpretation (Fig. 5).

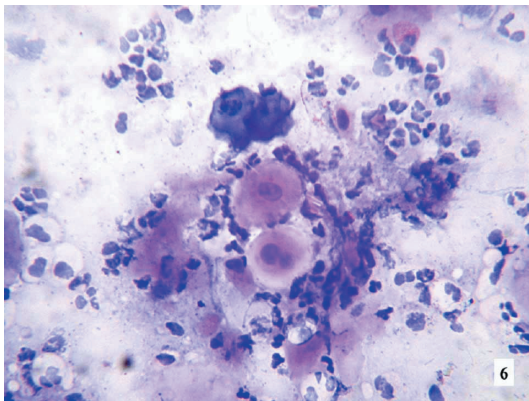
Several studies have been undertaken to compare the advantages and applications of liquid-based cytology and conventional exfoliative cytology (Fig. 6). Hayama et al. (2005) found that both techniques gave comparable cytological diagnoses for all cases in which a suitable sample was collected, although hypocellularity in three of

44 conventional smear cases meant that these were unsuitable for analysis. Liquid-based cytology showed statistically significant overall improvement in smear thickness and cell distribution, 41% and 66%, respectively ( $p \leq 0.05$ ), and also reduced cell overlap and less blood ( $p \leq 0.05$ ). Cell morphology also could be visualized better in the liquid-based preparations (Hayama et al. 2005).

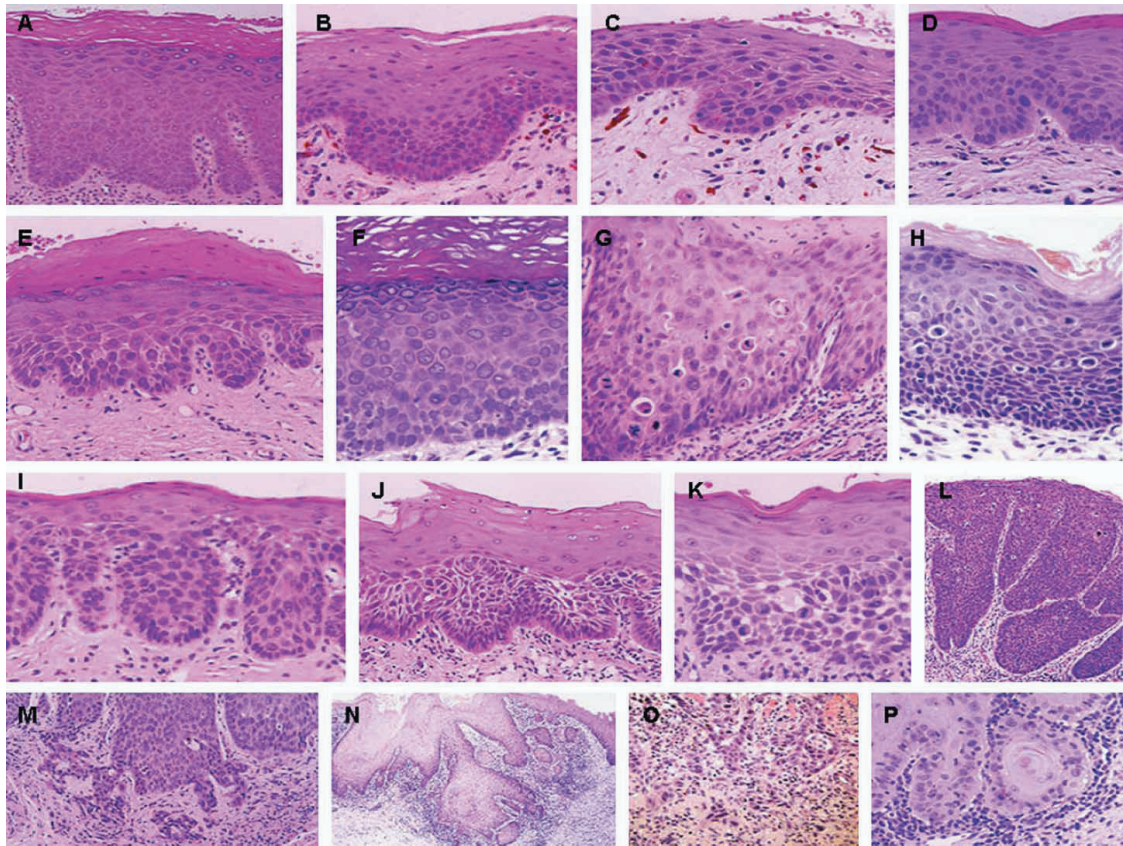
Navone et al. (2007) used dermatological curettes and a liquid base to augment the amount of material obtained by sampling. Only 8.8% of the samples were inadequate among the liquid-based cytology group compared to the conventional smear group. The liquid-based cytology group produced a sensitivity of 95.1% and a specificity of 99.0%. These investigators concluded that liquid-based cytology not only improved sensitivity and specificity for diagnosing malignant lesions, but also permitted suitable material to be obtained for molecular analyses, e.g., AgNOR, DNA or microbiopsy.

Concerning cytometry techniques, although it appears that a reduction in the nucleus and an increase in cytoplasm may be early indicators of malignant change, the results are disputed. Saiz et al. (2005) did not believe that the cellular proliferation index, mitotic index, polyploidy and S-phase parameters could be used as prognostic factors for oral SCC, because no statistically significant differences have been found in the appearance of local recurrence, distant metastasis and survival. Nonetheless, Pektas et al. (2006) demonstrated cell diploidy in 83.3% of malignant lesions, a statistically significant difference compared to the control group. They concluded that quantitative cytomorphology analysis using oral cytology is not only a valuable adjunct to biopsy for identifying premalignant lesions and early stage cancerous oral lesions, but it also is a rapid and minimally invasive procedure that requires no topical or local anesthetic and it has high specificity and sensitivity rates (Pektas et al. 2006). Remmerbach et al. (2001) demonstrated high sensitivity and specificity levels (94.6% and 99.5%, respectively) and positive and negative predictive values (98.1% and 98.5%, respectively) for diagnosing cancerous cells and concluded that DNA cytometry was useful for diagnosing precancerous lesions, carcinoma in situ and invasive carcinomas at all stages.

Doseva et al. (1984) found hypodiploid or hypertetraploid distributions instead of a diploid pattern in smears for leukoplakia and lichen ruber planus that subsequently underwent malignant



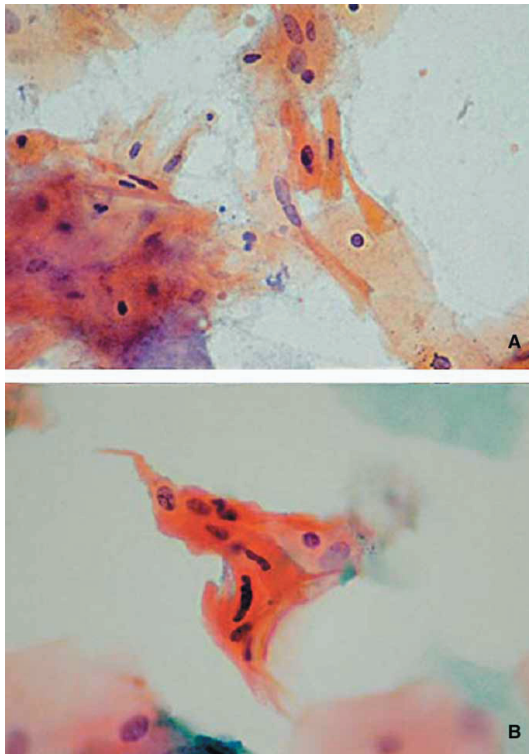
**Fig. 4.** Oral brush biopsy specimen from a patient with squamous cell carcinoma. Buccal mucosa showing a binucleated cell with evidence of intra-cellular and extra-cellular keratinization against an inflammatory background. Hematoxylin and eosin.  $\times 400$ . From Mehrota et al. (2006).



**Fig. 5.** Classification and grades of dysplasia. Adapted from Warnakulasuriya et al. (2008). A) Squamous epithelium showing keratosis, hyperplasia of stratum spinosum and increased maturation compartment with no changes in architecture. No cellular atypia is present. Grade: no dysplasia. B) Squamous epithelium showing increased basal cells (basal cell hyperplasia) as the only change in architecture. No cellular atypia is present. Grade: no dysplasia. C) Architectural changes are evident in the lower third of the epithelium. Mild cellular atypia is present. Grade: mild dysplasia. D) Architectural changes extend approximately to the lower third of the squamous cell epithelium. Cellular atypia is mild. Grade: mild dysplasia. E) Architectural changes extend to the middle third. Cellular atypia is moderate. Grade: moderate dysplasia. F) Architectural changes into middle third of the epithelium. Cellular atypia is moderate. Grade: moderate dysplasia. G) Architectural changes extend to the upper third of the epithelium. Cellular atypia is marked. Grade: severe dysplasia. H) Architectural changes extend to the upper third of the epithelium. Cellular atypia is marked. Grade: severe dysplasia. I) Architectural changes are severe and extend to the upper third of the epithelium. Cellular atypia, however, is moderate. Grade: moderate dysplasia. J) Architectural changes extend into the middle third of the epithelium and would constitute moderate dysplasia, but in view of marked atypia, moderate dysplasia is upgraded. Grade: severe dysplasia. K) Architectural changes extend to the middle third of the epithelium, but in view of marked cellular atypia, moderate dysplasia is upgraded. Grade: severe dysplasia. L) Architectural changes extend to almost full thickness of the epithelium and marked cellular atypia is clear. Grade: carcinoma in situ. M) Irregular interface between epithelium and connective tissue with pointed projections of epithelium indicates early invasion. N-P) Epithelial islands, possibly separated from the surface epithelium, indicate early invading carcinoma; serial sections may be necessary to confirm invasion.

degeneration. Remmerbach et al. (2003a) found that DNA-aneuploidy as a malignancy marker detected malignancy months in advance of histology. According to Thirthagiri et al. (2007), chromosomal instability, especially at the centrosome level, leads to aneuploidy and aneuploidy leads, in turn, to dysplasia, which

contributes to malignant progression of the tumor. Schimming et al. (1998) assessed the correlation between DNA distribution and clinical and pathological characteristics of oral SCC, and encountered a significantly higher N stage, a greater frequency of metastases and a lower survival rate for non-diploid tumors.



**Fig. 6.** Squamous cell carcinoma. A) Conventional cytology. Smear background with bacteria; elongated atypical squamous cells. B) Liquid-based cytology. Atypical squamous cell with cellular pleomorphism and nuclear hyperchromasia. Papanicolaou.  $\times 400$ . From Hayama et al. (2005).

## Conclusions

Poor or inadequate cytology (both number and state of cells) may be sufficient cause for excisional biopsy of a small lesion and incisional biopsy of a large lesion to confirm a diagnosis of cancer, to avoid unnecessary therapeutic measures such as hemiglossectomy, radical neck surgery, therapeutic irradiation and chemotherapy. Oral cytology is useful for monitoring several sites of a large lesion and can guide the choice of sites for one or more incisional biopsies. In the same way, it can be used for lesions such as lichen planus, which has a low potential to harbor or develop dysplasia, and sites adjacent to excised premalignant or malignant epithelial lesions. This technique may not be useful for assessing masses arising from or metastatic to the lamina propria or submucosa, because the surface epithelial cells will not give an accurate diagnosis.

Exfoliative cytology with the application of new purely physical and molecular techniques is becoming increasingly important for diagnosis of oral precancerous lesions and cancers. Molecular analysis is likely to become a key technique for diagnosing and managing oral cancers, and the use of molecular markers will permit early diagnosis, identification of changes before these become clinically visible and will permit evaluation of their responses to different treatments. Molecular markers also may prove useful for designing preventative programs.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- Acha A, Ruesga MT, Rodriguez MJ, Martinez de Pancorbo MA, Aguirre JM (2005) Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Med. Oral. Patol. Oral y Cirugia Bucal.* 10: 95–102.
- Ballantyne J (2007) Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin. Cancer Res.* 13: 1350–1351.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 72: 141–196.
- Bishop JW, Bigner SH, Colgan TJ, Husain M, Howell LP, McIntosh KM, Taylor DA, Sadeghi MH (1998) Multicenter masked evaluation of AutoCyte PREP thin layers with matched conventional smears. Including initial biopsy results. *Acta Cytol.* 42: 189–197.
- Bongers V, Snow GB, de Vries N, Braakhuis BJ (1996) Potential early markers of carcinogenesis in the mucosa of the head and neck using exfoliative cytology. *J. Pathol.* 178: 284–289.
- Boyd NM, Reade PC (1988) Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J. Oral Pathol.* 17: 193–201.
- Boyle JO, Mao L, Brennan JA, Koch WM, Eisele DW, Saunders JR, Sidransky D (1994) Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am. J. Surg.* 168: 429–432.
- Brinkman BM, Wong DT (2006) Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr. Opin. Oncol.* 18: 228–233.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 56: 2488–2492.
- Chandler JR (1966) The nonvalue of oral cytology. *Arch. Otolaryngol.* 84: 527–533.
- Cheng B, Rhodus NL, Williams B, Griffin RJ (2004) Detection of apoptotic cells in whole saliva of patients with oral premalignant and malignant lesions: a

- preliminary study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodont.* 97: 465–470.
- Cowpe JG, Longmore RB, Green MW** (1985) Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J. Royal Soc. Med.* 78: 995–1004.
- Cowpe JG, Longmore RB, Green MW** (1988) Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J. Royal Soc. Med.* 81: 509–513.
- Cowpe JG, Ogden GR, Green MW** (1993) Comparison of planimetry and image analysis for the discrimination between normal and abnormal cells in cytological smears of suspicious lesions of the oral cavity. *Cytopathology* 4: 27–35.
- Doseva D, Christov K, Kristeva K** (1984) DNA content in reactive hyperplasia, precancerosis, and carcinomas of the oral cavity. A cytophotometric study. *Acta Histochem.* 75: 113–119.
- Driemel O, Kosmehl H, Rosenhahn J, Berndt A, Reichert TE, Zardi L, Dahse R** (2007) Expression analysis of extracellular matrix components in brush biopsies of oral lesions. *Anticancer Res.* 27: 1565–1570.
- Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Muller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE** (2007) Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J. German Soc. Derm.* 5: 1095–1100.
- Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, Kleinsasser N, Staudenmaier R, Muller-Richter U, Reichert TE, Kosmehl H** (2008) Performance of conventional oral brush biopsies. *HNO* 56: 205–210.
- El-Naggar AK, Mao L, Staerkel G, Coombes MM, Tucker SL, Luna MA, Clayman GL, Lippman S, Goepfert H** (2001) Genetic heterogeneity in saliva from patients with oral squamous carcinomas: implications in molecular diagnosis and screening. *J. Molec. Diag.* 3: 164–170.
- Epstein JB, Zhang L, Rosin M** (2002) Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J. Can. Dent. Assoc.* 68: 617–621.
- Fist S** (2003) The oral brush biopsy: separating fact from fiction. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodont.* 9: 654–655.
- Freitas MD, García AG, Abelleira AC, Carneiro JLM, Rey JMG** (2004) Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 9: 355–361.
- García del Moral R, Quesada MJ, Ruiz Avila I** (1993) Histoquímica de proteínas, aminos biógenos y ácidos nucleicos. In: García del Moral R, Ed. *Laboratorio de anatomía patológica*. 1st ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid. pp. 245–263.
- Hayama FH, Motta AC, Silva Ade P, Migliari DA** (2005) Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med. Oral Patol. Oral y Cirugía Bucal.* 10: 115–122.
- Huang ME, Chang YC, Liao PS, Huang TH, Tsay CH, Chou MY** (1999) Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. *Oral Oncol.* 35: 296–301.
- Hullmann M, Reichert TE, Dahse R, von Eggeling F, Pistner H, Kosmehl H, Driemel O** (2007) Oral cytology: historical development, current status, and perspectives. *Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie* 11: 1–9.
- Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA** (1994) The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 77: 95–99.
- Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P** (2006) Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncol.* 42: 810–818.
- Lane EB, Alexander CM** (1990) Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Sem. Cancer Biol.* 1: 165–179.
- Langlois CC, Devildos LR, Oliveira GL, Aver-Araújo LM**, Eds. (1993) *Diagnóstico Histopatológico. Manual de Aulas Práticas*. 3rd ed. Faculdade de Odontologia, UFPel, Pelotas. pp. 25–31.
- Linder J, Zahniser D** (1997) The ThinPrep Pap test. A review of clinical studies. *Acta Cytol.* 41: 30–38.
- Martone T, Gillio-Tos A, De Marco L, Fiano V, Maule M, Cavalot A, Garzaro M, Merletti F, Cortesina G** (2007) Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 13: 5089–5094.
- Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R** (2006) Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Molec. Cancer.* 5: 11.
- Moralis A, Kunkel M, Reichert TE, Kosmehl H, Driemel O** (2007) Identification of a recurrent oral squamous cell carcinoma by brush cytology. *Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie* 11: 355–358.
- Nasuti JE, Tam D, Gupta PK** (2001) Diagnostic value of liquid-based (Thinprep) preparations in nongynecologic cases. *Diag. Cytopathol.* 24: 137–141.
- Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, Gandolfo S** (2007) The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathol.* 18: 356–360.
- Navone R, Pentenero M, Rostan I, Burlo P, Marsico A, Broccoletti R, Scully C, Gandolfo S** (2008) Oral potentially malignant lesions: first-level micro-histological diagnosis from tissue fragments sampled in liquid-based diagnostic cytology. *J. Oral Pathol.* 37: 358–363.
- Nichols ML, Quinn FB Jr, Schnadig VJ, Zaharopoulos P, Hokanson JA, Des Jardins L, McCracken MM** (1991) Interobserver variability in the interpretation of brush cytologic studies from head and neck lesions. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117: 1350–1355.
- Nunes DN, Kowalski LP, Simpson AJ** (2000) Detection of oral and oropharyngeal cancer by microsatellite analysis in mouth washes and lesion brushings. *Oral Oncol.* 36: 525–528.
- Ogden GR, Chisholm DM, Adi M, Lane EB** (1993) Cytokeratin expression in oral cancer and its relationship to tumor differentiation. *J. Oral Pathol. Med.* 22: 82–86.
- Ogden GR, Cowpe JG, Chisholm DM, Lane EB** (1994) DNA and keratin analysis of oral exfoliative cytology in

- the detection of oral cancer. *Eur. J. Cancer. Part B. Oral Oncol.* 30B: 405–408.
- Ogden GR, Cowpe JG, Green M** (1992) Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. *Acta Cytol.* 36: 706–710.
- Ogden GR, Cowpe JG, Green MW** (1991) Detection of field change in oral cancer using oral exfoliative cytologic study. *Cancer* 68: 1611–1615.
- Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ** (1997) Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J. Oral Pathol Med.* 26: 201–205.
- Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, Lane DP** (1992) Assessment of p53 protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. *J. Pathol.* 166: 389–394.
- Ogden GR, Leigh I, Chisholm DM, Cowpe JG, Lane EB** (1996) Exfoliative cytology of normal oral mucosa. Assessing the basal cell keratin phenotype. *Acta Cytol.* 40: 933–936.
- Ogden GR, McQueen S, Chisholm DM, Lane EB** (1993) Keratin profiles of normal and malignant oral mucosa using exfoliative cytology. *J. Clin. Pathol.* 46: 352–356.
- Okami K, Imate Y, Hashimoto Y, Kamada T, Takahashi M** (2002) Molecular detection of cancer cells in saliva from oral and pharyngeal cancer patients. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 27: 85–89.
- Papanicolaou GN, Traut HF** (1941) The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121: 211–224.
- Pektas ZO, Keskin A, Gunhan O, Karslioglu Y** (2006) Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. *J. Oral Maxillofacial Surg.* 64: 628–635.
- Potter TJ, Summerlin DJ, Campbell JH** (2003) Oral malignancies associated with negative transepithelial brush biopsy. *J. Oral Maxillofacial Surg.* 61: 674–677.
- Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO** (1998) Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J. Oral Maxillofacial Surg.* 27: 83–86.
- Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A, Bocking A** (2003a) Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Anal. Cell. Pathol.* 25: 159–166.
- Remmerbach TW, Weidenbach H, Muller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B, Bocking A** (2003b) Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal. Cell. Pathol.* 25: 139–146.
- Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Bocking A** (2001) Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal. Cell. Pathol.* 22: 211–221.
- Rick GM** (2003) Oral brush biopsy: the problem of false positives. *Oral Sur. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodont.* 96: 252.
- Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D** (2001) Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 61: 939–942.
- Saiz Bustillo R, Corchero Martín G, García-Montesinos Perea B, González Terán T, Sánchez Santolino S** (2005) Carcinoma oral de células escamosas. Parámetros citométricos de interés pronóstico. *Med. Oral, Patol. Oral y Cirugía Bucal.* 10: 462–467.
- Sandler HC** (1963) Veterans administration cooperative study of oral exfoliative cytology. *Acta Cytol.* 7: 180–182.
- Scheifele C, Schlechte H, Bethke G, Reichart PA** (2002) Detection of TP53-mutations in brush biopsies from oral leukoplakias. *Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie* 6: 410–414.
- Schimming R, Hlawitschka M, Haroske G, Eckelt U** (1998) Prognostic relevance of DNA image cytometry in oral cavity carcinomas. *Anal. Quant. Cytol. Histol./Internat. Acad. Cytol. Am. Soc. Cytol.* 20: 43–51.
- Schwartz JL, Panda S, Beam C, Bach LE, Adami GR** (2008) RNA from brush oral cytology to measure squamous cell carcinoma gene expression. *J. Oral Pathol. Med.* 37: 70–77.
- Sciubba JJ** (1999) Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J. Am. Dent. Assoc.* 130: 1445–1457.
- Sidransky D** (1995) Molecular markers in cancer diagnosis. *J. Nat. Cancer Inst. Monogr.* 17: 27–29.
- Smith RV, Schlecht NF, Childs G, Prystowsky MB, Belbin TJ** (2006) Pilot study of mucosal genetic differences in early smokers and nonsmokers. *Laryngoscope* 116: 1375–1379.
- Spafford ME, Koch WM, Reed AL, Califano JA, Xu LH, Eisenberger CF, Yip L, Leong PL, Wu L, Liu SX, Jeronimo C, Westra WH, Sidransky D** (2001) Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin. Cancer Res.* 7: 607–612.
- Spira A, Beane J, Schembri F, Liu G, Ding C, Gilman S, Yang X, Cantor C, Brody JS** (2004) Noninvasive method for obtaining RNA from buccal mucosa epithelial cells for gene expression profiling. *BioTechniques* 36: 484–487.
- Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, Kumar SV, Aldous KM, Gierthy JE, Kaminsky LS** (2004) Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Res.* 64: 6805–6813.
- Steinau M, Lee DR, Rajeevan MS, Vernon SD, Ruffin MT, Unger ER** (2005) Gene expression profile of cervical tissue compared to exfoliated cells: impact on biomarker discovery. *BMC Genomics* 6: 64.
- Sugerman PB, Savage NW** (1996) Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Austral. Dent. J.* 41: 71–74.
- Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzyszewska J, Jelen M, Tarkowski R, Wlodarska I, Spytrowska B, Gisterek I, Matkowski R, Kornafel J** (2008) Prognostic significance of nuclear and cytoplasmic expression of metallothioneins as related to proliferative activity in

squamous cell carcinomas of oral cavity. *Histol. Histopathol.* 23: 843–851.

**Thirthagiri E, Robinson CM, Huntley S, Davies M, Yap LF, Prime SS, Paterson IC** (2007) Spindle assembly checkpoint and centrosome abnormalities in oral cancer. *Cancer Lett.* 258: 276–285.

**Walling DM, Flaitz CM, Adler-Storthz K, Nichols CM** (2003) A non-invasive technique for studying oral

epithelial Epstein-Barr virus infection and disease. *Oral Oncol.* 39: 436–444.

**Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E** (2008) Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J. Oral Pathol. Med.* 37: 127–133.



## Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review)

MARIO PÉREZ-SAYÁNS<sup>1</sup>, JOSÉ MANUEL SOMOZA-MARTÍN<sup>1</sup>, FRANCISCO BARROS-ANGUEIRA<sup>2</sup>, MARÍA DOLORES REBOIRAS-LÓPEZ<sup>1</sup>, JOSÉ MANUEL GÁNDARA REY<sup>1</sup> and ABEL GARCÍA-GARCÍA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Odontología, Entreríos s/n, Santiago de Compostela, C.P. 15782; <sup>2</sup>Unity of Molecular Medicine, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, C.P. 15706, Spain

Received July 6, 2009; Accepted August 10, 2009

DOI: 10.3892/or\_00000565

**Abstract.** The development of oral squamous cell cancer (OSCC) is a multistep process involving the accumulation of multiple genetic alterations modulated by genetic predisposition and environmental influences such as tobacco and alcohol use, chronic inflammation, and viral infections. All of these factors can lead to a wide range of genetic and molecular alterations that can be detected using a range of molecular studies. The alterations mostly affect two large groups of genes: oncogenes and tumor suppressor genes, which can be either inactivated or overexpressed through mutations, loss of heterozygosity, deletions, or epigenetic modifications such as methylation. Other molecules that are closely associated with tumor pathogenesis and prognosis also exist and warrant further study. Important advances in molecular biology are helping to shed light on oral cancer and thus aiding in the early diagnosis and development of new personalized treatment approaches. The purpose of the review is to explore the genetic and molecular alterations associated with OSCC.

### Contents

1. Introduction
2. Differential gene expression in oral squamous cell carcinoma
3. Genetic and epigenetic anomalies in OSCC
4. Other molecules associated with OSCC
5. Conclusions

### 1. Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity. Accounting for between 90 and 95% of all malignant lesions of the mouth, OSCC

has become practically synonymous with oral cancer. Based on statistics from June 24, 2008, the American Cancer Society reported that 1,437,181 new cancer cases and 565 650 cancer-related deaths were expected in the United States in 2008 (1). The estimated number of cases of oral cavity cancers was 22,900, equivalent to 3% all cancer cases.

Carcinogenesis is a multistep process modulated by both environmental and genetic factors (Fig. 1). As early as 1988, Boyd and Reade (2) described the different mechanisms involved in carcinogenesis of the oral mucosa and distinguished between 2 major groups: chemical mechanisms, physical mechanisms, and viral mechanisms (2). More than a decade later, Hanahan and Weinberg (3) described 6 hallmarks of cancer: acquisition of growth signaling autonomy (oncogenes), growth-inhibitory signals (tumor suppressor genes), evasion of apoptosis, cellular immortalization, angiogenesis, and finally, invasion and metastasis.

### 2. Differential gene expression in oral squamous cell carcinoma

Numerous methods are available for directly analyzing tumor DNA, either directly in the tumor tissue itself or in previously prepared tissue. The most common methods are *in situ* hybridization, Southern and Northern blot analysis, polymerase chain reaction (PCR), and automatic DNA sequencing. Microarray technology, for its part, is particularly useful for establishing general gene expression patterns and for screening for differential gene expression. Array results, however, need to be validated using an alternative method such as Northern blot analysis or quantitative real-time (RT) PCR, used to evaluate product accumulation during the log phase of the reaction. Quantitative RT-PCR, currently considered the most reliable and reproducible gene quantification method available, is the most widely used technique for validating gene expression results obtained using microarray technology (5-7). To determine gene expression in OSCC, many researchers have combined DNA microarray hybridization with other molecular methods (such as quantitative RT-PCR) that measure differential gene expression.

A large number of studies have used DNA microarray technology to profile gene expression patterns in head and neck cancer and in OSCC in particular (8-29). The majority of these studies have concluded that there is a possible association between different genes and squamous cell

*Correspondence to:* Dr Mario Pérez-Sayáns, Facultad de Odontología, Entreríos s/n, Santiago de Compostela, C.P. 15782, Spain  
E-mail: perezsayans@gmail.com

*Key words:* oncogenes, tumor suppressor genes, oral squamous cell carcinoma, methylation

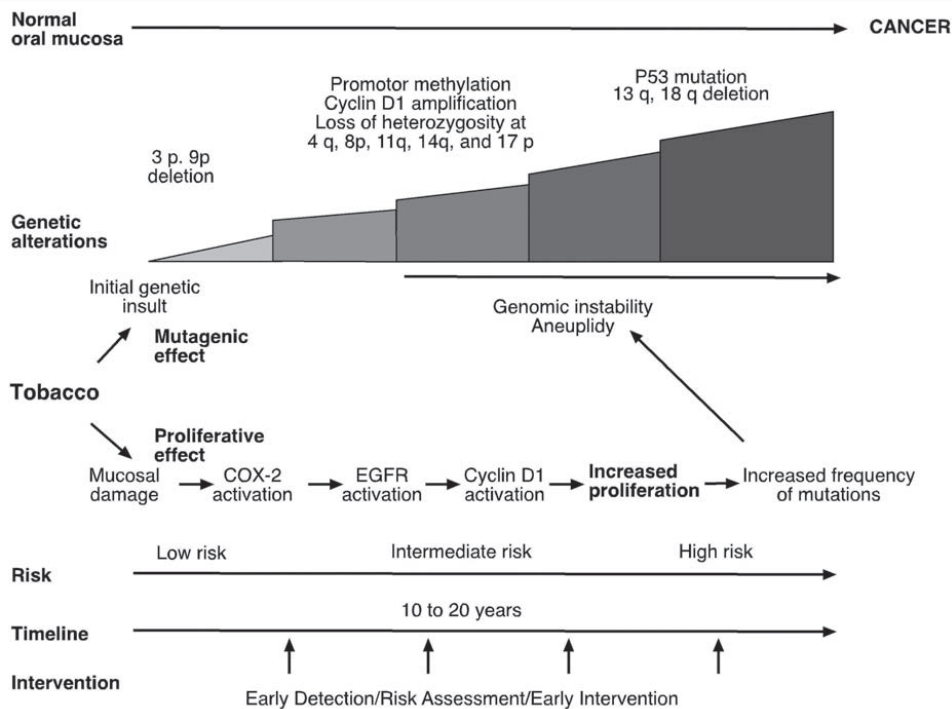


Figure 1. Chronic exposure to carcinogens such as tobacco causes genetic changes in the epithelial cells of the oral mucosa. The accumulation of genetic insults leads to genomic instability, the development of premalignant lesions, and ultimately invasive carcinoma. Carcinogens also have parallel indirect effects such as the induction of proliferative activity through, for example, the epidermal growth factor receptor (EGFR). COX, cyclooxygenase; RAR, retinoic acid receptor. Obtained from (18).

carcinoma. Many of the genes implicated have been previously described and are well known, but others have an unknown biological function and have yet to be analyzed in depth. Based on the results of these microarray studies, these new genes can now be investigated individually to determine their nature and function.

In a relatively recent study, our research group studied gene expression profiles in 5 patients with OSCC using the Atlas Glass Human 3.8 I Microarray (Fig. 2) (30). This microarray consists of 3,888 spots, including 3,757 oligonucleotides, 9 house-keeping genes, and controls. The genes, all well known and characterized, have a wide range of biological functions. Statically significant differences were found between tumor tissue and normal tissue for 426 genes, 322 (75.58%) of which were overexpressed and 104 (24.41%) of which were under-expressed. Interestingly, while the genes found to be differentially expressed varied to some extent between analyses, the biological functions they encoded were identical (Table I) (30).

### 3. Genetic and epigenetic anomalies in OSCC

To facilitate comprehension, we have classified the genetic and epigenetic anomalies associated with OSCC according to the type of structure affected (chromosome, allele, onco-

gene, tumor suppressor gene, or nucleotide) and the type of anomaly (polymorphism, point mutation, deletion, and other alterations).

There are reports of frequent chromosomal aberrations (deletions) at 2q21-24, 2q33-35, and 2q37 which affect numerous tumor suppressor genes including *LRP1B*, *CASP8*, *CASP10*, *BARD1*, *ILKAP*, *PPP1R7*, and *ING5* (31). One recent study reported that the loss of alleles 3p14 and 9p21 occurs early on in the development of OSCC tumors and can even occur in simple keratosis (32). Polysomy 3, for its part, is more common than polysomy 9 and is characteristic of dysplasia and *in situ* carcinoma (33).

A high frequency of loss of heterozygosity (LOH) at chromosomal loci 13q and 17p has been described in premalignant oral lesions and early carcinomas (34). The affected regions harbor important genes whose suppressor function in the development of tumors is probably severely altered by this LOH. Chromosome 9 appears to be one of the regions that is altered most often and earliest in tumor development; allelic losses at 9p21, for example, have been described in the majority of premalignant oral lesions and early carcinomas (Fig. 3) (35).

The 9p21 region harbors genes that code for the cyclin-dependent kinase inhibitors p16 and p14, two important regulators of cell proliferation. Several regions of chromo-

ONCOLOGY REPORTS 22: 1277-1282, 2009

1279

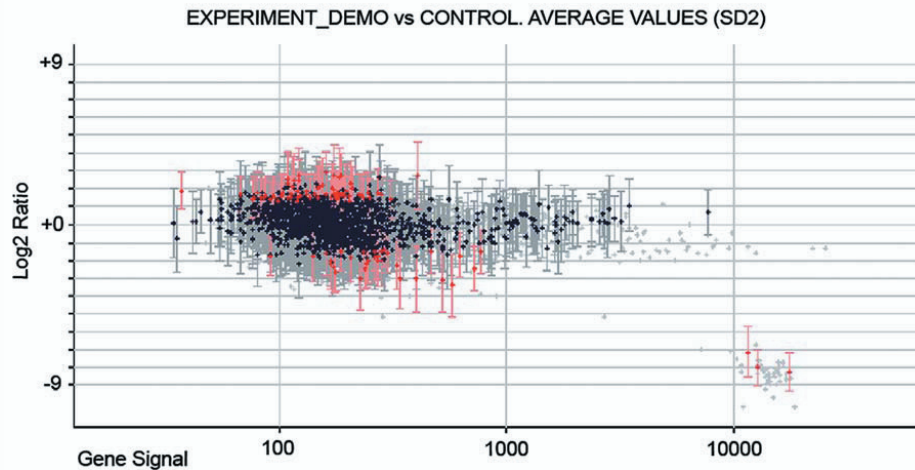


Figure 2. Log<sub>2</sub> graph showing Cy3/Cy5 ratio (after normalization of data using the Lowess method) and signal intensity of each microarray spot. The red dots (426 genes and 86 controls) correspond to significantly differentially expressed genes ( $P=0.05$ , t-test) in tumor tissue compared to normal tissue. The vertical bars show the standard deviation. Obtained from (29).

Table I. Number and percentages of genes in each functional category showing significant differences in expression (t-tests,  $p<0.05$ ) between normal and tumoral tissue.

Function	Total no.	% Total	No. up-regulated	% up-regulated	No. down-regulated	% down-regulated
Cell surface antigens	8	1.87	5	1.55	3	2.88
Transcription factors	52	12.20	33	10.24	19	18.26
Cell cycle proteins	3	0.70	3	0.93	0	0
Cell adhesion receptors/proteins	22	5.16	19	5.90	3	2.88
Immune system proteins	8	1.87	5	1.55	3	2.88
Extracellular transport/carrier proteins	17	3.99	11	3.41	6	5.76
Oncogenes and tumor suppressors	11	2.58	8	2.48	3	2.88
Stress response proteins	14	3.28	10	3.10	4	3.84
Membrane channels and transporters	27	6.33	19	5.90	8	7.69
Extracellular matrix proteins	8	1.87	5	1.55	3	2.88
Trafficking/targeting proteins	39	9.15	28	8.69	11	10.57
Metabolism proteins	80	18.77	68	21.11	12	11.53
Post-translational modification/protein folding	18	4.22	13	4.03	5	4.80
Translation	26	6.10	17	5.27	9	8.65
Apoptosis associated proteins	6	1.40	4	1.24	2	1.92
RNA processing, turnover, and transport	11	2.58	11	3.41	0	0
DNA binding and chromatin proteins	5	1.17	4	1.24	1	0.96
Cell receptors	38	8.92	33	10.24	3	2.88
Cell signaling, extracellular communication proteins	19	4.46	14	4.34	5	4.80
Intracellular transducers/effectors/modulators	53	12.44	36	11.18	17	16.34
Protein turnover	22	5.16	15	4.65	7	6.73
Cytoskeleton/motility proteins	25	5.86	22	6.83	3	2.88
DNA synthesis, recombination, and repair	11	2.58	5	1.55	6	5.76
Functionally unclassified	17	3.99	14	4.34	3	2.88

Obtained from (30).

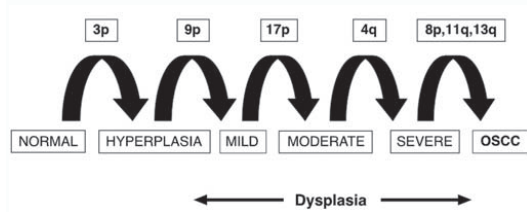


Figure 3. Molecular model of oral carcinogenesis. The diagram shows the genetic progression from dysplasia to oral squamous cell carcinoma (OSCC), through changes in the p or q arm of chromosomes 3, 4, 8, 9, 11, 13, and 17. Adapted from (64).

some 3, in particular 3p25, 3p21, and 3p13-14, commonly harbor chromosomal aberrations in oral cancer, although it is not yet known which genes are affected (36). Other aberrations such as allelic losses at 5q21-22, 22q13, 4q, 11q, 18q, and 21q, are often found in association with advanced tumor stages and poorly differentiated carcinomas (37).

Recent studies have identified allelic polymorphisms in the genes *HLA* and *MICA* (major histocompatibility complex-class-I-chain-related gene A) (38). In one of these studies, HLA-B35 and HLA-B40 were strongly associated with tumor metastasis (39).

Anomalies in certain oncogenes such as *ErbB1* (*Her-1*), *ErbB2*, and *N-, K- and H-ras* have not been found to play a key role in oral cancer (40-43). When altered, genes that code for the synthesis of cyclin proteins, may act as oncogenes. Overexpression of *CCND1*, for example, can induce overexpression of the cyclin D1 protein, which has been associated with poor prognosis in early-stage oral tumors (44-46).

Tumor suppressor gene anomalies are also found in malignant oral lesions. Most oral carcinomas are characterized by aberrant expression of at least one of the members of the retinoblastoma (pRb) family of growth suppressor proteins. *CDKN2A*, for example, which encodes the protein p16, is located at locus 9p21, one of the most vulnerable areas of the human genome in oral cancer, while p14, the alternative transcript of the same gene, is frequently deleted in malignant oral lesions. One of the most important tumor suppressor genes in humans is *TP53* (47). The functions of this gene and its molecular system have been found to be suppressed in numerous tumors, constituting one of the earliest findings in the natural history of oral cancer (48,49).

Three single nucleotide polymorphisms detected in the promoter region of the *DNMT3B* gene-*C46359T* [-149C>T], -238T>C, and -579>T-might play a causative role in several cancers, including OSCC (50).

In contrast, in OSCC, the base excision repair pathway, which comprises the genes *MUTYH*, *OGG1*, and *MTH1* and which repairs mutations that involve 8-oxoguanine, has been seen to play a very small or possibly even non-existent role in tumor development (51). Similar findings have been reported following argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) analyses, although the results have been disputed (18). According to Teresa *et al* and Costa *et al* AgNOR and Ki-67 analyses can be used to determine proliferative states

of epithelial cells in oral cancer (39,52), and Schwartz *et al* have shown levels of proliferating cell nuclear antigen to be increased in an experimental model (53).

Our research group found a very interesting association between OSCC and overexpression of *ATP6VIC1* 54, which seems to be the main gene involved in the regulation of V-ATPase enzymes and the acidity of solid oral tumors (54).

The most common epigenetic alteration is DNA methylation. Imai *et al* (55) recently demonstrated that Ras association family genes (*RASSF*) were altered in OSCC. In particular, they found *RASSF2* to be methylated in 26% of OSCC tumors analyzed (55).

#### 4. Other molecules associated with OSCC

Other molecules that have been associated with OSCC are cyclo-oxygenase 2 (*COX-2*), which has been found in high levels in dysplastic lesions (56); the human trophoblast cell-surface antigen (*TROP2*), which appears to be associated with shorter survival (57); and the epithelial adhesion molecule (*EpCAM*), which has been associated with tumor size, regional lymph node metastasis, histologic differentiation, and an invasive pattern (31). The connective tissue growth factor, *CCN2* (also known as *CTGF*), was recently associated with head and neck squamous cell cancer; findings included high levels of messenger RNA (mRNA) and its protein in stromal fibroblasts, tumor cells, and vascular endothelial cells (58). Overexpression of *MMP-2* and *MMP-9* has been associated with the invasive potential of tumors and levels of alcohol, leading several authors to hypothesize that alcohol might play a role in oral carcinogenesis through the stimulation of these genes (37).

It has been shown that molecular analysis of saliva can be used to study genomic DNA expression but not mRNA expression (59). Other studies have detected the soluble fragment of cytokeratin 19, Cyfra 21-1, in patients with OSCC, although further studies are required to determine the true diagnostic and prognostic value of this marker (60,61). Recent studies have shown that the determination of proteins and oxidated DNA levels in saliva might indicate high levels of reactive oxygen species, which appear to be involved in the development of OSCC (62).

Other recent findings in this area include the observation of an association between oral cancer and a set of new molecules called advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptors (RAGEs) (63). According to the authors of the study, RAGE expression decreases with an increase in OSCC differentiation. RAGEs, for example, are expressed in 100% of normal epithelial cells but in 0% of poorly differentiated OSCC cells.

#### 5. Conclusions

Oral carcinogenesis is a multifactorial process involving numerous genetic processes that can alter the function of oncogenes, tumor suppressor genes, and other related molecules. The resulting anomalies can increase the production of growth factors and the number of cell surface receptors, and/or increase transcription or intracellular messenger factor levels. These changes can, in turn, cause a loss of tumor

suppressor activity and give rise to a phenotype capable of increasing cellular proliferation, weakening cell cohesion, and causing local infiltration and metastasis.

## References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al*: Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 58: 71-96, 2008.
- Boyd NM and Reade PC: Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J Oral Pathol* 17: 193-201, 1988.
- Hanahan D and Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, *et al*: Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21: 10-14, 1999.
- Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, *et al*: Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn* 3: 26-31, 2001.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11: 1026-1030, 1993.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA and Rasmussen RP: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 130-131, 134-138, 1997.
- Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, *et al*: Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 20: 6196-6204, 2001.
- Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, *et al*: Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 21: 2634-2640, 2002.
- Francioso F, Carinci F, Tosi L, *et al*: Identification of differentially expressed genes in human salivary gland tumors by DNA microarrays. *Mol Cancer Ther* 1: 533-538, 2002.
- Hartmann KA, Modlich O, Prisack HB, *et al*: Gene expression profiling of advanced head and neck squamous cell carcinomas and two squamous cell carcinoma cell lines under radio/chemotherapy using cDNA arrays. *Radiother Oncol* 63: 309-320, 2002.
- Zhang X, Liu Y, Gilcrease MZ, Yuan, *et al*: A lymph node metastatic mouse model reveals alterations of metastasis-related gene expression in metastatic human oral carcinoma sublines selected from a poorly metastatic parental cell line. *Cancer* 95: 1663-1672, 2002.
- Mendez E, Cheng C, Farwell DG, *et al*: Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 95: 1482-1494, 2002.
- Ibrahim SO, Aarsaether N, Holsve MK, *et al*: Gene expression profile in oral squamous cell carcinomas and matching normal oral mucosal tissues from black Africans and white Caucasians: the case of the Sudan vs. Norway. *Oral Oncol* 39: 37-48, 2003.
- Kuo WP, Hasina R, Ohno-Machado L and Linggen MW: Classification and identification of genes associated with oral cancer based on gene expression profiles. A preliminary study. *N Y State Dent J* 69: 23-26, 2003.
- Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, *et al*: Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol* 39: 259-268, 2003.
- Nagata M, Fujita H, Ida H, *et al*: Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 106: 683-689, 2003.
- Brinkman BM and Wong DT: Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 18: 228-233, 2006.
- Ziobar AF, Patel KR, Alawi F, *et al*: Identification of a gene signature for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 5960-5971, 2006.
- Nguyen ST, Hasegawa S, Tsuda H, *et al*: Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 98: 740-746, 2007.
- Martinez I, Wang J, Hobson KF, *et al*: Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer* 43: 415-432, 2007.
- Chang JT, Wang HM, Chang KW, *et al*: Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC): overexpression of NPM, CDK1 and NDRG1 and under-expression of CHES1. *Int J Cancer* 114: 942-949, 2005.
- Arora S, Matta A, Shukla NK, *et al*: Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 42: 97-108, 2005.
- Jeon GA, Lee JS, Patel V, *et al*: Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 112: 249-258, 2004.
- Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, *et al*: Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 64: 55-63, 2004.
- Gonzalez HE, Gujrati M, Frederick M, *et al*: Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 754-759, 2003.
- Leethanakul C, Knezevic V, Patel V, *et al*: Gene discovery in oral squamous cell carcinoma through the Head and Neck Cancer Genome Anatomy Project: confirmation by microarray analysis. *Oral Oncol* 39: 248-258, 2003.
- Steinmuller M, Lee DR, Rajeevan MS, *et al*: Gene expression profile of cervical tissue compared to exfoliated cells: impact on biomarker discovery. *BMC Genomics* 6: 64, 2005.
- Choi S and Myers JN: Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 87: 14-32, 2008.
- Somoza-Martin JM, Garcia-Garcia A, Barros-Angueira F, *et al*: Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 63: 786-792, 2005.
- Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, *et al*: Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy. *Oral Oncol* 43: 869-877, 2007.
- Uzawa N, Akanuma D, Negishi A, *et al*: Homozygous deletions on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 37: 351-356, 2001.
- Schwarz S, Bier J, Driemel O, *et al*: Losses of 3p14 and 9p21 as shown by fluorescence in situ hybridization are early events in tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma and already occur in simple keratosis. *Cytometry A* 73: 305-311, 2008.
- El-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, *et al*: Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 55: 2656-2659, 1995.
- Ohta S, Uemura H, Matsui Y, *et al*: Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107: 81-91, 2009.
- Gebhart E, Liehr T, Wolff E, *et al*: Loss of 9p21 is embedded in a complex but consistent pattern of genomic imbalances in oral squamous cell carcinomas. *Cytogenet Genome Res* 101: 106-112, 2003.
- Moles MAG, Montoya JAG and Avila IR: Bases moleculares de la cancerización de cavidad oral. *Av Odontostomatol* 24: 55-60, 2008.
- Stephens HA, Vaughan RW, Collins R, *et al*: Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA, encoded by polymorphisms in exons 2, 3 and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens* 53: 167-174, 1999.
- Costa Ade L, de Araujo NS, Pinto Ddos S and de Araujo VC: PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 28: 438-441, 1999.
- Brandt B, Meyer-Staekling S, Schmidt H, *et al*: Mechanisms of EGFR gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res* 12: 7252-7260, 2006.
- Silva SD, Perez DE, Alves FA, *et al*: ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: correlation with clinical outcomes. *Oral Oncol* 44: 484-490, 2008.
- Schartinger VH, Kacani L, Andrlj J, *et al*: Pharmacodiagnostic value of the HER family in head and neck squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 66: 21-26, 2004.
- Vairaktaris E, Goutzaris L, Kalokerinos G, *et al*: Diabetes increases both N-ras and ets-1 expression during rat oral oncogenesis resulting in enhanced cell proliferation and metastatic potential. *In Vivo* 21: 615-621, 2007.

44. Zhou X, Zhang Z, Yang X, *et al*: Inhibition of cyclin D1 expression by cyclin D1 shRNAs in human oral squamous cell carcinoma cells is associated with increased cisplatin chemosensitivity. *Int J Cancer* 124: 483-489, 2009.
45. Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T and Kannan S: CCND1 polymorphisms (A870G and C1722G) modulate its protein expression and survival in oral carcinoma. *Oral Oncol* 44: 689-697, 2008.
46. Marsit CJ, Black CC, Posner MR and Kelsey KT: A genotype-phenotype examination of cyclin D1 on risk and outcome of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 14: 2371-2377, 2008.
47. Kozomara RJ, Brankovic-Magic MV, Jovic NR, *et al*: Prognostic significance of TP53 mutations in oral squamous cell carcinoma with human papilloma virus infection. *Int J Biol Markers* 22: 252-257, 2007.
48. Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, *et al*: Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res* 62: 5295-5300, 2002.
49. Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, *et al*: Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 37: 498-504, 2001.
50. Van Heerden WF, Swart TJ, Robson B, *et al*: FHIT RNA and protein expression in oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 21: 2425-2428, 2001.
51. Van Heerden WF, Swart TJ, van Heerden MB, *et al*: Immunohistochemical evaluation of Fhit protein expression in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 28: 433-437, 1999.
52. Teresa DB, Neves KA, Neto CB and Fregonezi PA: Computer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. *Acta Histochem* 109: 377-387, 2007.
53. Schwartz JL, Gu X, Kittles RA, *et al*: Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. *Oral Oncol* 36: 225-235, 2000.
54. Otero-Rey EM, Somoza-Martin M, Barros-Angueira F and Garcia-Garcia A: Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via over-expression of the ATP6V1C1 gene. *Oral Oncol* 44: 193-199, 2008.
55. Imai T, Toyota M, Suzuki H, *et al*: Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 99: 958-966, 2008.
56. Sudbo J: Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. *Clin Med Res* 2: 233-242, 2004.
57. Fong D, Spizzo G, Gostner JM, *et al*: TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Mod Pathol* 21: 186-191, 2008.
58. Mullis TC, Tang X and Chong KT: Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 61: 606-610, 2008.
59. Kumar SV, Hurteau GJ and Spivack SD: Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin Cancer Res* 12: 5033-5039, 2006.
60. Zhong LP, Zhu HG, Zhang CP, *et al*: Detection of serum Cyfra 21-1 in patients with primary oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36: 230-234, 2007.
61. Zhong LP, Zhang CP, Zheng JW, *et al*: Increased Cyfra 21-1 concentration in saliva from primary oral squamous cell carcinoma patients. *Arch Oral Biol* 52: 1079-1087, 2007.
62. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, *et al*: Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 109: 54-59, 2007.
63. Landesberg R, Woo V, Huang L, *et al*: The expression of the receptor for glycation endproducts (RAGE) in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105: 617-624, 2008.
64. Epstein JB, Zhang L and Rosin M: Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 68: 617-621, 2002.

## Role of V-ATPases in solid tumors: Importance of the subunit C (Review)

MARIO PÉREZ-SAYÁNS, ABEL GARCÍA-GARCÍA,  
MARÍA DOLORES REBOIRAS-LÓPEZ and PILAR GÁNDARA-VILA

Facultad de Odontología, Entreríos s/n, Santiago de Compostela, C.P. 15782, Spain

DOI: 10.3892/ijo\_00000000

**Abstract.** Acidity is one of the main characteristics of OSCC (oral squamous cell carcinoma) as a solid tumor. The V-ATPase is the primary regulator of the tumor micro-environment, by means of proton extrusion to the extracellular medium. The decrease in extracellular pH confers the cells a resistant, highly invasive and metastatic phenotype. However, the acid medium confers an optimum pH to the degradative enzymes (such as proteases and MMPs) for their proper functioning. The C subunit (ATP6V1C) of V1 intra-membrane domain of the V-ATPase, is primarily responsible for its enzymatic function, through the control of a reversible dissociation of V0 and V1 domains. In this review, we describe the importance of V-ATPases in the control of tumor micro-environment, the potential strategies as protein targeting to improve the effectiveness of drug treatment and the role of the C subunit as the primarily responsible of the enzymatic control. The inhibition of the V-ATPase activity through PPIs (proton inhibitors) seems to reduce the destructive and metastatic capacity in tumors, such as hepatocellular carcinoma. Nevertheless, none of these inhibitors was proven to be useful in OSCC; therefore, it is highly important to carry out further studies in order to develop specific inhibitors of the C subunit, to control the devastating effects of OSCC.

### Contents

1. Introduction
2. Role of V-ATPases in oral cancer
3. V-ATPases as protein targeting
4. Importance of C subunit
5. Conclusions

*Correspondence to:* Dr Mario Pérez-Sayáns, Facultad de Odontología, Entreríos s/n, Santiago de Compostela, C.P. 15782, Spain  
E-mail: perezsayans@gmail.com

*Key words:* oral squamous cell carcinoma, V-ATPase

### 1. Introduction

The main characteristics of the solid tumors (such as oral cancer) are the acidity and hypoxia, phenomena that result from the progression of metastatic cancer (1), the sensitivity to chemotherapeutic agents (2) and proliferation (3). In fact, a mechanism of resistance to cytotoxic drugs is the alteration of the pH gradient between the extracellular environment and cell cytoplasm (4).

The cytosolic pH seems to be strictly regulated by four mechanisms: the family of sodium-proton exchangers (NHE), the family of bicarbonate transporters (BCT), the family of monocarboxylate transporters (MCT) and the proton pumps (ATPase) (5,6) (Fig. 1). The lactate production has been commonly seen as the first acidification mechanism of the microenvironment (7). The lactate accumulation results in the activation of the aerobic glycolytic metabolism (8) which increases the amount of cellular lactate that is transported outside the cell through the H<sup>+</sup>/lactate co-transporter (MCT) (9). The increase in aerobic glycolysis (8,10) provides to the tumor a metabolic environment characterized by low levels of serum, hypoxia and an acid extracellular pH. This micro-environment increases the invasive ability of the tumor and the expression of growth and angiogenic factors/receptors (11). All this is correlated to an increment of the intracellular pH, an aggravation of the initial development of the interstitial acid microenvironment and a reversed transmembrane pH gradient (11,12). This increase in the intracellular pH is concomitant with an increment of DNA synthesis (8,13,14), cell cycle progression (15-17), serum and substrate-independent growth (8) and the *in vivo* growth of the tumor (8,18) and all these phenomena trigger a pathological and disorganized increase in density and cell number. However, tumors are able to create an acidic environment even in conditions of reduced production of lactate, suggesting that the aerobic metabolism is not the major mechanism responsible for the development of an acidic microenvironment within solid tumors such as oral squamous cell carcinoma (OSCC) (19,20). On the one hand, the same favourable conditions are maintained for the tumor cells, and on the other hand the selection of highly malignant cancer cells (which can survive in a hostile environment) is facilitated (21).

To survive in this microenvironment, tumor cells must have a regulatory system of cytosolic pH that assists cells in defending themselves against the dangerous H<sup>+</sup> ions. This

could explain the fact that the V-ATPases, which normally reside in acidic organelles may be also located at the cell surface, regulating the pH and exacerbating the migratory ability of metastatic cells (22,23).

## 2. Role of V-ATPases in oral cancer

The cell transformation and carcinogenesis processes are accompanied by metabolic disorders, increased production of protons, acidification of the extracellular environment and alkalization of the cytoplasm (24-26). Therefore, the development and maintenance of this gradient is due directly to the ability of tumor cells to secrete protons ( $H^+$ ), acidify the extracellular environment (11,12,26) and maintain an alkaline cytosolic pH (27). In addition, this ability is increased with the aggressiveness of the tumor (28,29).

Immunohistochemical data show that the V-ATPase is located in the plasma membrane of breast (23,24) and lung (30) cancer cells; this occurs prominently in the highly metastatic cells and with less intensity in the lowly metastatic cells (23,24). Otero-Rey *et al* demonstrate the ATP6V1C1 overexpression in OSCC, one of the most significant subunit of the V-ATPases (31).

According to Martínez-Zaguilán *et al* (24) the V-ATPase expression in the plasma membrane is due to some kind of dysfunction of the normal constituents of the cell. These constituents include the cytoskeleton (32), leader sequences (33) or alterations in a chaperone (34). To Sennoune *et al* the changes in cytosolic pH have multiple phenotypic expression, but according to the authors, the alteration of a single protein (the V-ATPase in the plasma membrane) is responsible for the dysfunctions in protein and cellular pathways of cancer (27).

The acid component of the intratumoral metabolic micro-environment increases the metastatic potential by promoting the angiogenesis (27,35), the anchorage-independent growth, the genetic instability (7) and the invasion, infiltration and penetration of cancer cells into the normal tissue (11).

Martínez-Zaguilán *et al* found that microvascular endothelial cells with the highest migratory capacity express V-ATPases in the plasma membrane. The treatment of these cells with inhibitors of V-ATPases reduces the proton flux, via inhibition of V-ATPase in the plasma membrane (pmV-ATPases) and cell migration, suggesting that they are essential for the regulation of cytosolic pH and migration of endothelial cells (36).

The proton flux, via V-ATPase, evaluated by fluorescence spectroscopy in living cells, was greater in highly than in lowly metastatic cells. Curiously, the lowly metastatic cells use preferably  $Na^+/H^+$  and  $HCO_3^-$  transporters, while highly metastatic cells use V-ATPases. Moreover, these latter cells are more invasive and migratory than the former. These data indicate that the pmV-ATPases are involved in the acquisition of a more metastatic phenotype (37).

The V-ATPases play an important role in the development of tumor metastasis, as previously said. Many tumor cells secrete lysosomal enzymes, involved in the degradation of the extracellular matrix, required for metastatic invasion. These enzymes have a low optimum pH and the V-ATPases are the only responsible for the microenvironment acidification (24,38).

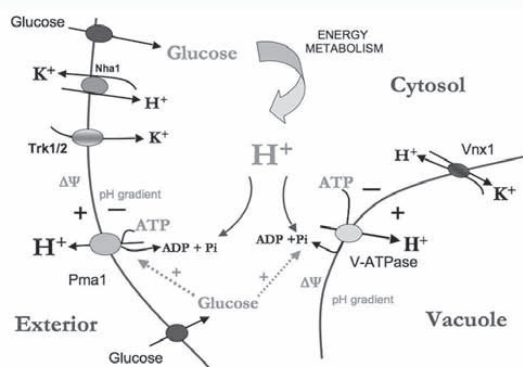


Figure 1. Role of the V-ATPase in the control of intra and extracellular pH. Obtained from Martínez Muñoz (2008) J Biol Chem 283: 29: 20309-20319.

The motility and invasive phenotype are the requirements that make the cell responsible for metastasis (11,27).

The treatment with V-ATPase inhibitors (such as Bafilomycin A1 and Concanamycin A) inhibits the enzyme activity as well as the migratory ability of highly metastatic cells (23,30). It has been shown that the greatest increase in the invasiveness of tumor cells is the result of two complementary mechanisms: breaking of the cell-matrix interactions that arise because of the acid secretion increment, the protease activity (such as Cathepsin B) and the increased cell motility (11,23,30). The breast cancer cells, through V-ATPases, acidify the extracellular environment in order to facilitate the reabsorption of the extracellular matrix by means of proteases and metastasis (28).

Cell pH is crucial for several biological functions such as cell proliferation, invasion and metastasis, drug resistance and apoptosis. The hypoxic conditions are frequent phenomena during the OSCC development and they cause an intra- and extracellular acidosis. This cellular acidosis seems to be a trigger for apoptosis and allows the endonuclease activation that induces DNA fragmentation. The pH regulators should be over-regulated in the tumor cells in order to avoid intracellular acidification under the above-mentioned conditions (31).

As already mentioned, the tumor microenvironment is essential for the neoplastic progression and the reduction of extracellular pH is one of this microenvironment features. Since V-ATPase is the main proton pump regulator of the cell pH, its involvement in the neoplastic progression should not surprise anyone.

## 3. V-ATPases as protein targeting

Growing scientific evidence suggests a key role of tumor acidic microenvironment in cancer development, in terms of progression and metastasis. Among all regulatory mechanisms of tumor microenvironment, the V-ATPases play a key role due to their inhibition possibility by means of RNA interference techniques and inhibitors of proton pump (39).

Early attempts to block the V-ATPases as a protein targeting date back to 1988, when Moriyama *et al* described the inhibition of V-ATPase activity, through blocking the

Table I. Inhibitors of pH regulators.

<p>A. V-ATPase inhibitors</p> <p>Bafilomycin A1</p> <p>Concanamycin A (Folimycin)/B</p> <p>NEM: N-ethyl-maleimide</p> <p>NBD-Cl: 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole</p> <p>DCCD: N,N0-dicyclohexyl-carbodiimide</p> <p>Destruxin B</p> <p>Salicylilalamide A</p> <p>Lobatamide</p> <p>Oximidine</p> <p>B. NHE inhibitors</p> <p>Guanidine derivatives</p> <p>(i) Benzoylguanidine</p> <p>Cariporide, HOE642: 4-isopropyl-3-methylsulphonylbenzoyl-guanidine methanesulphonate</p> <p>Hoe 694: 3-methylsulfonyl-4-piperidinobenzoyl, guanidine hydrochloride</p> <p>FR183998: 5-(2,5-dichlorothiophen-3-yl)-3-[(2-dimethylaminoethyl)carbamoyl]benzoylguanidine dihydrochloride</p> <p>FR168888: 5-hydroxymethyl-3-(pyrrol-1-yl) benzoylguanidine methanesulfonate</p> <p>EMD 85131: 2-methyl-5-methylsulfonyl-1-(1-pyrrolyl)-benzoylguanidine</p> <p>(ii) Carbonylguanidine</p> <p>Zoniporide or CP-597,396: [1-(Quinolin-5-yl)-5-cyclopropyl-1H-pyrazole-4-carbonyl]guanidine hydrochloride monohydrate</p> <p>TY-12533: 6,7,8,9-tetrahydro-2-methyl-5H-cyclohepta[b]pyridine-3-carbonylguanidine maleate</p> <p>CAS 181048-29-3, MS-31-050: 2-(2-methylphenyl)-5,7-dimethoxy-4-quinolyl carbonylguanidine dihydrochloride</p> <p>CAS 181048-36-2, MS-31-038: 2-phenyl-8-(2-methoxyethoxy)-4-quinolyl carbonylguanidine bismethanesulfonate</p> <p>KB-R9032: N-(4-isopropyl-2,2-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazine-6-carbonyl)guanidine (4b) methanesulfonate salt</p> <p>(iii) Others</p> <p>T-162559: (5E,7S)-[7-(5-fluoro-2-methylphenyl)-4-methyl-7,8-dihydro-5(6H)-quinolinylideneamino] guanidine dimethanesulphonate</p> <p>Amiloride derivatives</p> <p>DMA: 50-(N,N-dimethyl)-amiloride</p> <p>HMA: 5-(N,N-hexamethylene) amiloride</p> <p>MIA: 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride</p> <p>C. Bicarbonate transporter inhibitor</p> <p>Triflozin: 4-(a,a,a-trifluoro-m-toluidino)-nicotinic acid</p> <p>DIDS: 4,40-diisothiocyanato-stilbene-2,20-disulfonic acid</p> <p>SITS: 4-acetamido-40;isothiocyanostilbene-2,20-disulfonic acid</p> <p>S3705</p> <p>D. MCT inhibitors</p> <p>DIDS: 4,40-diisothiocyanato-stilbene-2,20-disulfonic acid</p> <p>a-cyano-4-hydroxycinnamate (a-CHC)</p> <p>p-Chloromercuribenzenesulphonate</p> <p>Diethyl pyrocarbonate</p> <p>Quercetin</p>
--

assembly and reducing H<sup>+</sup> secretory activity, using fusidic acid and suramin (40).

In 2001, Boyd *et al* described a small group of molecules that share a common core of benzyl-lactate-enamide in their structure. These molecules are proton pump inhibitors (PPI) (Table I). The most representative are the following: *salicylamide A*, *lobatamides A-F*, *oxymidines I* and *II*, *bafilomycins* and *canamycins*. Of these, the authors found that the latter two are the most potent V-ATPase inhibitors and even that there is no distinction between mammalian

and non-mammalian V-ATPases. This inhibition causes a reduction in the development of tumor cells and cell lines with oncogenes (41) through programmed cell death (apoptosis) (42). The PPI effect is mediated by a very early production of reactive oxygen species (ROS) that preceded alkalization of lysosomal pH, lysosomal membrane permeabilization, and cytosol acidification, suggesting an early destabilization of the acidic vesicular compartment. Lysosomal alterations were followed by mitochondrial membrane depolarization, release of cytochrome c, chromatin condensation, and caspase

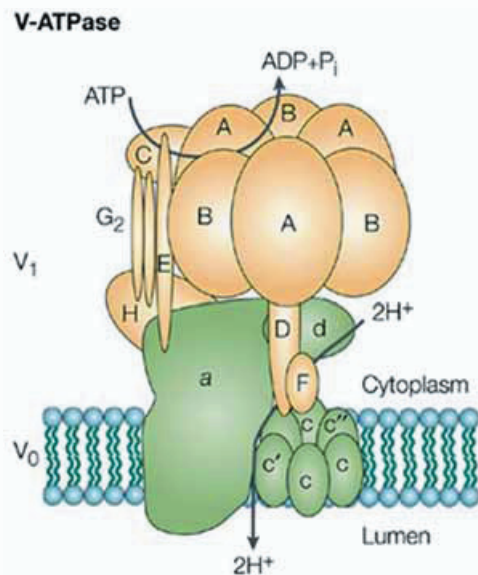


Figure 2. The cytosolic domain V1 (shown in yellow), is composed of three subunits A and three subunits B, two subunits G and one subunit of types C, D, E, F and H. The transmembrane domain V0 (shown in green) is composed of five different subunits: a, c, c', and d. ATP hydrolysis by the peripheral V1 domain drives proton transport through the integral V0 domain from the cytoplasm to the lumen. Modified from Nishi and Forgac (37).

activation (43). It seems that the ROS have a clear effect on oral carcinogenesis (44).

Regarding B-cell lymphomas, the proapoptotic activity of PPI is clearly related to the inhibition of tumor growth (43).

Yoshimoto and Imoto show new roles of V-ATPase inhibitors in tumor cells that overexpress EGFR (epidermal growth factor receptor). The authors find that the V-ATPase inhibitors induce apoptosis in EGFR-stimulated A431 cells (human epidermal carcinoma) with the same dose range that inhibits the V-ATPase activity. However, when cells are not stimulated by EGFR, the inhibitors do not induce apoptosis, while they put a brake on cell growth, independently of the cell cycle (45).

The ATP6L or the C subunit of V0 domain has been determined in recent studies as a possible target in the suppression of metastasis and tumor growth via V-ATPase inhibition, aimed at altering the acid microenvironment of the extracellular matrix, which is necessary for the activity of many MMPs (metalloproteinases) and proteases (23,27,46,47).

Saroussi and Nelson (23) and Ohta *et al* (48) note that V-ATPase C subunit emerges as overexpressed in pancreatic invasive tumors when compared to benign or non-invasive tumors, suggesting that the V-ATPase may have a key role in tumor progression.

However, Otero-Rey *et al* find that ATP6V0C is not overexpressed in OSCC in a statistically significant way, so that blocking this gene does not seem to be very useful in this type of tumors (31).

Lu *et al* demonstrate the ability to slow tumor growth and to suppress distant metastasis in human hepatocellular

carcinoma, by the decrease of proton extrusion and the activity of the gelatinase, via inhibition of C subunit gene (ATP6L) by using RNA interference techniques (47).

It has been shown that the E5 oncoprotein of the bovine papillomavirus binds to the C subunit of V-ATPase V0 domain (49,50), triggering a Golgi alkalization that correlates with cell transformation induced by this protein (51); therefore, blocking the V-ATPase via inhibition of C subunit could suppress the carcinogenic effects of HPV.

It seems that Concanamycin A binds to the C subunit of the V0 (52) domain as well as the Bafilomycin (53). According to Bowman *et al* the mutations in the genomic sequence of the C subunit (four mutations have been found: T32I, F136L, Y143H and Y143N) give the cell the ability to resist Bafilomycin A1.

There are other new specific inhibitors of the V-ATPases, which are already synthesized in the laboratory as the analogues of archazolid A and B (54). The use of the novel NiK12192 V-ATPase inhibitor increases the anti-tumor activity of other chemotherapeutic drugs (23,55). Another study shows the efficacy of FR202126 (a specific V-ATPase inhibitor of osteoclasts) in decreasing the osteolysis in the lung cancer metastasis (56).

However, it seems that none of these inhibitors has been proven useful in the OSCC, so that it is of high importance to carry out further research in order to determine the actual implication of V-ATPases in cancer development and implementation of other inhibitors in the subunits responsible for enzyme assembly (23).

#### 4. Importance of C subunit

V-ATPase is composed of a cytosolic V1 domain and a transmembrane V0 domain. The V1 domain consists of three A and three B subunits, two G subunits as well as a C, D, E, F and H subunit. C subunit is analogue but not homologous to the subunit  $\gamma$  of F-ATPases (Fig. 2). Two alternative transcript variants, ATP6V1C1 and ATP6V1C2, a and b, that encode different isoforms, have been found for this gene. Regarding the ATP6V1C1, it is always expressed in all tissues, while ATP6V1C2a, b are found in lungs, kidneys and epididymis with an actin-binding function (57).

The C subunit is the 40-kDa protein, located in the V1 domain of the V-ATPase. The novel imaging techniques such as SAXS (small angle X-ray scattering) allow describing the structure and morphology of the C subunit and its involvement in the regulation of V-ATPases (58,59).

By means of immune electronic microscopy, we can determine the spatial location and distribution of the various subunits, in this case of the C subunit (60,61). The model proposed by Zhang *et al* coincides with the one proposed by Drory *et al* which stipulates that the crystal structure of the C subunit consists of two globular domains connected by a flexible connection (62) (Fig. 3).

Inoue and Forgac, besides establishing the crystal structure of the C subunit and its importance in the reversible dissociation as a mechanism for monitoring the V-ATPase activity, describe the connection of the latter with the G and E subunit of the V1 domain and the A subunit of the V0 domain, establishing the importance of the C subunit as the highest responsible for the enzyme control (63,64).

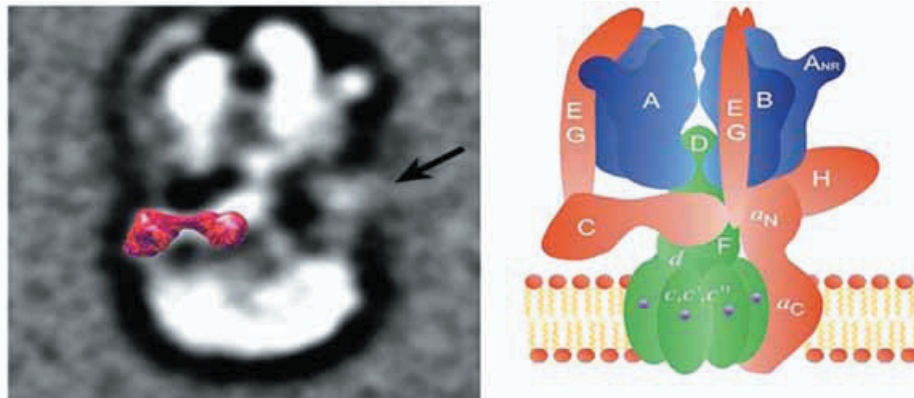


Figure 3. Image of the crystallographic structure of the C subunit and schematic work model. (A) The surface representation of the crystal structure of yeast subunit C is superimposed to match the observed density in the yeast V-ATPase projection. (B) Schematic working model of the subunit arrangement in the yeast V-ATPase. Modified from Zhang *et al* (60).

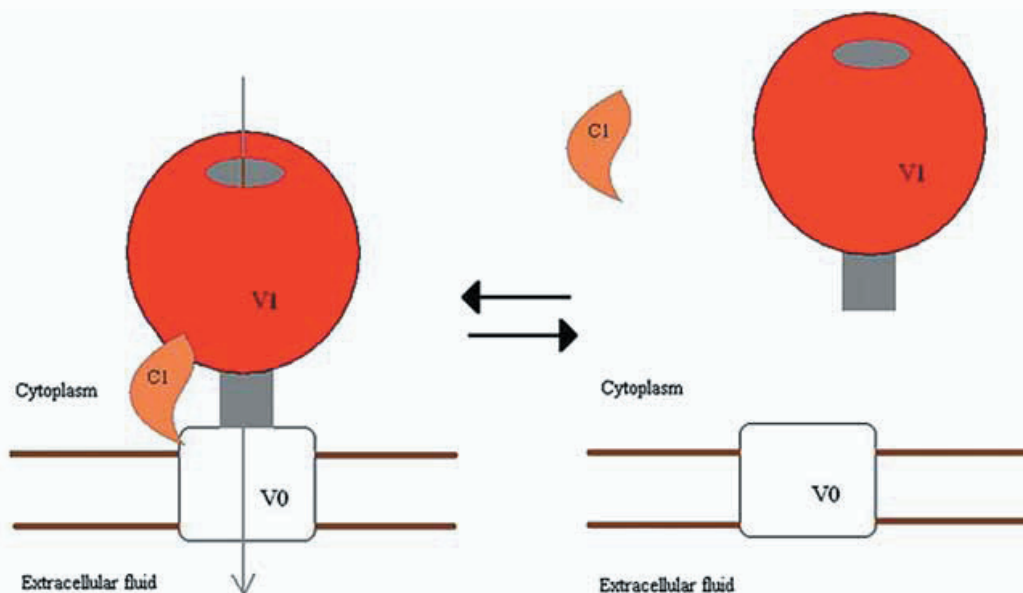


Figure 4. Structural model of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, comprising a membrane component (V0) and a catalytic cytosolic component (V1). Dissociation of the V-ATPase into the V1 and V0 components is regulated by the C1 subunit. Obtained from Otero-Rey (31).

In an experimental model, Peng *et al* show that the C subunit is crucial to proton secretion function of the V-ATPases, since the ATP hydrolysis is blocked without it (65).

To many authors, the most important function of the subunit C is the control of reversible dissociation. According to Grüber *et al* subunit C is intimately involved in the reversible dissociation of the V0 and V1 domains. The nucleotide occupation of this latter and the conformational change in its structure allow such a dissociation (66,67).

At first, Puopolo *et al* assert that during the formation of the complex V1V0, subunit C speeds up the process but it is not essential (68), although these results are discussed in other studies of the same period of time, that defend the hypothesis

of the C subunit as the only regulatory of the dissociative mechanism (69). This theory is supported by Drory *et al* who state that the C subunit is the only responsible for the *in vivo* dissociation of the V-ATPase (62). According to Voss *et al* the C subunit is responsible for producing the dissociation of the V-ATPase in the cytosolic V1 complex and in the membranous V0 complex through interaction with A-kinase protein. It seems that the C subunit serves as a substrate for the A-kinase protein and its phosphorylation may be the main mechanism of forming the active V1V0 holoenzyme (70).

Another mechanism of reversible dissociation regulated by the C subunit is the separation of V1V0 holoenzyme in V1 and V0 subcomplex, which is carried out through binding this

holoenzyme to the F-actin next to the basement membrane of epithelial cells. It seems that the C subunit acts as an anchor protein, allowing the connection between the V-ATPase and the actinic cytoskeleton (32).

In a study of our research group, we have demonstrated the overexpression of the ATP6V1C1 gene in OSCC biopsies. It seems that the C1 subunit of V-ATPases is responsible for allowing the assembly of membranous V0 component and cytosolic catalytic component (31) (Fig. 4). The RAVE complex (V-ATPase regulator and endosomal membranes) is essential for stable assembly of the C subunit of V-ATPase (64,71).

Smardon and Kane found *in vitro* that without the C subunit, the assembly of the two domains occurred, but the V1V0 complex was highly unstable and the activity of the V-ATPase extremely low, suggesting the exclusivity of the C subunit in regulating the complex V1V0 assembly. In the same way, the C subunit is incapable of getting assembled to the V-ATPase without RAVE and therefore, the enzyme activity is lost (71). These data are supported by the study made by Keenan and Kane who find a 48% higher decrease in catalytic activity, without affecting the enzyme assembly in experimental models with different mutations in the gene of the C subunit (72).

Previous studies suggest that the cells that express high levels of C subunit have an increased resistance to chemotherapeutic agents, so they may be a possible target in anticancer therapy (73).

Murakami *et al* found an overexpression of the ATP6C gene or C subunit in the cisplatin-resistant tumors, a logical fact given the V-ATPase increased number and activity in cases of chemoresistance and the importance of this subunit in the regulation of the pump (74).

## 5. Conclusions

Cell pH is crucial for several biological functions such as cell proliferation, invasion and metastasis, drug resistance and apoptosis. The hypoxic conditions are frequent phenomena during the development of oral cancer and trigger an intra- and extracellular acidosis. This cellular acidosis seems to be mainly controlled by the V-ATPases, which are clearly involved in cell transformation, carcinogenesis and metastasis.

The inhibition of V-ATPase with PPIS allows the anticancer drugs to enter and act within the tumor cells, causing apoptotic mechanisms that lead to the inhibition of tumor growth.

The involvement of the C subunit of the V1 domain in the enzymatic function of the V-ATPases, highlights the need for further research of specific inhibitors of the above-mentioned subunit in order to control the disastrous consequences of cancer.

## References

- Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ and Hendrix MJ: Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 14: 176-186, 1996.
- Raghuand N, Mahoney B, van Sluis R, Baggett B and Gillies RJ: Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone. *Neoplasia* 3: 227-235, 2001.
- Morita T, Nagaki T, Fukuda I and Okumura K: Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res* 268: 297-305, 1992.
- De Milito A and Fais S: Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance. *Expert Opin Pharmacother* 6: 1049-1054, 2005.
- Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, *et al.*: Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 29: 541-549, 2003.
- Torigoe T, Izumi H, Ise T, Murakami T, Uramoto H and Ishiguchi H: Vacuolar H(+)-ATPase: functional mechanisms and potential as a target for cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 13: 237-243, 2002.
- Gillies RJ, Raghuand N, Karczmar GS and Bhujwala ZM: MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 16: 430-450, 2002.
- Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I and Poignee M: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 14: 2185-2197, 2000.
- Juel C: Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev* 77: 321-358, 1997.
- Raghuand N and Gillies RJ: pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat* 3: 39-47, 2000.
- Cardone RA, Casavola V and Reshkin SJ: The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 5: 786-795, 2005.
- Sennoune SR, Luo D and Martinez-Zaguilan R: Plasmalemmal vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in cancer biology. *Cell Biochem Biophys* 40: 185-206, 2004.
- Hagag N, Lacal JC, Graber M, Aaronson S and Viola MV: Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol Cell Biol* 7: 1984-1988, 1987.
- Ober SS and Pardee AB: Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2766-2770, 1987.
- Reshkin SJ, Bellizzi A, Albarani V, Guerra L, Tommasino M and Paradiso A: Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange, motility, and invasion induced by serum deprivation. *J Biol Chem* 275: 5361-5369, 2000.
- Siczkowski M, Davies JE and Ng LL: Activity and density of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in normal and transformed human lymphocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 267: C745-C752, 1994.
- Doppler W, Jaggi R and Groner B: Induction of v-mos and activated Ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalisation and cell-cycle progression. *Gene* 54: 147-153, 1987.
- Pouyssegur J, Franchi A and Pages G: pHi, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found Symp* 240: 186-196, 2001.
- Newell K, Franchi A, Pouyssegur J and Tannock I: Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1127-1131, 1993.
- Yamagata M, Hasuda K, Stamato T and Tannock IF: The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* 77: 1726-1731, 1998.
- De Milito A and Fais S: Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol* 1: 779-786, 2005.
- Nelson N and Harvey WR: Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 79: 361-385, 1999.
- Saroussi S and Nelson N: Vacuolar H(+)-ATPase-an enzyme for all seasons. *Pflugers Arch* 457: 581-587, 2009.
- Martinez-Zaguilan R, Lynch RM, Martinez GM and Gillies RJ: Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 265: C1015-C1029, 1993.
- McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA and Cala PM: Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C676-C688, 2000.
- Perona R and Serrano R: Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* 334: 438-440, 1988.

27. Sennoune SR and Martinez-Zaguilan R: Plasmalemmal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases in angiogenesis, diabetes and cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39: 427-433, 2007.
28. Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I and Rochefort H: Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* 15: 382-392, 1997.
29. Parkins CS, Stratford MR, Dennis MF, Stubbs M and Chaplin DJ: The relationship between extracellular lactate and tumour pH in a murine tumour model of ischaemia-reperfusion. *Br J Cancer* 75: 319-323, 1997.
30. Sennoune SR, Bakunts K, Martinez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, *et al*: Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1443-C1452, 2004.
31. Otero-Rey EM, Somoza-Martin M, Barros-Angueira F and Garcia-Garcia A: Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via over-expression of the ATP6V1C1 gene. *Oral Oncol* 44: 193-199, 2008.
32. Vitavska O, Wieczorek H and Merzendorfer H: A novel role for subunit C in mediating binding of the H<sup>+</sup>-V-ATPase to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 278: 18499-18505, 2003.
33. Izumi H, Ise T, Murakami T, Torigoe T, Ishiguchi H and Uramoto H: Structural and functional characterization of two human V-ATPase subunit gene promoters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1628: 97-104, 2003.
34. Orive G, Reshkin SJ, Harguindey S and Pedraz JL: Hydrogen ion dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in cancer angiogenesis and antiangiogenesis. *Br J Cancer* 89: 1395-1399, 2003.
35. Rojas JD, Sennoune SR, Maiti D, Bakunts K, Reuveni M, Sanka SC, *et al*: Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPases at the plasma membrane regulate pH and cell migration in microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1147-H1157, 2006.
36. Martinez-Zaguilan R, Raghunand N, Lynch RM, Bellamy W, Martinez GM and Rojas B: pH and drug resistance. I. functional expression of plasmalemmal V-type H<sup>+</sup>-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol* 57: 1037-1046, 1999.
37. Nishi T and Forgac M: The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases-nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 94-103, 2002.
38. Nelson N, Perzov N, Cohen A, Hagai K, Padler V and Nelson H: The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J Exp Biol* 203: 89-95, 2000.
39. Fais S, De Milito A, You H and Qin W: Targeting vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Res* 67: 10627-10630, 2007.
40. Moriyama Y and Nelson N: Inhibition of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases by fusidic acid and suramin. *FEBS Lett* 234: 383-386, 1988.
41. Boyd MR, Farina C, Belfiore P, Gagliardi S, Kim JW and Hayakawa Y: Discovery of a novel antitumor benzolactone enamide class that selectively inhibits mammalian vacuolar-type (H<sup>+</sup>)-ATPases. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 114-120, 2001.
42. Nishihara T, Akifusa S, Koseki T, Kato S, Muro M and Hanada N: Specific inhibitors of vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPases induce apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 255-262, 1995.
43. De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M and Marino ML: Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res* 67: 5408-5417, 2007.
44. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A and Nagler RM: Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 109: 54-59, 2007.
45. Yoshimoto Y and Imoto M: Induction of EGF-dependent apoptosis by vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase inhibitors in A431 cells overexpressing the EGF receptor. *Exp Cell Res* 279: 118-127, 2002.
46. Germanov E, Berman JN and Guernsey DL: Current and future approaches for the therapeutic targeting of metastasis (review). *Int J Mol Med* 18: 1025-1036, 2006.
47. Lu X, Qin W, Li J, Tan N, Pan D, Zhang H, *et al*: The growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma xenografts are inhibited by small interfering RNA targeting to the subunit ATP6L of proton pump. *Cancer Res* 65: 6843-6849, 2005.
48. Ohta T, Numata M, Yagishita H, Futagami F, Tsukioka Y and Kitagawa H: Expression of 16 kDa proteolipid of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 73: 1511-1517, 1996.
49. Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T, McLean P, Smith K and Bubb V: Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. *Nature* 352: 347-349, 1991.
50. Andresson T, Sparkowski J, Goldstein DJ and Schlegel R: Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase mutants transform cells and define a binding site for the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Biol Chem* 270: 6830-6837, 1995.
51. Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Supryniewicz F, Schlegel R and Grinstein S: Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol* 148: 305-315, 2000.
52. Huss M, Ingenhorst G, Konig S, Gassel M, Drose S, Zeeck A, *et al*: Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *J Biol Chem* 277: 40544-40548, 2002.
53. Fernandes F, Loura LM, Fedorov A, Dixon N, Kee TP and Prieto M: Binding assays of inhibitors towards selected V-ATPase domains. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1777-1786, 2006.
54. Menche D, Hassfeld J, Sasse F, Huss M and Wieczorek H: Design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues of archazolid: a highly potent simplified V-ATPase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 1732-1735, 2007.
55. Petrangolini G, Supino R, Pratesi G, Bo LD, Tortoreto M and Croce AC: Effect of a novel vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor on cell and tumor response to camptothecins. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 939-946, 2006.
56. Niikura K: Effect of a V-ATPase inhibitor, FR202126, in syngeneic mouse model of experimental bone metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 60: 555-562, 2007.
57. Smith AN, Borthwick KJ and Karet FE: Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 297: 169-177, 2002.
58. Svergun DI, Konrad S, Huss M, Koch MH, Wieczorek H and Altendorf K: Quaternary structure of V1 and F1 ATPase: significance of structural homologies and diversities. *Biochemistry* 37: 17659-17663, 1998.
59. Armbruster A, Svergun DI, Coskun U, Juliano S, Bailer SM and Gruber G: Structural analysis of the stalk subunit Vma5p of the yeast V-ATPase in solution. *FEBS Lett* 570: 119-125, 2004.
60. Zhang Z, Inoue T, Forgac M and Wilkens S: Localization of subunit C (Vma5p) in the yeast vacuolar ATPase by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett* 580: 2006-2010, 2006.
61. Chaban YL, Juliano S, Boekema EJ and Gruber G: Interaction between subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar ATPase and the stalk of the C-depleted V(1) ATPase from *Manduca sexta* midgut. *Biochim Biophys Acta* 1708: 196-200, 2005.
62. Drory O, Frolow F and Nelson N: Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function. *EMBO Rep* 5: 1148-1152, 2004.
63. Inoue T and Forgac M: Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V1 domain and subunit a of the V0 domain. *J Biol Chem* 280: 27896-27903, 2005.
64. Forgac M: Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 917-929, 2007.
65. Peng S, Stone D and Xie X: Reconstitution of recombinant 40-kDa subunit of the clathrin-coated vesicle H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 268: 23519-23523, 1993.
66. Gruber G: Structural features and nucleotide-binding capability of the C subunit are integral to the regulation of the eukaryotic V1Vo ATPases. *Biochem Soc Trans* 33: 883-885, 2005.
67. Armbruster A, Hohn C, Hermesdorf A, Schumacher K, Borsch M and Gruber G: Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding. *FEBS Lett* 579: 1961-1967, 2005.
68. Puopolo K, Sczekan M, Magner R and Forgac M: The 40-kDa subunit enhances but is not required for activity of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem* 267: 5171-5176, 1992.
69. Beltran C, Kopecky J, Pan YC, Nelson H and Nelson N: Cloning and mutational analysis of the gene encoding subunit C of yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 267: 774-779, 1992.

70. Voss M, Vitavska O, Walz B, Wieczorek H and Baumann O: Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H(+)-ATPase by protein kinase A. *J Biol Chem* 282: 33735-33742, 2007.
71. Smardon AM and Kane PM: RAVE is essential for the efficient assembly of the C subunit with the vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 282: 26185-26194, 2007.
72. Keenan Curtis K and Kane PM: Novel vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase complexes resulting from overproduction of Vma5p and Vma13p. *J Biol Chem* 277: 2716-2724, 2002.
73. Ma L and Center MS: The gene encoding vacuolar H(+)-ATPase subunit C is overexpressed in multidrug-resistant HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 675-681, 1992.
74. Murakami T, Shibuya I, Ise T, Chen ZS, Akiyama S and Nakagawa M: Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular PH in cisplatin resistance. *Int J Cancer* 93: 869-874, 2001.
75. Bowman *et al* (page 4)
76. Muñoz M, 2008 (Figure 1, legend)

# Measurement of ATP6V1C1 expression in brush cytology samples as a diagnostic and prognostic marker in oral squamous cell carcinoma

Mario Pérez-Sayáns,<sup>1,\*</sup> María Dolores Reboiras-López,<sup>1</sup> José Manuel Somoza-Martín,<sup>1</sup> Francisco Barros-Angueira,<sup>2</sup> Pilar Gayoso Diz,<sup>3</sup> José Manuel Gándara Rey<sup>1</sup> and Abel García-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit; Faculty of Medicine and Dentistry; Entrerrios s/n; Santiago de Compostela, Spain; <sup>2</sup>Unity of Molecular Medicine; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica; Edificio de Consultas planta-2; Hospital Clínico Universitario; Santiago de Compostela, Spain; <sup>3</sup>Department of Clinical Epidemiology; Edificio de Consultas planta 0, 15706; Complejo Hospitalario Universitario de Santiago; Santiago de Compostela, Spain

**Key words:** *ATP6V1C1*, oral squamous cell carcinoma, brush cytology, real-time quantitative polymerase chain reaction, ROC, diagnostic marker, metastasis

**Abbreviations:** *ATP6V1C1*, ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal 42 kDa, V1 subunit C, isoform 1; OSCC, oral squamous cell carcinoma; ROC, receiver operating characteristic

**Background:** Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity. Brush cytology has reemerged as a molecular tool for diagnosing this cancer. *ATP6V1C1*, one of the main genes regulating V-ATPase activity, has been implicated in metastasis and multiple drug resistance. The aim of this study was to measure *ATP6V1C1* expression levels in OSCC and to evaluate the value of this test in the diagnosis and prognosis of OSCC.

**Results:** The differences in *ATP6V1C1* expression between patients and controls were statistically significant (Mann-Whitney U test = 26,  $p < 0.001$ ). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed an area under the curve of 0.9476, with the following diagnostic indices: sensitivity, 81.25%, specificity, 93.75%; accuracy, 87.50%; positive predictive value, 92.86%; negative predictive value, 83.33%; positive likelihood ratio, 30; and negative likelihood ratio, 0.06.

**Material and methods:** Patients with OSCC and a control group of healthy individuals were studied. The clinical and demographic variables analyzed included age, sex, smoking, tumor location and tumor stage. Brush cytology samples were obtained using a cytology brush and analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction for *ATP6V1C1* expression.

**Conclusions:** It was confirmed that *ATP6V1C1* levels were significantly higher in patients with OSCC than in healthy controls, with expression increasing with higher tumor stage. ROC analysis showed that the measurement of *ATP6V1C1* expression levels is a highly sensitive and specific diagnostic method.

## Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity. Accounting for between 90% and 95% of all malignant lesions of the mouth, OSCC has become practically synonymous with oral cancer. Although diagnosis is based on pathology findings, the use of molecular analysis to search for early malignant changes in the oral mucosa or identify certain aspects of tumor behavior such as invasive capacity or metastasis is becoming increasingly common.<sup>1,2</sup>

Although the TNM cancer staging system includes important prognostic factors, it cannot be used to accurately predict the biologic properties of tumors and is therefore of little value in guiding treatment strategies based on the biologic behavior of tumors.<sup>3</sup> The ultimate goal when evaluating disease should be to

provide as accurate a prognosis as possible and, where possible, to establish a diagnosis in the early stages of disease.<sup>4,5</sup>

While traditional cytological examination of oral lesions is labor intensive and requires extensive experience to identify and evaluate cells with suspect morphologic features, the analysis of molecular alterations with a view to detecting specific gene abnormalities is based on objective analysis.<sup>6</sup> Brush cytology, for example, is a quick, simple and painless technique that can be used to detect early-stage cancer lesions.<sup>7-10</sup>

The main characteristics of OSCC, a solid tumor, are acidity and hypoxia, both of which have been implicated in tumor metastasis,<sup>11</sup> sensitivity to chemotherapy agents,<sup>12,13</sup> and proliferation.<sup>14</sup>

Cytosolic pH appears to be strictly regulated by 4 mechanisms: sodium/proton exchangers (NHEs), bicarbonate transporters

\*Correspondence to: Mario Pérez-Sayáns; Email: perezsayans@gmail.com  
Submitted: 02/23/10; Revised: 03/23/10; Accepted: 03/25/10  
Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/cbt/article/11880

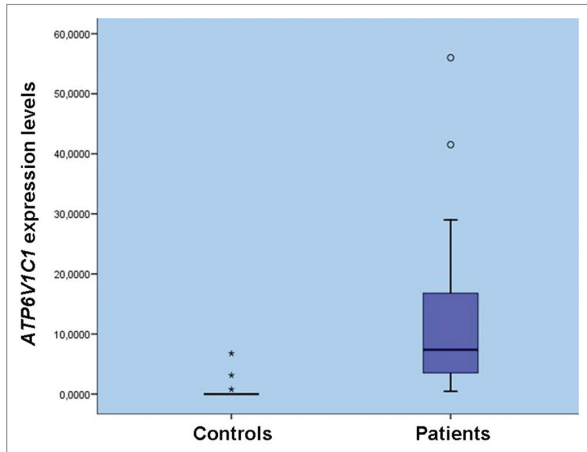


Figure 1. *ATP6V1C1* expression levels in patients and controls.

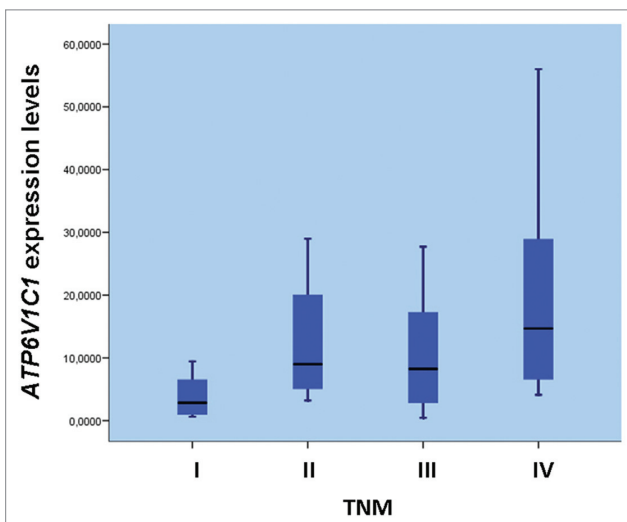


Figure 2. *ATP6V1C1* expression levels according to tumor stage.

(BCTs), monocarboxylate transporters (MCTs) and proton pumps (ATPases).<sup>15,16</sup> Lactate production has commonly been considered to be the main mechanism underlying the acidification of the tumor microenvironment.<sup>17</sup> Nonetheless, solid tumors such as OSCC are capable of creating an acidic environment, even in conditions of limited lactate production.<sup>18,19</sup> To survive in this microenvironment, tumor cells need a cytosolic pH regulation system to help protect themselves from harmful H<sup>+</sup> ions. This may explain why V-ATPases, which are normally located in acidic organelles, may also reside on the cell surface, where they regulate pH and increase the migratory capacity of metastatic cells.<sup>20-22</sup>

V-ATPase is composed of a cytosolic V1 domain and a transmembrane V0 domain. The former consists of 3 A subunits,

2 B subunits, 2 G subunits, and 1 C, D, E, F and H subunit. Two alternative transcript variants encoding different isoforms have been found in the gene that controls the expression of the C subunit: *ATP6V1C1* and *ATP6V1C2a,b*. While *ATP6V1C1* is expressed continuously in all tissues, *ATP6V1C2a,b* is found only in the lungs, kidneys and epididymis, where it has an actin-binding function.<sup>23,24</sup>

The C subunit is a 40-kDa protein located in the V1 domain of V-ATPase.<sup>25-29</sup> This subunit, which is essential for the proton secretion function of V-ATPases<sup>30</sup> is intimately involved in the reversible dissociation of the V1 and V0 domains<sup>31-33</sup> and is considered to be solely responsible for regulating the dissociative mechanism of the enzyme.<sup>34,35</sup>

The present study is a follow-up of previous work by our group analyzing differential gene expression in OSCC and normal oral mucosa cells using DNA microarray analysis of biopsy samples.<sup>36</sup> Of 322 genes found to be overexpressed in tumor tissue compared to normal tissue, we observed, using real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), that *ATP6V1C1* was overexpressed in 100% of OSCC samples.<sup>24</sup> In view of the important biological functions of this gene, we wished to measure *ATP6V1C1* levels in brush cytology OSCC samples and assess their value as tumor diagnostic and prognostic markers.

## Results

**Descriptive analysis.** The mean (SD) age of the members of the OSCC group was 65.69 (12.01) years (range, 44 to 81 years); 75% were men and 25% women. Fifty percent of the group were smokers, 37.5% were non-smokers, and 12.5% were ex-smokers. Sixteen patients had primary intraoral tumors located on the tongue (31.3%), on the gums (25%), on the cheek (12.5%), on the floor of the mouth (18.8%), and in the retromolar trigone (12.5%). At the time of diagnosis, 25% of patients had stage I disease, 12.5% had stage II disease, 31.3% had stage III disease, and 31.3% had stage IV disease.

The mean (SD) age of the control group was 26.88 (3.37) years (range, 24–34 years); 25% were men and 75% were women. Less than half of the group (43.8%) were smokers, 56.25% were non-smokers, and there were no ex-smokers.

**Analysis of associations between clinical and demographic characteristics.** There were a majority of men (75%) in the OSCC group and a majority of women (75%) in the control group. This difference was statistically significant (Pearson chi-square = 16.00,  $p < 0.001$ ). No statistically significant differences were found for any of the other clinical associations studied.

**qRT-PCR analysis of *ATP6V1C1* expression.** *Distribution of expression levels.* Mean (SD) *ATP6V1C1* expression was 12.14 (12.88) (range, 0.46–56.01) in the OSCC group and 0.33 (1.3) (range, 0–6.77) in the control group. This difference was statistically significant (Mann-Whitney U test = 26,  $p < 0.001$ ) (Fig. 1).

*ATP6V1C1* expression levels increased with higher tumor stage (Fig. 2). The mean (SD) expression was 3.85 (3.36) (range, 0.63–9.43) for stage I tumors; 12.55 (11.42) (range, 3.21–29.00) for stage II tumors; 10.69 (9.58) (range, 0.46–27.71) for stage III tumors; and 20.08 (17.15) (range, 4.13–56.01) for stage IV tumors.

No statistically significant associations were detected between *ATP6V1C1* levels and sex, tumor location or smoking.

**Diagnostic yield analysis.** As described in the materials and methods section, ROC curve analysis was used to determine the ability of *ATP6V1C1* levels to discriminate between healthy individuals and patients with OSCC. The AUC was 0.9746, which indicates the high diagnostic yield of measuring *ATP6V1C1* expression in such cases (Fig. 3).

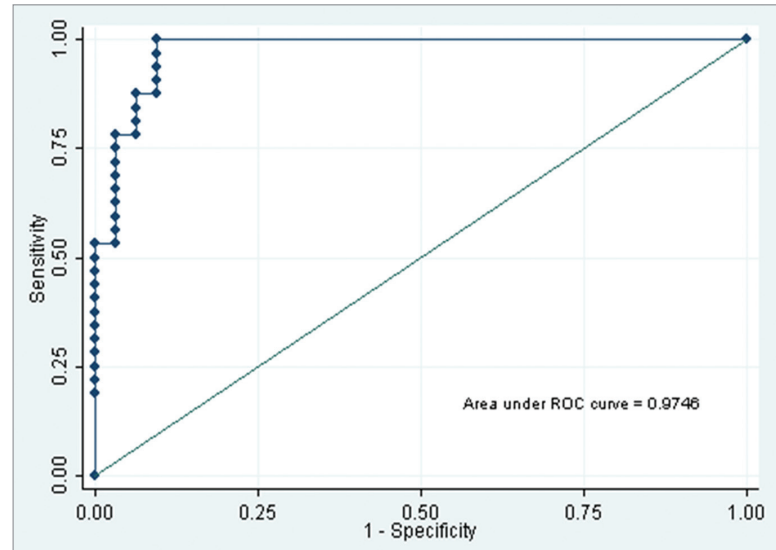
Figure 4 shows the cutoff for *ATP6V1C1* expression in relation to the sensitivity and specificity values at these points.

As can be seen in Table 1, for a cutoff of 0.218, both sensitivity and specificity were 90.63%. Nonetheless, for the same cutoff, there was a high rate of false positives, an important consideration given that the test would be performed in clinical settings in individuals with potentially malignant lesions. We also calculated the likelihood ratios for each cutoff to analyze the discriminative ability of the test. For an *ATP6V1C1* expression cutoff of 0.5, which had a sensitivity of 81.5% and a specificity of 93.7%, the LR<sup>+</sup> and LR<sup>-</sup> levels were 30 and 0.06, respectively.

Logistic regression analysis was used to analyze the diagnostic yield of measuring *ATP6V1C1* levels to discriminate between patients with OSCC and healthy individuals. We also analyzed whether diagnostic yield improved with the inclusion of other variables in the model. Specifically, we added sex and smoking to the baseline model, which included *ATP6V1C1* only.

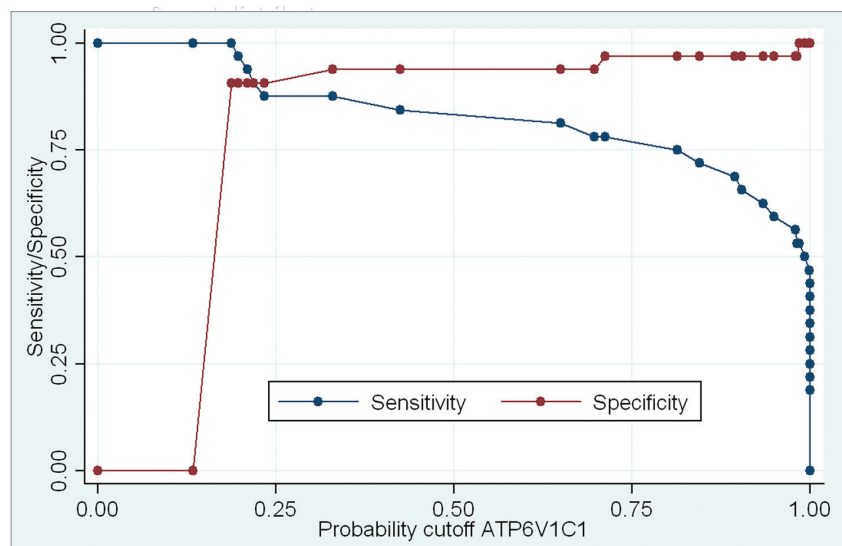
The diagnostic yield values for a cutoff of 0.5 for the baseline model are shown in Table 2.

The results for the model including *ATP6V1C1* expression and smoking are shown in Table 3. As can be seen, both test validity and diagnostic accuracy increased, as did overall



**Figure 3.** Receiver operating characteristic curve showing sensitivity versus inverse of specificity. The optimal values are close to 1 for sensitivity and close to 0 for the inverse of specificity. The closer to 1 the area under the curve (AUC) value is, the greater the suitability of the test for the purpose studied. In our case, the AUC was 0.9746, clearly indicating that the measurement of *ATP6V1C1* expression is an effective manner of discriminating between healthy individuals and patients with OSCC.

©2010 Landes Bioscience.



**Figure 4.** Graph showing sensitivity values (blue line) and specificity values (red line) for *ATP6V1C1* expression cutoffs.

diagnostic yield (accuracy of 95.31 compared to 87.50 in the baseline model).

The likelihood ratios based on the model incorporating *ATP6V1C1* and smoking were LR<sup>+</sup> = 30 and LR<sup>-</sup> = 0.06. In

**Table 1.** Sensitivity and specificity values for different *ATP6V1C1* expression cutoffs

<i>ATP6V1C1</i> expression	Sensitivity	Specificity	LR <sup>+</sup>	LR <sup>-</sup>
0.813002	0.750000	0.968750	23.44	0.26
0.696819	0.781250	0.937500	12.45	0.23
0.711953	0.781250	0.968750	24.41	0.23
0.500000	0.812500	0.937500	30	0.06
0.329883	0.875000	0.937500	14	0.13
0.233310	0.875000	0.906250	9.33	0.14
0.218178	0.906250	0.906250	9.66	0.16

**Table 2.** Diagnostic yield values based on *ATP6V1C1* expression only, with a cutoff of 0.5 for a sample to be considered OSCC

Diagnostic yield	Values %
Sensitivity	81.25
Specificity	93.75
Positive Predictive Value (PPV)	92.86
Negative Predictive Value (NPV)	83.33
<b>Accuracy</b>	<b>87.50</b>

**Table 3.** Diagnostic yield values based on *ATP6V1C1* expression and smoking, with a cutoff of 0.5 for a sample to be considered OSCC

Diagnostic yield	Values %
Sensitivity	93.75
Specificity	96.88
Positive Predictive Value (PPV)	96.77
Negative Predictive Value (NPV)	93.44
<b>Accuracy</b>	<b>95.31</b>

other words, a clinician would be 30 times as likely to diagnose a patient with a positive result as OSCC positive than as OSCC negative. By contrast, a clinician would only be 0.06 times as likely to diagnose a patient with a negative result as OSCC positive than as OSCC negative.

### Discussion

It was recently shown that RNA could be extracted from cells obtained by brush cytology and proposed that this method would be useful in the early diagnosis of premalignant and cancerous oral lesions.<sup>37,38</sup> While the analysis of RNA in saliva offers advantages in that samples are easy to obtain, it does not provide a direct measure of gene expression in tissue.<sup>39,40</sup> The saliva analysis test measures extracellularly stable RNA via the identification of disease markers but sheds no light on possible causes.<sup>41</sup> The analysis of RNA obtained from brush cytology specimens, in contrast, can be used to isolate live cells from sites with a risk of disease. Early changes that characterize disease progression that affect gene expression can thus be detected using a minimally invasive technique.<sup>42</sup> Spivack et al.<sup>43</sup> concluded that RNA

obtained by brush cytology was of value in determining susceptibility to cancer in healthy populations, detecting markers in the early stages of carcinogenesis, and evaluating the efficacy or toxicity of chemopreventive or chemotherapeutic agents via the analysis of gene expression in cytology samples.

The only statistically significant association we detected for the presence of disease in the study group was male sex. Nonetheless, no statistical inferences can be drawn regarding epidemiological or sociodemographic data given the small sample size.

*ATP6V1C1* levels were significantly higher in the OSCC group than in the control group, confirming the main hypothesis of this study. Levels were also significantly higher in advanced-stage tumors (stages III and IV) than in early-stage ones (stages I and II). The increase in expression levels grew with increasing tumor stage, a finding consistent with the idea that tumors with lower levels of differentiation have lower pH values, obliging cells to express higher levels of V-ATPase in order to survive in the acidic microenvironment.<sup>22,44</sup>

We found that *ATP6V1C1* levels in brush cytology samples from patients with OSCC were significantly higher than in oral mucosa samples from healthy individuals. It is difficult to compare our findings with others as no studies to date have analyzed *ATP6V1C1* levels in OSCC let alone in brush cytology samples. Just a few studies have analyzed OSCC using microarrays containing cDNA sequences for *ATP6V1C1*,<sup>45-47</sup> but none of these validated their results.

The tests performed to examine diagnostic yield (sensitivity, specificity, predictive values and likelihood ratios) all confirmed that the measurement of *ATP6V1C1* levels was an effective method for distinguishing between patients with OSCC and healthy individuals. The improved results obtained when smoking was included in the logistic regression model indicates that tobacco influences OSCC and probably transcript levels. We believe that this preliminary study is a necessary step towards advancing knowledge on strategies to not only differentiate OSCC samples from healthy oral mucosa samples, but also to distinguish OSCC from precancerous lesions such as leukoplakia, erythroplasia or erosive lichen planus.

In order to present our results within a relevant context, thus, we have performed a review of the literature regarding the important role played by V-ATPases, and the C1 subunit in particular, in solid tumors in terms of pH control, multiple drug resistance (MDR), and the possible therapeutic applications associated with the use of specific V-ATPase inhibitors.

**Role of V-ATPases in the control of pH and metastasis.** Extracellular pH in patients with OSCC is slightly acidic (around 6.8–7.0), as has been previously described for solid tumors in animal models. Becelli et al.<sup>48</sup> found that reversed pH gradient was directly related to resistance to chemotherapy agents. To survive in this microenvironment, tumor cells need to be able to regulate cytosolic pH. This may explain why V-ATPases, which are normally located in acidic organelles, may also reside on the cell surface, where they regulate pH and increase the migratory capacity of metastatic cells.<sup>22,44</sup> This is accompanied by a parallel increase in intracellular pH in addition to an increase in DNA synthesis,<sup>49-51</sup> cell cycle progression,<sup>52-54</sup> serum- and substrate-

independent growth<sup>49</sup> and in vivo tumor growth,<sup>49,55</sup> leading to a pathological increase and a disruption in cell density and number. Such an environment increases the invasive capacity of the tumor and the expression of growth and angiogenic factors/receptors, and promotes the transition to a more aggressive, metastatic phenotype.<sup>56</sup>

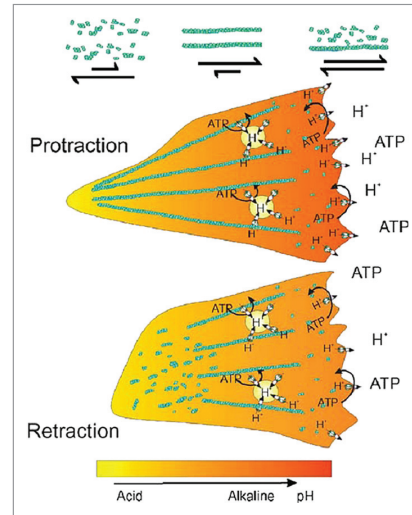
Many tumor cells secrete lysosomal enzymes that participate in the degradation of the extracellular matrix required for metastatic invasion. These enzymes have a low optimal pH and it is V-ATPases that are responsible for acidifying the microenvironment.<sup>58,59</sup> To become metastatically competent, cells must acquire motility and an invasive phenotype.<sup>56,57</sup> A reduction in extracellular pH in the tumor microenvironment has been seen to increase tumor cell motility through the formation of pseudopodia, leading to more invasive cell migration. In metastatic cells, this extracellular acidification also induces an increase in the number and length of pseudopodia,<sup>60</sup> which project in the direction of movement of the tumor cells, i.e., towards the circulatory capillaries<sup>61</sup> (Fig. 5).

**Chemoresistance.** Resistance to chemotherapy agents is one of the main reasons for treatment failure in patients with cancer, and multidrug resistance (MDR) occurs in many types of tumors. The main mechanism that gives rise to the MDR phenotype is the overexpression of drug efflux transporters such as the P glycoprotein (Pgp) in the plasma membrane. While a clear association has been established between MDR and Pgp expression in some tumors, the mechanism by which drug resistance occurs within the multistep process of OSCC has not yet been fully elucidated.<sup>62</sup> Several genes have been implicated in MDR, including *MDR1*, *MRP*, *GST- $\pi$*  and *DNA topoisomerase II*. Nonetheless, it has been hypothesized that hypoxia and acidity may contribute to the transition from benign to malignant growth, inducing the selection of tumor cells capable of surviving in an acidic, oxygen-deprived environment. Acidity, for example, has been associated with chemotherapy resistance,<sup>12</sup> proliferation<sup>14</sup> and metastatic behavior.<sup>11</sup> Indeed, alteration of the pH gradient between the extracellular environment and the cell cytoplasm has been suggested as a possible mechanism of resistance to cytotoxic drugs.<sup>13</sup>

Recent studies have suggested that V-ATPases, may play a key role in the acidification of the tumor environment. Several human tumor cells are characterized by increased V-ATPase expression and activity, and pretreatment with proton pump inhibitors (PPIs) has been found to sensitize tumor cell lines to the effect of different chemotherapy drugs.<sup>13,63-65</sup>

It is also known that low pH levels are suitable for the complete activation of PPIs,<sup>66</sup> suggesting that tumor alkalization may be an extremely interesting target for future anticancer treatments.<sup>13,63,64</sup>

There is scientific evidence that suggests that the acidic tumor microenvironment holds the key to cancer management in terms of disease progression and metastasis. Of all the mechanisms that regulate this microenvironment, V-ATPases are key targets as they can be inhibited by RNA interference and PPIs. While there are many pH regulator inhibitors, V-ATPase inhibitors have proven to be the most efficient as V-ATPases are the main regulators of pH.<sup>20,22,62</sup> Specific V-ATPase inhibitors such as concanamycin



**Figure 5.** Proposed mechanism by which overexpression of pmV-ATPase at the leading edge of the cell modulates cell migration/invasion. The proposed model should be viewed as a framework to explain how pmV-ATPases determine the acquisition of an invasive phenotype needed for angiogenesis and metastasis. Changes in pH<sub>cyt</sub> are critical for establishing cell polarity needed for cell movement. A critical step in directed motility and migration is the asymmetric actin polymerization at the leading edge. Increase in pH<sub>cyt</sub> promotes recruitment of cofilin and dynamic actin remodeling at the leading edge of migratory cells. Therefore, the pH<sub>cyt</sub> fluctuations that are needed to control dynamic assembly/disassembly of microtubules/microfilaments will allow protrusion at the leading edge and retraction at the lagging edge by changing the rigidity of the cytoskeleton structure favoring the sol-gel transition. Also, the high density of pmV-ATPase at the leading migratory edge in invasive cells suggests that there is increased acidity at the extracellular milieu via pmV-ATPase. This acid release provides an optimum extracellular environment for proteases to degrade the extracellular matrix and therefore allow cell invasion.<sup>60</sup>

and bafilomycins are other candidates for investigation, not only to treat cancer but also to reduce MDR in tumors.<sup>20</sup>

## Materials and Methods

**Patient selection and clinical data.** The study group consisted of 16 patients histopathologically diagnosed with OSCC at the maxillofacial surgery department of the Complejo Hospitalario Universitario in Santiago de Compostela, Spain. None of the group had received previous chemotherapy or radiotherapy.

The control group was formed by 16 volunteers, all students at the faculty of medicine and dentistry at the University of Santiago de Compostela. A clinical history was obtained in all cases and the oral cavity examined to check for the absence of disease. Individuals with systemic or oral cavity disease were excluded.

The following information was collected from the participants' clinical histories: age; sex; smoking (defined by 4 categories: those who had been smoking for more than 5 years; those who had quit smoking in the last 10 years; those who had quit smoking over 10 years ago; and those who had never smoked);

tumor site (mobile portion of tongue, base of tongue, gum, floor of mouth, cheek and retromolar trigone); tumor stage (according to the fifth edition of the American Joint Committee on Cancer's Cancer Staging Manual).

The present study was approved by the clinical research ethics committee of Galicia, Spain. All the participants were informed of the nature of the study and signed the corresponding informed consent form. No identifying data were recorded, thus guaranteeing the anonymity of participants.

**Sample collection.** A cytological sample was taken by the same person from all participants (both patients and controls) for molecular analysis of *ATP6V1C1* expression. In the control group, the samples were taken by vigorous brushing (10–15 rotations) of the jugal mucosa using a cytology brush (Cytobrush; Medscand Medical, Madrid, Spain). In the OSCC group, the samples were also taken using the Cytobrush but directly from the lesion. Local anesthesia was not required and none of the patients reported any discomfort during the procedure.

**Processing of samples.** The brush cytology samples were used for the molecular (RNA) study. RPMI-1640 medium (Microvet, Madrid, Spain), which is designed to maintain numerous cell lines, was used to transport and store the samples. For optimal conservation, samples should be stored at between 2°C and 10°C and protected from light.

Nucleic acid extraction and reverse transcription were used to obtain complementary DNA (cDNA) for subsequent analysis of *ATP6V1C1* expression. All experiments were performed in duplicate.

The method used requires the isolation of messenger RNA from each sample, the preparation of cDNA using reverse transcriptase, and the amplification of specific cDNA from a housekeeping. The selected gene was *ABL* (Abelson), which was also analyzed via RT-PCR. The steps followed are described below.

(1) *Extraction of total RNA.* To extract total RNA, the samples were centrifuged at 12,000 rpm for 1 minute. After removal of the supernatant, the cell pellet was processed using an RNeasy mini kit (Quiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. RNA integrity was checked by electrophoresis run through 1% agarose gel.

(2) *Reverse transcription.* The RNA collected was converted to cDNA through a reverse transcription reaction using AMV reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and random primers (Roche Diagnostics). The mixture was incubated at 37°C for 1 hour and following the denaturation of transcriptase at 65°C for 10 minutes, the resulting cDNA was stored at -20°C until needed.

(3) *Real-time quantification.* For PCR analysis, 5 µL of reverse transcription mix was mixed with 15 µL of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) containing 250 nM of primers and 125 nM of TaqMan probe, which

are specific for the *ABL* and *ATP6V1C1* gene, respectively. For quantification purposes, we used the ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A standard commercial curve (*ABL* FusionQuant Standards; Ipsogen, New Haven, USA) was used to quantify the *ABL* gene. To quantify the *ATP6V1C1* gene, a calibration curve was generated using serial dilutions (1, 1/100, 1/1,000, 1/10,000) from a sample taken from a control. The values used to determine the threshold cycle were measured using the ABI 7300 System and the corresponding SDS software.

(4) *Normalization of data.* The expression curves for each gene were normalized by comparison with the curves for the housekeeping gene (*ABL*). The results were expressed as the relationship between the number of copies of *ATP6V1C1* and the number of copies of *ABL*. A value of 0 indicated that the gene was not expressed in a given sample.

**Statistical analysis.** All analyses were performed using the STATA 11 software package (StataCorp LP, Texas, USA). Quantitative variables were described using means or medians and standard deviations and categorical variables were described using frequencies and percentages. The univariate analysis includes several statistical tests depending on the application conditions. For the analysis of predictive value of *ATP6V1C1* expression in oral mucosa brush cytology samples, we use the Receiver Operating Characteristic (ROC) curves to analyze which *ATP6V1C1* expression cutoffs had the best predictive ability (area under the curve [AUC] closest to 1). Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were calculated to assess the validity of the test and diagnostic accuracy. Positive likelihood ratios (LR<sup>+</sup>) and negative likelihood ratios (LR<sup>-</sup>) were also estimated, using the following formulas:

$$RV^+ = \text{Sensitivity}/(1 - \text{Specificity})$$

$$RV^- = (1 - \text{Sensitivity})/\text{Specificity}$$

## Conclusions and Perspectives

We confirmed that the *ATP6V1C1* gene was significantly overexpressed in patients with OSCC compared to healthy controls by performing qRT-PCR analysis of brush cytology samples. There was also a statistically significant relationship, characterized by an increasing gradient, between *ATP6V1C1* levels and tumor stage. ROC curve analysis indicated that the measurement of *ATP6V1C1* expression is a highly sensitive and specific means of discriminating between OSCC samples and normal oral mucosa samples. Despite its obvious limitations, this preliminary study provides a solid and necessary basis for future studies analyzing the value of measuring *ATP6V1C1* levels to detect early-stage OSCC through the identification of precancerous lesions as well as strategies aimed at limiting metastasis and MDR based on RNA interference or the use of specific V-ATPase inhibitors.

## References

- Kosicki DM, Riva C, Pajarola GF, Burkhardt A, Gratz KW. Oral CDx brush biopsy—a tool for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2007; 117:222-7.
- Robinson PN, Mickelson AR. Early diagnosis of oral cavity cancers. *Otolaryngol Clin North Am* 2006; 39:295-306.
- Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30:323-8.
- Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Müller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007; 5:1095-100.
- Remmerbach TW, Hemprich A, Bocking A. Minimally invasive brush-biopsy: Innovative method for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2007; 117:926-40.

6. Spafford MF, Koch WM, Reed AL, Califano JA, Xu LH, Eisenberger CF, et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res* 2001; 7:607-12.
7. Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, Gandolfo S. The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology* 2007; 18:356-60.
8. Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing pre-malignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 2006; 5:11.
9. Acha A, Ruesga MT, Rodriguez MJ, Martinez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and pre-cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10:95-102.
10. Perez-Sayans M, Somoza-Martín J, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez M, Gandara-Vila P, Rey JG, Garcia-Garcia A. Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. *Biotech Histochem* 2009; 1-11.
11. Martinez-Zaguilan R, Sefor EA, Sefor RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14:176-86.
12. Raghunand N, Mahoney B, van Sluis R, Baggett B, Gillies RJ. Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone. *Neoplasia* 2001; 3:227-35.
13. De Milito A, Fais S. Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6:1049-54.
14. Morita T, Nagaki T, Fukuda I, Okumura K. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res* 1992; 268:297-305.
15. Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, et al. Cellular pH regulators: Potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 2003; 29:541-9.
16. Torigoe T, Izumi H, Ise T, Murakami T, Uramoto H, Ishiguchi H, et al. Vacuolar H(+)-ATPase: Functional mechanisms and potential as a target for cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 2002; 13:237-43.
17. Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwala ZM. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 2002; 16:430-50.
18. Newell K, Franchi A, Pouyssegur J, Tannock I. Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1127-31.
19. Yamagata M, Hasuda K, Stamato T, Tannock IF. The contribution of lactic acid to acidification of tumours: Studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* 1998; 77:1726-31.
20. Perez-Sayans M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Rey JM, Garcia-Garcia A. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2009; 35:707-13.
21. Nelson N. A journey from mammals to yeast with vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase). *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35:281-9.
22. Saroussi S, Nelson N. Vacuolar H(+)-ATPase-an enzyme for all seasons. *Pflügers Arch* 2008.
23. Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 2002; 297:169-77.
24. Otero-Rey EM, Somoza-Martín M, Barros-Angueira F, Garcia-Garcia A. Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via overexpression of the ATP6V1C1 gene. *Oral Oncol* 2008; 44:193-9.
25. Svergun DI, Konrad S, Huss M, Koch MH, Wiczorek H, Altendorf K, et al. Quaternary structure of V1 and F1 ATPase: Significance of structural homologies and diversities. *Biochemistry* 1998; 37:17659-63.
26. Armbruster A, Svergun DI, Coskun U, Juliano S, Bailer SM, Gruber G. Structural analysis of the stalk subunit Vma5p of the yeast V-ATPase in solution. *FEBS Lett* 2004; 570:119-25.
27. Chaban YL, Juliano S, Boekema EJ, Gruber G. Interaction between subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar ATPase and the stalk of the C-depleted V(1) ATPase from *manduca sexta* midgut. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1708:196-200.
28. Zhang Z, Inoue T, Forgac M, Wilkens S. Localization of subunit C (Vma5p) in the yeast vacuolar ATPase by immuno electron microscopy. *FEBS Lett* 2006; 580:2006-10.
29. Drory O, Frolow E, Nelson N. Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function. *EMBO Rep* 2004; 5:1148-52.
30. Peng S, Stone D, Xie X. Reconstitution of recombinant 40-kDa subunit of the clathrin-coated vesicle H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 1993; 268:23519-23.
31. Gruber G. Structural features and nucleotide-binding capability of the C subunit are integral to the regulation of the eukaryotic V1Vo ATPases. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:883-5.
32. Armbruster A, Hohn C, Hermesdorf A, Schumacher K, Borsch M, Gruber G. Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding. *FEBS Lett* 2005; 579:1961-7.
33. Voss M, Vitavska O, Walz B, Wiczorek H, Baumann O. Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H(+)-ATPase by protein kinase A. *J Biol Chem* 2007; 282:33735-42.
34. Beltran C, Kopecky J, Pan YC, Nelson H, Nelson N. Cloning and mutational analysis of the gene encoding subunit C of yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 1992; 267:774-9.
35. Perez-Sayans M, Garcia-Garcia A, Reboiras-Lopez MD, Gandara-Vila P. Role of V-ATPases in solid tumors: Importance of the subunit C (review). *Int J Oncol* 2009; 34:1513-20.
36. Somoza-Martín JM, Garcia-Garcia A, Barros-Angueira F, Otero-Rey E, Torres-Espanol M, Gandara-Vila P, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:786-92.
37. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332:429-35.
38. Patel K, Rhodus NL, Gaffney P, Ondrey F. Extraction of RNA from oral biopsies in oral leukoplakia. *IADR Congress* 2004; 1240-1.
39. Ballantyne J. Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin Cancer Res* 2007; 13:1350-1.
40. Laine ML, Farre MA, Crusius JB, van Winkelhoff AJ, Pena AS. The mouthwash: A non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J Periodontol* 2000; 71:1315-8.
41. Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2006; 18:228-33.
42. Schwartz JL, Panda S, Beam C, Bach LE, Adami GR. RNA from brush oral cytology to measure squamous cell carcinoma gene expression. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2008; 37:70-7.
43. Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, Kumar SV, Aldous KM, Gierthy JF, Kaminsky LS. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Res* 2004; 64:6805-13.
44. Nelson N, Harvey WR. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 1999; 79:361-85.
45. Mendez E, Cheng C, Farwell DG, Ricks S, Agoff SN, Futran ND, et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002; 95:1482-94.
46. Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, Misra J, Ohyama H, Todd R, et al. Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol* 2003; 39:259-68.
47. Warner GC, Reis PP, Jurisica I, Sultan M, Arora S, Macmillan C, et al. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis. *Int J Cancer* 2004; 110:857-68.
48. Becelli R, Renzi G, Morello R, Altieri F. Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. *J Craniofac Surg* 2007; 18:1051-4.
49. Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, et al. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 2000; 14:2185-97.
50. Hagag N, Lecal JC, Graber M, Aaronson S, Viola MV. Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol Cell Biol* 1987; 7:1984-8.
51. Ober SS, Pardee AB. Intracellular pH is increased after transformation of chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2766-70.
52. Reshkin SJ, Bellizzi A, Albarani V, Guerra L, Tommasino M, Paradiso A, Casavola V. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell na(+)/H(+) exchange, motility and invasion induced by serum deprivation. *J Biol Chem* 2000; 275:5361-9.
53. Siczkowski M, Davies JE, Ng LL. Activity and density of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in normal and transformed human lymphocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 1994; 267:745-52.
54. Doppler W, Jaggi R, Groner B. Induction of v-mos and activated ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalisation and cell cycle progression. *Gene* 1987; 54:147-53.
55. Pouyssegur J, Franchi A, Pages G. pH<sub>i</sub>, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found Symp* 2001; 240:186-96.
56. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:786-95.
57. Sennoune SR, Martinez-Zaguilan R. Plasmalemmal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases in angiogenesis, diabetes and cancer. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39:427-33.
58. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:94-103.
59. Martinez-Zaguilan R, Lynch RM, Martinez GM, Gillies RJ. Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993; 265:1015-29.
60. Glunde K, Guggino SE, Solaiyappan M, Pathak AP, Ichikawa Y, Bhujwala ZM. Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells. *Neoplasia* 2003; 5:533-45.
61. Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:921-30.
62. Ling V. Multidrug resistance: Molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40:3-8.
63. Luciani F, Spada M, De Milito A, Molinari A, Rivoltini L, Montinaro A, et al. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1702-13.
64. De Milito A, Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol* 2005; 1:779-86.
65. Sennoune SR, Luo D, Martinez-Zaguilan R. Plasmalemmal vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in cancer biology. *Cell Biochem Biophys* 2004; 40:185-206.

66. De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M, Marino ML, et al. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res* 2007; 67:5408-17.

©2010 Landes Bioscience.  
Do not distribute.

## Cytopathology

cytopathology

**RNA quantification in oral cytological samples using three different instruments: Cytobrush®, Dermatological Curette and Oral CDx® brush test.**

Journal:	<i>Cytopathology</i>
Manuscript ID:	CYT-2010-0088.R1
Manuscript type:	Original article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Reboiras López, Maria Dolores; University of Santiago de Compostela, Dentistry Pérez Sayáns, Mario; University of Santiago de Compostela, Dentistry Somoza Martín, José Manuel; University of Santiago de Compostela, Dentistry Gayoso Diz, Pilar; Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Department of Clinical Epidemiology Barros Angueira, Francisco; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Molecular Medicine Gándara Rey, José Manuel; University of Santiago de Compostela, Dentistry García García, Abel; University of Santiago de Compostela, Dentistry
Key Words:	oral exfoliative cytology, oral squamous cell carcinoma , quantitative real time polymerase chain reaction, Cytobrush, Curette, Oral CDx

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**TITLE: RNA quantification in oral cytological samples using three different instruments: Cytobrush®, Dermatological Curette and Oral CDx® brush test.**

**First and Corresponding Author:**

María Dolores Reboiras-López DDS; Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit. Faculty of Medicine and Dentistry, Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034676478378. E- mail: cilolitareboiras@gmail.com.

**Contributing Authors:**

- Mario Pérez-Sayáns DDS. Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit. Faculty of Medicine and Dentistry, Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034626233504. Fax: 0034986295424. E-mail: perezsayans@gmail.com.

- José Manuel Somoza-Martín DDS, PhD; Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034619099006. E- mail: cinolo@gmail.com.

- Pilar Gayoso-Diz PhD, Department of Clinical Epidemiology, Edificio de Consultas planta 0, 15706. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain. TLF: 0034981950033. E- mail: Pilar.Gayoso.Diz@sergas.es.

- Francisco Barros-Angueira PhD; Unidad de Medicina Molecular - Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica. Edificio de Consultas planta -2. Hospital Clínico Universitario C.P. 15706 Santiago de Compostela. Spain. TLF: 0034981951490. E- mail: francisco.barros@usc.es.

- José Manuel Gándara-Rey MD, DDS, PhD; Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034639814869. E- mail: josemanuel.gandara@usc.es.

- Abel García-García MD, PhD. Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034606461881. E- mail: abel.garcia@usc.es.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Introduction:** Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is diagnosed late and the five-year survival rate is below 50%. In an attempt to find methods for early diagnosis there has been a growing interest in exfoliative cytology. The goal of this research is to compare the efficacy of studying the gene expression in exfoliative cytology of the oral cavity using three different instruments (Cytobrush, a curette and the Oral CDx brush).

**Material and methods:** 104 cytological samples were analyzed; these were obtained from volunteer healthy subjects using all three instruments. The clinical and demographical variables under study were age, sex and smoking habits. We analyzed the amount of RNA (or quantification of the gene expression) of ABL housekeeping gene by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR-qRT).

**Results:** The differences in the adequate samples, obtained using three instruments to study gene expression, were statistically significant ( $\chi^2 = 16.6$  and  $p < 0.001$ ). Cytobrush provided 48.6%, the curette 90.6% and Oral CDx 80%. The probability of obtaining adequate samples is 10 times higher when using a curette and 4 times higher using Oral CDx, in contrast with Cytobrush.

**Conclusions:** Oral exfoliative cytology is a simple and noninvasive technique that provides sufficient RNA from oral cells to perform studies on gene expression. However, it is important to select the correct sampling instrument so as to be able to obtain adequate samples.

**Keywords:** oral exfoliative cytology; RNA; oral squamous cell carcinoma (OSCC); quantitative real time polymerase chain reaction (PCR-qRT); Cytobrush; Curette; Oral CDx

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## INTRODUCTION

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the sixth most common malignancy in the world (1). Despite the advances in oral cancer treatments combining resection, chemotherapy and radiotherapy, the 5-year survival rate is below 50% (2). However, OSCC prognosis improves significantly if it is diagnosed early. Most oral cancers originate in premalignant lesions and small changes in normal oral mucosa; being asymptomatic they are incidentally diagnosed. Although the oral cavity is easily accessible, for both visual inspection and additional tests, it is often long before these dysplastic lesions are diagnosed (3).

Nowadays, it is generally accepted that OSCC is a consequence of the multi-step acquisition of genomic disorders promoting malignancy. Throughout these past decades identification of tumoral markers in OSCC pursuing the goal of predicting their behavior and clinical evolution has been subject to a special interest. In an attempt to find methods to facilitate early OSCC diagnosis, there has been a recent growing interest in exfoliative cytology in oral precancer and cancer (3,3-9).

Exfoliative cytology is a relatively simple noninvasive technique and is widely accepted by the patients. A genetic study of tumoral markers in cytology samples allows for the detection of molecular alterations before changes occur in cell morphology, and thus before such alterations are clinically visible. Molecular changes in OSCC progression give way to genetic alterations that affect protein synthesis (5,10,11). Studying such alterations permit early diagnosis of premalignant and malignant lesions before these are clinically visible, and the assessment of the disease's progression and its response to treatment (12).

The degree of expression of a gene can be studied with a broad approach by detecting and/or quantifying functional mRNA in the cytoplasm. Thus, the most effective analysis methods are based on the ability to detect specific mRNA and not protein products (13). The goal of this research is to compare the efficacy of

1  
2  
3 studying gene expression in exfoliative cytology of the oral cavity using three  
4 different instruments, thus establishing the most adequate instrument to retrieve  
5 samples for OSCC genetic testing or oral lesions with malignancy risk.  
6  
7  
8  
9

## 10 11 12 **MATERIAL AND METHODS**

### 13 14 15 **Study population**

16  
17  
18  
19 The study population of this research consisted of 104 exfoliative cytology samples  
20 of the oral cavity, specifically of the buccal mucosa, obtained using three different  
21 instruments. These samples were taken from voluntary healthy students of the  
22 Faculty of Medicine and Dentistry of the University of Santiago de Compostela.  
23

24  
25 We initially estimated a sample size (n) of 93 samples for a situation in which the  
26 proportion of samples with sufficient material was 50% in the case of the instrument  
27 with the lowest performance and 90% in the case of the highest performance  
28 instrument; considering a 95% security level ( $1 - \alpha$ ), and 90% power ( $\beta$ ). The  
29 required number of samples was 31 per instrument, which required an overall  
30 sample size of 93 samples. This size was increased to 104 samples in case of the  
31 event of losses in processing and transporting samples.  
32

33  
34 All subjects underwent a physical examination and an examination of the oral cavity  
35 to confirm absence of oral pathologies. Subjects having a systemic disease and/or  
36 pathology of the oral cavity were excluded.  
37

38  
39 This research has obtained the approval of the Clinical Research Ethics Committee  
40 of Galicia.  
41  
42  
43

### 44 45 46 47 **Obtaining the samples**

48  
49 The cytological samples of the oral cavity were obtained by scraping the buccal  
50 mucosa using three different instruments:  
51

- 52  
53 - Cervical sampling brush Cytobrush® (Medscan AB, Malmö, Sweden).  
54 The test sample is obtained by vigorously scraping the buccal mucosa  
55 with the brush, rotating the brush 10-15 times. Figure (1A).  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- A dermatological curette 7mm diameter (Stiefel, Madrid, Spain). For the sample obtained using the dermatological curette we used the "pencil technique" superficially scraping the buccal mucosa. Figure (1B).
- Oral CDx® Brush Kit (Oral Cancer Prevention International, Inc. Mfg. Medical Packaging Corporation, Camarillo, CA USA). The Oral CDx Brush Kit contains a circular brush specially designed for cytological sampling of the oral cavity. Although the kit contains a slide and fixative for conventional computer assisted cytology, we only used the brush for sampling. The brush is used by placing the flat part on the buccal mucosa and performing 5-15 rotations, exerting certain pressure, until a reddish area is seen. Figure (1C).

It was not necessary to apply topical anesthesia with any of these instruments. The subjects showed no sign of discomfort during the sampling process with any of these instruments.

### Processing the samples

The means for transporting and storing samples was RPMI-1640 MEDIUM (Microvet, Madrid, Spain), formulated to maintain numerous cell lines.

The method we have used for processing the samples in the laboratory has involved the following steps: mRNA isolation of each sample, preparation of cDNA by reverse transcriptase and amplification of cDNA specific to ABL (Abelson) housekeeping gene. In the laboratory we have quantified ABL gene expression by means of PCR-qRT using the cells obtained using all three extraction techniques.

### Total RNA extraction

The initial step for total RNA extraction was the centrifugation of samples at 12,000 RPM during 1 minute. After discarding the supernatant, the cell pellet was processed using RNeasy minikit (Quiagen, Hilden, Germany) following the

1  
2  
3 manufacturer's protocol. This procedure is based on membrane retention of  
4 RNA and subsequent elution.  
5  
6

#### 7 8 Obtaining cDNA 9

10  
11 RNA was converted into cDNA by reverse transcription using AMV reverse  
12 transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and "random primers"  
13 (Roche). The reaction was performed on a final volume of 20 microL, following  
14 the protocol specified by the manufacturer. The mixture was incubated at 37°C  
15 during one hour following transcriptase denaturation at 65°C during 10 minutes;  
16 the cDNA obtained was stored at -20°C until its use. The integrity and quality of  
17 the obtained cDNA were tested by real-time PCR, as described below.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

#### 25 26 Quantification by quantitative real-time PCR 27

28  
29 We chose a design of oligos and probes, i.e. nucleotide sequences of ABL  
30 "housekeeping" gene. For PCR analysis, we mixed 5µl of inverse transcription  
31 reaction with 15µl of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems,  
32 Foster City, USA), containing 250 nM of primers, with 125 nM of TaqMan probe,  
33 specific to the ABL gene. The probes and primers of the ABL gene are supplied  
34 by the purveyor.  
35  
36  
37  
38  
39  
40

41  
42 All samples were tested twice. For quantification we used the ABL commercial  
43 standard curve (ABL FusionQuant Standards, Ipsogen, New Haven USA). The  
44 values for determining the cycle threshold (Ct) were measured with the real-  
45 time PCR system ABI 7300, using its software (7300 System SDS Software,  
46 Applied Biosystems) and transformed into copies of ABL using standard curves  
47 obtained the same day of the experiment. PCR conditions were the following:  
48 10 min at 95°C, for enzyme activation and 40 two-step cycles: 15 sec at 95°C,  
49 1 min at 60°C.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56

#### 57 58 Analysis of ABL expression 59 60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

In the study of the efficacy of cytological sampling techniques in gene expression research we considered two consecutive phases. A qualitative evaluation, analyzing the collection of adequate samples using each instrument. A sample was considered sufficient to undergo research if gene expression studies by exfoliative cytology presented quantification values of RNA > 0; a sample with 0 value was considered inadequate. And further quantitative assessment was performed on those samples considered adequate. In these, ABL gene expression quantification was analyzed in relation to the sampling instrument.

#### Statistical analysis

For the description of quantitative variables we used the median or average deviation and standard deviation (SD) or interquartile range. For categorical variables we used frequency and percentages. In the univariate analysis, we used the following tests: for the comparison of averages, the Mann-Whitney U or the Kruskal-Wallis H tests - depending on the application conditions; for the comparison of proportions, the chi-square or Fisher's exact test. To study the ability to obtain enough samples with each instrument, we performed a binomial logistic regression analysis, the dependent variable being: obtaining enough to study gene expression and the technique – the latter, as an independent variable. Cytobrush® was used as the reference technique. We used the SPSS package, version 15.0 (Chicago, IL, USA).

## RESULTS

In a qualitative assessment, 72.1% (75) of samples provided sufficient cellular material (or mRNA) to study ABL gene expression. In a comparative study of the three cytological sampling instruments; we observed that Cytobrush only provided 48.6% adequate samples compared to 90.6% adequate samples collected with the curette and 80% adequate samples using Oral CDx; such differences are statistically significant ( $\chi^2 = 16.6$  and  $p < 0.001$ ) (Table 1). We have evaluated the adequacy of the samples in relation to their clinical and

1  
2  
3 demographical variables (Table 2). No significant differences were observed in  
4 the proportion of adequate samples.  
5  
6  
7

8  
9 Considering Cytobrush as the reference oral cytology sampling instrument, by  
10 means of a logistical regression analysis, we found that the probability of  
11 obtaining adequate samples for genetic testing is 10 times higher with the  
12 curette and four times higher using Oral CDx (Table 3).  
13  
14  
15  
16

17 For the analysis of utility sampling in oral exfoliative cytology we have used 73 of the  
18 75 samples, excluding two cases that presented abnormally high levels of RNA (>600).  
19 Thus, we observed that in the cytological samples collected with the Cytobrush we  
20 obtained a quantification of  $6.82 \pm 6.71$ , in the case of the curette the quantification was  
21  $17.64 \pm 21.10$ , and for the Oral CDx of  $16.04 \pm 15.81$  (Kruskal Wallis = 8.64,  $p= 0.013$ )  
22 (Table 4).  
23  
24  
25  
26  
27

28 Distribution of RNA quantification of the ABL gene with each of the techniques  
29 is represented by means of a box diagram in Figure 2.  
30  
31  
32  
33  
34

### 35 DISCUSSION

36 The oral epithelium is where the earliest genetic alterations are produced,  
37 resulting in the emergence of OSCC (14). Therefore, analysis of RNA  
38 expression in oral keratinocytes can be used to detect early stages of this  
39 disease or even to monitor patients and evaluate the effectiveness of different  
40 treatments (15,16). The possibility of obtaining RNA from oral cells in a  
41 noninvasive way, using exfoliative cytology, without having to perform a biopsy,  
42 would be the ideal way to develop a great amount of OSCC genetic studies,  
43 thus facilitating early diagnosis (14). Studies in RNA analysis have been carried  
44 out using urine and saliva thanks to their easy sampling, however, these do not  
45 measure the tissue itself, thus their accuracy is not entirely adequate (17-19).  
46 By contrast, samples obtained by brushing or scraping, have the advantage of  
47 performing genetic analysis on the RNA of live cells, of malignant or of  
48 suspected malignancy, collected directly from the oral epithelium instead of  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

stable RNA cell fragments in a cellular environment. Recently, the possibility of isolating RNA cells obtained by oral exfoliative cytology and being able to use these cells to determine the susceptibility of having cancer in the general population and to detect tumoral markers in an early stage has been confirmed (11,20).

Different methods have been used to collect samples of the oral cavity throughout the evolution of exfoliative cytology: scraping the mucosa with different tools such as wooden spatulas, cotton, mouthwashes or even sampling the patient's saliva (15,21). However, it has been observed that the best technique to obtain better quality material is the physical method, scraping the oral epithelium with different instruments (10,21,22). It is considered that the ideal instrument for exfoliative cytology should have the following general characteristics: ease of use in any location, that it is not uncomfortable for the patient and that it provides an adequate cellularity of epithelial cells for their study (23). These studies prove that Cytobrush increases the number of cells collected in a sample and, therefore, it is the most commonly used instrument for exfoliative cytology sampling (7). It is a conical brush for gynecological cytologies that has been used for many years and its use has been extrapolated to the oral cavity (2,16,21,24).

Navone et al., have recently used, a disposable dermatological curette for exfoliative cytology sampling. Scraping until the mucosa bleeds lightly, thus confirming that the basal layer of the epithelium has been reached, this technique has even been considered as a "micro-biopsy" since it is possible to obtain small epithelial fragments that can be histologically analyzed (8).

Oral CDx is a computer-assisted method for the analysis of cytological samples collected by transepithelial biopsy. This kit includes a circular brush specially designed for oral transepithelial sampling (4,10,25-28).

The possibility of isolating DNA of epithelial cells to study gene expression is a proven fact. However, RNA isolation has not been reliably validated since ribonucleases present in the saliva degrade the RNA during cytological

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

sampling (12). Certain pilot studies have proven the possibility of isolating RNA cells obtained by oral exfoliative cytology and quantifying mRNA using microarrays or RT-PCR analysis (11,29-31). Klaassen et al., have demonstrated the possibility of detecting mRNAs of genes with moderate or low expression in the oral epithelium of exfoliated cells of the oral cavity by means of RT-PCR (32).

All the papers published so far regarding the study of genetic expression of the oral epithelium by exfoliative cytology have used Cytobrush as the sampling instrument (2,14,20,32), the Oral CDx (30) and a curette (8). Pentenero et al., in a recent study on DNA content with flow cytometry in oral potentially malignant disorders (PMDs) used a dermatological curette for cytological sampling. (33). However, there is no paper comparing the amount of RNA obtained with each of these instruments.

Habis et al., have been the first to assess RNA quantity and quality obtained by cervical exfoliative cytology and to prove its efficacy for analysis with microarrays (34). Schwartz et al., examined the possibility of using RNA of oral cells obtained by brushing to examine gene expression in a tumor and normal tissue using a model of oral cancer in a hamster (14). The results of this study attest to the notion that RNA obtained from oral cells by brushing can be used as a marker for reproducible measurement of gene expression in this tissue. These authors have also seen that the differences in RNA gene expression of cells obtained by exfoliative cytology were higher compared to those collected by biopsies. They considered that the cytology by brushing the oral mucosa leads to homogeneous epithelial cell samples and that when a conventional biopsy is used it contains a mixture of epithelial, stromal and sub-stromal tissue. This does not represent a problem when immunohistochemical studies are carried out, since it permits the study of protein expression in individual areas of the sample. Thus, samples obtained by brushing have the advantage that RNA analysis is carried out directly on tumor cells or premalignant lesions and, therefore, it is more appropriate for the identification of genes functionally involved in carcinogenic processes. The results of this study support the hypothesis that if the superficial scraping sample is more superficial, we will

1  
2  
3 only obtain cells from the epithelium's superficial layers where RNA is already  
4 degraded. Therefore, if we use a more aggressive instrument such as the  
5 curette, which even allows us to perform "micro-biopsies", adequate samples  
6 for studying gene expression increase significantly in comparison with the  
7 Cytobrush which is a far less aggressive instrument. The Oral CDx brush,  
8 which has been specially designed for oral cytology is significantly harder and  
9 has a specific shape, is the instrument, followed by the curette, which offers us  
10 a greater chance of obtaining adequate samples.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

19 In our study we found no statistically significant differences in RNA  
20 quantification of the studied gene in relation to smoking habits, probably  
21 because we studied the genetic expression of a housekeeping gene. However,  
22 we consider the possible existence of such differences in relation to the  
23 aggressiveness of the sampling instrument and the keratinization of the  
24 mucosa in smokers. Smith et al., in a pilot study, have not been able to identify  
25 113 genes with microarrays from RNA extracted from oral epithelial cells  
26 obtained by exfoliative cytology with Oral CDx with gene expression (under-  
27 expressed and over-expressed) showing significant differences between  
28 smokers and nonsmokers (30).  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

## 41 CONCLUSIONS

42  
43  
44 Oral exfoliative cytology is a simple and noninvasive technique to obtain RNA  
45 of the oral cells to conduct studies on gene expression. It is important to  
46 consider the sampling instrument, even if the samples are valid for molecular  
47 study since all the instruments permit a satisfactory analysis. However, the  
48 curette is 10 times more likely to provide an adequate sample when compared  
49 to Cytobrush. The same happens with Oral CDx, which provides satisfactory  
50 samples with a probability level 4 times higher than the Cytobrush, despite the  
51 fact that the latter is the most commonly used instrument to date.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**REFERENCES**

- (1) Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis.* 2000 Mar;6(2):65-74.
- (2) Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, et al. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal.Cell.Pathol.* 2001;22(4):211-221.
- (3) Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, et al. The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology* 2007 Dec;18(6):356-360.
- (4) Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J.Am.Dent.Assoc.* 1999 Oct;130(10):1445-1457.
- (5) Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J.Can.Dent.Assoc.* 2002 Nov;68(10):617-621.
- (6) Navone R, Marsico A, Reale I, Pich A, Broccoletti R, Pentenero M, et al. Usefulness of oral exfoliative cytology for the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Minerva Stomatol.* 2004 Mar;53(3):77-86.
- (7) Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Muller-Richter U, Kosmehl H, et al. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J.Dtsch.Dermatol.Ges.* 2007 Dec;5(12):1095-1100.
- (8) Navone R, Pentenero M, Rostan I, Burlo P, Marsico A, Broccoletti R, et al. Oral potentially malignant lesions: first-level micro-histological diagnosis from tissue fragments sampled in liquid-based diagnostic cytology. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Jul;37(6):358-363.
- (9) Navone R. Cytology of the oral cavity: a re-evaluation. *Pathologica* 2009 Feb;101(1):6-8.
- (10) Acha A, Ruesga MT, Rodriguez MJ, Martinez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2005 Mar-Apr;10(2):95-102.
- (11) Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, Kumar SV, Aldous KM, Gierthy JF, et al. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Res.* 2004 Sep 15;64(18):6805-6813.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

(12) Perez-Sayans M, Somoza-Martin J, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez M, Gandara-Vila P, Rey JG, et al. Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. *Biotech.Histochem.* 2009 Aug 25:1-11.

(13) Alberts B, Bray D, Hopkin K, Jonhson A, Lewis J, Raff M, et al. Del DNA a la proteína: cómo leen las células el genoma. In: Alberts B, Bray D, Hopkin K, Jonhson A, Lewis J, Raff M, et al, editors. . 2ª ed.: Editorial médica Paramericana S.A.; 2007. p. 229-266.

(14) Schwartz JL, Panda S, Beam C, Bach LE, Adami GR. RNA from brush oral cytology to measure squamous cell carcinoma gene expression. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Feb;37(2):70-77.

(15) Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol.Cancer.* 2006 Mar 23;5:11.

(16) Diniz-Freitas M, Garcia-Garcia A, Crespo-Abelleira A, Martins-Carneiro JL, Gandara-Rey JM. Applications of exfoliative cytology in the diagnosis of oral cancer. *Med.Oral* 2004 Aug-Oct;9(4):355-361.

(17) Ballantyne J. Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin.Cancer Res.* 2007 Feb 15;13(4):1350; author reply 1351.

(18) Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr.Opin.Oncol.* 2006 May;18(3):228-233.

(19) Laine ML, Farre MA, Crusius JB, van Winkelhoff AJ, Pena AS. The mouthwash: a non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J.Periodontol.* 2000 Aug;71(8):1315-1318.

(20) Perez-Sayans M, Reboiras-Lopez MD, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Gayoso Diz P, Gandara Rey JM, et al. Measurement of ATP6V1C1 expression in brush cytology samples as a diagnostic and prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.Biol.Ther.* 2010 Jun 25;9(12).

(21) Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. *Acta Cytol.* 1992 Sep-Oct;36(5):706-710.

(22) Chandler JR. The nonvalue of oral cytology. *Arch.Otolaryngol.* 1966 Nov;84(5):527-533.

(23) Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1994 Jan;77(1):95-99.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- (24) Mollaoglu N, Wilson MJ, Cowpe JG. Extraction of DNA from oral cytological samples by scraping and smear method suitable for restriction site mutation analysis: a pilot study. *Diagn.Cytopathol.* 2001 Aug;25(2):83-85.
- (25) Mehrotra R, Hullmann M, Smeets R, Reichert TE, Driemel O. Oral cytology revisited. *J.Oral Pathol.Med.* 2009 Feb;38(2):161-166.
- (26) Trullenque-Eriksson A, Munoz-Corcuera M, Campo-Trapero J, Cano-Sanchez J, Bascones-Martinez A. Analysis of new diagnostic methods in suspicious lesions of the oral mucosa. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2009 May 1;14(5):E210-6.
- (27) Kosicki DM, Riva C, Pajarola GF, Burkhardt A, Gratz KW. OralCDx brush biopsy--a tool for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.* 2007;117(3):222-227.
- (28) Delavarian Z, Mohtasham N, Mosannen-Mozafari P, Pakfetrat A, Shakeri MT, Ghafoorian-Maddah R. Evaluation of the diagnostic value of a Modified Liquid-Based Cytology using OralCDx (R) Brush in early detection of oral potentially malignant lesions and oral cancer. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2010 Apr 11.
- (29) Steinau M, Lee DR, Rajeevan MS, Vernon SD, Ruffin MT, Unger ER. Gene expression profile of cervical tissue compared to exfoliated cells: impact on biomarker discovery. *BMC Genomics* 2005 May 5;6(1):64.
- (30) Smith RV, Schlecht NF, Childs G, Prystowsky MB, Belbin TJ. Pilot study of mucosal genetic differences in early smokers and nonsmokers. *Laryngoscope* 2006 Aug;116(8):1375-1379.
- (31) Spira A, Beane J, Schembri F, Liu G, Ding C, Gilman S, et al. Noninvasive method for obtaining RNA from buccal mucosa epithelial cells for gene expression profiling. *BioTechniques* 2004 Mar;36(3):484-487.
- (32) Klaassen I, Copper MP, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Snow B,J.M. Exfoliated oral cells messenger RNA:suitability for biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Jun;7:469-472.
- (33) Pentenero M, Giaretti W, Navone R, Demurtas A, Rostan I, Bertolusso G, et al. DNA aneuploidy and dysplasia in oral potentially malignant disorders: association with cigarette smoking and site. *Oral Oncol.* 2009 Oct;45(10):887-890.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

(34) Habis AH, Vernon SD, Lee DR, Verma M, Unger E. Molecular quality of exfoliated cervical cells: implications for molecular epidemiology and biomarker discovery. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Mar;13(3):492-6.

#### TABLES AND FIGURES

**Figure 1:** Instruments used in cytological sampling. **A:** Cytological sampling using Cytobrush - rotation technique. **B:** Sampling using a Dermatological Curette - the pencil technique. **C:** Sampling with the Oral CDx Kit - localized transverse rotation.

**Figure 2:** Box diagram representing ABL RNA quantification for each instrument. Figure footer: RNA of ABL gene has been quantified by number of copies. <sup>^</sup>Value over 1.5 times percentile 75. <sup>\*</sup>Value over 3 times percentile 75.

**Table 1:** Number and percentage of adequate (valid) and inadequate samples depending on the RNA collection technique. Considering a sample adequate with quantification expression of ABL >0, and a sample is considered inadequate with quantification expression of ABL=0. 48% of the samples obtained using Cytobrush are adequate compared to 90.6% of adequate samples obtained with a curette. 20% of the samples obtained by Oral CDx are inadequate. The differences are statistically significant ( $\chi^2 = 16.6$  and  $p < 0.001$ ).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 2:** Relationship between clinical and demographical variables and collection of valid or inadequate samples. No statistically differences were observed.

Table footer: \* In brackets the number of samples in the relevant category. Data is percentage (frequency) or mean  $\pm$ SD.

**Table 3:** Probability of obtaining a valid sample depending on the instrument. The curette provides 10.2 times more chances of obtaining a valid sample than the reference instrument (Cytobrush). Oral CDx is 4.22 times more likely to provide an adequate sample for RNA analysis. OR: odds ratio; CI: confidence interval.

**Table 4:** Quantification of RNA of the ABL gene depending on the sampling technique employed during oral exfoliative cytology. We observed that the curette showed a higher average of RNA (17.64), followed closely by Oral CDx (14.36). Cytobrush is the instrument providing the least amount of RNA (6.82). The differences are statistically significant (Kruskal Wallis = 8.64,  $p= 0.013$ )

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

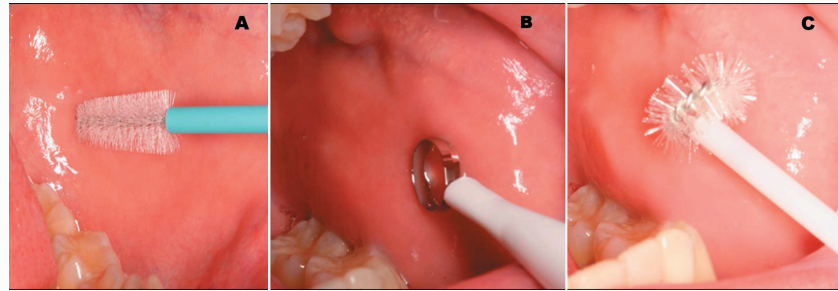


Figure 1: Instruments used in the cytological sampling. A: Cytological sampling using Cytobrush, by means of the rotation technique. B: Sample collection using Dermatological Curette, by means of the pencil technique. C: Sampling with the Oral CDx Kit, obtained by means of localized transverse rotation.  
99x34mm (600 x 600 DPI)

Peer Review

## Cytopathology

Page 18 of 22

Instrument	n	Adequate		Inadequate	
		n	%	n	%
Cytobrush	37	18	48.6	19	51.4
Curette	32	29	90.6	3	9.4
Oral Cdx	35	28	80	7	20
Total	104	75	72.1	29	27.9

**Table 1:** Number and percentage of adequate (valid) and inadequate samples depending on the RNA collection technique, considering adequate a sample with quantification expression of ABL >0, and inadequate a sample with quantification values of expression of ABL=0. 48% of the samples obtained using Cytobrush were valid compared to 90.6% of valid samples obtained with a dermatological curette. 20% of the samples obtained using Oral CDx were inadequate. The differences are statistically significant ( $\chi^2 = 16.6$  and  $p < 0.001$ ).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Clinical and demographical variables	Adequate samples (75)*	Inadequate samples (29)*	p
<i>Gender</i>			
Male (32)*	68.82% (22)	31.3% (10)	0.6
Female (72)*	73.6% (53)	26.4% (19)	
<i>Smoking habits</i>			
Smoker (36)*	69.4% (25)	30.6% (11)	0.6
Non Smoker(68)*	73.5% (50)	26.5% (18)	
Age	23.5±3.2	24.4±3.2	0.108

**Table 2:** Relationship between clinical and demographical variables; and the collection of adequate or inadequate samples. No statistically significant differences were observed. Table footer: \* In brackets the number of samples in the relevant category. Data is percentage (frequency) or average ±SD.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Technique	OR	CI 95%
Curette	10.2	2.64- 39.4
Oral CDx	4.22	1.48-12.1
Cytobrush	-	-

**Table 3:** Probability of obtaining a valid sample depending on the instrument. The curette provides 10.2 times more chances of obtaining a valid sample than the reference instrument (Cytobrush). Oral CDx is 4.22 times more likely to provide a valid sample for RNA analysis. OR: odds ratio; CI: confidence interval.

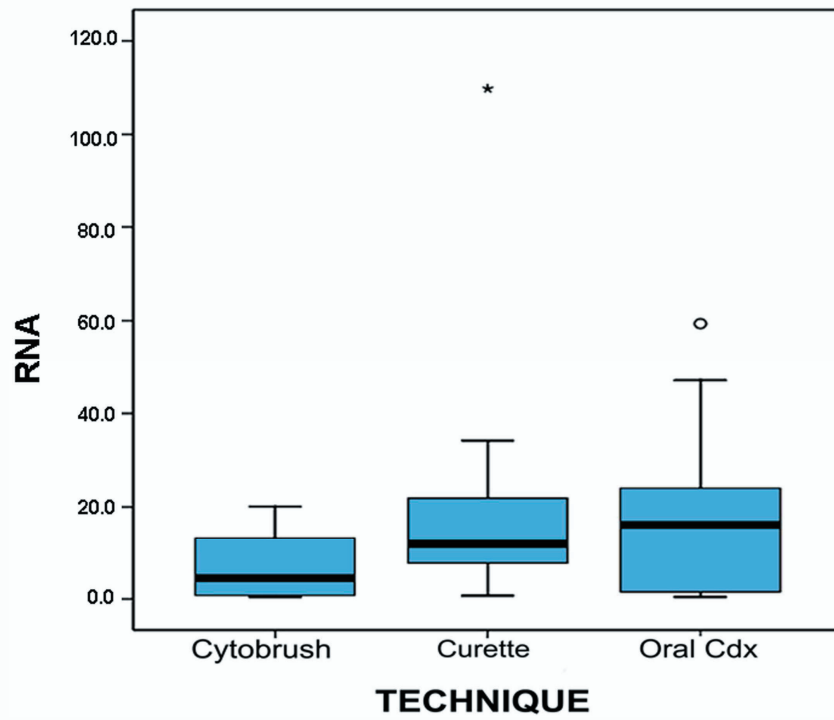
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Technique	n	Average $\pm$ SD	CI 95%	Range	
				Maximum	Minimum
Cytobrush	18	6.82 $\pm$ 6.71	3.48-10.15	20.09	0.34
Curette	27	17.64 $\pm$ 21.10	9.29-25.99	109.79	0.67
Oral CDx	28	16.04 $\pm$ 15.81	9.91-25.99	59.39	0.42

**Table 4:** Quantification of RNA of the ABL gene depending on the sampling technique employed during oral exfoliative cytology. We observed that the curette is the instrument presenting a higher average of RNA (17.64), followed closely by Oral CDx (14.36). Cytobrush is the instrument providing the least amount of RNA (6.82). The differences are statistically significant (Kruskal Wallis = 8.64, p= 0.013)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Box diagram representing ABL RNA quantification for each instrument. Figure footer: RNA of ABL gene has been quantified by number of copies. °Value over 1.5 times percentile 75. \*Value over 3 times percentile 75.

183x155mm (300 x 300 DPI)



## Cytopathology

cytopathology

**Comparative study of three different sampling instruments:  
Cytobrush, Curette and OralCDx for liquid-based cytology of  
the oral mucosa.**



Journal:	<i>Cytopathology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript type:	Original article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Reboiras López, Maria Dolores; University of Santiago de Compostela, Dentistry Pérez Sayáns, Mario; University of Santiago de Compostela, Dentistry Somoza Martín, José Manuel; University of Santiago de Compostela, Dentistry Antúnez López, José Ramón; Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Pathology Unit Gayoso Diz, Pilar; Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Department of Clinical Epidemiology Gándara Vila, Pilar; University of Santiago de Compostela, Dentistry Gándara Rey, José Manuel; University of Santiago de Compostela, Dentistry García García, Abel; University of Santiago de Compostela, Dentistry
Key Words:	oral exfoliative cytology, liquid based oral cytology, Cytobrush, Oral CDx, curette, oral squamous cell carcinoma

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Comparative study of three different sampling instruments: Cytobrush, Curette and OralCDx for liquid-based cytology of the oral mucosa.**

**First and Corresponding Author:**

María Dolores Reboiras-López DDS; Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit. Faculty of Medicine and Dentistry, Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034676478378. E- mail: cilolitareboiras@gmail.com.

**Contributing Authors:**

- Mario Pérez-Sayáns PhD, DDS. Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit. Faculty of Medicine and Dentistry, Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034626233504. Fax: 0034986295424. E-mail: perezsayans@gmail.com.

- José Manuel Somoza-Martín DDS, PhD; Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit. Faculty of Medicine and Dentistry, Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034619099006. E- mail: cinolo@gmail.com

- José Ramón Antúnez López, PhD, Pathology Unit, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Choupana s/n Santiago de Compostela 15706 Spain. TLF 0034981950873. E-mail: jose.ramon.antunez.lopez@sergas.es

- Pilar Gayoso Diz PhD, Department of Clinical Epidemiology, Edificio de Consultas planta 0, 15706. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain. TLF: 0034981950033. E- mail: pilar.gayoso.diz@sergas.es.

- Pilar Gándara-Vila DDS; Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit. Faculty of Medicine and Dentistry Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034616166691. E- mail: pilar.gandara@usc.es.

- José Manuel Gándara Rey MD, DDS, PhD; Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034639814869. E- mail: josemanuel.gandara@usc.es.

- Abel García-García MD, PhD. Entrerríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782 Spain. TLF: 0034606461881. E- mail: abel.garcia@usc.es.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## ABSTRACT

**Introduction:** Exfoliative cytology of the oral cavity is a simple and noninvasive technique that allows the study of epithelial cells. Liquid-based cytology arises as an auxiliary diagnosis tool in an effort to improve the specificity and the sensitivity of conventional cytology.

**Objective:** The objective of this study is to analyze the quality of normal oral mucosa cytology samples obtained using three different instruments: Cytobrush®, dermatological Curette and Oral CDx® by means of liquid-based cytology thus determining if there are any differences in the quality of the samples depending on the instrument used.

**Material and methods:** 104 cytological samples of the oral cavity were analyzed; these were obtained from volunteer healthy subjects using the three instruments. The clinical and demographic variables under study were age, sex and smoking habits. We have analyzed the cellularity, the quality of the preparation and the types of cells in the samples.

**Results:** All the preparations showed appropriate preparation quality. In all the analyzed smears cells were distributed uniformly and did not show any mucus, bleeding, inflammatory exudate or artifacts. We found no correlation between the average number of cells and the type of instrument. The samples were generally formed by two types of cells: superficial and intermediate. No differences were found between the cytological preparations of the three instruments. We did not observe basal cells in any of the 104 analyzed samples.

**Key words:** oral exfoliative cytology; liquid based oral cytology; Cytobrush; Oral CDx; curette; oral squamous cell carcinoma.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## INTRODUCTION

The oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the sixth most common malignancy in the world (1). It is estimated that over 500,000 new cases are diagnosed annually and 75% of them are in developed countries (2). Despite the advances in the treatment of oral cancer combining resection, chemotherapy and radiotherapy, the survival rate at 5 years is below 50%. This rate has not improved in the past 25 years (3). However, OSCC prognosis improves significantly if it is diagnosed early. Most oral cancers originate in premalignant lesions and small changes in the normal oral mucosa, being asymptomatic they are incidentally diagnosed. Although the oral cavity is easily accessible, both visually and to make additional tests, it is often long before these dysplastic lesions are diagnosed (4,5).

The classical diagnostic methods for precancerous and cancerous lesions of the oral cavity have been, for a long time, clinical examination and histological study, and recently, the molecular study of the biopsied material (4,6). Although biopsy is a relatively simple technique, it is a bloody technique that involves surgery, thus limiting certain professionals and it may cause a possible initial rejection in some patients. Moreover, in some situations it might prove difficult to choose the most appropriate place or places to biopsy, especially in the case of larger lesions. There is also great subjectivity in the observing pathologist's study of the samples (7-9).

All these conditions support the need to find and develop new diagnostic methods for oral neoplasia. It is important that these new methods are simple, reliable and not too bloody, enabling satisfactory diagnosis and monitoring (10). In this sense, there is a recent interest for oral cytology of oral cancer and precancer as an auxiliary method for early diagnosis of such processes; since, in addition to the characteristics described above, it may be used for multiple small lesions or larger ones (5,11-14).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Oral exfoliative cytology is defined as the study of cell morphology that has been shed naturally or artificially by the oral mucosa. This technique consists of the observation under a microscope of certain parameters such as the size and the contour of the nuclei, the nucleus / cytoplasm ratio, chromatism, keratinization, i.e.: parameters indicating atypical changes in the cells and possible malignancy (15-19). However, the practice of oral cytology disappeared due to the problems derived from this technique: collection of isolated cells, false negatives and the subjective evaluation of the samples (20,21). In order to overcome these problems the improvement of the sampling instruments has been attempted and improvements have been made in the form of transportation.

The objective of this paper is to analyze cellularity, the quality of the preparation and the types of cells present in normal oral mucosa samples obtained using three different instruments: Cytobrush®, dermatological curette and OralCDx® brush, by means of liquid-based cytology and thus determine the possible differences between them.

## **MATERIAL AND METHODS:**

### **Study population**

The sample consisted of 104 exfoliative cytology samples of the oral cavity, specifically of the buccal mucosa, obtained by using three different instruments. These samples were taken from voluntary healthy persons and students of the Faculty of Medicine and Dentistry of the University of Santiago de Compostela. We estimated a sample size (n) of 93 samples for a difference in the proportion of valid samples of 40%, with 90% power and a security level of 95%. The size was increased to 104 samples. Subjects having a systemic disease and/or a pathology of the oral cavity were excluded. This research has obtained the approval of the Clinical Research Ethics Committee of Galicia.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Obtaining the samples

The cytological samples of the oral cavity were obtained by superficially scraping the malar mucosa using three different instruments:

- Cytobrush® cervical sampling brush (Medscan AB, Malmö, Sweden). The test sample is obtained by vigorously scraping the malar mucosa with the brush, rotating the brush 10-15 times (Figure 1A).
- Dermatological curette 7mm diameter (Stiefel, Madrid, Spain). We used the "pencil technique" for sampling with the dermatological curette, performing a superficial scraping the malar mucosa (Figure 1B).
- OralCDx® Brush Kit (Oral Cancer Prevention International, Inc. Mfg. Medical Packaging Corporation, Camarillo, CA USA). The OralCDx Brush Kit is a circular brush specially designed for cytological sampling of the oral cavity. Although the kit contains a slide and fixative for conventional computer assisted cytology, we only used the brush for sampling. The brush is used by placing the flat part on the malar mucosa and performing 5-15 rotations, exerting certain pressure, until a reddish area is obtained (Figure 1C).

It was not necessary to apply topical anesthesia with any of these instruments. The means for transporting and storing the samples was PreservCyt® (Cytoc Corporation, Marlborough, USA).

The instrument with the collected sample was inserted in the vial, which was shaken vigorously and rotated several times (counter clockwise) until most of the sample was suspended in the liquid. All the collected cytological samples were anonymized for their conservation and use for further studies.

### Processing the samples

1  
2  
3 The standard protocol recommended by the manufacturer was used to prepare  
4 the mono-layer samples using ThinPrep®2000 Processor (Cytoc. Corporation,  
5 Boxborough, Mass., USA).  
6  
7  
8  
9

### 10 **Evaluating the samples**

11  
12 The pathologist performed a cytological assessment of the quality of the  
13 preparations obtained with each instrument. The standard parameters used for  
14 the assessment were: cellularity of the sample, distribution on the slide, quality of  
15 the preparation and types of cells present in the samples.  
16  
17  
18  
19  
20

21  
22 Following the guidelines of the British Society for Clinical Cytology of 2002,  
23 samples presenting any of the features mentioned below were considered  
24 inadequate: low cellularity, poor fixation (drying) and/or thick layer (22,23).  
25  
26  
27  
28  
29

30 Sample cellularity was analyzed as if it were a cervical smear, using the  
31 Bethesda 2001 System (23,24) and the Eclipse™ 6.400X microscope (Nikon). A  
32 liquid-based cytology is considered acceptable if it contains an approximate  
33 minimum of at least 5,000 well preserved squamous cells. The average number  
34 of cells an area must contain for the sample's results to be more than 5,000 is  
35 calculated considering the diameter of the preparation, in the case of the  
36 Thinprep it is 20mm, and the ocular lens used. We drew a line in the center of  
37 each preparation with a marker. Using the ocular lens FN20/10X we evaluated  
38 the cells of the squamous epithelium which were correctly visualized in ten  
39 discontinuous areas in the average parameter of each preparation. Therefore, an  
40 average of at least 50 cells per area is required to obtain the minimum  
41 preparation of 5,000 cells / preparation; as recommended by the Bethesda  
42 System to classify the sample as adequate. If a sample contains empty areas or  
43 spaces the percentage of the hypocellular areas is calculated and this proportion  
44 must be included in the calculations (24).  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57

### 58 **RESULTS**

59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The average age of the 9 male subjects is  $22.56 \pm 1.67$  years. As regards to the group of 20 female subjects, the average age is  $23.60 \pm 3.33$  years. There are no statistically significant differences ( $p=0.18$ ). As regards to their smoking habits, 33.3% of the men (3) and 40% of the women (8) are smokers, there are no significant differences ( $p=0.732$ ) (Table 1).

The prevalence of smokers was similar to the samples obtained with each technique, representing 35.1% of the samples obtained using Cytobrush, 34.4% of those obtained using the curette and 34.3% of the samples obtained with OralCdx ( $p=0.9$ ) (Figure 2).

We did not find differences between the cellularity of the preparations and the instrument used for sampling. All processed liquid-based cytology preparations using ThinPrep®2000 showed an adequate preparation quality, with over 50 cells per area. In all the analyzed smears, the cells were distributed uniformly and showed no signs of mucus, bleeding, inflammatory exudate or artifacts. We found no correlation between the average number of cells and the type of instrument used to collect the samples (Figure 3).

With regards to the types of cells, the samples were generally formed by two types of cells: superficial and intermediate, no differences were found between the cytological preparations of the three instruments. We did not observe basal cells in any of the 104 analyzed samples. We have observed isolated signs of keratinization, thus, in 20 samples there were some signs of dyskeratosis, in 6 samples we have observed parakeratosis and we have documented 3 keratin pearls. Such findings have not shown any correlation with the type of instrument used to obtain the sample (Figure 4).

## DISCUSSION

Exfoliative cytology is applied to the diagnosis of oral diseases since Papanicolaou and Traut demonstrated their validity in the diagnosis of cervical neoplasia. Traditionally, it has been used to diagnose mycotic infection, as in the

1  
2  
3 case of oral candidiasis, deep mycosis such as paracoccidioidomycosis, in the  
4 study of epithelial infections of the Epstein-Barr virus in hairy leukoplakia lesions,  
5 as well as in the orientation of the diagnosis of vesicular-bullous lesions (25).  
6  
7  
8

9  
10 The instrument used to obtain the cytological sample must be easy to use in any  
11 location, cause little discomfort for the patient and provide an appropriate number  
12 of epithelial cells representing all of the epithelial layers (reaching the basal  
13 membrane) so it may be used in the diagnosis of suspicious or malignant lesions  
14 of the oral cavity (26). Different sampling instruments have been used throughout  
15 the evolution of exfoliative cytology to collect samples of the oral cavity: wooden  
16 spatulas, cotton, mouth washes, etc. However, we have observed that  
17 Cytobrush® increases the number of cells collected and allows a better  
18 distribution on the slide.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28 Cytobrush® is a conical brush for gynecological cytologies which has been used  
29 for many years. Its use has been extrapolated to the oral cavity (3,16,17,27).  
30 There is some controversy on the use of this technique in early detection of oral  
31 cancer since the existence of false positives has been documented, proving high  
32 sensitivity (90%) but a low specificity (3%) (28). However, Remmerbach et al.,  
33 studied the reliability of oral cytology by scraping and conducting cytometric  
34 analysis in the early diagnosis of oral cancer, finding the technique to have  
35 94.6% sensitivity and a specificity of 99.5% (3). Potter et al., in a series of  
36 confirmed OSCC cases found 4 cases of false negatives (3.5%), resulting in  
37 delays in the definitive diagnosis (29).  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 OralCDx is a computer-assisted method for the analysis of cytological samples  
49 collected by transepithelial biopsy. This kit includes a circular brush specially  
50 designed for oral transepithelial sampling: (11,26,30-32,13). Scheifele et al., in a  
51 published paper which studied 103 cases compatible with premalignant oral  
52 lesions and OSCC, found that the sensitivity of OralCDx in the detection of  
53 dysplasia and OSCC reached 92.3% and 94% specificity. Such results support  
54 the use of this technique as a tool for oral lesion screening (33). However, Poate  
55 et al., in a study on 112 patients with clinical suspicions of potentially malignant  
56 oral lesions which underwent a conventional biopsy and exfoliative cytology with  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

OralCDx, have observed a sensitivity level of the technique in the detection of oral epithelial dysplasia of 71.4% and 32% specificity. The positive predictive value of the results considered abnormal using a brush cytology was 44%, while the negative predictive value was 60% (34).

Although the brushing "biopsy" techniques seem to present a higher sensitivity and specificity than conventional cytology, these differences are not significantly higher (30). Recent studies such as the one conducted by Hohlweg-Majert et al., have found a sensitivity of oral biopsy by computer assisted oral brushing biopsy (OralCDx) of 52%, a specificity of 29% and a positive predictive value of 63%. According to these authors the use of oral brush cytology as an oral lesion screening method must be revised (35). Boopathi et al., consider that OralCDx overestimates dysplastic oral lesions leading to a high figure of false positives (36).

Navone et al., recently have used a disposable dermatological curette to collect samples of exfoliative cytology sampling until a light bleeding of the mucous occurs thus confirming that the basal layer of the epithelium has been reached, they have even obtained small sections of tissue that could be considered as "micro-biopsies". Comparing their results with those of other authors who performed a brush biopsy we can observe a reduction of false negatives with a sensitivity of 71.4% and a 60% negative predictive value (5).

The improvements in the means of transportation have led to the extrapolation of the liquid-based cytology, widely used for cervical cancer screening, to the oral cavity. Unlike conventional cytology, where the cells are extended on a slide and later fixed, in this technique the sampling instrument is inserted in a preserving liquid medium. This allows for the immediate fixation of the cells, thus all the collected material can be used and it results in preparations with abundant cells extended in a thin and homogeneous layer (23,37-39). This technique allows the morphological study of cells in greater quantity and quality; as well as obtaining enough cellular material to perform a great amount of immunohistochemical, viral and, above all, molecular studies (5).

In 2005, Hayama et al., analyzed the use of conventional and liquid-based cytology for the diagnosis of oral lesions, comparing the thickness of the sample,

1  
2  
3 cellular distribution, microbiota and inflammation, observing that in fact liquid-  
4 based cytology provided statistically better results than those of conventional  
5 cytology as regards to the thinness of the samples (41%) and cell distribution  
6 (39).  
7  
8  
9

10  
11  
12 The first study published using Cytobrush and liquid-based cytology in oral cavity  
13 epidermoid carcinomas was conducted by Navone et al., in 2007, which found  
14 99% specificity and 95.1% sensitivity in liquid-based samples. 8.8% of the  
15 samples were inadequate (5). The same research group has recently conducted  
16 a study on 500 patients with potentially malignant lesions and OSCC. The  
17 research comprises conventional cytology performed in 89 cases and 411 liquid-  
18 based cytologies using Thinprep Processor. The cytology sampling was  
19 conducted using Cytobrush and the curette. The results of this study show an  
20 86% sensitivity for conventional cytology, 94.3% specificity and a predictive value  
21 of 95.7% with 12% of inadequate samples. Liquid-based cytology obtained  
22 sensitivity 94% for high-grade lesions and carcinomas, 98.9% specificity and a  
23 positive predictive value of 95.9% and 8.8% of inadequate samples (2).  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

35  
36 Although the value of the brush biopsy or liquid-based cytology have shown  
37 diverse results in terms of sensitivity, specificity, the results have not been  
38 confirmed in all these studies by means of a biopsy. Moreover, in the cases in  
39 which both techniques were performed, these were not done simultaneously nor  
40 in the same area, therefore extrapolation of the results is complicated (40). All  
41 the research papers on liquid-based oral cytology have used Cytobrush and its  
42 variants and the dermatological curette as the sampling instrument. Delevarian et  
43 al., have been the first to conduct a study to evaluate the diagnostic value of  
44 liquid-based cytology in early detection of premalignant and malignant lesions of  
45 the oral cavity, using OralCDx® Brush. These authors found 88.8% sensitivity in  
46 the technique, 100% specificity, a positive predictive value of 100% and a  
47 negative predictive value of 80%. All samples contained cells representing all  
48 epithelial layers and they consider that, thanks to the design of the brush's  
49 bristles, with greater rigidity, problems of false negatives and inadequate  
50 samples are solved, thus increasing the sensitivity of the technique (40). To date,  
51 there are no published papers comparing Cytobrush, the curette and oral  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

OralCDx in liquid-based cytology in order to analyze whether the quality of the sample varies depending on the instrument used to scrape the oral mucosa.

Kujan et al., have been the first to conduct a study on liquid-based oral cytology on the oral mucosa of healthy individuals. In this paper, the authors have used the following sampling instruments: CervexBrush ® to collect samples of the malar mucosa and GT ® Cytobrush Plus to sample the tongue. The means for transportation was SurePath and its processor. These authors found that most of the liquid-based preparations showed adequate quality, only 1.3% were inadequate; in our study, however, 100% of the samples were adequate to conduct cytological tests, regardless of instrument used for sample collection (23).

In our study, with regards to the types of cells, the samples were generally formed by two types of cells: superficial and intermediate, no differences were found between the cytological preparations of the three instruments. We have observed isolated keratin products, thus in 20 samples there were some signs of dyskeratosis, in 6 samples we have observed parakeratosis and we have documented 3 keratin pearls. These findings did not show any correlation with the type of instrument used to collect the sample, coinciding with Kujan et al., who did not find any relationship between the average cell numbers and the sampling location or the type of brush used (23).

We did not observe basal cells in any of the 104 analyzed samples. Kujan et al., only found basal and parabasal cells in 6 of the 150 analyzed samples (23). Our results do not coincide with those reported by Delavairan et al., who claim that the samples obtained and processed using OralCDx and treated in liquid-base contained cells representative of all basal layers, including basal and parabasal cells (40). Probably these differences may be due to different sample processing methods. In our research we have used ThinPrep 2000 where, after shaking the sample, it passes, by means of negative pressure, through a filter containing a thin layer of cellular material. However, Delavairan et al., centrifuged the sample and extended the cellular sediment on the slide (40).

1  
2  
3 We agree with others authors who currently state that oral exfoliative cytology  
4 could be the most effective tool in the OSCC and precancerous lesion screening  
5 due to the reduction of false negatives or positives in the development of specific  
6 instruments for sampling the oral cavity and in the implementation of liquid-based  
7 cytology (2,20,23). However, we consider it necessary to carry out gene  
8 expression studies of oral cytology samples to detect early changes that are not  
9 yet visible in cytomorphological studies.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

### 19 **CONCLUSIONS**

20  
21  
22 The main advantage of liquid-based cytology is that it increases the number of  
23 samples suitable for cytological analysis. The ThinPrep ® 2000 Processor  
24 performs a dispersion of the sample which subsequently passes through a filter  
25 resulting in a homogeneous layer of cell material. Thus, the samples are  
26 homogenized regardless of the cellularity of the sample present in the medium of  
27 transportation. Therefore, we have not found differences in the quality of the  
28 samples taken using Cytobrush, a curette or OralCDx brush, regardless of the  
29 fact that these instruments are more or less aggressive with the oral epithelium.  
30 Since our objective is to study cytomorphological liquid-based cytology, there are  
31 no differences regarding the instrument used. However, if the objective is to  
32 conduct studies of gene expression and to obtain sufficient amounts of RNA,  
33 likely there will be certain differences depending on the aggressiveness of  
34 instrument used; especially since the RNA in surface epithelial cells is more  
35 degraded.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## TABLES AND FIGURES

Figure 1: Instruments used in the cytological sampling. A: Cytobrush, B: Curette, C: Oral CDx.

Figure 2: Distribution of the samples collected with each instrument in relation to tobacco consumption. The prevalence of smokers was similar in the samples obtained with each technique ( $p=0.9$ ).

Figure 3: Quality of liquid-based and conventional cytology samples using different instruments. A: conventional cytology using Cytobrush, B: conventional cytology using the dermatological curette, C: conventional cytology using Oral CDx, D: liquid-based cytology using Cytobrush, E: liquid-based cytology using a dermatological curette, F: liquid-based cytology using Oral CDx. A significant reduction in cell overlapping and the amount of blood and mucus in the liquid-based cytology is observed. No differences in quality are appreciated in relation to the type of instrument used. We found no correlation between the average number of cells and the type of instrument used. Papanicolaou (20X).

Figure 4: Alterations in the keratinization pattern of normal oral epithelium in liquid-based cytology samples. A: parakeratosis, B: dyskeratosis, C y D: keratin pearls Papanicolaou (40X).

Table 1: Clinical and demographic characteristics of the study population. Homogeneous study population. There a no statistically significant differences between sex and age ( $p=0.18$ ).

## REFERNCES

(1) Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. Oral Dis. 2000 Mar;6(2):65-74.

- 1  
2  
3  
4 (2) Navone R. Cytology of the oral cavity: a re-evaluation. *Pathologica* 2009  
5 Feb;101(1):6-8.
- 6  
7 (3) Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich  
8 A, et al. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer.  
9 *Anal.Cell.Pathol.* 2001;22(4):211-221.
- 10  
11 (4) Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez MD,  
12 Gandara Rey JM, Garcia-Garcia A. Genetic and molecular alterations associated  
13 with oral squamous cell cancer (Review). *Oncol.Rep.* 2009 Dec;22(6):1277-1282.
- 14  
15 (5) Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, et al. The  
16 impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia  
17 and carcinoma. *Cytopathology* 2007 Dec;18(6):356-360.
- 18  
19 (6) Perez-Sayans M, Reboiras-Lopez MD, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F,  
20 Gayoso Diz P, Gandara Rey JM, et al. Measurement of ATP6V1C1 expression in  
21 brush cytology samples as a diagnostic and prognostic marker in oral squamous  
22 cell carcinoma. *Cancer.Biol.Ther.* 2010 Jun 25;9(12).
- 23  
24 (7) Kujan O, Khatlab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral  
25 histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia:  
26 an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol.* 2007 Mar;43(3):224-  
27 231.
- 28  
29 (8) Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia  
30 classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for  
31 improvement. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Mar;37(3):127-133.
- 32  
33 (9) Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular  
34 biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol.Cancer.* 2006 Mar  
35 23;5:11.
- 36  
37 (10) Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Muller-Richter U, Kosmehl  
38 H, et al. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions.  
39 *J.Dtsch.Dermatol.Ges.* 2007 Dec;5(12):1095-1100.
- 40  
41 (11) Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions.  
42 Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx  
43 Study Group. *J.Am.Dent.Assoc.* 1999 Oct;130(10):1445-1457.
- 44  
45 (12) Navone R, Marsico A, Reale I, Pich A, Broccoletti R, Pentenero M, et al.  
46 Usefulness of oral exfoliative cytology for the diagnosis of oral squamous dysplasia  
47 and carcinoma. *Minerva Stomatol.* 2004 Mar;53(3):77-86.
- 48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

(13) Navone R, Pentenero M, Rostan I, Burlo P, Marsico A, Broccoletti R, et al. Oral potentially malignant lesions: first-level micro-histological diagnosis from tissue fragments sampled in liquid-based diagnostic cytology. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Jul;37(6):358-363.

(14) Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J.Can.Dent.Assoc.* 2002 Nov;68(10):617-621.

(15) Mehrotra R, Singh MK, Pandya S, Singh M. The use of an oral brush biopsy without computer-assisted analysis in the evaluation of oral lesions: a study of 94 patients. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2008 Aug;106(2):246-253.

(16) Diniz-Freitas M, Garcia-Garcia A, Crespo-Abelleira A, Martins-Carneiro JL, Gandara-Rey JM. Applications of exfoliative cytology in the diagnosis of oral cancer. *Med.Oral* 2004 Aug-Oct;9(4):355-361.

(17) Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. *Acta Cytol.* 1992 Sep-Oct;36(5):706-710.

(18) Jones AC, Migliorati CA, Stewart CM. Oral cytology: indications, contraindications, and technique. *Gen.Dent.* 1995 Jan-Feb;43(1):74-7; quiz 79-80.

(19) Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1994 Jan;77(1):95-99.

(20) Kahn MA. Oral exfoliative cytology procedures: conventional, brush biopsy and ThinPrep. *J.Tenn.Dent.Assoc.* 2001 Winter;81(1):17-20.

(21) Perez-Sayans M, Somoza-Martin J, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez M, Gandara-Vila P, Rey JG, et al. Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. *Biotech.Histochem.* 2009 Aug 25:1-11.

(22) Slater DN, Rice S, Stewart R, Melling SE, Hewer EM, Smith JH. Proposed Sheffield quantitative criteria in cervical cytology to assist the grading of squamous cell dyskaryosis, as the British Society for Clinical Cytology definitions require amendment. *Cytopathology* 2005 Aug;16(4):179-192.

(23) Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P. Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncol.* 2006 Sep;42(8):810-818.

- 1  
2  
3  
4 (24) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The  
5 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*  
6 2002;287(16):2114-9.  
7  
8 (25) Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology.  
9 *Aust.Dent.J.* 1996 Apr;41(2):71-74.  
10  
11 (26) Acha A, Ruesga MT, Rodriguez MJ, Martinez de Pancorbo MA, Aguirre JM.  
12 Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer.  
13 *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2005 Mar-Apr;10(2):95-102.  
14  
15 (27) Mollaoglu N, Wilson MJ, Cowpe JG. Extraction of DNA from oral cytological  
16 samples by scraping and smear method suitable for restriction site mutation  
17 analysis: a pilot study. *Diagn.Cytopathol.* 2001 Aug;25(2):83-85.  
18  
19 (28) Rick GM. Oral brush biopsy: the problem of false positives. *Oral Surg.Oral*  
20 *Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2003 Sep;96(3):252.  
21  
22 (29) Potter TJ, Summerlin DJ, Campbell JH. Oral malignancies associated with  
23 negative transepithelial brush biopsy. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2003 Jun;61(6):674-  
24 677.  
25  
26 (30) Mehrotra R, Hullmann M, Smeets R, Reichert TE, Driemel O. Oral cytology  
27 revisited. *J.Oral Pathol.Med.* 2009 Feb;38(2):161-166.  
28  
29 (31) Trullenque-Eriksson A, Munoz-Corcuera M, Campo-Trapero J, Cano-Sanchez  
30 J, Bascones-Martinez A. Analysis of new diagnostic methods in suspicious lesions  
31 of the oral mucosa. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2009 May 1;14(5):E210-6.  
32  
33 (32) Kosicki DM, Riva C, Pajarola GF, Burkhardt A, Gratz KW. OralCDx brush  
34 biopsy--a tool for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma.  
35 *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.* 2007;117(3):222-227.  
36  
37 (33) Scheifele C, Schmidt-Westhausen AM, Dietrich T, Reichart PA. The sensitivity  
38 and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol.* 2004  
39 Sep;40(8):824-828.  
40  
41 (34) Poate TW, Buchanan JA, Hodgson TA, Speight PM, Barrett AW, Moles DR, et  
42 al. An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral  
43 Medicine unit. *Oral Oncol.* 2004 Sep;40(8):829-834.  
44  
45 (35) Hohlweg-Majert B, Deppe H, Metzger MC, Schumm S, Hoefler H, Kesting MR,  
46 et al. Sensitivity and specificity of oral brush biopsy. *Cancer Invest.* 2009  
47 Mar;27(3):293-297.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

(36) Bhoopathi V, Kabani S, Mascarenhas AK. Low positive predictive value of the oral brush biopsy in detecting dysplastic oral lesions. *Cancer* 2009 Mar 1;115(5):1036-1040.

(37) Song LH, Goh ES, Phang LC, Poh WT, Tay SK. Technical aspect of ThinPrep. *Singapore Med.J.* 2000 Dec;41(12):575-578.

(38) Ronco G, Cuzick J, Pierotti P, Cariaggi MP, Dalla Palma P, Naldoni C, et al. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. *BMJ* 2007 Jul 7;335(7609):28.

(39) Hayama FH, Motta AC, Silva Ade P, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2005 Mar-Apr;10(2):115-122.

(40) Delavarian Z, Mohtasham N, Mosannen-Mozafari P, Pakfetrat A, Shakeri MT, Ghafoorian-Maddah R. Evaluation of the diagnostic value of a Modified Liquid-Based Cytology using OralCDx (R) Brush in early detection of oral potentially malignant lesions and oral cancer. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2010 Apr 11.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

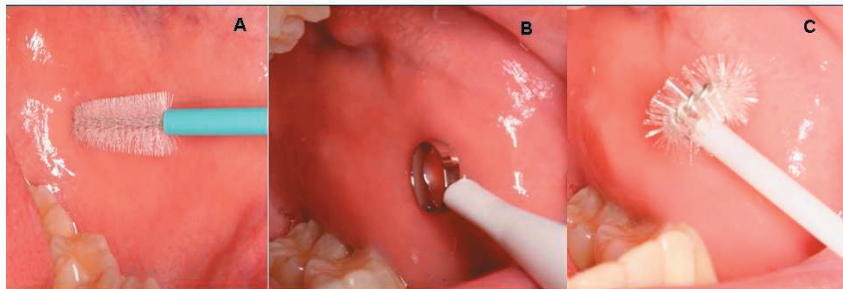
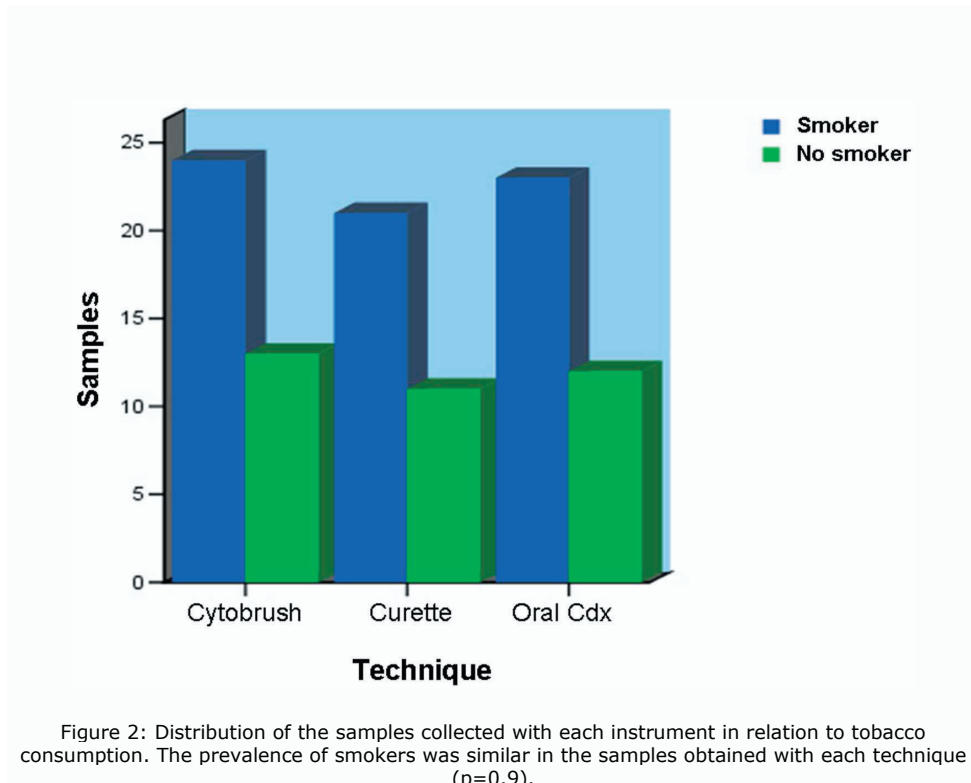


Figure 1: Instruments used in the cytological sampling. A: Cytobrush, B: Curette, C: Oral CDx.  
254x190mm (96 x 96 DPI)

Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



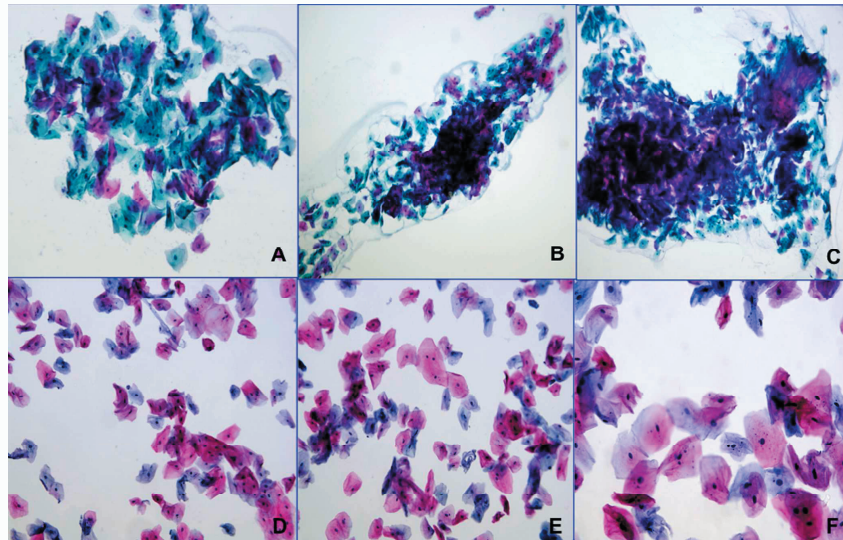


Figure 3: Quality of liquid-based and conventional cytology samples using different instruments. A: conventional cytology using Cytobrush, B: conventional cytology using the dermatological curette, C: conventional cytology using Oral CDx, D: liquid-based cytology using Cytobrush, E: liquid-based cytology using a dermatological curette, F: liquid-based cytology using Oral CDx. A significant reduction in cell overlapping and the amount of blood and mucus in the liquid-based cytology is observed. No differences in quality are appreciated in relation to the type of instrument used. We found no correlation between the average number of cells and the type of instrument used.

Papanicolaou (20X).  
352x225mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

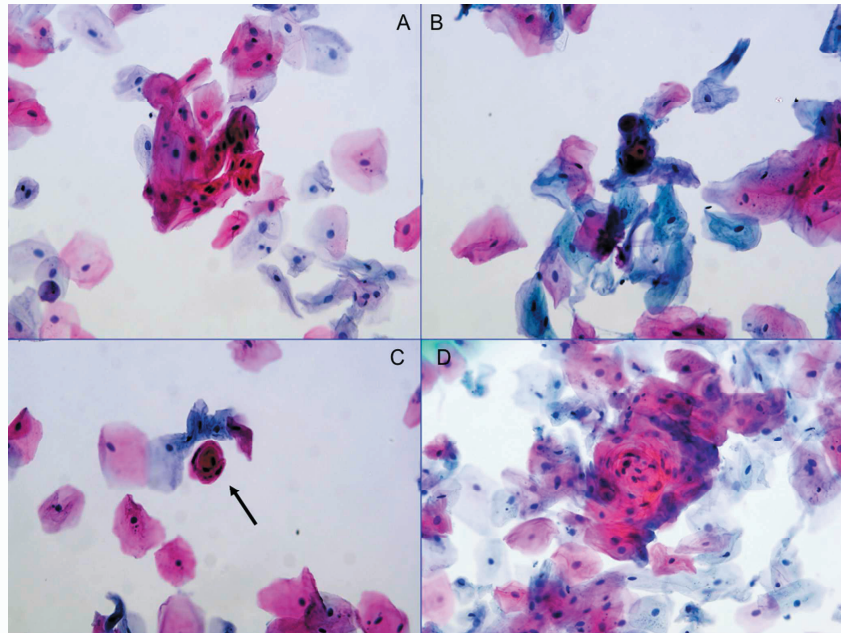


Figure 4: Alterations in the keratinization pattern of normal oral epithelium in liquid-based cytology samples. A: parakeratosis, B: dyskeratosis, C y D: keratin pearls Papanicolaou (40X). 352x264mm (300 x 300 DPI)

Sex	Men	Women	Total
Age	22.56±1.67	23.6±3.33	
Smoker	3 (33.3%)	8 (40%)	18 (62,1%)
Non-smoker	6(66.7%)	12(60%)	11(37.9%)

**Table 1:** Clinical and demographic characteristics of the study population. Homogeneous study population. There a no statistically significant differences between sex and age ( $p=0,18$ ).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60