

Aplicación de las técnicas de biología molecular en oncología oral

Application of molecular biology techniques in oral cancer

López-Durán M*, Campo-Trapero J**, Cano-Sánchez J***, Díez-Pérez R*, Bascones-Martínez A****

RESUMEN

Este artículo de revisión se propone exponer las principales técnicas de biología molecular disponibles actualmente para los investigadores, en el campo del cáncer y precáncer oral, clasificadas según el tipo de material biológico del que se disponga para iniciar la investigación. Éste puede ser ADN, ARN o proteínas. La explicación de cada técnica comprenderá una breve sistemática del proceso, así como sus ventajas, inconvenientes y estado de actividad actual. Todo ello con la finalidad de esclarecer las aplicaciones, pronto indispensables, de las técnicas más destacadas, en el diagnóstico precoz, pronóstico y tratamiento individualizado del carcinoma oral. Entre las técnicas más útiles en este proceso se encuentran: la electroforesis en gel, las técnicas de hibridación, la tecnología microarray, los biochips, la PCR convencional, la cuantitativa o la transcriptasa inversa, las técnicas de Southern, Northern y Western blot, la secuenciación de ADN, la clonación de genes, la inmunohistoquímica, el ensayo ELISA y la citometría de flujo. Destacan en particular por su gran utilidad, la tecnología microarray, los biochips y la PCR.

Palabras clave: Técnicas biología molecular, cáncer oral, carcinoma oral de células escamosas, PCR, microchips, microarrays.

SUMMARY

This article summarizes the main techniques in the area of molecular biology that are available for the investigation of oral cancer and precancer. They have been classified depending on the biological material we expect to analyze, which can be DNA, RNA or proteins. The explanation for each technique includes a brief description of its basics, as well as some advantages, drawbacks and current use of the technique. Our aim is to throw light on the applications of these techniques, soon indispensable for most studies, in the early diagnosis, prognosis and individualized treatment of oral carcinoma. The most useful techniques for this objective are nowadays: gel electrophoresis, hybridation, microarray technology, biochips, PCR (conventional, quantitative or reverse transcriptase), Southern, Northern and Western blot studies, DNA sequencing, cloning, immunohistochemistry, ELISA and flow cytometry. Some techniques that deserve a special mention due to their greater usefulness in the area of oral cancer are microarray technology, biochips and PCR.

Key words: Molecular biology techniques, oral cancer, oral squamous cell carcinoma, PCR, microchips, microarrays.

Fecha de recepción: 17 de abril de 2009.

Aceptado para publicación: 22 de abril de 2009.

* Licenciado en Odontología. Facultad de Odontología. Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial. UCM.

** Doctor en Odontología. Profesor contratado doctor. Facultad de Odontología. Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial. UCM.

*** Doctor en Odontología. Profesor asociado. Facultad de Odontología. Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial. Facultad de Odontología. UCM.

**** Doctor en Medicina y en Estomatología. Catedrático de Medicina y Cirugía Bucofacial. Facultad de Odontología. Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial. UCM.

López-Durán M, Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Díez-Pérez R, Bascones-Martínez A. Aplicación de las técnicas de biología molecular en oncología oral. *Av. Odontoestomatol* 2010; 26 (4): 189-196.

INTRODUCCIÓN

Una vez secuenciado el genoma humano, hay que acotar y otorgar su función a cada fragmento de ADN correspondiente a un gen. El Proyecto Genoma Humano ha revelado que los diez billones de pares de bases que forman el ADN codifican entre 30.000 y 40.000 genes (1). El ADN de las células de un organismo contiene la información genética necesaria para la construcción de sus proteínas, que determinarán la función biológica del gen o la patología de la enfermedad. La molécula de ARNm (ARN mensajero) es una copia de esta información mediante un proceso conocido como transcripción. La información codificada en la molécula de ARNm es interpretada en un proceso denominado traducción que tiene como fin la construcción de la proteína.

Sin embargo, el mero conocimiento de la secuencia de bases del ADN no es suficiente para definir la función biológica o la patología de la enfermedad. Para alcanzar este conocimiento se han desarrollado técnicas basadas en los perfiles de expresión, que a su vez han favorecido la detección de nuevos protooncogenes, genes supresores tumorales y modificaciones genéticas involucradas en la carcinogénesis oral. A toda esta tecnología se le une la bioinformática, capaz de descifrar la ingente cantidad de los datos generados por las técnicas de biología molecular (2). La caracterización de los patrones moleculares alterados que conducen a la transformación maligna puede emplearse tanto para el diagnóstico temprano del cáncer como para un tratamiento eficaz de esta patología (1). Todo esto también está suponiendo una revolución en la investigación de la carcinogénesis oral al permitirnos llevar a cabo un análisis en una escala genómica o proteómica, complementaria a los métodos convencionales de diagnóstico clínico o histopatológico, con el objetivo de determinar biomarcadores que puedan ser aplicados a nivel diagnóstico y/o terapéutico en las lesiones de precáncer y cáncer oral.

APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN ONCOLOGÍA ORAL

Subclasificación de los tumores orales identificados histológicamente

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) es el sexto más común en el mundo, y está asociado a una baja

supervivencia y una alta morbilidad, constituyendo el cáncer oral el 40% de los CCC (3). En la actualidad, la tecnología *microarray* ha descubierto cuatro subtipos de carcinoma oral de células escamosas (COCE) según sus distintos comportamientos clínicos, identificados por los perfiles de expresión génica. Chung et al, describieron un subtipo de COCE asociado al EGFR (receptor del factor de crecimiento endotelial), otro con un mesénquima enriquecido, un tercer tipo similar al epitelio normal y un último subclasificado en base a sus altos niveles de enzimas antioxidantes (4, 5). Estos grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de supervivencia sin recurrencia del tumor, y una exactitud del 80% en la predicción de metástasis linfáticas (5).

Diagnóstico y pronóstico molecular del cáncer

El COCE, como sucede con el resto de los cánceres, es una enfermedad causada por la acumulación de anomalías en la secuencia y expresión de un número de genes críticos. La tecnología *microarray* ha conseguido identificar muchos genes con alteraciones en su expresión, siendo la mayoría reguladores del ciclo celular, marcadores de diferenciación, genes con función antioxidante o reparadora del ADN, y genes involucrados en la adhesión celular, en las señales de transducción o en la respuesta inflamatoria (1, 6, 7) Entre ellos, cabe mencionar por su importancia o relevancia los siguientes: Proliferación y ciclo celular: el EGFR, C-myc, las ciclinas A y D1, Ki67, Bcl-2, H-RAS; supresión tumoral: p53, Bax, Rb, p16, p21, p27, maspina; angiogénesis: EGFR, VEGF; invasión y metástasis: caderinas, cateninas, MMPs, integrinas, proteína S100. Hasta el momento actual no se ha encontrado un gen o grupo de genes implicados en el desarrollo de la enfermedad en la mayoría de los casos y que pudiera ser, por lo tanto, utilizado como biomarcador en el diagnóstico precoz y/o manejo de los pacientes con COCE.

Todas las formas de cáncer desarrollan alteraciones comunes, como son: la habilidad para la autosuficiencia en las señales de crecimiento e insensibilidad a las señales que se oponen a él, evasión de la apoptosis, angiogénesis, potencial replicativo ilimitado, invasión tisular y capacidad de metástasis (8). Las alteraciones que promueven este crecimiento celular anormal, detectables mediante las técnicas

de biología molecular, son: la mutación, delección, amplificación, translocación y las modificaciones en la expresión génica o en el nivel de metilación. Se ha observado que los cambios en los patrones de metilación pueden aparecer incluso dos años antes del desarrollo de un COCE, por lo que se ha propuesto utilizar estas modificaciones como biomarcadores para la detección y pronóstico de esta patología (9) Ninguna de las múltiples técnicas que existen actualmente para la detección de los patrones de metilación es universal. Para la selección de la más adecuada se debe considerar el tipo, cantidad y calidad del material biológico. Las técnicas más avanzadas para la detección de metilaciones en los genes son el MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), la HPLC (High-performance liquid chromatography) (9) y la MSP-PCR (Methylation - Specific PCR) (9-11).

En lesiones potencialmente malignas, como la leucoplasia oral, se ha empleado la tecnología microarray para identificar genes que sirvieran de biomarcadores para las lesiones displásicas con potencial para progresar a COCE, estableciéndose la tecnología microarray como el método de elección para analizar los marcadores potenciales de progresión de la displasia epitelial. (1, 7).

Mejora en el desarrollo de fármacos

El empleo de la biología molecular para el tratamiento oncológico pretende, por una parte, identificar los subgrupos sensibles a beneficiarse del tratamiento, y por otra, establecer nuevas dianas terapéuticas determinando los genes asociados con un mal pronóstico o ausencia de respuesta al tratamiento (12). Además, facilita la predicción de efectos adversos durante los estudios de toxicidad (12). El desarrollo farmacológico actual se centra en agentes diseñados contra genes específicos involucrados en el cáncer, alejándose cada vez más de los fármacos con toxicidad general (12). Cabe destacar también la importancia de la tecnología microarray en este campo (1, 12).

Estudio de la estabilidad cromosómica

La longitud de los telómeros es un importante indicador en el estudio tanto de la estabilidad cromosó-

mica como de la actividad de la telomerasa y la capacidad proliferativa de las células, pudiendo utilizarse para el pronóstico de malignidad en las células tumorales (13). Entre los *métodos empleados para medir la longitud de los telómeros* se encuentran los siguientes: southern blot, hybridization protection assay, fluorescence in situ hybridization (FISH), citometría de flujo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la microscopía electrónica.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR DISPONIBLES PARA SU APLICACIÓN EN ONCOLOGÍA ORAL

Existen en la actualidad numerosas técnicas para el estudio de las alteraciones producidas en el cáncer o precáncer oral. En las tablas 1 y 2 aparecen explicadas las técnicas principales, clasificadas en grupos según el tipo de material genético que pretendamos analizar: ADN, ARN o proteínas. Algunas de ellas son aplicables a todo tipo de muestra biológica, mientras que otras son específicamente utilizadas para cada uno de los tipos de material de partida.

De todas las técnicas que se resumen en las Tablas 1 y 2, merecen especial atención y un desarrollo mayor la tecnología *microarray*, los *biochips* y la *PCR*.

La tecnología *microarray* permite la miniaturización del proceso de hibridación de las secuencias de nucleótidos en superficies microscópicas, que normalmente son leídas por un láser capaz de interpretar los fluoróforos. Pueden usarse para detectar ADN, ARN o proteínas y permiten analizar incluso todo el genoma humano conocido en un único experimento (14, 15). El microarray permite analizar los niveles de expresión de un gen, determinando la cantidad de material genético presente (4). Son ensayos sencillos que requieren un material muy accesible, de alta validez y reproducibilidad (6, 15).

En general, el procedimiento del *microarray* puede dividirse en las siguientes fases:

1. Fabricación del *array*.
2. Aislamiento y marcaje del material genético.
3. Aplicación de la muestra marcada al *array* y medición de la hibridación.

TABLA 1.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICABLES TANTO A MUESTRAS DE ADN, ARN O PROTEÍNAS

		Base metodológica	Aplicación	Ventajas	Inconvenientes
TÉCNICAS COMUNES	Electroforesis en gel	Separación de ácidos nucleicos o proteínas según su tamaño y carga eléctrica mediante campo eléctrico, en medio poroso.	Comparación de muestras biológicas distintas (sano/enfermo).	Técnica sencilla	Necesita comparar datos con otros conocidos. Se tiende a la miniaturización y a los chips.
	Hibridación	Unión de sondas específicas marcadas a los ácidos nucleicos o proteínas a identificar.	Se usa en PCR, chips de ADN, Southern y Northern Blot.	Alta especificidad.	Requiere un método de visualización (radiactividad o quimioluminiscencia).
	Microarray	Miniaturización del proceso de hibridación para analizar un número elevado de muestras en un único experimento.	Monitorización de niveles de biomarcadores, detección de cambios en material genético, determinación de dianas farmacológicas, evaluación de interacciones entre proteínas.	Técnica cuantitativa, sencilla, accesible, de alta validez, reproducibilidad y sensibilidad.	Los de ADNc no permiten detectar modificaciones post-transcripcionales.
	Biochips	Ensayo bioquímico miniaturizado.	Farmacogenómica y farmacogenética (Identificación de dianas terapéuticas; desarrollo de fármacos), diagnóstico de enfermedades, detección de mutaciones y polimorfismos, análisis de perfiles de expresión.	Estudio de varios elementos simultáneamente en la misma muestra; requiere cantidades mínimas de muestra y reactivos; rendimiento alto de la muestra.	Problemas para analizar proteínas (la estructura 3D favorece uniones múltiples; fácil desnaturalización o inactivación por la manipulación), precio.

4. Análisis e interpretación de los datos (12). Una técnica frecuentemente empleada para el estudio del cáncer oral es la aplicación de la inmunohistoquímica a muestras recogidas en *tissue microarrays* (TMA) (Fig. 1).

El concepto de los *microarrays* basados en anticuerpos fue propuesto por Ekins y Chu en la segunda mitad de la década de 1980. Probaron matemáticamente que estos *arrays* permitían determinar múltiples niveles proteicos de forma simultánea y con una alta sensibilidad. Posibilitan, por tanto, identificar y

cuantificar proteínas, así como estudiar su función. La limitación de los *microarrays* de ADNc es que no son capaces de detectar modificaciones que ocurran después de la transcripción (metilación, fosforilación, etc), permitiendo en este caso sólo una visión parcial del proceso (7).

Las aplicaciones de los *microarrays* incluyen:

- La monitorización de los niveles de biomarcadores en los pacientes con lesiones de cáncer o precáncer oral.

TABLA 2.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICABLES ESPECÍFICAMENTE A MUESTRAS DE ADN, ARN O PROTEÍNAS

		Base metodológica	Aplicación	Ventajas	Inconvenientes
TÉCNICAS PARA ADN	PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	Método enzimático de amplificación de secuencias específicas de ADN (ej: gen) para obtener millones de copias, mediante la ADN polimerasa	Amplificación de genes; modificación de fragmentos de ADN; genotipificación; detección de mutaciones, marcadores genéticos, expresión de genes.	Límite de detección muy alto	Requiere material genético bicatenario y técnicas de visualización; es semicuantitativa; frecuentes falsos positivos por contaminación leve
	PCR cuantitativa o en tiempo real	Variante de la PCR en la que se cuantifica de forma absoluta o relativa (comparando con un gen normalizador) el producto de la amplificación de ADN	Cuantificación de expresión génica, valoración de la eficacia de fármacos, detección de agentes infecciosos y polimorfismos, diagnóstico tumoral, medición de telómeros	Técnica cuantitativa; mayor sensibilidad y rapidez; menor probabilidad de contaminación; no requiere electroforesis para su visualización	Requiere una curva de calibrado para la cuantificación absoluta y una alta calidad del material de partida; aconsejable la estandarización
	Cloning	Duplicar un gen o una porción de éste	Obtener un fragmento de ADN buscado	Posibilidad de ampliar la muestra exacta	Se obtiene sólo una copia
	Southern blot	Electroforesis e hibridación para secuencias específicas de ADN	Detección del tamaño y cantidad de un fragmento de ADN de interés (ej: telómero)	Permite cuantificar tamaño y abundancia	Técnica lenta que requiere grandes cantidades de ADN
	Secuenciación	Conocimiento de la secuencia de bases nitrogenadas de un fragmento de ADN mediante un método químico o enzimático	Entender la estructura; detectar mutaciones y mecanismos fisiopatológicos generados por inferencia en la secuencia y homología de genes	Permite el conocimiento de la estructura más básica de un nucleótido o gen	Sólo permite el conocimiento de la secuencia de bases, pero no su función
TÉCNICAS PARA ARN	Northern blot	Electroforesis e hibridación para secuencias específicas de ARNm	Detección del tamaño y número de transcripciones	Es la técnica más sensible para detectar niveles de expresión de ARNm	Técnica lenta que requiere grandes cantidades de ARN
	RT-PCR (PCR transcriptasa inversa)	Amplificación de fragmentos de ARN de interés para obtener millones de copias, con un paso previo de conversión de ARNm en ADNc bicatenario	Cuantificación de expresión génica, valoración de la eficacia de fármacos, detección de agentes infecciosos, diagnóstico tumoral	Requiere cantidades mínimas de ARN	Técnica semicuantitativa
	Hibridación <i>in situ</i>	Visualización de una secuencia de ADN o ARN en el sitio físico donde se encuentra, mediante hibridación por complementariedad de bases. Variaciones de la técnica: FISH, Q-FISH, TELI-FISH (parafina), Flow-FISH	Analizar la presencia y/o distribución de una secuencia de ADN o ARN transcrito de interés en tejidos o células. Muy utilizada en los TMA, donde puede hacerse de forma automatizada	Sondas más sensibles y específicas que las de ADN; la visualización en el tejido permite correlacionar resultados con muestras histológicas e inmunológicas	Las sondas de ARN son más lábiles que las de ADN
TÉCNICAS PARA PROTEÍNAS	Western blot	Electroforesis en gel para separar proteínas según su peso molecular y detección mediante anticuerpos específicos	Examinar cambios en niveles proteicos	Técnica con gran sensibilidad; permite detectar también el peso molecular de las proteínas	Técnica semicuantitativa, poco específica; laboriosa; requiere técnicas de visualización
	Inmuno-histoquímica	Detección de moléculas mediante uniones específicas antígeno-anticuerpo	Localización de proteínas específicas en tejidos o células	Posible a partir de muestras congeladas o en formol	Técnica semicuantitativa
	ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	Ensayo inmunoenzimático que puede ser directo/ indirecto, cualitativo/ cuantitativo/ semicuantitativo	Cuantificación de moléculas	Sencilla, rápida, económica, automatizable, análisis simultáneo de varias muestras	Requiere técnicas de visualización de la reacción enzimática
	Citometría de flujo	Paso de células por un fluido colocado bajo una fuente de luz que permite su visualización	Recuento celular, evaluación de marcadores fenotípicos, ciclos celulares, apoptosis	Técnica rápida; permite valorar el contenido total de ADN de una población celular	Requiere células en suspensión

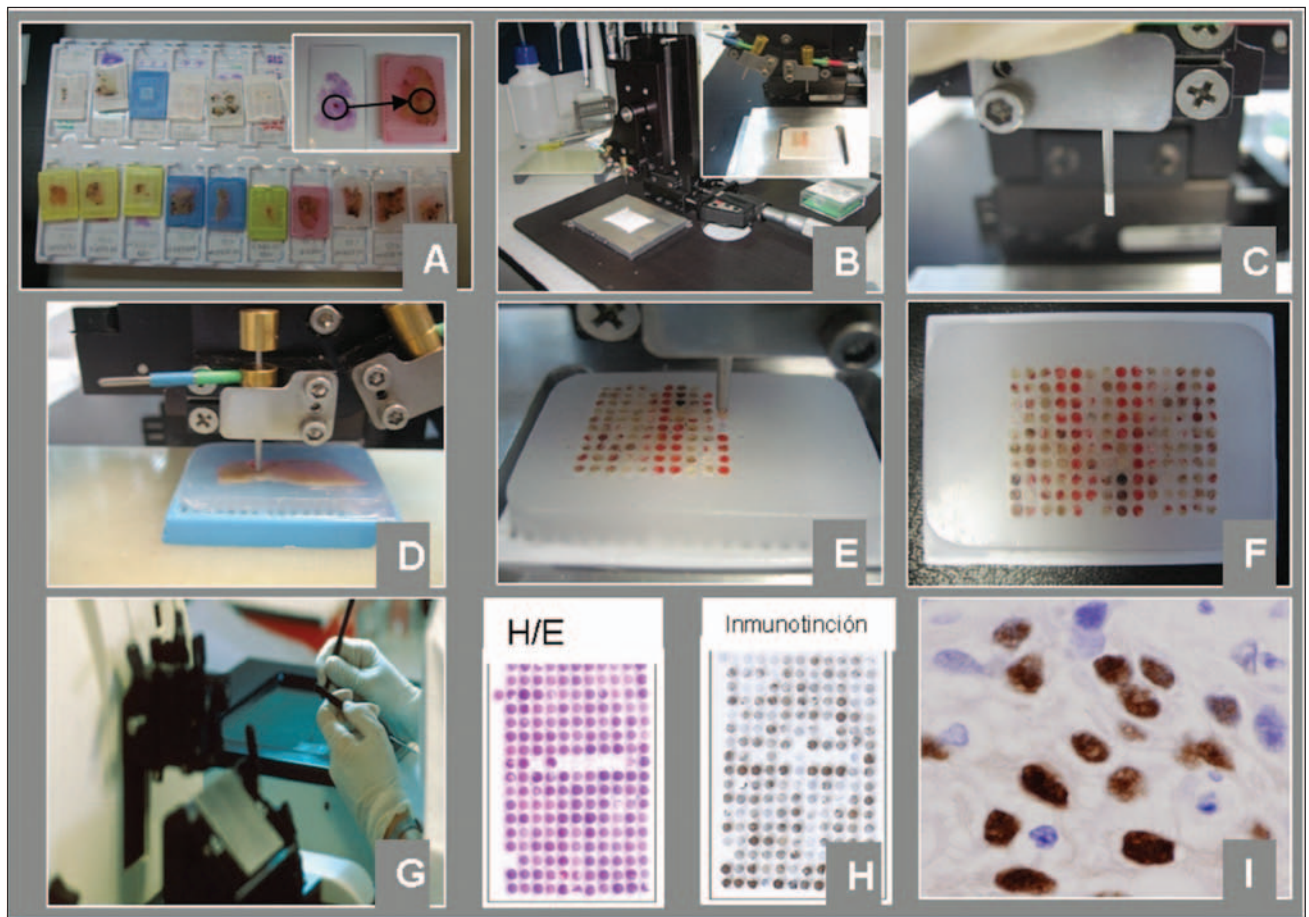


Fig. 1. Construcción y análisis de un TMA a partir de muestras fijadas en formaldehído y embebidas en parafina. A) Marcaje de la zona de interés en portaobjetos y parafinas. B) Fijación del bloque receptor en el microtomo. C) Confección del cilindro receptor. D) Toma de la región marcada. E) Colocación en el cilindro preconfeccionado. F) Recoger el resto de las muestras en el bloque receptor de la misma manera. G) Corte del TMA. H) Tinción con hematoxilina/eosina y/o inmunotinción. I) Visualización mediante microscopio.

- La determinación de cambios en los niveles celulares de expresión génica o proteica; el análisis de distintos candidatos farmacológicos.
- El descubrimiento y validación de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del COCE.
- La evaluación de las interacciones entre proteínas.
- La monitorización de las modificaciones proteicas. (1, 4, 6, 12, 15).

La Genómica y la Proteómica utilizan para su estudio en el campo de los biochips, los ADN-chips y los microarrays proteicos, respectivamente. Con las proteínas, el escenario se vuelve más complicado por varias razones, entre las que se encuentran las siguientes:

- La amplia variedad proteica permite muchas formas de funcionalización e hibridación.
- La técnica no consigue una amplificación de proteínas igualable a la PCR.
- Requiere una herramienta de análisis estadístico para cuantificar las uniones de la estructura tridimensional proteica.
- Los métodos de transporte e inmovilización pueden producir la desnaturalización o inactivación de las proteínas (16).

Otra técnica muy utilizada por su enorme potencial replicativo es la PCR (por Polymerase Chain Reaction), bien la convencional, la semicuantitativa pero con un límite de detección mucho mayor que el resto de las técnicas, o cualquiera de sus varia-

des. Esta técnica fue descrita inicialmente por Khorana y colaboradores en 1974, y perfeccionada por Mullis en 1986, siendo de las más empleadas actualmente. Permite la amplificación de un fragmento de ADN de interés (por ejemplo un gen), obteniendo millones de copias, en sólo 30 ó 50 ciclos de reacción. La PCR requiere material genético bicatenario (ADN molde o *template*), que se separa en las dos hebras mediante incrementos de temperatura, y donde cada uno de los filamentos aislados sirve de molde para la síntesis y amplificación de nuevas hebras de ADN (17). La PCR es una técnica válida para diferentes aplicaciones médicas que requieran una concentración alta de un fragmento concreto de ADN (17). Entre las variaciones de esta técnica se encuentran la PCR en tiempo real (PCR cuantitativa), capaz de determinar el número de copias de ADN presentes en una muestra, o la PCR transcriptasa inversa, adaptada para analizar ARN mensajero monocatenario mediante un paso previo de conversión a ADN complementario bicatenario. Esta técnica puede usarse en los casos en que se dispone de niveles de ARN insuficientes para la técnica de Northern blot. Además de proporcionar información cuantitativa, la PCR en tiempo real presenta otra serie de ventajas frente a la PCR tradicional, entre las que se encuentra su mayor sensibilidad (menos falsos negativos), rapidez y menor probabilidad de contaminación (menos falsos positivos) (17). Existe una PCR especialmente diseñada para la detección de las metilaciones en los genes implicados en la carcinogénesis oral. Es la Methylation-Specific PCR o MSP, que precisa de un tratamiento especial de la muestra con bisulfito sódico para diferenciar las bases metiladas de las no metiladas (10, 11). La Nested-MSP (MN-MSP) aparece como método alternativo a la MSP en aquellos casos en que se analicen muestras con baja cantidad o calidad de ADN inicial, como puede ocurrir con las conservadas en parafina (11).

CONCLUSIÓN

Debido a que el cáncer oral es una enfermedad asociada a cambios moleculares, genéticos y tisulares, el descubrimiento de biomarcadores que puedan detectar estas alteraciones proporciona una potente herramienta para el diagnóstico, seguimiento y predicción del pronóstico y de la respuesta al tratamiento.

Se podría afirmar que, a día de hoy, la tecnología precede al conocimiento, ya que es el rápido desarrollo de estas técnicas lo que permite avanzar en el conocimiento de las enfermedades a nivel molecular, así como la creación de dianas terapéuticas cada vez más específicas y fiables. En la actualidad existen numerosas herramientas disponibles para dilucidar las funciones biológicas de un gen en sus diferentes niveles de expresión (DNA, mRNA o proteínas), entre las que se encuentran: la electroforesis en gel, las técnicas de hibridación, la tecnología microarray, los biochips, la PCR convencional, la cuantitativa o la transcriptasa inversa, las técnicas de Southern, Northern y Western blot, la secuenciación de ADN, la clonación de genes, la inmunohistoquímica, el ensayo ELISA y la citometría de flujo. No todas las técnicas son aplicables a cualquier muestra biológica, sino que deberemos tener en cuenta el tipo, cantidad y método de conservación del material de partida, así como los objetivos, tiempo y economía de la investigación.

Actualmente, las técnicas con mayor utilidad en el estudio del cáncer oral son la PCR cuantitativa, los biochips y la tecnología microarray. La PCR en tiempo real o cuantitativa comprende, además de las ventajas inherentes a la PCR convencional, el poder de cuantificación del producto inicial, un aumento en la sensibilidad, una mayor rapidez y menor probabilidad de contaminación. La hibridación con microarrays ha esclarecido la relación existente entre el perfil de expresión génica y la presencia de diversas patologías. Esta técnica es además de gran interés en el ensayo de fármacos anticancerígenos. Los biochips consiguen un alto rendimiento de la muestra y de los reactivos y, al igual que los microarrays permiten medir la expresión de decenas de miles de genes simultáneamente, pudiéndose recoger dicha información en bases de datos con perfiles de expresión génica que permitan comprender las funciones e interacciones de estos genes.

Una vez se empiezan a crear estas bases de datos, es importante añadir a toda investigación molecular la denominada búsqueda *in silico*, a través de las numerosas herramientas bioinformáticas actualmente disponibles, que permiten el acceso a estas bases de datos, muchas de ellas de acceso público.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nazmul-Hossain ANM, Patel KJ, Rhodus NL, Moser KL. Microarrays: applications in dental research. Review article. *Oral Diseases* 2008;14: 25-9.
2. Glazer CA, Chang SS, Ha PK, Califano JA. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. *Oral Oncol* (2008), doi:10.1016/j.oraloncology.2008.05.013.
3. Ziober AF, Patel KR, Alawi F, Gimotty P, Weber RS, Feldman MM, et al. Identification of a gene signature for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;15;12: 5960-71.
4. Kuo WP, Whipple ME, Epstein JB, Jenssen TK, Santos GS, Ohno-Machado L et al. Deciphering gene expression profiles generated from DNA microarrays and their applications in oral medicine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:584-91.
5. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell.* 2004;5 (5):489-500.
6. Weber A, Hengge UR, Stricker I, Tischoff I, Markwart A, Anhalt K et al. Protein microarrays for the detection of biomarkers in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Pathol* 2007; 38(2):228-38.
7. Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, Rubini C, Palmieri A, Stabellini A et al. Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia. *Oral Oncol.* 2005;41: 365-74.
8. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;200:57-70.
9. Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M, Minarowski L, Naumnik W, Niklinski J et al. Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45(4):315-24.
10. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9821-6.
11. Licchesi JD, Herman JG. Methylation-specific PCR. *Methods Mol Biol.* 2009;507:305-23.
12. Clarke PA, te Poele R, Workman P. Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents. *Eur J Cancer.* 2004;40(17):2560-91.
13. Kah-Wai L, Ju Y. The telomere length dynamic and methods of its assessment. *J Cell Mol Med* 2005; 9(4):977-89.
14. Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2008, doi:10.1016/j.oraloncology.2008.05.015.
15. Radhakrishnan R, Solomon M, Satyamoorthy K, Martin LE, Lingen MW. Tissue microarray - a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(3):166-76.
16. Pasquarelli A. *Materials Science and Engineering C* (2007), doi:10.1016/j.msec.2007.06.001
17. <http://www.medmol.es/tecnicas.cfm>.
18. Tachibana M, Shinagawa Y, Kawamata H, Omotehara F, Horiuchi H, Ohkura Y, et al. RT-PCR amplification of RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral cancer sections: analysis of p53 pathway. *Anticancer Res* 2003;23 (3C):2891-6.
19. J. Bayani, J.A. Squire. Application and interpretation of FISH in biomarker studies. Mini-review. *Cancer Letters* 2007;249:97-109.
20. Chandler HL, Colitz CMH. *Molecular Biology for the Clinician: Understanding Current Methods.* *J Am Anim Hosp Assoc* 2006;42:326-35.

CORRESPONDENCIA

Mercedes López-Durán
lopezduran.m@gmail.com