

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)

MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS



Estudio piloto sobre la expresión de Ciclina D1, Maspina, p21 y Ki-67 en lesiones orales potencialmente malignizables y carcinomas orales de células escamosas.

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER PRESENTADO POR:

Tania Lisseth Santos Tucto.

TUTOR: Prof. Julián Campo Trapero.

Madrid, 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al equipo investigador conformado por el Dr. Jorge Cano, el Dr. José Montans y mi tutor el Dr. Julián Campo gracias por sus conocimientos, apoyo y participación en este estudio.

A la Dra. Rosario Carrillo, el MIR. Ignacio Pinilla y todas las personas que trabajan en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, por su enseñanza y permitir la recolección de muestras requeridas para el desarrollo de este trabajo.

A Patricia Gonzáles y Zaira Vega, técnicas del área de biotecnología del CNIO, gracias por su dedicación, paciencia y enseñanza.

A mi madre, por su esfuerzo, bondad y cariño de siempre.

A mi padre, gracias por tus consejos.

A toda mi familia; hermanos, tíos y primos, gracias por su apoyo incondicional durante esta etapa.

A mis amigos, gracias por la ayuda y compañía durante este tiempo académico. En especial a Annel, gracias por darme ánimos todos los días.

Al Programa Nacional de Becas del Gobierno del Perú, por apoyar económicamente este estudio y permitir que realice el máster.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Ciclo celular y mecanismos de control.....	1
1.2. Carcinogénesis.....	3
1.3. Lesiones orales potencialmente malignizables (LOPMs) y carcinoma oral de células escamosas (COCE).....	3
1.4. Senescencia celular.....	7
1.4.1. Definición y características.....	7
1.4.2. Causas de senescencia celular.....	9
1.4.3. Tipos de senescencia.....	9
1.4.3.1. Senescencia replicativa.....	9
1.4.3.2. Senescencia inducida por oncogenes.....	10
1.4.4. Vías de senescencia.....	10
1.4.5. Marcadores de senescencia y Ki-67.....	12
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo General.....	18
4.2. Objetivos específicos.....	18
5. MATERIAL Y MÉTODO	19
5.1. Diseño del estudio.....	19
5.2. Sujetos participantes y tamaño muestral.....	20
5.3. Recogida de datos.....	21
5.4. Procesamiento de la muestra.....	23
5.5. Tinción inmunohistoquímica.....	24
5.6. Análisis de los resultados.....	27
5.7. Análisis estadístico.....	28
6. RESULTADOS	30
7. DISCUSIÓN	50
8. CONCLUSIONES	57
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
10. ANEXOS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las vías de senescencia.....	11
Figura 2. Colocación de las muestras en el portaobjetos para el análisis.....	23
Figura 3. Equipos PT Link.....	25
Figura 4. Equipo DAKO Autostainer.....	25
Figura 5. Patrón de expresión de Ciclina D1.....	34
Figura 6. Patrón de expresión de Maspina.....	35
Figura 7. Patrón de expresión de p21.....	36
Figura 8. Patrón de expresión de Ki-67.....	37
Figura 9. Representación de las proteínas con expresión estadísticamente significativa entre las etapas de carcinogénesis oral.....	42
Figura 10. Análisis global de la expresión de proteínas relacionadas con senescencia.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos histopatológicos de la displasia epitelial en la mucosa oral.....	5
Tabla 2. Sistemas de clasificación para la displasia epitelial.....	5
Tabla 3. Clasificación TNM y estadio clínico.....	22
Tabla 4. Grado de diferenciación histopatológica.....	23
Tabla 5. Descripción de los anticuerpos utilizados en la técnica inmunoquímica.....	24
Tabla 6. Grados de tinción para la cuantificación de la inmunotinción.....	28
Tabla 7. Características demográficas de los pacientes.....	30
Tabla 8. Localizaciones de las muestras.....	31
Tabla 9. Grado de las displasias.....	31
Tabla 10. Características de los carcinomas de células escamosas.....	32
Tabla 11. Expresión de Ciclina D1.....	34
Tabla 12. Expresión de Maspina.....	35
Tabla 13. Expresión de p21.....	36
Tabla 14. Expresión de Ki-67.....	37
Tabla 15. Cuantificación de la inmunotinción.....	38
Tabla 16. Coincidencia entre la expresión del factor de proliferación celular Ki-67 y las proteínas relacionadas con senescencia celular.....	38
Tabla 17. Prueba de Friedman para Ciclina D1.....	39
Tabla 18. Prueba de Friedman para Maspina.....	40
Tabla 19. Prueba de Friedman para p21.....	41
Tabla 20. Valores p para las diferencias de la expresión de proteínas entre los grupos.....	42
Tabla 21. Correlaciones globales entre las proteínas.....	43
Tabla 22. Correlaciones entre las proteínas en el grupo de TON.....	44
Tabla 23. Correlaciones entre las proteínas en el grupo de LOD+.....	45
Tabla 24. Correlaciones entre las proteínas en el grupo de COCE.....	46
Tabla 25. Expresión de las proteínas relacionadas con senescencia celular entre los grupos de LOD+ y COCE con respecto al tiempo.....	48
Tabla 26. Prueba de los rangos con signos de Wilcoxon.....	49

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CICLO CELULAR Y MECANISMOS DE CONTROL

El ciclo celular se desarrolla mediante una secuencia de eventos que permiten que la célula crezca, se divida y duplique su genoma. Este proceso se divide en cuatro fases: la fase G1 que es una fase de crecimiento donde se sintetizan macromoléculas celulares incluyendo proteínas, ARN y membranas. Luego, se lleva a cabo la fase S en la que se da la síntesis de ADN para continuar con otro período de crecimiento llamado fase G2. Finalmente, se desarrolla la fase M donde las células sufren mitosis y el ADN se divide igualmente en dos células hijas a través de la citocinesis (1). Sin embargo, se debe considerar que, en la mayoría de los tejidos adultos las células están en un estado detenido del ciclo celular denominado fase G0, que puede ser transitorio (este estado se denomina quiescencia) o permanente (este estado puede darse tras diferenciación terminal o senescencia) (2).

El paso de una fase a otra del ciclo celular depende de mecanismos de vigilancia llamados puntos de control. El término "punto de control del ciclo celular" se refiere a mecanismos mediante los cuales la célula detiene activamente la progresión a través del ciclo celular hasta que pueda asegurar que el proceso anterior, tal como la replicación del ADN o la mitosis, esté completo (3). Existen innumerables mecanismos para asegurar que los reguladores del ciclo celular se activen e inactiven oportunamente en el orden correcto. En general, los puntos de control incluyen un sensor que monitorea los defectos del ciclo celular, un transductor que transmite y amplifica la señal, y un efector que detiene el ciclo celular (1). Estas vías reguladoras responden a la señalización extracelular o el estrés intracelular y el daño del ADN (4).

El ciclo celular eucariota es impulsado por una familia de proteínas quinasas llamadas quinasas dependientes de ciclina (CDKs) (1). Estas proteínas forman el núcleo de la regulación del ciclo celular, los miembros de la familia de la ciclina

interactúan con los CDKs, y estos complejos están obligados a pasar por las fases del ciclo celular (4). Diversos factores mitogénicos estimulan estos complejos, las ciclinas de tipo D interactúan con CDK4 y CDK6 y son necesarias para la transición de la fase G0 a la fase G1. Ciclina E se une a CDK2 y permite la entrada a la fase S. El complejo ciclina A/CDK2 regula el paso a través de la fase S. Luego, también induce la fase G2 conjuntamente con CDC2 y ciclina A. Posteriormente, la ciclina B1 y CDC2 desencadenan los eventos moleculares asociados con mitosis (5).

La actividad de CDK4 y CDK6 se controla negativamente por unión a inhibidores de CDK de la familia INK4 (p16INK4A, p15INKB, p18INK4C y p19INK4D) (2). La expresión de los CDKs permanece relativamente constante en todo el ciclo celular, mientras que las ciclinas son sintetizadas y destruidas de forma cíclica durante el ciclo celular (6).

La regulación del ciclo celular también se da en respuesta a eventos intracelulares, tales como injurias genotóxicas y metabólicas, así como la alteración de la velocidad de la división y el tamaño de la célula (7). Las vías de señalización, tales como p53, actúan sobre estas injurias deteniendo la división celular y activando la iniciación de una respuesta apoptótica. Por lo tanto, las vías celulares como la diferenciación, la senescencia y la apoptosis convergen con, y son frecuentemente activadas por, los inhibidores de la división celular (4).

Además, existen RNAs largos no codificantes (lncRNAs) que también están implicados en la regulación de puntos críticos del ciclo celular tales como las ciclinas, CDKs, inhibidores de CDK, pRB y p53. Estos lncRNAs actúan como reguladores epigenéticos, reguladores del factor de transcripción, reguladores post-transcripción y andamios de proteínas. Varios lncRNAs son inducidos por el daño del ADN y participan en la detención del ciclo celular o la inducción de la apoptosis como respuestas al daño del ADN. Por lo tanto, las desregulaciones de estos lncRNA reguladores del ciclo celular pueden estar implicados en la tumorigénesis (8).

1.2. CARCINOGENÉISIS

El conocimiento del desarrollo y mecanismos de control del ciclo celular permiten comprender mejor la carcinogénesis. Estos mecanismos se encargan de reparar el ADN y supervisar la replicación de las células con la finalidad de preservar el genoma, garantizando la duplicación fiel del cromosoma y la transmisión a la descendencia (9). Existen dos mecanismos de reparación del daño a nivel genómico, estos son la apoptosis y la senescencia replicativa (10). Cuando la célula no puede repararse y se producen las alteraciones necesarias para generar la inestabilidad del genoma se origina la carcinogénesis e inicia el desarrollo del tumor, este proceso desencadena la expresión de oncogenes y alteración en las funciones de los genes supresores de tumores (11-14). Estas alteraciones se dan principalmente en tres grupos: la maquinaria de proteínas del ciclo celular incluyendo complejos de quinasas dependientes de ciclina (CDK), las enzimas metabólicas y las especies de oxígeno reactivo (15). La expresión de la carcinogénesis se caracteriza por la falta de cohesión intercelular, aumento en la proliferación celular y mayor capacidad de infiltración de tejidos y metástasis (10).

1.3. LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNIZABLES (LOPMs) Y CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (COCE)

En mayo del 2005, en un workshop coordinado por la OMS de Londres se reunió un grupo de trabajo internacional compuesto por especialistas en epidemiología, medicina y patología oral y biología molecular con la finalidad de discutir todo lo relacionado a precáncer y cáncer oral. Uno de los consensos de este grupo fue denominar trastornos potencialmente malignos para describir a las presentaciones clínicas que podrían tener un potencial para convertirse en cáncer. El término potencialmente maligno o malignizable indica que no todas las lesiones y condiciones descritas bajo este término pueden transformarse en cáncer, sino que hay una familia de alteraciones morfológicas entre las cuales algunas pueden tener un mayor potencial de transformación maligna (16). En este workshop la leucoplasia

fue definida como “placa blanca con riesgo de transformación maligna habiendo excluido otras enfermedades o alteraciones conocidas que no supongan un aumento en el riesgo de cáncer” (16). Actualmente, la leucoplasia es considerada como una lesión oral potencialmente maligna (LOPM) y es la más frecuente de todas las LOPMs en la cavidad oral (17,18).

La leucoplasia puede presentar a nivel histopatológico varios patrones que van desde una hiperplasia hasta una displasia epitelial severa (19). Las leucoplasias sin displasia epitelial (LOD-) suponen el 80 a 90% de todas las leucoplasias y las leucoplasias con displasia epitelial (LOD+) representan el 10 a 20%. Sin embargo, la presencia de displasia epitelial en el examen histológico se considera actualmente como el indicador más importante de mayor probabilidad de transformación maligna. Las LOD+ malignizan con mayor frecuencia que las LOD- (19-21).

La palabra displasia, proviene del griego y literalmente significa “crecimiento anormal”, ella engloba la existencia microscópica de una combinación variable de fenómenos representativos de un desorden de la maduración epitelial y una alteración de la proliferación celular (19,22).

Actualmente, la valoración cualitativa y cuantitativa de la capacidad de malignización de las LOPMs sigue considerándose un proceso subjetivo y controversial (18). Todavía no se han determinado marcadores definitivos que puedan predecir la existencia y evolución de las LOPMs. Sin embargo, la valoración del grado de displasia, a través de la biopsia y el análisis histopatológico, sigue siendo la mejor aproximación diagnóstica en la valoración de la capacidad de malignización de las LOPMs (22).

Basándose en los datos arquitecturales y citológicos que definen la displasia epitelial según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (**tabla 1**). Kujan O et al.(23) realizaron una valoración y determinaron dos situaciones de displasia, lesiones displásicas de bajo grado y lesiones displásicas de alto grado. El punto de corte entre una y otra es la presencia de 4 datos arquitecturales y 5 datos citológicos,

independientemente del nivel dentro del epitelio. Utilizando esta valoración, estos autores, observaron que solo el 15,1% de las lesiones de bajo riesgo se transformaron en un carcinoma oral de células escamosas (COCE), por lo cual, esta clasificación demostró una sensibilidad del 85% y una especificidad del 80% en su estudio (23). Actualmente, la OMS considera los grados leve, moderada y severa y los criterios establecidos por Kujan O et al.(23) para determinar el grado de displasia (24) (tabla 2).

Tabla 1. Datos histopatológicos de la displasia epitelial en la mucosa oral

Datos arquitecturales	Datos citológicos
1. Estratificación irregular. 2. Pérdida de polaridad de las células basales. 3. Crestas epiteliales anómalas (en gota, bulbosas,...) 4. Aumento del número de mitosis. 5. Mitosis anormales superficiales. 6. Queratinización prematura de células aisladas. 7. Perlas de queratina dentro de las crestas.	1. Variación anormal en el tamaño nuclear. 2. Variación anormal en la forma nuclear. 3. Variación anormal en el tamaño celular. 4. Variación anormal en la forma celular. 5. Aumento en la proporción núcleo/citoplasma. 6. Aumento del tamaño nuclear. 7. Mitosis atípicas. 8. Aumento del número/tamaño nucléolos. 9. Hiper Cromatismo.

Fuente: Gale N et al. Aguirre Echebarría P, Aguirre Urizar J.(22,25)

Tabla 2. Sistemas de clasificación para la displasia epitelial

Grado de displasia (OMS)	Sistema binario (23)
Displasia leve	Displasia de bajo grado
Displasia moderada	
Displasia severa	Displasia de alto grado

Fuente: El-Naggar A, Chang K, Grandis J, Takata T, Slootweg P. (24)

Consecuentemente, con el propósito de realizar una valoración más objetiva, a través de ciertos marcadores celulares, se están realizando investigaciones utilizando técnicas inmunohistoquímicas y moleculares. De esta forma, se pretende encontrar criterios diagnósticos y pronósticos que puedan sustituir o confirmar la presencia de displasia epitelial y su capacidad de malignización.

El término cáncer se define por la OMS como un grupo amplio de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo (26). Se considera una enfermedad multifactorial y un problema de salud a nivel mundial que genera una alta tasa de mortalidad (27,28).

Durante el desarrollo del cáncer las células proliferan sin control, probablemente porque la célula de la cual derivan ha sufrido alguna alteración genética. Este proceso puede degenerarse a tal punto que las células se extiendan más allá de los límites normales e invadan otros tejidos (26). A veces, este proceso maligno va precedido de LOPMs como la leucoplasia y la eritroplasia oral. Se ha observado que hasta un 10% de los pacientes con leucoplasia tienen un carcinoma invasivo en la lesión (29). Además, parece que la supervivencia de pacientes con cáncer oral que han presentado una lesión local previa es de 63%, cinco años después del diagnóstico (30).

En España, el cáncer oral representa un 2,0% de todos los tipos de tumores, su incidencia es de 1,9% y su mortalidad es de 1,1 por cada 100.000 habitantes (31). Dentro de los cánceres de la cavidad oral, el COCE es uno de los más frecuentes, constituyendo el 92,8% de todos los procesos malignos orales (32). Los factores de riesgo más significativos, de todos los cánceres de cabeza y cuello, son el consumo de tabaco y alcohol, la exposición a estos factores representa aproximadamente el 80% del desarrollo de estos tipos de cánceres a nivel mundial, con cierta variación para diferentes localizaciones, 65% para la cavidad oral y 86% para la laringe (33). Otros factores a considerar son la edad, el sexo, mala higiene oral, exposición a químicos y radiaciones, prótesis mal ajustadas y presencia del Virus de Papiloma Humano (34). Además, los tumores pueden desarrollarse dentro de un contexto de cáncer de campo, con tumores adicionales que surgen del mismo entorno ambiental o epigenético que dio origen al primer tumor; esta teoría, conocida como cancerización de campo plantea que tanto los tumores primarios como secundarios se originan en un área del epitelio previamente acondicionada por la exposición prolongada a mutágenos medioambientales (34,35).

En el diagnóstico, el método más utilizado para la detección de posibles lesiones potencialmente malignas o cancerosas es la inspección visual (36). Aunque, varios estudios han demostrado que puede reducir la mortalidad en pacientes de alto riesgo (consumidores de tabaco y alcohol) (36-38). La inspección visual solo se restringe a detectar aquellas lesiones ya establecidas y no determina el grado de displasia, el estadio tumoral o la evolución de una LOPM a carcinoma (36).

Por lo expuesto, se requieren más estudios para establecer un mejor sistema de evaluación que permita un diagnóstico, tratamiento y pronóstico correcto tanto de las LOPMs como del COCE (39). El diagnóstico correcto antes de llegar a estadios avanzados podría mejorar el pronóstico del tratamiento y reducir la mortalidad a causa del cáncer oral (40).

En la actualidad, los principales marcadores pronósticos son: la clasificación TNM, la localización y la histopatología (32). Sin embargo, ninguno de ellos ha demostrado ser un marcador totalmente válido y confiable para valorar el pronóstico de la evolución y respuesta al tratamiento de las LOPMs y carcinomas orales de células escamosas (COCEs), es por esta razón que, las investigaciones actuales pretenden descubrir nuevos marcadores moleculares, ya que se ha observado que existen eventos en la biología molecular de las células que permiten identificar la progresión de las LOPMs y COCEs a nivel histopatológico (41).

1.4. SENESCENCIA CELULAR

1.4.1. Definición y características

La senescencia celular es un fenómeno que fue descrito por primera vez en un estudio bajo condiciones no fisiológicas e in vitro donde se demostró que las células normales tenían una capacidad limitada para proliferar en el cultivo. Hoy en día, se define como la detención irreversible de la proliferación celular debido a diferentes causas de estrés celular (42,43).

Existen dos hipótesis importantes acerca de la senescencia celular, la primera es que este mecanismo puede ser una barrera frente a la progresión de malignidad en aquellas células que hayan sufrido un daño o estrés suficiente como para alterar su ciclo celular, pero insuficiente como para provocar su apoptosis, en este contexto, la respuesta de senescencia se considera beneficiosa porque actúa como un supresor de tumores (43); la segunda hipótesis proviene del hecho de que la regeneración y reparación de los tejidos se deterioran con la edad, entonces, se propuso la respuesta de senescencia celular para comprender el envejecimiento, o pérdida de la capacidad regenerativa, de las células in vivo, en este contexto, la senescencia celular se consideró perjudicial, ya que contribuía a la disminución de la función y renovación de los tejidos. Durante muchos años, estas hipótesis se siguieron más o menos independientemente, sin embargo, a medida que crecía la comprensión de la respuesta de senescencia, estas hipótesis se unieron, trayendo nuevos conocimientos a los campos del cáncer y el envejecimiento (43).

Asimismo, todas las células mitóticas pueden entrar en senescencia celular a excepción de las células embrionarias (44,45). Las células mitóticas pueden iniciar la senescencia cuando se encuentran con eventos potencialmente oncogénicos y adquirir características que comprenden el fenotipo senescente. Estas características incluyen el cese de la proliferación celular, conocida como detención del crecimiento, en esencia irreversible; aunque algunas células que no expresan p16^{INK4a} pueden retomar la replicación celular si se les inactiva el supresor tumoral p53 (46). Sin embargo existen otras características que también se han descrito en la literatura ya que ninguna de sus características son específicas de ellas de manera exclusiva, y no todas muestran todas las características (41). Las características adicionales más importantes y descritas hasta ahora son: permanencia de su actividad metabólica, adquisición de funciones alteradas tales como el aumento en la expresión de la beta-galactosidasa lisosomal (47,48), cambios en su morfología (sólo in vitro); las células senescentes in vitro se distinguen morfológicamente por adquirir una forma plana y alargada, y por

aumentar su tamaño hasta en dos veces. Sin embargo, in vivo solo podremos saber que se encuentran en estado senescente porque nunca observaremos el proceso de mitosis en ellas (49). Además, las células senescentes se caracterizan porque su foci nuclear presenta daños en el ADN y heterocromatina e incluye telómeros disfuncionales (50,51).

1.4.2. Causas de senescencia

Las células mitóticamente competentes responden a diversos estímulos o factores de estrés, sean extrínsecos o intrínsecos, manifestando el fenotipo senescente. Estos factores de estrés incluyen telómeros disfuncionales, daño no telomérico al ADN, señales mitogénicas excesivas, incluyendo las producidas por oncogenes (que también causan daño al ADN), estrés no genotóxico como perturbaciones en la organización de la cromatina y, probablemente, estrés con una etiología aún desconocida (43,52-54). Asimismo, las especies reactivas de oxígeno también se pueden considerar como inductores de senescencia celular ya que pueden provocar efectos mutagénicos en las células a través de iones de oxígeno y radicales libre (4,55,56).

La activación del mecanismo de senescencia por los factores o estímulos mencionados depende tanto de las condiciones de cultivo como del tipo celular (57).

1.4.3. Tipos de senescencia

De acuerdo al mecanismo por el cual se inicia la senescencia pueden describirse dos tipos:

1.4.3.1. Senescencia replicativa:

Este tipo de senescencia se describió por Hayflick y Moorhead en 1961 (42). Estos autores demostraron que las células normales tienen una capacidad proliferativa limitada que finaliza con la detención estable del ciclo celular. En este estudio, observaron que los fibroblastos cultivados in vitro dejaban de dividirse después de entre 50 y 100 duplicaciones, llamando a este fenómeno celular el

“límite Hayflick” (42). En la actualidad, evidencias han demostrado que los telómeros se acortan en cada ciclo celular por mecanismos fisiológicos propios (58,59). Una vez que uno o más telómeros se acortan hasta alcanzar una longitud mínima crítica, se expresa el fenotipo senescente, lo cual significaría el cese replicativo (60).

1.4.3.2. Senescencia inducida por oncogenes (SIO):

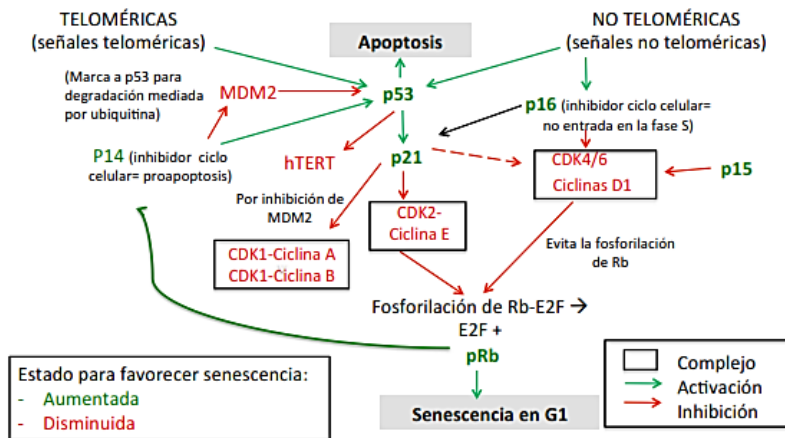
Este tipo de senescencia se activa por una fuente de estrés que deriva de señales proliferativas aberrantes de oncogenes (61). Por lo tanto, este tipo de respuesta puede ser la clave para la protección celular contra el cáncer. Existen estudios que demuestran que la SIO ocurre durante los estadios más tempranos o premalignos del desarrollo tumoral tanto en modelos animales como humanos (62-64). En estas etapas las señales inductoras de senescencia pueden alcanzar suficiente intensidad para ser efectivas manteniendo al tumor en un estado no agresivo (64). Por otro lado, la mutación de alguna de estas vías inductoras promueve la progresión maligna mediada por oncogenes (61-63). Sin embargo, la SIO también puede reactivarse cuando hay supresión de oncogenes o restablecimiento de la función de los genes supresores tumorales en los tumores malignos (65). Este mecanismo de protección contra el cáncer no solo se ha demostrado in vivo sino también in vitro (57).

La posible asociación entre la expresión de la SIO y las LOPMs permiten considerar a la SIO como un probable biomarcador del pronóstico de la evolución de las LOPMs a COCEs. Aunque, Collado y Serrano proponen que la SIO se activa cuando el tumor ya ha empezado a desarrollarse, pero aún no ha alcanzado el fenotipo maligno (63). Otro aspecto que todavía se desconoce es cuanta actividad oncogénica es necesaria para inducir la SIO, así como cuanta actividad se necesita para que un tejido normal o una LOPM se transforme en maligna y la proporción de estos niveles entre sí (60).

1.4.4. Vías de senescencia

Existen dos vías en las que los estímulos que hemos descrito desencadenan una respuesta senescente inducida por oncogenes (61,66): la ruta ARF/p53/p21 y la ruta p16/Rb/E2F y una tercera vía menos conocida a través de los receptores del ácido retinoico (67).

Figura 1. Esquema de las vías de senescencia



Fuente: López-Durán M.(41)

- **Vía ARF/p53:** el estrés genotóxico de las especies reactivas de oxígeno, el daño del ADN y los telómeros disfuncionales activan la respuesta de esta vía. La proteína p53 puede detener el ciclo celular a causa de alteraciones en el ADN para que la célula lleve a cabo los mecanismos necesarios para su reparación, o apoptosis cuando la lesión al ADN es irreparable. La estimulación de esta vía provoca que la proteína p14ARF inhiba a la proteína mdm2 ya que esta última produce la degradación de p53. Esto produce la transcripción de genes dependientes de p53, incluido el que codifica p21, e induce la senescencia provocando la detención del crecimiento celular. El papel de p53 en esta vía es importante ya que la pérdida su función retrasa la senescencia replicativa en células humanas. Existen ciertas células que al perder la función de p53 pueden pasar de su estado senescente a un nuevo

estado replicativo, con un peligroso estado genómico alterado. Otras células, sin embargo, permanecen en estado senescente a pesar de la inactivación de p53. Esto se debe a que esas células han entrado en senescencia a través de la vía p16/pRb, la cual es irreversible para la célula, aunque exista inactivación de p53, pRb o ambas (41,60,66).

- **Vía p16/pRb:** Esta vía se da por la expresión de p16, esta proteína es inducida por una gran variedad de estímulos estresantes, incluido la sobreexpresión de oncogenes como RAS, p16 es un inhibidor del ciclo celular y un regulador positivo de pRB, es decir, activa pRB para que establezca heterocromatina represiva en los loci E2F y posiblemente en otros genes promotores del crecimiento. La formación de estos focos de heterocromatina produce la represión de varios genes implicados en el desarrollo del ciclo celular. Además, parece ser que una vez formados esos focos de heterocromatina, éstos no necesitan la activación de p16 o pRb para seguir en esa disposición. Esto hace que la célula se mantenga de forma permanente en estado senescente, aunque exista la inactivación de p53. De esta manera, p16 impide la reversibilidad de la senescencia por inactivación de p53. Así pues, esta vía es una excelente barrera a la proliferación celular (4,66,68).

1.4.5. Marcadores de senescencia y Ki-67

El estudio de la senescencia celular, tanto in vivo como in vitro, ha contribuido con el descubrimiento de numerosos marcadores moleculares que expresan este mecanismo celular (60). Asimismo, se ha observado que algunos de estos marcadores se encuentran relacionados a las LOPMs y el cáncer de la cavidad bucal. La expresión de un marcador en una LOPM y la no expresión del mismo marcador en un carcinoma oral permiten evaluar el progreso de la carcinogénesis oral (69). Parece que cuando una célula pierde su respuesta senescente pasa de un estado benigno (LOPM) a un estado de malignidad (COCE) (60,66). Sin

embargo, no se puede afirmar que esto indique un proceso causa efecto debido a la complejidad del proceso carcinogénico, sino que parece ser una expresión más de la carcinogénesis (41,61).

Hoy en día, se pretende descubrir marcadores de senescencia que se expresen en LOPMs ya que este evento permitiría establecer un mejor pronóstico de la lesión. Los siguientes marcadores han sido descritos como marcadores potenciales de senescencia en las LOPMs que se presentan en la cavidad oral: p53, p16, p14, p15, p21, DCR2, E2F, actina, maspina, ciclina D1, Rb, RAR, MDM2, hTERT, DEC1, CDK 4, CDK 6 y betagalactosidasa (4,60,70). Este estudio piloto ha seleccionado tres proteínas relacionadas a senescencia celular para evaluar su expresión en el tejido oral normal (TON), la LOPM (leucoplasia oral con displasia) y el COCE de un mismo paciente. Maspina fue seleccionada por presentar resultados relevantes como marcador de senescencia celular en el estudio en el cual se basa esta investigación (41); p21 y Ciclina D1 se seleccionaron por ser representativas de cada una de las dos vías de senescencia celular, respectivamente.

Maspina cuyo nombre se debe a la homología con las serpinas mamarias (en inglés maspin por mammary serpins) (71). Es una proteína, serin-proteasa, que se encuentra en las células epiteliales y funciona como supresor tumoral inhibiendo la angiogénesis y migración de las células tumorales a otros tejidos u órganos (72,73). Asimismo, se ha observado que su expresión proteica se encuentra aumentada en los queratinocitos en senescencia (67). La localización de su expresión es diversa, puede ser secretada o constituir una proteína de la superficie celular (71) o puede expresarse en el citoplasma o el núcleo; algunos estudios han asociado su expresión nuclear a un buen pronóstico y su expresión citoplasmática a un mal pronóstico por presentar un fenotipo invasor (72,74-76).

p21 es una proteína que regula el ciclo celular a nivel de la fase G1 inhibiendo a las quinasas dependientes de ciclinas (CDK 2 y CDK4). Esta proteína pertenece a la

vía de senescencia ARF/p53, ya que su expresión es dependiente de p53. Además, inhibe la apoptosis por mecanismos tanto intracelulares como paracrinós (77).

Ciclina D1 es una proteína considerada un protooncogen debido a que actúa en el ciclo celular incrementando la proliferación celular, a través de la formación de complejos con quinasas dependientes de ciclinas por fosforilación y desfosforilación promoviendo la transición de la fase G1 a la fase S. Esta proteína participa en la vía de senescencia p16/pRb mediante la fosforilación de pRB, de esta manera evita su unión a E2F y el desarrollo de la senescencia celular. Además, su actividad es inhibida por varios genes supresores de tumores, incluyendo p16, p21 y p27 (78). La sobreexpresión de ciclina D1 puede funcionar como factor pronóstico independiente. Se ha encontrado su sobreexpresión en LOPMs (79) y en cáncer oral, relacionando su sobreexpresión con un mal pronóstico en las situaciones de cáncer oral (80).

Ki-67 es una proteína nuclear que funciona como marcador de proliferación celular ya que es expresada en las células durante las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M), y ausente en las células en estado de reposo (G0). Es por ese motivo que su anticuerpo monoclonal permite la detección inmunohistoquímica de células que se encuentran en proliferación celular. Por lo tanto, Ki-67 puede ser utilizado para medir la fracción de crecimiento en los tejidos normales, en las neoplasias malignas, y como un control negativo de senescencia celular (43).

2. JUSTIFICACIÓN

Como se ha descrito, existen diferentes mecanismos que controlan el crecimiento y proliferación celular con la finalidad de evitar la degeneración celular y carcinogénesis. Cualquier alteración en la activación e inactivación de los componentes reguladores del ciclo celular, que actúan como barreras de una proliferación atípica, podría demostrar si la lesión es propensa a malignizarse. Actualmente, se ha observado que la identificación de marcadores moleculares, relacionados a los mecanismos de regulación del ciclo celular, podría ser un buen criterio para determinar la evolución de una LOPM. La SIO es uno de estos mecanismos de regulación y se ha demostrado que se produce en etapas tempranas de la carcinogénesis, es decir, cuando la lesión puede poseer potencialidad de malignizarse. La finalidad de la SIO es evitar la malignización de la lesión (63). Por lo tanto, este mecanismo podría ser útil en el cáncer oral como herramienta de pronóstico de LOPMs.

Debido a que el carcinoma oral se asocia a una alta morbilidad y mortalidad, y la tasa de transformación maligna de las leucoplasias varía del 0,1% al 17,5% según los distintos estudios (17,31), sería muy útil poder determinar qué LOPMs tienen una mayor probabilidad de progresar a COCE. La identificación de marcadores moleculares relacionados a la senescencia en LOPMs y COCEs podría ayudarnos a determinar el pronóstico del progreso de estas lesiones. Para ello, se debe estudiar las expresiones e interrelaciones de las proteínas relacionadas a senescencia en el tejido oral de humanos que presenten estas lesiones. López-Durán M. (41), realizó un estudio de este tipo y analizó la expresión de diecinueve marcadores moleculares de senescencia en muestras que representaban las fases consecutivas de la carcinogénesis oral de células escamosas. Determinó en su estudio que Maspina era la única proteína con una presencia aumentada en las LOPMs y considerablemente disminuida en los COCEs, por lo cual esta proteína podría ser un marcador representativo de protección senescente frente al cáncer oral. Sin embargo, las muestras utilizadas en su estudio no fueron obtenidas del

mismo paciente, lo que no permite establecer un factor pronóstico de la evolución de la lesión a través de marcadores de senescencia estudiados.

Por lo tanto, la finalidad de este estudio piloto es determinar la expresión de este marcador (Maspina) y dos marcadores más que se encuentran relacionados a ambas vías de senescencia celular (Ciclina D1 y p21), en los diferentes estadios de la carcinogénesis oral con muestras del mismo paciente. Asimismo, este estudio piloto pretende ser un primer paso para determinar las limitaciones y mejoras que se requieren para desarrollar una investigación completa que permita comprender este mecanismo y establecer perfiles de marcadores asociados a SIO que puedan “diagnosticar” una LOPM como senescente y determinar su probabilidad de evolucionar a COCE.

3. HIPÓTESIS

- **Hipótesis de investigación:** Existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Ciclina D1, Maspina, p21 y Ki-67 cuando se determinan en LOPMs y en COCEs del mismo paciente.
- **Hipótesis nula:** No existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Ciclina D1, Maspina, p21 y Ki-67 cuando se determinan en LOPMs y en COCEs del mismo paciente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la expresión de Ciclina D1, Maspina, p21 y Ki-67 en LOPMs y COCEs del mismo paciente.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar los patrones de expresión de Ciclina D1, Maspina, p21 y Ki-67 mediante tinción inmunohistoquímica en tres tipos de tejido oral (TON, LOD+ y COCE) del mismo paciente.
- Comparar la expresión de estas proteínas entre los grupos de estudio (TON, LOD+ y COCE) observando principalmente diferencias de expresión entre lesiones de LOD+ y COCE en un mismo paciente.
- Determinar si existe correlación entre la expresión de las proteínas analizadas en el estudio.
- Determinar las diferencias de expresión de Ciclina D1, Maspina, p21 y Ki-67 entre los grupos de LOD+ y COCE observando el tiempo que transcurre entre la presencia de una lesión y otra.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

La presente investigación es un estudio piloto, diseñado en humanos, de tipo analítico transversal y retrospectivo. Está compuesto por tres grupos de estudio que representan las principales fases consecutivas de la carcinogénesis del carcinoma oral de células escamosas de un mismo paciente. Estos grupos son:

- Tejido oral normal.
- LOPM: en este estudio son casos de leucoplasia oral con displasia (LOD+).
- COCE.

Entonces, las variables del estudio son las siguientes:

- **La variable exposición** es la progresión de la lesión desde el tejido oral normal (TON) hasta el COCE (grupos de estudio: TON, LOD+ y COCE).
- **La variable respuesta** es la expresión de las proteínas (Ciclina D1, Maspina, p21 y Ki-67).
- **Las variables secundarias** consideradas en este estudio son la edad, el sexo, la localización de la lesión, consumo de tabaco, alcohol, el grado de displasia, la clasificación TNM, estadio clínico y tipo histológico del COCE y el tiempo transcurrido entre el diagnóstico de LOD+ y COCE.

Para analizar la expresión de las proteínas se eligió la tinción inmunohistoquímica (IHQ) por ser la más utilizada en los antecedentes encontrados y ser una técnica que presenta estabilidad en el tiempo, por lo que su análisis y cuantificación es más factible y menos sensible a la técnica que otros métodos de análisis.

5.2. Sujetos participantes y tamaño muestral

Se incluyeron en el estudio siete pacientes, los cuales fueron seleccionados de la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, la selección se hizo desde enero de 2000 a enero de 2017 por un muestreo no probabilístico por intencionalidad.

Las muestras de cada paciente se obtuvieron del almacén del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, las biopsias fueron identificadas mediante un código y número asignado a cada paciente. En total se obtuvieron dos muestras por paciente (bloque de parafina con LOD+ y bloque de parafina con COCE). La muestra correspondiente al TON se obtuvo de los tejidos que representaban los márgenes de seguridad de las biopsias pertenecientes a las LOD+.

Los criterios de selección que se tuvieron en cuenta fueron los siguientes:

- Inclusión:
 - Pacientes mayores de 18 años.
 - Pacientes con diagnóstico histopatológico de COCE que tengan biopsia previa de LOD+.
- Exclusión:
 - Pacientes con biopsias registradas que no se encontraban en el almacén del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal.
 - Pacientes que no tengan biopsias almacenadas con suficiente tejido oral para realizar el análisis mediante tinción inmunohistoquímica.
 - Bloques de parafina con biopsias de los pacientes que no pertenezcan al primer diagnóstico de LOD+ y COCE.

5.3. Recogida de datos

- Comité ético

El proyecto de investigación fue sometido al dictamen del Comité de Ética de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal obteniendo resolución favorable con el código de protocolo 111/17 (**anexo 1**).

- Selección y recolección de las muestras

Se realizó la búsqueda de los pacientes en la base de datos del programa interno del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal (DELPHYN) y se incluyeron siete pacientes debido a que cumplían los criterios de selección. Luego, se ingresó a la red general de hospital (Sistema Cajal) y al programa interno para el registro de muestras, la emisión de informes y archivo de los casos de acuerdo a codificaciones diagnósticas (Sistema SNOMED) para recolectar de forma manual los datos necesarios para el estudio de los pacientes. Cada paciente se registró mediante una codificación, ésta se realizó con la finalidad de proteger los datos del paciente. Los datos se transcribieron a una ficha de recolección de datos que contiene las variables de estudio (**anexo 2**).

Una vez obtenidos los códigos de los bloques de parafina de cada paciente, éstos y las preparaciones histológicas de TON, LOD+ y COCE se buscaron en el almacén del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid. Un especialista en patología oral del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal (R.C.G.) confirmó las características de LOD+ y el COCE mediante observación con microscopio óptico de los portaobjetos con las muestras teñidas con hematoxilina/eosina, y verificó si estas muestras correspondían a los bloques de parafina. El TON se analizó a partir de los márgenes de seguridad de las biopsias de LOD+ incluidas en parafina.

- Clasificación de la displasia epitelial y el COCE

Para la clasificación del grado de displasia de la leucoplasia oral se tomó en cuenta el sistema de clasificación propuesto por la OMS y Kujan O et al.(23)

La clasificación TNM de los tumores corresponde a los criterios de la International Union Against Cancer (81).

Tabla 3. Clasificación TNM y estadio clínico

Tumor primario (T)
TX Sin información sobre el tumor primario
T0 Sin evidencia del tumor primario
TIS Carcinoma in situ
T1 Tumor de menos de 2 cm de diámetro
T2 Tumor entre 2 y 4 cm de diámetro
T3 Tumor de más de 4 cm de diámetro
T4 Tumor de más de 4 cm de diámetro con afección del antro, los músculos pterigoideos, la base de la lengua o la piel
Ganglios linfáticos regionales (N)
NX Los ganglios pueden ser valorables o no
N0 Sin ganglios clínicamente positivos
N1 Un nódulo clínicamente positivo, homolateral y de diámetro < 3 cm
N2a Un nódulo clínicamente positivo, homolateral de entre 3 y 6 cm de diámetro
N2b Múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos, ninguno mayor de 6 cm de diámetro
N3a Ganglios positivos homolaterales y mayores de 6 cm
N3b Ganglios positivos clínicamente bilaterales y mayores de 6 cm
N3c Ganglios positivos clínicamente contralaterales y mayores de 6 cm
Metástasis a distancia (M)
MX No se valoró las metástasis a distancia
M0 Sin evidencia de metástasis a distancia
M1 Con metástasis a distancia
Estadio/TNM
I T1N0M0
II T2N0M0
III T3N0M0
T1, T2 o T3 N1M0
IV Cualquier T4
Cualquier N2 o N3
Cualquier M1

Fuente: Prieto-Prieto I, Prieto-Fenech A, Bascones A.(82)

Tabla 4. Grado de diferenciación histopatológica

Gx	No se puede establecer el grado de diferenciación
G1	Bien diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pobremente diferenciado
G4	Indiferenciado

Fuente: Prieto-Prieto I, Prieto-Fenech A, Bascones A.(82)

5.4. Procesamiento de las muestras

El análisis de los bloques de parafina y preparaciones histológicas se realizó en la Unidad de Histopatología del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), en Madrid. Se inició con el desparafinado de las muestras, según el protocolo certificado del CNIO (PT-HIS-03) (**anexo 3**).

Con el objetivo de optimizar el análisis de las muestras y reducción de costos se colocaron las muestras de LOD+ y COCE en un solo portaobjetos.

Figura 2. Colocación de las muestras en el portaobjetos para el análisis



5.5. Tinción inmunohistoquímica

Los marcadores que se utilizaron en la IHQ y que se encuentran disponibles y optimizados en tejido humano en el CNIO son los siguientes: Cyclin D1 FLEX, Serpin B5 (Maspin), p21 (WAF1) y Ki-67 FLEX. Estas proteínas forman parte de alguna de las vías que conducen a la senescencia celular o son expresadas por células senescentes y permiten la identificación de éstas, a excepción de Ki-67. Se estudió Ki-67 FLEX como control negativo de senescencia, debido a que esta proteína nos indica si existe proliferación celular o no, en caso de que los marcadores de células senescentes no se expresen.

Tabla 5. Descripción de los anticuerpos utilizados en la técnica inmunohistoquímica

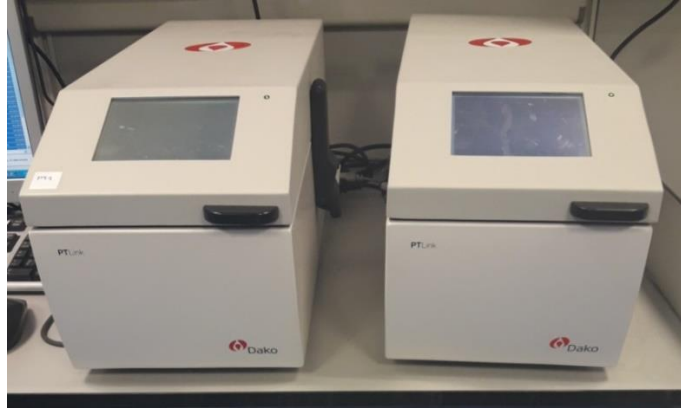
ANTICUERPO	CLON	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Cyclin D1 FLEX	Monoclonal conejo (EP12)	Dako	IR083
SERPIN B5 (Maspin)	Policlonal conejo	Proteintech Group Inc.	11722-1-AP
P21 (WAF1)	Monoclonal ratón (EA10)	Merck	MABE325
Ki-67 FLEX	Monoclonal ratón (MIB-1)	Dako	IR626

- Recuperación antigénica

La recuperación antigénica se llevó a cabo para eliminar el efecto de la fijación del formol. Este proceso se realizó en unos baños llamados PT Link colocando los portaobjetos en gradillas específicas para ellas y verificando que cada una contenga portaobjetos con el mismo tampón de recuperación antigénica (Tris/EDTA a pH=9). Estas gradillas se introdujeron en una estufa a 55°C por 12 a 24 horas, después de completado el proceso se colocaron en los baños de PT Link a 95 °C por 20 minutos. En el caso de SerpinB5 (Maspin) la recuperación antigénica

se realizó durante el proceso de tinción, ya que la plataforma que está optimizada (Discovery XT Ventana, Roche) permite hacerlo en el mismo procedimiento.

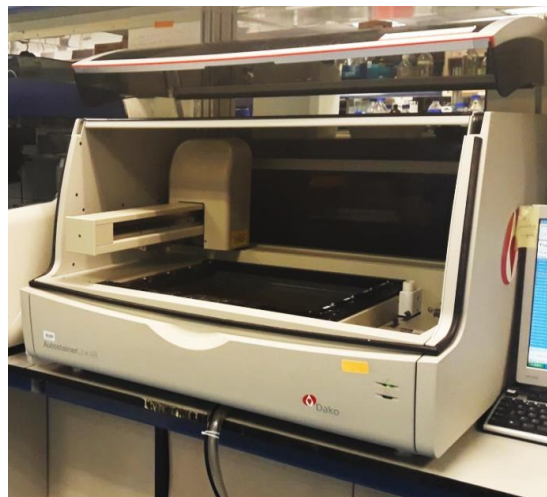
Figura 3. Equipos PT Link



- Técnica inmunohistoquímica

El proceso de inmunohistoquímica se realizó de forma automatizada en inmunoteñidores DAKO Autostainer, a excepción del SerpinB5 (Maspin) que se realizó en Discovery XT Ventana, Roche.

Figura 4. Equipo DAKO Autostainer



Se llevaron a cabo los siguientes pasos de acuerdo al protocolo de IHQ del CNIO:

- Bloqueo de actividades enzimáticas endógenas

Una vez finalizada la fase anterior de recuperación antigénica, se procedió al bloqueo de actividad enzimática endógena de la Peroxidasa, para ello se utilizó un reactivo que contiene 3-4% peróxido de hidrógeno (EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent Dako).

- Adición del anticuerpo primario

Se eliminó el exceso de agua y se incubó el anticuerpo primario entre 20 a 40 minutos a temperatura ambiente o a 37°C. La dilución óptima se determinó por la puesta a punto de cada anticuerpo, estos datos se encuentran registrados en la base de datos GESTLAB del CNIO, así como en el inmunoteñidor Autostainer. Finalmente se lavaron las muestras.

- Sistema de visualización

Esta etapa se realizó también de forma automatizada con el sistema de visualización EnVision FLEX. Este sistema de visualización estuvo compuesto por un polímero de dextrano al que iban unidos anticuerpos secundarios capaces de unirse al anticuerpo primario, y moléculas de enzima peroxidasa. Estos polímeros reaccionaron con el sustrato cromógeno diaminobenzidina produciendo un precipitado de color. En el caso de Discovery XT, se usó OmniMap anti conejo como polímero, reaccionando con la diaminobenzidina del ChromoMap DAB.

- Criterios de aceptación y rechazo

Se incluyó al menos un control externo por cada marcador, localizado en un extremo del porta objetos, con un cilindro de +/-1 mm de diámetro o bien una muestra completa.

Se aceptaron los ensayos realizados en los laboratorios solo si los resultados obtenidos en los controles y en la muestra estaban dentro de los siguientes criterios de aceptación:

- La expresión observada en el control positivo externo tuvo idéntica localización celular y similar intensidad.
- El resultado esperado en el control negativo fue ausencia completa de expresión o ausencia de señal visible al microscopio.

La validación de la técnica fue realizada por el Director del Programa de Biotecnología del CNIO (F.P.).

5.6. Análisis de resultados

Dos especialistas en patología oral (R.C.G. y J.M.A.) realizaron la validación y el análisis de los resultados. Primero determinaron las mismas zonas más características de TON, LOD+ y COCE de cada paciente mediante observación con microscopio óptico.

El grado de tinción de cada muestra fue analizado por los mismos especialistas mediante observación (a 10x, 40x y 100x) por microscopio óptico de forma independiente. La fiabilidad del análisis se evaluó verificando el grado de coincidencia obtenido por los dos observadores (interobservador) y realizando una segunda medición para evaluar el grado de coincidencia del mismo observador (intraobservador) (**anexo 4**). Además, todas las muestras fueron escaneadas para ser visualizadas mediante un software (ZEN lite 1.3) con fines didácticos (**anexo 5**).

Los grados de tinción determinados para cada uno de los marcadores se basaron en el estudio de López-Durán M.(41)

Tabla 6. Grados de tinción para la cuantificación de la inmunotinción

ANTICUERPO	CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN
Ciclina D1	0: Ausencia total 1: Células basales 2: Células epiteliales+basales
Maspina	0: Solo citoplasma 1: < 50% núcleos 2: > 50% núcleos
P21	0: < 20% 1: 20-50% 2: > 50%
Ki-67	0: < 10% núcleos 1: 10-30% núcleos 2: 30-60% núcleos 3: > 60% núcleos

Fuente: López-Durán M.(41)

5.7. Análisis estadístico

Se inició con la creación de la base de datos en hojas de cálculo del programa Microsoft Excel 2010. Posteriormente, los datos se analizaron dentro del paquete estadístico SPSS (versión 21.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.).

En cuanto a las variables de este estudio piloto, la variable exposición es la etapa de la lesión desde el TON hasta el COCE y es considerada como una variable cualitativa con tres categorías. La variable respuesta es la expresión de las proteínas Ciclina D1, Maspina, p21 y Ki-67, es de tipo ordinal y presenta escalas de tres a cuatro categorías dependiendo del tipo de proteína. Cada categoría de estas variables corresponde a un intervalo en el que el siguiente representa una mayor cantidad de tinción que el anterior. Es por eso que, en el análisis estadístico, se tomará esta variable a veces como cualitativa y otras veces como cuantitativa. Además, esta variable puede convertirse en binaria si se agrupa en las categorías de bajo/alto grado de tinción de cada una de las proteínas.

Una vez establecidos los tipos y categorías de todas las variables consideradas en este estudio piloto se inició con el análisis estadístico. En primer lugar, se realizó la estadística descriptiva de las variables secundarias y se definieron la media y la desviación estándar para las variables cuantitativas y la distribución de frecuencias y los porcentajes para las variables cualitativas. Asimismo, se realizó el análisis descriptivo de los patrones de expresión de las proteínas a través de las medias de expresión de cada una, así como los porcentajes del grado de tinción, ambos en los tres grupos de estudio.

Luego se realizó la estadística inferencial para determinar las diferencias de expresión de las proteínas entre los grupos, se utilizó el Test de Friedman por ser una prueba estadística no paramétrica de comparación de tres o más muestras relacionadas (TON, LOD+ y COCE de un mismo paciente tomados en momentos diferentes) y cuya característica es que la variable dependiente (expresión de las proteínas) tenga escala ordinal. Posteriormente, se aplicó un test no paramétrico de comparaciones múltiples para determinar entre qué grupos las diferencias eran estadísticamente significativas.

Se utilizó la correlación de Spearman para analizar las correlaciones entre la expresión de las proteínas.

Además, se utilizó la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon para observar si existen diferencias estadísticas significativas en la expresión de proteínas entre los grupos de LOD+ y COCE de observando el tiempo transcurrido entre el diagnóstico de un grupo y otro.

El nivel de significación estadística para todas las pruebas de inferencia se estableció en $p < 0,05$.

Finalmente, se realizó un análisis global de los perfiles de expresión de las proteínas para resumir y comparar éstos en relación a los grupos que representan las etapas de carcinogénesis oral.

6. RESULTADOS

En este estudio piloto se incluyeron siete pacientes de los cuales se analizaron tres tipos de tejidos de cada paciente (TON, LOD+ y COCE) que pretendían representar las etapas de la carcinogénesis oral, obteniendo al final un total de veintiún muestras. El análisis de la expresión de proteínas relacionadas a senescencia celular en estos tres tipos de tejido se realizó mediante tinción inmunohistoquímica.

6.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA DE ESTUDIO

Se recogieron antecedentes de la muestra en relación a sus datos demográficos, clínicos e histopatológicos que se describen en las siguientes tablas:

6.1.1. Factores demográficos

Los datos demográficos correspondientes a los tres grupos de estudio (TON, LOD+ y COCE) son homogéneos por tratarse del mismo paciente. Sin embargo, observamos en la **tabla 7** que la mayor parte de la muestra son mujeres, exfumadores y han consumido alcohol con frecuencia. En relación a la edad el promedio fue 68,6 años.

Tabla 7. Características demográficas de los pacientes

	PACIENTES (N=7)	
	n	%
Sexo		
Masculino	2	28,6
Femenino	5	71,4
Tabaco		
No fumador	2	28,6
Exfumador	5	71,4
Fumador	0	0,0
Alcohol		
Sí	4	57,1
No	3	42,9
	Media	DS
Edad	68,6	8,121

6.1.2. Localizaciones

Los análisis de los tejidos normales se realizaron de los márgenes de seguridad o zonas de tejido normal que presentaban las muestras de LOD+, es por ello que ambos grupos presentan la misma localización. Tres pacientes no presentaron la misma localización en los grupos de LOD+ y COCE. La localización más frecuente entre los grupos fue la lengua.

Tabla 8. Localizaciones de las muestras

Localización	TON (n=7)		LOD+ (n=7)		COCE (n=7)		TOTAL (N=21)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Encía	1	14,3	1	14,3	0	0,0	2	9,5
Lengua	5	71,4	5	71,4	4	57,1	14	66,6
Suelo de boca	1	14,3	1	14,3	1	14,3	3	14,3
Mucosa yugal	0	0,0	0	0,0	1	14,3	1	4,8
Región tuberositaria	0	0,0	0	0,0	1	14,3	1	4,8

6.1.3. Grado de displasia

Se observa que el grado de displasia que se encuentra en mayor porcentaje es la displasia severa y es de alto grado (57,1%).

Tabla 9. Grado de las displasias

	DISPLASIA (N=7)	
	n	%
OMS		
Leve	1	14,3
Moderada	2	28,6
Severa	4	57,1
Kujan O et al. (23)		
Bajo	3	42,9
Alto	4	57,1

6.1.4. Clasificación TNM, estadio clínico y tipo histológico

Se observa en las muestras que el 57,1% de los COCEs fueron tumores de menos de dos centímetros de diámetro (estadío T1); 28,6% eran COCEs de entre dos y cuatro centímetros de diámetro (estadío T2) y el 14,3% tenían un tamaño superior a cuatro centímetros (estadío T3). El 71,4% de carcinomas no presentaban ganglios clínicamente afectados y el 28,6% tenían un nódulo clínicamente positivo menor de seis centímetros. Ninguno de los casos presentaba metástasis a distancia en el momento de los exámenes. El estadio clínico más frecuente de los carcinomas fue el I. Histológicamente, el 71,4% de los carcinomas eran bien diferenciados y el 28,6% eran moderadamente diferenciados.

Tabla 10. Características de los carcinomas de células escamosas

	COCE (N=7)	
	n	%
Clasificación TNM		
T1	4	57,1
T2	2	28,6
T3	1	14,3
T4	0	0,0
N0	5	71,4
N1	0	0,0
N2	2	28,6
Estadio clínico		
I	4	57,1
II	1	14,3
III	0	0,0
IV	2	28,6
Tipo histológico		
G1	5	71,4
G2	2	28,6
G3	0	0,0

6.2. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON SENESCENCIA CELULAR EN TON, LOD+ Y COCE.

Las proteínas (Ciclina D1, Maspina y P21) analizadas en este estudio piloto se eligieron por ser representativas o estar relacionadas con senescencia celular, además de encontrarse optimizadas en el CNIO.

Los datos desarrollados a continuación en gráficos y tablas demostrarán para cada uno de los marcadores:

- Medias de expresión de cada proteína en los tres grupos de estudio para ver su patrón de expresión.
- Porcentajes de cada grado de tinción en cada uno de los grupos de estudio.

6.2.1. EXPRESIÓN DE CICLINA D1

El patrón de expresión de Ciclina D1 es progresivamente ascendente.

Figura 5. Patrón de expresión de Ciclina D1

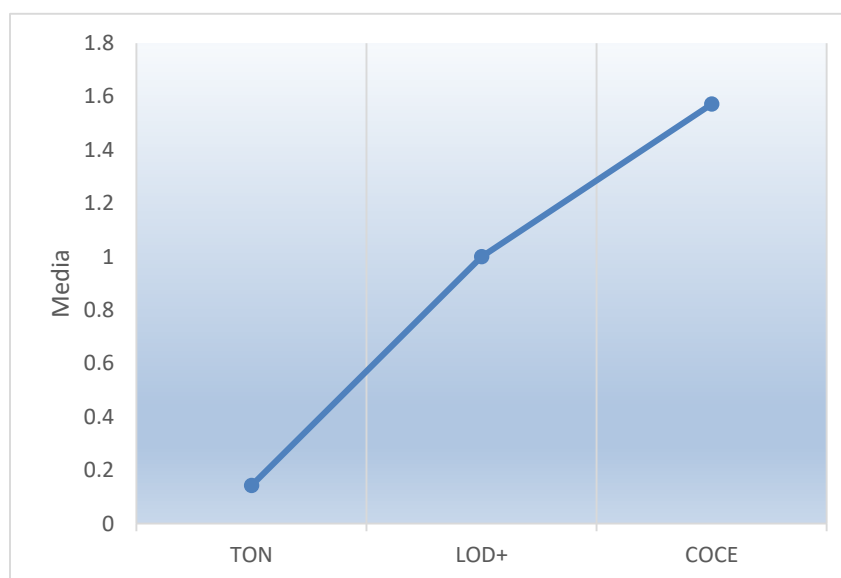


Tabla 11. Expresión de Ciclina D1

	GRADO DE TINCIÓN – Ciclina D1		
	0	1	2
TON	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)
LOD+	0 (0,0%)	7 (100,0%)	0 (0,0%)
COCE	0 (0,0%)	3 (42,9%)	4 (57,1%)

6.2.2. EXPRESIÓN DE MASPINA

El patrón de expresión de Maspina es ascendente con leve disminución en la fase de carcinoma.

Figura 6. Patrón de expresión de Maspina

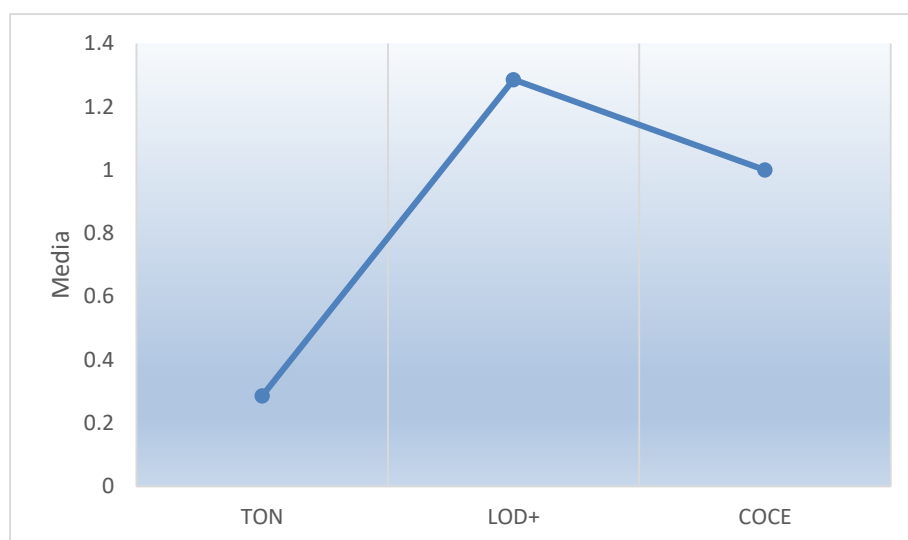


Tabla 12. Expresión de Maspina

	GRADO DE TINCIÓN – Maspina		
	0	1	2
TON	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0 (0,0%)
LOD+	0 (0,0%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)
COCE	2 (28,6%)	3 (42,9%)	2 (28,6%)

6.2.3. EXPRESIÓN DE p21

El patrón de expresión de p21 es ascendente con moderada disminución en la fase de carcinoma.

Figura 7. Patrón de expresión de p21

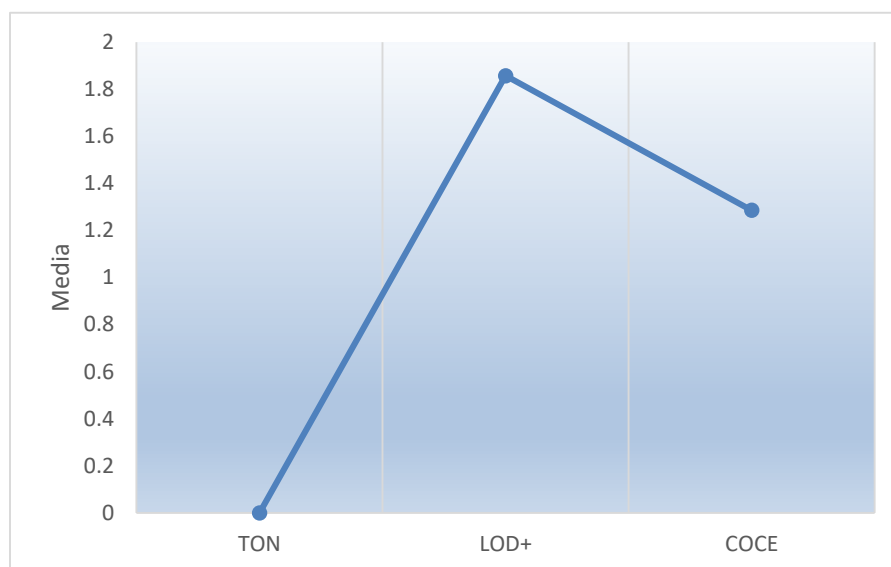


Tabla 13. Expresión de p21

	GRADO DE TINCIÓN – p21		
	0	1	2
TON	7 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
LOD+	0 (0,0%)	1 (14,3%)	6 (85,7%)
COCE	0 (0,0%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)

6.3. EXPRESIÓN BAJA DE Ki-67 PARA DETERMINAR EL ESTADO SENESCENTE DE LAS MUESTRAS

Se tomarán valores de expresión baja y alta de acuerdo a la cuantificación de la inmunotinción para determinar si la expresión baja del factor de proliferación celular Ki-67 coincide con una expresión alta de las proteínas relacionadas a senescencia celular en este estudio. En el caso de Ciclina D1 se espera que la expresión baja de Ki-67 coincida con su expresión baja, debido a que Ciclina D1 es un protooncogén que incrementa la proliferación celular y su expresión debería estar disminuida en una célula que se encuentra en senescencia celular.

Figura 8. Patrón de expresión de Ki-67

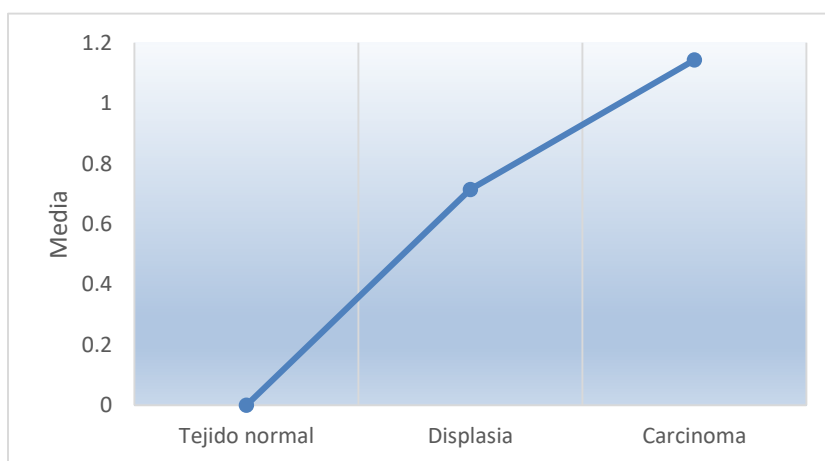


Tabla 14. Expresión de Ki-67

	GRADO DE TINCIÓN – Ki-67			
	0	1	2	3
TON	7 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
LOD+	3 (42,9%)	3 (42,9%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)
COCE	2 (28,6%)	2 (28,6%)	3 (42,9%)	0 (0,0%)

Tabla 15. Cuantificación de la inmunotinción

Proteína	Cuantificación de la inmunotinción	
Ki-67	0: < 10% de núcleos	Bajo
	1: 10-30% de núcleos	
	2: 30-60% de núcleos	Alto
	3: > %60 de núcleos	
Ciclina D1	0: Ausencia	Bajo
	1: Células basales	Alto
	2: Células basales más epiteliales	
Maspina	0: solo citoplasma	Bajo
	1: < 50% de núcleos	Alto
	2: > 50% de núcleos	
p21	0: < 20%	Bajo
	1: 20-50%	
	2: >50%	Alto

Fuente: López-Durán M.(41)

Tabla 16. Coincidencia entre la expresión del factor de proliferación celular Ki-67 y las proteínas relacionadas con senescencia celular.

	Ki-67		Ciclina D1		Maspina		p21	
	Bajo	Alto	Bajo	Alto	Bajo	Alto	Bajo	Alto
TON	7	0	7	0	7	0	7	0
LOD+	6	1	7	0	5	2	1	6
COCE	4	3	3	4	5	2	5	2

En el grupo de TON no se encontraron coincidencias entre la expresión baja de las muestras analizadas. En cambio, en el grupo de LOD+ se encontraron coincidencias entre Ki-67/Ciclina D1 y Ki-67/p21, Ki-67 y Maspina no presentaron coincidencias en su expresión. En el grupo de

COCE, solo Ki-67 y Ciclina D1 presentan coincidencia en su expresión a excepción de un caso.

6.4. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CADA PROTEÍNA ENTRE LOS TRES GRUPOS DE ESTUDIO PARA DETERMINAR SI EXISTEN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS SIGNIFICATIVAS ENTRE ELLAS.

Para determinar si las expresiones de las proteínas entre los grupos de estudio presentan diferencias significativas se utilizó la prueba estadística de Friedman. El test no paramétrico de Friedman compara los rangos (medianas) de tres o más muestras relacionadas y determina que las diferencias no se deban al azar. Las tres proteínas presentan diferencias estadísticamente significativas cuando se expresan entre los grupos de TON, LOD+ y COCE de un mismo paciente.

Tabla 17. Prueba de Friedman para Ciclina D1

Rangos

	Rango promedio
TON	1,14
LOD+	2,14
COCE	2,71

Estadísticos de contraste^a

N	7
Chi-cuadrado	11,273
gl	2
Sig. asintót.	0,004

a. Prueba de Friedman

Tabla 18. Prueba de Friedman para Maspina**Rangos**

	Rango promedio
TON	1,36
LOD+	2,50
COCE	2,14

**Estadísticos de
contraste^a**

N	7
Chi-cuadrado	7,053
gl	2
Sig. asintót.	0,029

a. Prueba de Friedman

Tabla 19. Prueba de Friedman para p21

Rangos

	Rango promedio
TON	1,00
LOD+	2,79
COCE	2,21

Estadísticos de
contraste^a

N	7
Chi-cuadrado	13,040
gl	2
Sig. asintót.	0,001

a. Prueba de Friedman

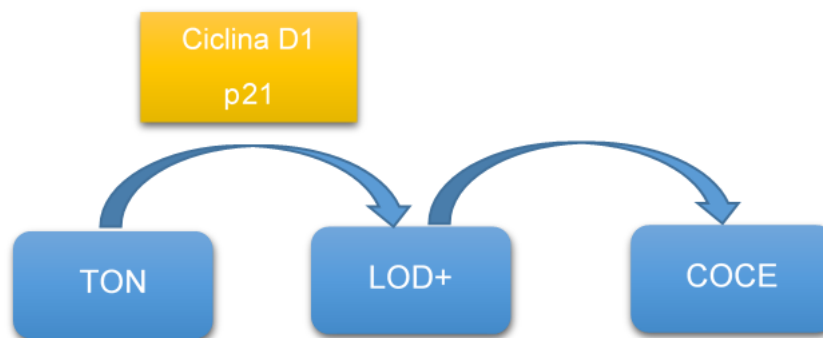
Para determinar entre qué grupos se encuentran estas diferencias estadísticas significativas se utilizó un test no paramétrico de comparaciones múltiples y se determinó que existen dichas diferencias entre los grupos de TON y LOD+ para las proteínas Ciclina D1 y p21, así como entre los grupos de TON y COCE para las mismas proteínas.

Tabla 20. Valores p para las diferencias de la expresión de proteínas entre los grupos

Grupos a comparar		Proteína (p valor)		
		Ciclina D1	Maspina	p21
TON	LOD+	0,003*	0,053	0,000*
TON	COCE	0,009*	0,140	0,001*
LOD+	COCE	0,090	1,000	0,090

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Figura 9. Representación de las proteínas con expresión estadísticamente significativa entre las etapas de carcinogénesis oral



6.5. CORRELACIONES ENTRE LAS EXPRESIONES DE LAS PROTEÍNAS EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE ESTUDIO

La expresión de estas proteínas sobre los mismos tejidos analizados en este estudio piloto nos permite determinar las correlaciones que se producen entre ellas a varios niveles:

6.5.1. Correlaciones globales entre las proteínas

Existe correlación positiva fuerte entre la expresión de: ciclina D1-p21, ciclina D1-Ki67, maspina-p21.

Tabla 21. Correlaciones globales entre las proteínas

		Ciclina D1	Maspina	p21	Ki-67
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	1,000	0,394	0,518*	0,722**
	Ciclina D1 Sig. (bilateral)	.	0,077	0,016	0,000
	N	21	21	21	21
Maspina	Coeficiente de correlación	0,394	1,000	0,584**	0,207
	Sig. (bilateral)	0,077	.	0,005	0,369
	N	21	21	21	21
p21	Coeficiente de correlación	0,518*	0,584**	1,000	0,252
	Sig. (bilateral)	0,016	0,005	.	0,271
	N	21	21	21	21
Ki-67	Coeficiente de correlación	0,722**	0,207	0,252	1,000
	Sig. (bilateral)	0,000	0,369	0,271	.
	N	21	21	21	21

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

**.. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

6.5.2. Correlaciones entre las proteínas en el grupo de TON

No existen correlaciones significativas entre la expresión de proteínas en el grupo de TON.

Tabla 22. Correlaciones entre las proteínas en el grupo de TON

			Ciclina D1	Maspina	p21	Ki-67
Rho de Spearman	Ciclina D1	Coeficiente de correlación	1,000	0,645	.	.
		Sig. (bilateral)	.	,117	.	.
		N	7	7	7	7
	Maspina	Coeficiente de correlación	0,645	1,000	.	.
		Sig. (bilateral)	0,117	.	.	.
		N	7	7	7	7
	p21	Coeficiente de correlación
		Sig. (bilateral)
		N	7	7	7	7
	Ki-67	Coeficiente de correlación
		Sig. (bilateral)
		N	7	7	7	7

6.5.3. Correlaciones entre las proteínas en el grupo de LOD+

No existen correlaciones significativas entre la expresión de proteínas en el grupo de LOD+.

Tabla 23. Correlaciones entre las proteínas en el grupo de LOD+

		Ciclina D1	Maspina	p21	Ki-67
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación
	Ciclina D1 Sig. (bilateral)
	N	7	7	7	7
	Coeficiente de correlación	.	1,000	0,258	-0,171
	Maspina Sig. (bilateral)	.	.	0,576	0,714
	N	7	7	7	7
	Coeficiente de correlación	.	0,258	1,000	-0,220
	p21 Sig. (bilateral)	.	0,576	.	0,635
	N	7	7	7	7
	Coeficiente de correlación	.	-0,171	-0,220	1,000
	Ki-67 Sig. (bilateral)	.	0,714	0,635	.
	N	7	7	7	7

6.5.4. Correlaciones entre las proteínas en el grupo de COCE.

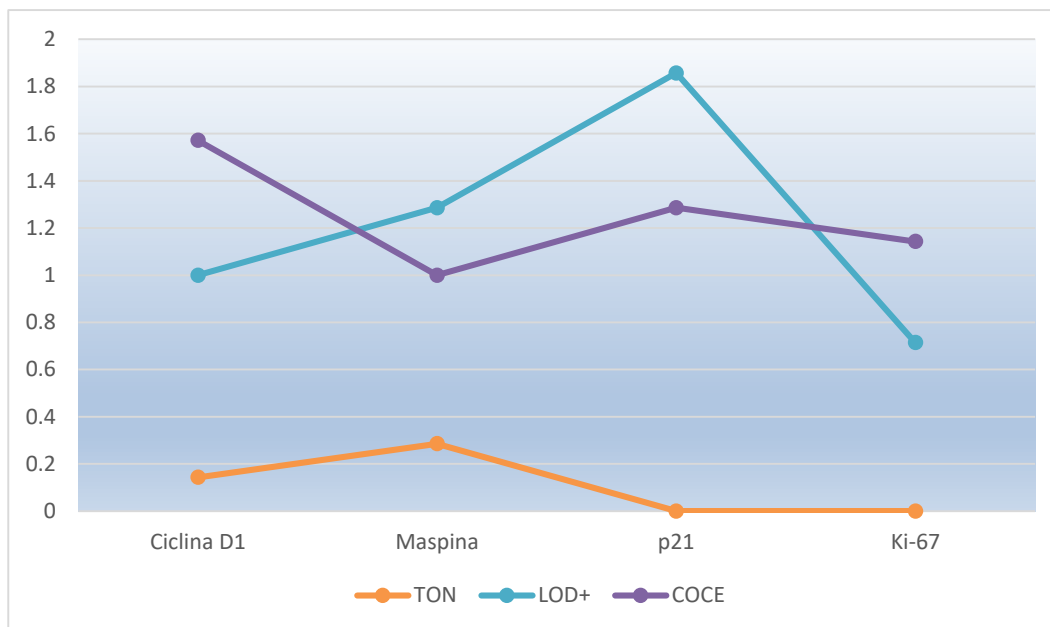
No existen correlaciones significativas entre la expresión de proteínas en el grupo de COCE.

Tabla 24. Correlaciones entre las proteínas en el grupo de COCE

		Ciclina D1	Maspina	p21	Ki-67
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	1,000	-0,382	-0,730	0,840
	Ciclina D1 Sig. (bilateral)	.	0,398	0,062	0,018
	N	7	7	7	7
Maspina	Coeficiente de correlación	-0,382	1,000	0,000	-,250
	Maspina Sig. (bilateral)	0,398	.	1,000	0,589
	N	7	7	7	7
p21	Coeficiente de correlación	-0,730	0,000	1,000	-,837
	p21 Sig. (bilateral)	0,062	1,000	.	0,019
	N	7	7	7	7
Ki-67	Coeficiente de correlación	0,840	-0,250	-0,837	1,000
	Ki-67 Sig. (bilateral)	0,018	0,589	0,019	.
	N	7	7	7	7

6.6. ANÁLISIS GLOBAL DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON SENESCENCIA CELULAR EN LOS TRES GRUPOS DE ESTUDIO

Figura 10. Análisis global de la expresión de proteínas relacionadas con senescencia



Se realizó este análisis con la finalidad de resumir y comparar los perfiles proteicos en relación a los grupos que representan las etapas de carcinogénesis oral y se observó que con respecto al TON las expresiones de todas las proteínas se encuentran aumentadas tanto en el grupo de LOD+ como en el grupo de COCE. Al comparar los perfiles proteicos del grupo de COCE con el grupo de LOD+ se observa que Ciclina D1 y Ki-67 se encuentran aumentadas, y Maspina como p21 se encuentran disminuidos.

6.7. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON SENESCENCIA CELULAR ENTRE LOS GRUPOS DE DISPLASIA Y CARCINOMA OBSERVANDO EL TIEMPO ENTRE LA PRESENCIA DE AMBAS LESIONES.

Se realizó la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon para observar si existen diferencias estadísticas significativas en la expresión de proteínas entre los grupos de LOD+ y COCE a pesar de la variabilidad del tiempo que transcurrió entre el diagnóstico de muestra entre un grupo y otro (el menor tiempo transcurrido fue de 1 mes y el mayor de 29 meses). Se determinó que existen diferencias estadísticas significativas en la expresión de ciclina D1 y p21 entre los grupos de LOD+ y COCE a pesar de la variabilidad en el tiempo transcurrido entre la toma de muestra de cada grupo. Asimismo, se observa que ciclina D1 se expresa en mayor grado en el grupo de COCE y p21 se expresa en mayor grado en el grupo de LOD+.

Tabla 25. Expresión de las proteínas relacionadas con senescencia celular entre los grupos de LOD+ y COCE con respecto al tiempo

PACIENTE	TIEMPO (meses)	CICLINA D1		MASPINA		p21		Ki-67	
		Displasia	Carcinoma	Displasia	Carcinoma	Displasia	Carcinoma	Displasia	Carcinoma
1	1	1	2	2	1	2	1	1	1
2	20	1	2	1	2	1	1	1	2
3	12	1	2	1	0	2	1	1	2
4	2	1	2	1	0	2	1	2	2
5	10	1	1	1	1	2	2	0	0
6	29	1	1	2	2	2	1	0	1
7	12	1	1	1	1	2	2	0	0

Tabla 26. Prueba de los rangos con signos de Wilcoxon

Estadísticos de contraste ^a				
	Ciclina D1	Maspina	p21	Ki-67
Z	-2,000 ^b	-1,000 ^c	-2,000 ^c	-1,732 ^b
Sig. asintót. (bilateral)	0,046	0,317	0,046	0,083

a. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

b. Basado en los rangos negativos.

c. Basado en los rangos positivos.

Rangos

	N	Rango promedio	Suma de rangos
Ciclina D1 (LOD+/COCE)	Rangos negativos	0 ^a	0,00
	Rangos positivos	4 ^b	10,00
	Empates	3 ^c	
	Total	7	
Maspina (LOD+/COCE)	Rangos negativos	3 ^d	7,50
	Rangos positivos	1 ^e	2,50
	Empates	3 ^f	
	Total	7	
p21 (LOD+/COCE)	Rangos negativos	4 ^g	10,00
	Rangos positivos	0 ^h	0,00
	Empates	3 ⁱ	
	Total	7	
Ki-67 (LOD+/COCE)	Rangos negativos	0 ^j	0,00
	Rangos positivos	3 ^k	6,00
	Empates	4 ^l	
	Total	7	

a. $Ciclina\ D1_COCE < Ciclina\ D1_LOD+$

b. $Ciclina\ D1_COCE > Ciclina\ D1_LOD+$

c. $Ciclina\ D1_COCE = Ciclina\ D1_LOD+$

d. $Maspina_COCE < Maspina_LOD+$

e. $Maspina_COCE > Maspina_LOD+$

f. $Maspina_COCE = Maspina_LOD+$

g. $p21_COCE < p21_LOD+$

h. $p21_COCE > p21_LOD+$

i. $p21_COCE = p21_LOD+$

j. $Ki-67_COCE < Ki-67_LOD+$

k. $Ki-67_COCE > Ki-67_LOD+$

l. $Ki-67_COCE = Ki-67_LOD+$

7. DISCUSIÓN

La senescencia celular es la detención irreversible de la proliferación celular, debido a diferentes causas de estrés celular, para evitar la propagación de células atípicas durante la mitosis (43). Por este motivo se ha demostrado en células vivas que es un importante mecanismo de protección contra el cáncer (83). Sin embargo, aparte de suprimir la tumorigénesis se ha evidenciado que también podría promover la reparación de tejidos, la inflamación asociada al envejecimiento y la progresión del cáncer. Así, la senescencia celular podría participar en cuatro procesos biológicos complejos producto de la expresión secuencial de su fenotipo, aunque algunos de estos presenten efectos aparentemente opuestos (44,65). Por lo tanto, es importante destacar que se está empezando a entender su relevancia fisiológica y ello implica un desafío, por lo que esta investigación pretende contribuir con la comprensión de la funcionalidad de los mecanismos de senescencia para aprovechar sus beneficios y suprimir sus inconvenientes.

El objetivo principal de este estudio piloto fue determinar la expresión de las proteínas Ciclina D1, Maspina y p21 en los grupos de TON, LOD+ y COCE para observar sus perfiles proteicos y poder comprobar su utilidad como potenciales marcadores pronósticos de cáncer oral. También se pretende comparar la metodología y resultados de este estudio piloto con los obtenidos en la investigación de López-Durán M.(41) Finalmente, se analiza las limitaciones en este estudio para plantear una nueva investigación con las correcciones y consideraciones necesarias.

El análisis descriptivo de las variables secundarias permite observar su posible influencia en los resultados que obtuvimos. La edad promedio de los individuos de los cuales se obtuvo las muestras fue de 68,6 años, el sexo más prevalente fue el femenino y la mayor parte tenían antecedentes de haber consumido frecuentemente tabaco y alcohol. Se ha descrito que la edad avanzada puede influir favoreciendo los mecanismos de senescencia celular (44,47,52,84,85). Del mismo modo, el antecedente de consumo de tabaco y alcohol son factores de riesgo para desarrollar

cáncer oral por lo que también afectarían al desarrollo del mecanismo de senescencia celular (35,86,87).

En cuanto a la localización de la lesión, se tuvo en cuenta que la LOD+ y el COCE pertenezcan a la misma localización y/o el COCE fuese el tumor primario al que evolucionó la LOD+. La localización más frecuente que se observó en este estudio fue la lengua y coincide con la localización más encontrada en otros estudios (19,88,89). El grado de displasia de las LOD+, según la clasificación de Kujan O et al.(23), fue alto en la mayoría de las muestras, esto podría favorecer el potencial de malignización de las LOD+ ya que se ha observado en estudios anteriores que las LOD+ malignizan con mayor frecuencia y probabilidad si son de alto grado, a diferencia de las leucoplasias sin displasia (19-21).

La clasificación TNM, el estadio clínico y el tipo histológico del COCE son los marcadores pronóstico más utilizados para esta lesión, en esta investigación se ha observado que la clasificación TNM, estadio clínico y tipo histológico más frecuente son T1N0M0, estadio I y G, por lo que podría suponerse que las muestras de COCE en este estudio presentarían un buen pronóstico. Sin embargo, estos marcadores pronósticos tanto para LOPM como para COCE aún son controvertidos, se espera que con el avance de la biología molecular se puedan establecer marcadores pronósticos más objetivos basados en mecanismos de protección celular, como la senescencia.(48,60,78,90).

Acerca de la expresión de las proteínas, el patrón de expresión de Maspina y p21 fue ascendente con leve y moderada disminución en la fase de COCE, respectivamente. El incremento de la expresión de estas dos proteínas en la fase de LOD+ indicaría un estado pro-senescente (61-63,91,92), es decir, existiría intención de las células de frenar la transformación maligna de las LOD+. En cambio, Ciclina D1 presentó un patrón progresivamente ascendente, es decir, tuvo mayor expresión en el grupo de COCE. Este es un resultado esperado debido a que esta proteína es considerada un protooncogén debido a que promueve la proliferación celular, por lo que se espera su expresión disminuida en las LOD+ que mantendrían estado senescente y el incremento de su expresión en COCE (66,93).

A pesar de que existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Ciclina D1, Maspina y p21 en las tres etapas del cáncer oral (TON, LOD+ y COCE), al realizar el análisis entre dos grupos, las diferencias en la expresión solo son significativas para Ciclina D1 y p21 cuando se compara su expresión entre los grupos de TON y LOD+. Sin embargo, cuando la comparación es entre la LOD+ y el COCE ninguna proteína presenta expresión diferencial significativa. Estos resultados no nos permiten realizar inferencias estadísticas, pero si observar el comportamiento de estas proteínas. Por ejemplo, la sobreexpresión de Maspina en el grupo de LOD+ coincide con los resultados mostrados en el estudio de López-Durán M.(41), aunque en este estudio las diferencias de expresión de Maspina entre los grupos de LOD+ y COCE si fueron significativas. La diferencia en los resultados entre el estudio de López-Durán M.(41) y este estudio piloto pueden deberse a que las muestras de cada etapa de cáncer oral en su estudio fueron obtenidas de diferentes pacientes, y a su mayor tamaño muestral. Además, Maspina ha sido estudiada en muchos tipos de cánceres y los resultados sobre su potencial pronóstico a veces son contradictorios (75,94,95). Esto probablemente se debe a que Maspina tiene distintos patrones de localización; principalmente se expresa en el citoplasma, pero también puede observarse en el núcleo por lo que esto puede influir en su función y detección (72). Sin embargo, Maspina es mayormente considerado como supresor tumoral (96).

La proteína p21 también muestra incremento en su expresión en las LOD+, estos resultados coinciden con los estudios de López-Durán M.(41) y Queiroz AB et al.(97) por lo que p21 también debe ser considerado como marcador pronóstico en un futuro estudio más amplio.

Ciclina D1 es una proteína activadora de las quinasas CDK4 y CDK6 (93), la activación de estas promovería el avance del ciclo celular por lo que Ciclina D1 estaría disminuida durante la senescencia. Los resultados de este estudio para esta proteína coinciden con los estudios que demuestran su sobreexpresión en carcinomas orales (41,80,98), de hecho estudios en COCE han podido relacionar su expresión aumentada con un pronóstico desfavorable del tumor (39).

La proteína Ki-67 fue analizada como control negativo de senescencia ya que es un marcador válido y confiable de proliferación celular (43). De acuerdo a esto se observó que en el grupo de TON no existían indicios de proliferación celular. En cambio, en el grupo de LOD+ solo se encontraron coincidencias entre Ki-67/Ciclina D1 y Ki-67/p21 y en el grupo de COCE, las coincidencias solo fueron entre Ki-67 y Ciclina D1 a excepción de un caso. Esto confirmaría que la proliferación celular se encuentra disminuida en las LOD+, probablemente por encontrarse en un estado de senescencia, y estaría incrementada en los COCEs. Por lo tanto, se podría utilizar este marcador como control negativo de senescencia en los próximos estudios.

Al analizar las correlaciones de las proteínas en la muestra global observamos que estas varían en función a la etapa de carcinogénesis oral. Sin embargo, estas correlaciones desaparecen al analizarlas en cada etapa. Es probable que esto se deba a que se analizaron solamente tres proteínas y al tamaño insuficiente de la muestra de este estudio piloto.

Respecto al tiempo transcurrido entre el diagnóstico de una LOPM y el COCE, no se han encontrado estudios que analicen la expresión de las proteínas relacionadas con senescencia considerando el tiempo entre las etapas de carcinogénesis oral de un mismo paciente. Se ha observado en este estudio que las proteínas se expresan con diferencias entre estos grupos a pesar de la variabilidad de los tiempos que transcurrieron entre el diagnóstico de LOD+ y COCE. Por lo tanto evaluar el tiempo transcurrido del diagnóstico de una LOD+ a un COCE sería útil para comprobar el verdadero pronóstico de la lesión.

El diseño de este estudio piloto fue transversal y retrospectivo y, a diferencia del estudio de López-Duran M.(41), fue realizado en las muestras de un mismo paciente, lo cual disminuye la heterogeneidad que podrían presentar las muestras y favorece la extrapolación de los resultados a la población. A pesar de que, por el objetivo del estudio, lo ideal sería realizar un estudio longitudinal, esto es poco factible para la variable de carcinogénesis oral, ya que es imposible predecir la evolución de una LOPM en los humanos; razón por la que un estudio retrospectivo

podría ser más adecuado. Sin embargo, el principal inconveniente del diseño retrospectivo es la obtención del TON, debido a que se ha observado, en la recolección de muestras de esta investigación, que no todas las biopsias presentan márgenes de seguridad suficientes para poder analizarlo. Este problema deberá ser subsanado para la inclusión de los casos de un futuro estudio más amplio.

Asimismo, consideramos que el mejor modelo de estudio es “*in vivo*” debido a que el comportamiento de algunas proteínas de las vías de senescencia es diferente según los modelos animales utilizados (68). Además todas las proteínas empleadas en este estudio piloto se encontraban optimizadas para tejidos humanos en el CNIO.

La muestra de este estudio piloto fue obtenida por conveniencia, bajo los criterios de inclusión y exclusión. Esto no permite la inferencia de los resultados a situaciones similares en la realidad, pero con los valores obtenidos de los parámetros de las variables estudiadas, tales como el intervalo de cuantificación del grado de tinción de las proteínas, se podrá realizar el cálculo del tamaño muestral representativo de la población en un futuro estudio, con una muestra más amplia.

La inmunohistoquímica fue la técnica elegida para determinar la expresión de las proteínas, se eligió esta técnica por ser la más utilizada en estudios previos, lo que permitió comparar los resultados (41,91,99-101). Además esta técnica tiene estabilidad en el tiempo y esta característica facilita su análisis y permite escanear los resultados obtenidos para poder observarlos mediante un programa informático. Asimismo, para optimizar todo el proceso se espera poder realizar el estudio futuro utilizando matrices de tejido *tissue microarrays (TMA)*, de esta forma también se pueden minimizar los sesgos propios de los distintos procesos de tinción, costos y materiales. En este estudio las muestras se colocaron en portaobjetos agrupadas en pares, y por paciente, debido a que solamente se trataba de siete pacientes.

Además de las proteínas utilizadas en este estudio piloto, se intentó optimizar la proteína CDK4 para realizar su análisis en tejidos humanos. Dicha optimización no se pudo completar a tiempo para ser presentada en este estudio piloto. Así pues en el estudio futuro tenemos pensado utilizar las proteínas analizadas en este estudio

piloto y algunas más que puedan ser optimizadas en humanos y se encuentren relacionadas a senescencia.

Para este estudio piloto se eligió la proteína Maspina por mostrarse como un probable marcador pronóstico de senescencia celular en cáncer oral en diversos estudios (41,72,73,99).

Ciclina D1 y p21 fueron seleccionadas por representar a cada vía de senescencia celular, tanto la vía p53-ARF como la vía p16. Sin embargo, el proceso de senescencia implica más proteínas (43) y lo ideal sería analizar la función de la mayoría de ellas, objetivo que se planea realizar en un futuro estudio.

Respecto a los parámetros para realizar el análisis de la expresión de las proteínas mediante las tinciones, se considerará en el estudio futuro la utilización de un software de cuantificación. De esta forma se intentaría aumentar la fiabilidad de los resultados y reducir el posible sesgo del observador a pesar de ser patólogos experimentados y calibrados.

Por lo tanto, este estudio piloto permite plantear un estudio más completo en esta misma línea, considerando, principalmente, lo siguiente: (i) aumentar el número de proteínas relacionadas con las diferentes vías de senescencia celular; (ii) determinar el método de cuantificación adecuado para el análisis de la expresión de las proteínas en las muestras de estudio (observador vs software); (iii) realizar el cálculo del tamaño muestral y seguir considerando los tejidos representativos de las etapas del cáncer oral de un mismo paciente y (iv) preparar las muestras en *tissue microarrays (TMA)* para determinar la expresión de cada proteína en la misma región tisular.

Consecuentemente, y a pesar de todas estas limitaciones, consideramos que este estudio piloto es un primer paso para realizar un estudio mayor que demuestre los perfiles de expresión de la mayoría de proteínas relacionadas a senescencia celular en las diferentes etapas de la carcinogénesis oral de un mismo paciente. Una vez determinados estos perfiles, sería importante considerar el tiempo transcurrido entre la presencia de la LOPM y el COCE, así como el tiempo de supervivencia y/o

recidiva de dichos pacientes, lo que nos permitiría poder establecer marcadores pronósticos basados en el mecanismo de senescencia celular.

8. CONCLUSIONES

Este estudio piloto, en el que se compara la expresión de las proteínas relacionadas con senescencia en tres grupos vinculados a las etapas del cáncer oral, concluye lo siguiente:

1. El patrón de expresión obtenido por las tres proteínas fue diferente: Maspina tuvo un patrón ascendente en la LOD+ con leve disminución en el COCE; p21, un patrón ascendente en la LOD+ con moderada disminución en los COCE; y Ciclina D1, un patrón progresivamente ascendente, es decir su expresión fue menor en la LOD+ y mayor en el COCE.
2. Existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Ciclina D1, Maspina y p21 en los tres grupos de estudio (TON, LOD+ y COCE). Sin embargo, al observar si las diferencias son significativas entre dos grupos, solo Ciclina D1 y p21 presentan éstas entre los grupos de TON y LOD+ y ninguna proteína entre los grupos de LOD+ y COCE, por lo que no se pueden establecer, con este estudio, como marcadores de protección senescente frente al cáncer oral.
3. Existen correlaciones positivas entre las proteínas, tras ser analizadas en la muestra global, lo que demostraría que su expresión varía en función a la etapa de carcinogénesis oral. Sin embargo, estas correlaciones desaparecen al analizarse en cada etapa, por lo que no se pueden establecer nexos de expresión entre ellas.
4. La expresión de las proteínas es diferente en cada grupo de muestras, independientemente del tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la LOD+ y el COCE.
5. Los resultados de este estudio piloto recomiendan plantear un nuevo estudio con la utilización de más proteínas relacionadas con la senescencia celular, con un tamaño muestral mayor, para valorar este mecanismo supresor de tumores en el proceso de carcinogénesis oral dentro de un mismo paciente.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Poon RY. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. United States; 2016. p. 3-19.
- (2) Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2017; 17(2): 93-115.
- (3) Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004; 432(7015): 316-23.
- (4) Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, et al. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(1): 51-61.
- (5) Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999 12; 35(14): 1886-94.
- (6) Bretones G, Delgado MD, Leon J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*; 1849(5): 506-16.
- (7) Tang Z. Basic Properties of the Cell-Division Cycle. In: Coutts AS, Weston L, editors. *Cell Cycle Oscillators (Methods and Protocols)* New York Heidelberg Dordrecht London: Springer; 2016. p. 25.
- (8) Kitagawa M, Kitagawa K, Kotake Y, Niida H, Ohhata T. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cell Mol Life Sci*; 70(24): 4785-94.
- (9) Aguilera A, Garcia-Muse T. Causes of genome instability. *Annu Rev Genet* 2013; 47: 1-32.
- (10) McGregor F, Muntoni A, Fleming J, Brown J, Felix DH, MacDonald DG, et al. Molecular changes associated with oral dysplasia progression and acquisition of immortality: potential for its reversal by 5-azacytidine. *Cancer Res* 2002; 62(16): 4757-66.
- (11) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
- (12) 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* 2000; 36(3): 256-63.
- (13) Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000; 36(4): 311-27.

- (14) Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol* 2000; 36(5): 404-13.
- (15) Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2013; 138(2): 255-71.
- (16) Warnakulasuriya S, Johnson NW, van dW. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36(10): 575-80.
- (17) Cerero Lapiedra R, Baladé Martínez D, Moreno López LA, Esparza Gómez G, Bagán JV. Leucoplasia verrugosa proliferativa: propuesta de criterios diagnósticos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15(5): 276-82.
- (18) Van dW. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015; 20(6): e685-92.
- (19) Martínez DB, Martínez SL, Lapiedra RC, Gómez GE. Las lesiones blancas de la mucosa en el ámbito del precáncer oral. *RCOE* 2009; 14(2): 179-97.
- (20) Gupta PC, Mehta FS, Daftary D, Pindborg J, Bhonsle R, Jainawalla P, 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): 287-333.
- (21) Mincer HH, Coleman SA, Hopkins KP. Observations on the clinical characteristics of oral lesions showing histologic epithelial dysplasia. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1972; 33(3): 389-99.
- (22) Aguirre Echebarría P, Aguirre Urizar J. Displasia epitelial: Concepto y significación. *Av Odontoestomatol* 2008; 24(1): 81-8.
- (23) Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006; 42(10): 987-93.
- (24) El-Naggar A, Chang K, Grandis J, Takata T, Slootweg P. WHO Classification of Head and Neck Tumors. 4th ed. Lyon: IARC; 2017.
- (25) Gale N, Pilch B, Sidransky D, El Naggar A, Westra W, Califano J. Epithelial precursors lesions. *Pathology & Genetics Head and Neck Tumours*. 1st ed. Lyon: IARC Press-WHO Press; 2005. p. 177-79.
- (26) Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347(20): 1593-1603.

- (27) García García V, González-Moles M, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral: Revisión bibliográfica. *Av Odontoestomatol* 2005; 21(6): 287-95.
- (28) Díez-Pérez R, Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, López-Durán M, González-Moles M, Bascones-Ilundain J, et al. Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions. *Oncol Rep* 2011; 25(5): 1203-09.
- (29) Femiano F, Scully C. DNA cytometry of oral leukoplakia and oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10 (Suppl 1): E9-14.
- (30) American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta: American Cancer Society; 2016
- (31) SEOM. *La situación del cáncer en España/ El cáncer en España*. Madrid (España): SEOM 2016.
- (32) Lo Muzio L, Santarelli A, Panzarella V, Campisi G, Carella M, Ciavarella D, et al. Oral squamous cell carcinoma and biological markers: an update on the molecules mainly involved in oral carcinogenesis. *Minerva Stomatol* 2007; 56(6): 341-47.
- (33) Lubin JH, Purdue M, Kelsey K, Zhang ZF, Winn D, Wei Q, et al. Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* 2009; 170(8): 937-47.
- (34) Antón M, Somacarrera Pérez M. *Càncer oral: genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. Revisión de la literatura*. *Av Odontoestomatol* 2015; 31(4): 247-59.
- (35) Stewart B, Wild CP. *World cancer report 2014*. Health 2017.
- (36) Ziober BL, Mauk MG, Falls EM, Chen Z, Ziober AF, Bau HH. Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis. *Head Neck* 2008; 30(1): 111-21.
- (37) Weinberg MA, Estefan DJ. Assessing oral malignancies. *Am Fam Physician* 2002; 65(7):1379-84.
- (38) 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; 365(9475): 1927-33.
- (39) Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(1): 67-76.

- (40) Sudø, J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int J Cancer* 2005; 115(3): 339-45.
- (41) López-Durán M. Determinación de los perfiles de expresión de marcadores de senescencia en lesiones orales potencialmente malignizables y en carcinomas orales de células escamosas. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2016.
- (42) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
- (43) Campisi J, d'Adda dF. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(9): 729-40.
- (44) Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011; 192(4): 547-56.
- (45) Miura T, Mattson MP, Rao MS. Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging Cell* 2004; 3(6): 333-43.
- (46) Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003; 22(16): 4212-22.
- (47) Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International journal of cancer* 2012; 130(8): 1715-25.
- (48) Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 2013; 75: 685-705.
- (49) Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
- (50) Herbig U, Jobling WA, Chen BPC, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 (CIP1), but not p16 (INK4a). *Mol Cell* 2004; 14(4): 501-13.
- (51) Kim S, Beauséjour C, Davalos AR, Kaminker P, Heo S, Campisi J. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem* 2004; 279(42): 43799-804.
- (52) Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 05; 37(5): 961-76.
- (53) Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM. Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem* 1995; 270(51): 30701-08.

- (54) Daynes RA, Enioutina EY, Jones DC. Role of redox imbalance in the molecular mechanisms responsible for immunosenescence. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5(5): 537-48.
- (55) Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, et al. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999; 274(12): 7936-40.
- (56) Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88(5): 593-602.
- (57) Prieur A, Peeper DS. Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(2): 150-55.
- (58) Kim Sh S, Kaminker P, Campisi J. Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene* 2002; 21(4): 503-11.
- (59) Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130(2): 223-33.
- (60) Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, López-Durán M, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez J, Bascones-Martínez A. Marcadores de senescencia celular en cáncer y precáncer oral. *Av Odontoestomatol* 2008; 24(1): 69-80.
- (61) Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; 436(7051): 642.
- (62) Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AHFM, Schlegelberger B, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 2005; 436(7051): 660-65.
- (63) Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(6):472-76.
- (64) Serrano M. Cancer: a lower bar for senescence. *Nature* 2010; 464(7287): 363-64.
- (65) Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(1): 51-7.
- (66) Campisi J. Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science* 2005; 309(5736):886-87.

- (67) Nickoloff BJ, Lingen MW, Chang B, Shen M, Swift M, Curry J, et al. Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity. *Cancer Res* 2004; 64(9): 2956-61.
- (68) Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porras I, Cañamero M, et al. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 2011; 19(6):728-39.
- (69) Warnakulasuriya KA, Tavassoli M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27(8): 376-81.
- (70) Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* 2007; 371: 21-31.
- (71) Sheng S. The promise and challenge toward the clinical application of maspin in cancer. *Front Biosci* 2004; 9: 2733-45.
- (72) Marioni G, Gaio E, Giacomelli L, Bertolin A, D'Alessandro E, Stramare R, et al. MASPIN subcellular localization and expression in oral cavity squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265 Suppl 1: S97-S104.
- (73) Iezzi G, Piattelli A, Rubini C, Goteri G, Artese L, Perrotti V, et al. Maspin expression in oral squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg* 2007; 18(5): 1039-43.
- (74) Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, Craig Allred D. Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. *J Pathol* 2003; 199(4): 432-35.
- (75) Takeda C, Takagi Y, Shiomi T, Nosaka K, Yamashita H, Osaki M, et al. Cytoplasmic maspin expression predicts poor prognosis of patients with soft tissue sarcomas. *Diagn Pathol* 2014; 9: 205.
- (76) Reshma V, Rao K, Priya NS, Umadevi HS, Smitha T, Sheethal HS. Expression of maspin in benign and malignant salivary gland tumors: an immunohistochemical study. *Indian J Dent Res* 2014; 25(3): 346-51.
- (77) Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 2004; 23(16): 2919-33.
- (78) Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer-a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32(3): 233-45.

- (79) Papadimitrakopoulou V, Izzo JG, Liu DD, Myers J, Ceron TL, Lewin J, et al. Cyclin D1 and cancer development in laryngeal premalignancy patients. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2(1): 14-21.
- (80) Liu H, Lu H, Lui M, Yu E, Shen W, Chen Y, et al. Detection of copy number amplification of cyclin D1 (CCND1) and cortactin (CTTN) in oral carcinoma and oral brushed samples from areca chewers. *Oral Oncol* 2009; 45(12): 1032-36.
- (81) Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours: John Wiley & Sons; 2011.
- (82) Prieto IP, Fenech AP, Martínez AB. Cáncer oral. *Medicina clínica* 2006; 127(7): 258-64.
- (83) Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(6): 816-27.
- (84) Golomb L, Sagiv A, Pateras IS, Maly A, Krizhanovsky V, Gorgoulis VG, et al. Age-associated inflammation connects RAS-induced senescence to stem cell dysfunction and epidermal malignancy. *Cell Death Differ* 2015; 22(11): 1764-74.
- (85) Ohtani N, Mann DJ, Hara E. Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer science* 2009; 100(5): 792-97.
- (86) Bermejo M, Martínez A. Leucoplasia oral: Conceptos actuales/Oral Leukoplakia: Current considerations. *Av Odontoestomatol* 2009; 25(2): 83-97.
- (87) Zhang L, Wu R, Dingle RC, Gairola CG, Valentino J, Swanson HI. Cigarette smoke condensate and dioxin suppress culture shock induced senescence in normal human oral keratinocytes. *Oral Oncol* 2007; 43(7): 693-700.
- (88) García-García V, Bascones Martínez A. Cáncer oral: Puesta al día. *Av Odontoestomatol* 2009; 25(5): 239-48.
- (89) Vázquez Álvarez R, Fernández González F, Gándara Vila P, Reboiras López D, García García A, Gándara Rey JM. Correlación clínico-patológica de la leucoplasia oral en una muestra de 54 pacientes. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 16(1): 15-20.
- (90) Bascones-Martínez A, López-Durán M, Cano-Sánchez J, Sánchez-Verde L, Díez-Rodríguez A, Aguirre-Echebarría P, et al. Differences in the expression of five senescence markers in oral cancer, oral leukoplakia and control samples in humans. *Oncology letters* 2012; 3(6): 1319-25.
- (91) Nasser W, Flechtenmacher C, Holzinger D, Hofele C, Bosch FX. Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant

- progression of oral leukoplakias. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2011; 40(8): 629-35.
- (92) Perez-Sayans M, Suarez-Penaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. The role of p21Waf1/CIP1 as a Cip/Kip type cell-cycle regulator in oral squamous cell carcinoma (Review). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18(2): e219-25.
- (93) Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 2000; 14(1): 183-88.
- (94) Umekita Y, Yoshida H. Expression of maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma. *Histopathology* 2003; 42(6): 541-45.
- (95) Ghazy SE, Helmy IM, Baghdadi HM. Maspin and MCM2 immunoprofiling in salivary gland carcinomas. *Diagn pathol* 2011; 6(1): 89.
- (96) Rau KM, Chen YJ, Sun MT, Kang HY. Prognostic effects and regulation of activin A, maspin, and the androgen receptor in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Anticancer Res* 2011; 31(5): 1713-20.
- (97) Queiroz AB, Focchi G, Dobo C, Gomes TS, Ribeiro DA, Oshima CT. Expression of p27, p21 (WAF/Cip1), and p16 (INK4a) in normal oral epithelium, oral squamous papilloma, and oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2010; 30(7): 2799-2803.
- (98) De Vicente JC, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, López-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol* 2002; 38(3): 301-8.
- (99) Yoshizawa K, Nozaki S, Okamune A, Kitahara H, Ohara T, Kato K, et al. Loss of maspin is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* 2009; 38(6): 535-39.
- (100) Abrahao AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Brazilian oral research* 2011; 25(1): 34-41.
- (101) Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Neil Hayes D, Couch ME, Kimple RJ. Association of p16INK4a overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck* 2011; 33(11): 1622-27.

10. ANEXOS:

ANEXO 1. APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO



Conformidad de la Dirección del Centro

Dra. Belén de la Hoz Caballer Adjunta a la Gerencia de Gestión del Conocimiento del Hospital "Ramón y Cajal" y vista la autorización del Comité de la Ética de la Investigación que ha evaluado el estudio

CERTIFICA

Que conoce la propuesta realizada para que sea realizado en este Hospital el Proyecto de Investigación:

ESTUDIO PILOTO: EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SENESCENCIA CELULAR EN LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNAS Y CARCINOMAS ORALES DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Versión Junio 2017 tras aclaraciones CEI

Y que será realizado por D^a. **Rosario Carrillo Gijón**, como Investigadora Principal.

Servicio: **Anatomía Patológica**

Que acepta la realización de dicho Proyecto de Investigación en este Hospital siempre y cuándo no implique ningún gasto adicional para el centro.

Lo que firma en Madrid a 28 de Junio de 2017.



Fdo. Dra. Belén de la Hoz Caballer


DICTAMEN DEL COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

DÑA. Itziar de Pablo López de Abechuco, Secretaria del COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL

CERTIFICA

Que se ha evaluado la propuesta del promotor referida al proyecto de investigación:

TÍTULO:

ESTUDIO PILOTO: EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SENESCENCIA CELULAR EN LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNAS Y CARCINOMAS ORALES DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Versión Junio 2017 tras aclaraciones CEI

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.


Este CEI actuando como comité evaluador, emite dictamen **FAVORABLE** y acepta que dicho estudio sea realizado en los centros siguientes por los investigadores principales que se relacionan a continuación:

D^a. Rosario Carrillo Gijón / Hospital Universitario Ramón y Cajal

Y HACE CONSTAR QUE:

- 1º En la reunión celebrada el día 26 de Junio de 2017 ACTA nº: 326 se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.
- 2º En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente -Real Decreto 1090/2015 y Decreto CAM 39/1994 de la Comunidad de Madrid- para que la decisión del citado CEI sea válida.
- 3º El CEI, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ ICH/ 135/95)
- 4º La composición actual del CEI es la siguiente:

PRESIDENTE	Sonsoles Sancho García.	Oncología Radioterápica
VICEPRESIDENTE	M ^a Ángeles Gálvez	Farmacología Clínica
SECRETARIO TECNICO	Itziar de Pablo López de Abechuco	Farmacología Clínica
VOCALES	M ^a Jesús Blanchard Rodríguez	Hematología
	Irene Cabrera Troye	Miembro Lego, ajeno a la investigación biomédica/asistencia clínica
	Yolanda de Blas Fernández	DUE Servicio de Urgencias
	Guillermo García Ribas	Neurología

 Hospital Universitario Ramón y Cajal SaludMadrid	COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
--	--

	Carmen Guillén Ponce	Oncología Médica. Comité Ética Asistencial. Miembro de la Comisión de Investigación
	Rosa Ana Hernández Antolín	Cardiología
	Manuel Luque Ramírez	Endocrinología y Nutrición. Miembro de la Comisión de Investigación
	María Muñoz García	Farmacia Hospitalaria.
	Alfonso Muriel García	Bioestadística Clínica
	Cristina Pueyo López	Farmacia Hospitalaria. Máster en Bioética
	Carmen Ruiz Ballesteros	Miembro Lego, ajeno a la investigación biomédica/asistencia clínica. Licenciada en Derecho
	Javier Sánchez Casajús	Miembro Lego, ajeno a la investigación biomédica/asistencia clínica
	José Miguel Sánchez Torres	Oncología Médica
	José Luis San Millán López	Genética Molecular
	Sonia Soto Díaz	Medicina Familiar y Comunitaria, Comisión Central de Investigación de la GAP
	Marta del Álamo Camuñas	Biología-IRYCIS

En el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación, ni en el dictamen de la solicitud de autorización del mismo.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor

Madrid a 28 de Junio de 2017



Fdo.: Dña. Itziar de Pablo López de Abechucó
Secretaría CEI

ANEXO 2. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Diagnóstico

TON LOD+ COCE

Datos del paciente

Número:.....

Fecha de nacimiento (edad):

Sexo (H/M): Raza: Edad.....Tiempo de evolución desde la LOD+ a COCE.....

Patología sistémica/Medicación :

.....

.....

Informe clínico/ Radiografías/ Fotografías:

.....

.....

Tabaco:

- No fumador

- Exfumador

¿Desde cuándo? ¿cuánto tiempo fumó?..... ¿cuántos/día?.....

- Fumador

¿Desde cuándo? ¿cuánto tiempo? ¿cuántos/día?

- Alcohol:

Tipo:..... Cantidad: Frecuencia.....

Otras drogas/otros hábitos:

.....

LOD+:

Código de biopsia:

Fecha de inicio:

Tipo histológico: displasia (leve/moderada/severa-bajo/alto grado):

.....

Tamaño: Localización: Tiempo evolución:.....

Profesional responsable del diagnóstico:

Tipo de biopsia: Método:..... Procedimiento:..... Tamaño:.....

Informe patológico/ Observaciones/Fecha:

.....

.....

.

COCE:

Código de biopsia:

Fecha de inicio:.....

Tipo histológico (bien/mal diferenciado):

Clasificación TNM:

Tamaño: Localización: Tiempo evolución:

Profesional responsable del diagnóstico:

Tipo de biopsia: Método:..... Procedimiento: Tamaño:

Informe patológico/ Observaciones/Fecha:

.....

.....

ANEXO 3. PROTOCOLO CERTIFICADO DEL CNIO (PT-HIS-03)

Técnica inmunohistoquímica:

Desparafinado

Una vez cortadas las secciones se dejan escurrir y se meten en una estufa a 56°C durante 16 horas (excepcionalmente mínimo 2 horas). Posteriormente se procede al desparafinado e hidratación para eliminar la parafina (insoluble en agua) con el fin de que no interfiera en los procesos posteriores de tinción, etc.

Se hace con un disolvente orgánico como xilol y a continuación se hidrata con etanol decreciente. Estas muestras ya hidratadas no deben secarse nunca, manteniéndolas en agua o buffer antes de la técnica a aplicar.

Este proceso se puede realizar de forma manual, automatizada (en el teñidor automático PRISMA de SAKURA) o en combinación con otras técnicas llamadas de recuperación antigénica en PT LINK.

A) Manual: cuando se realiza de manera manual el proceso es solo el desparafinado aplicable a las técnicas de CISH que no necesitan desenmascaramiento.

- El proceso completo consta de los siguientes pasos:
 - Xilol (2 pasos de 4 min)
 - Etanol Absoluto (5 min)
 - Etanol 95% (3 min)

B) Automatizado:

Teñidor PRISMA.

Se selecciona el protocolo denominado: **Desparafinado**.

El protocolo *Desparafinado* se utiliza para desparafinar portas que posteriormente se van a utilizar para técnicas de Inmunohistoquímica, de hibridación in situ y para técnicas histológicas.

Se introducen los porta-objetos en una gradilla específica para teñidor Prisma, se inserta un soporte que permite ser reconocido por el brazo automático del teñidor, teniendo en cuenta que la descripción UP quede orientada en la parte superior de la gradilla.

Se enciende el equipo y se sigue el protocolo establecido en cada uno de ellos para esta fase del proceso.

Una vez finalizado se retiran las muestras y se introducen en una jarra coplin con agua para que se mantengan hidratadas. Si la técnica posterior es una Hematoxilina/Eosina, se selecciona el protocolo H/E y se continúa con el procedimiento.

Inmunoteñidor Discovery XT (Ventana)

Se imprime una etiqueta que identifique el nº de portaobjetos y el programa que se quiere realizar.

Se identifica el portaobjetos con la etiqueta que identifique el protocolo a realizar.

Se coloca el portaobjetos en una de las posiciones del soporte específico para el equipo.

Se da a inicio del equipo y comienza la lectura de la etiqueta y el posterior protocolo a realizar.

Previamente se comprueba que las garrafas de reactivos para desparafinar están vacías. Si al porta se le va a hacer una técnica de inmunohistoquímica o hibridación in situ que requiere tratamiento adicional se continúa el proceso sin pausa alguna, en dichos casos la identificación del proceso se ve en la etiqueta de forma que previamente hemos seleccionado el protocolo que proceda para caso.

El proceso consta de 2 pasos con el reactivo de desparafinado (EZPprep), uno de 8 minutos y otro de 4 minutos, entre los cuales se realiza un lavado con el tampçon de lavado. Se realiza a 37°C aunque en un primer momento, se hace un precalentamiento a 75°C.

ANEXO 4. ANÁLISIS DE CONCORDANCIA

Se calculó la concordancia inter e intraoperador para la expresión de las proteínas relacionadas a senescencia celular utilizando el coeficiente Tau-b de Kendall por tratarse variables ordinales. Los análisis fueron realizados por separado por dos médicos especializados en patología (R.C.G y J.M.A.), cada patólogo repitió las mediciones un día después de haber realizado la primera medición. La concordancia inter e intraoperador fue casi perfecta en todos los casos.

CONCORDANCIA INTEROPERADOR

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Tau-b de Kendall	Ciclina D1	0,838	0,087	6,880	0,000
	Maspina	0,887	0,073	6,864	0,000
	p21	0,956	0,042	20,494	0,000
	Ki-67	0,969	0,029	8,177	0,000

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

CONCORDANCIA INTRAOPERADOR

Patólogo 1

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Tau-b de Kendall	Ciclina D1	0,941	0,056	8,491	0,000
	Maspina	1,000	0,000	13,124	0,000
	p21	1,000	0,000	39,288	0,000
	Ki-67	0,939	0,058	7,028	0,000

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Patólogo 2

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Tau-b de Kendall	Ciclina D1	0,947	0,050	7,595	0,000
	Maspina	0,943	0,053	6,308	0,000
	p21	0,907	0,060	12,410	0,000
	Ki-67	1,000	0,000	7,668	0,000

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

ANEXO 5. IMÁGENES DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

