

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)**



**TESIS DOCTORAL**

**Determinación de los perfiles de expresión de marcadores de senescencia en lesiones orales potencialmente malignizables y en carcinomas orales de células escamosas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Mercedes López Durán**

Director

Antonio Bascones Martínez  
Julián Campo Trapero  
Jorge Cano Sánchez

**Madrid, 2016**



# **DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SENESCENCIA EN LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNIZABLES Y EN CARCINOMAS ORALES DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

---

**TESIS DOCTORAL**  
**Mercedes López Durán**

Directores:

**Dr. Antonio Bascones Martínez**

**Dr. Julián Campo Trapero**

**Dr. Jorge Cano Sánchez**

Departamento de Estomatología III  
Facultad de Odontología  
Universidad Complutense de Madrid

**2015**



## **AGRADECIMIENTOS**

---

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral, y en especial:

A mis directores de tesis, en primer lugar por brindarme la oportunidad de participar en esta línea de investigación que ha resultado ser parte de la actualidad más prometedora en la investigación del cáncer. Y en segundo lugar, pero no menos importante, por la ayuda y presión, siempre necesaria, prestadas a lo largo de estos años.

Al Dr. Lorenzo Lo Muzio, por la colaboración para poder iniciar este proyecto.

A mis compañeros del Máster de Periodoncia, por ayudarme en la recolección de las muestras de tejido sano.

A los doctores Pablo Aguirre-Echevarría y Emilio Álvarez Fernández, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón, por su inestimable asesoramiento en la clasificación de las muestras.

Al personal del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), en especial a Lidia Sánchez Verde y Ana Díez Rodríguez. Por su adiestramiento y ayuda para la preparación y el análisis de las muestras.

A los pacientes, que han permitido que sus datos y muestras biológicas sean empleados para la investigación, aún encontrándose en situaciones vitales complicadas. Sin ellos, la realización del estudio no hubiera sido posible.

A la Fundación Mutua Madrileña por su patrocinio, por confiar en nosotros para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A Elena Figuero y a Gildo Fernández-Abascal, por enseñarme a utilizar y entender el SPSS.

A los Dres. Jeffrey O'Sullivan y Stephen Flint, por permitirme realizar una estancia muy enriquecedora en el School of Dental Science, Trinity College, Dublín. Y por permitirme asistir a la "Cancer Clinic" del Dublin Dental School and Hospital.

A las personas que, aunque no aparezcan especificadas, han estado presentes de alguna manera durante la realización de este proyecto.

A mi familia, por su cariño y comprensión durante las horas de ausencia.

## Índice

---

<b>RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
CARACTERÍSTICAS Y EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL	24
<i>Concepto y significado de la displasia epitelial</i>	25
CARCINOGENÉNESIS Y MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO CELULAR	26
APOPTOSIS Y CÁNCER	27
CÁNCER Y CICLO CELULAR	27
SENESCENCIA Y CÁNCER ORAL	29
<i>¿Qué es la senescencia?</i>	29
<i>Características de las células senescentes</i>	30
<i>Causas de senescencia</i>	31
<i>Senescencia y envejecimiento</i>	33
<i>Senescencia y tabaco</i>	33
<i>Senescencia e inflamación</i>	33
<i>Niveles de expresión de los oncogenes</i>	34
<i>Tipos de senescencia:</i>	34
<i>Evolución en la investigación de la SIO a lo largo del tiempo</i>	36
<i>Senescencia y tratamiento anticáncer</i>	37
<i>Inconvenientes de la senescencia</i>	38
<i>Vías y marcadores de senescencia</i>	38
<i>El marcador de proliferación celular ki-67 en la senescencia</i>	51
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>52</b>
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>54</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>58</b>
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	59
2. SELECCIÓN DE CASOS, PACIENTES	59
3. DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS DE DISPLASIA DE LAS LESIONES POTENCIALMENTE MALIGNIZABLES	60
<i>3.1. Clasificación de la displasia y clasificación tumoral</i>	60
4. CONSTRUCCIÓN DEL <i>TISSUE MICROARRAY (TMA)</i> CON TEJIDOS ORALES BENIGNOS, LESIONES ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES (LEUCOPLASIAS CON Y SIN DISPLASIA) Y CARCINOMAS ORALES	62
5. TÉCNICA DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA	65
6. ANÁLISIS DE LOS <i>TISSUE MICROARRAYS</i>	66
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
<b>RESULTADOS</b>	<b>69</b>
1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA DE ESTUDIO	70

1.1. Ausencia de homogeneidad entre los grupos en cuanto a factores demográficos	70
1.2. Localizaciones patológicas más frecuentes a nivel de lengua y suelo de la boca	71
1.3. Predominio de leucoplasias homogéneas y de displasia de grado leve	71
1.4. Carcinomas con estadios clínicos e histológicos variados (tabla 13)	72
2. EXPRESIÓN DE 19 PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LAS VÍAS DE SENESCENCIA EN LESIONES DE MUCOSA ORAL NORMAL, DE LEUCOPLASIA ORAL CON Y SIN DISPLASIA Y DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (ver tinciones en anexo 4)	73
<i>Expresión de actina</i>	74
<i>Expresión de CDK6</i>	75
<i>Expresión de ciclina D1</i>	76
<i>Expresión de E2F1</i>	77
<i>Expresión de hTERT</i>	78
<i>Expresión de maspina</i>	79
<i>Expresión de MDM2</i>	80
<i>Expresión de p14ARF</i>	81
<i>Expresión de p15INK4b</i>	82
<i>Expresión de p16INK4a</i>	83
<i>Expresión de p21CIP1</i>	84
<i>Expresión de p53</i>	85
<i>Expresión de pRb</i>	86
<i>Expresión de Rb</i>	87
3. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CADA PROTEÍNA ENTRE LOS CUATRO GRUPOS DE ESTUDIO PARA DETERMINAR SI EXISTE UNA EXPRESIÓN DIFERENCIAL SIGNIFICATIVA ENTRE ELLOS	88
4. MUESTRAS QUE PRESENTARÍAN UN ESTADO SENESCENTE BASÁNDONOS EN UNA EXPRESIÓN BAJA DE Ki67 JUNTO CON UNA EXPRESIÓN ALTA DE p16	92
5. CORRELACIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE LA CARCINOGENÉISIS ORAL	94
6. TIPOLOGÍAS O PERFILES PROTEICOS PARA CADA UNO DE LOS GRUPOS DE ENFERMEDAD Y SELECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MÁS REPRESENTATIVAS	100
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>102</b>
Relevancia clínica del estudio de la senescencia en cáncer oral y lesiones orales potencialmente malignizables	103
Objetivos y aplicación clínica	103
Diseño del estudio	103
Existencia de variables modificadoras	105
Expresión de las proteínas involucradas en las vías de senescencia	106
Correlación entre las proteínas y las vías de senescencia	110
Perspectivas para futuras investigaciones	111
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>112</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO 1: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO 2: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE. CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	<b>130</b>

---

<b>ANEXO 3. APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO</b>	<b>132</b>
<b>ANEXO 4. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>133</b>
Expresión de los marcadores de senescencia de la vía ARF-p53	133
Expresión de los marcadores de senescencia de la vía p16-pRb	134
Expresión de maspina	135
<b>ANEXO 5. PUBLICACIÓN DEL ESTUDIO PILOTO</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO 6. RESULTADO DE LA ESTANCIA EN EL TRINITY COLLEGE (DUBLÍN, IRLANDA) PARA LA MENCIÓN EUROPEA</b>	<b>144</b>

---

## Índice de figuras

---

Figura 1. Secuencia de alteraciones genéticas implicadas en la transformación maligna de la mucosa sana. (Modificado de Califano y cols 1996) .....	25
Figura 2. Fases del ciclo celular .....	28
Figura 3. Límite Hayflick .....	34
Figura 4. Mecanismos de evasión de senescencia en cáncer.....	35
Figura 5. Esquema de las dos principales vías de senescencia.....	39
Figura 6. Relaciones de p16 en las vías que conducen a la senescencia .....	47
Figura 7. Mecanismo de producción de senescencia por CDKs .....	50
Figura 8. Selección de las zonas más representativas de cada muestra para su inclusión en los <i>tissue microarrays</i> , mediante observación con microscopio de tinciones con <i>hematoxilina-eosina</i> .....	60
Figura 9. Aparato manual para la fabricación de TMAs, de Beecher .....	64
Figura 10. Construcción y análisis de un TMA a partir de muestras fijadas en formaldehído y embebidas en parafina.....	64
Figura 11. Patrón de expresión de actina.....	74
Figura 12. Patrón de expresión de CDK6.....	75
Figura 13. Patrón de expresión de ciclina D1 .....	76
Figura 14. Patrón de expresión de E2F.....	77
Figura 15. Patrón de expresión de hTERT .....	78

---

Figura 16. Patrón de expresión de maspina .....	79
Figura 17. Patrón de expresión de MDM2 .....	80
Figura 18. Patrón de expresión de p14ARF .....	81
Figura 19. Patrón de expresión de p15INK4b.....	82
Figura 20. Patrón de expresión de p16 INK4a .....	83
Figura 21. Patrón de expresión de p21 CIP1 .....	84
Figura 22. Patrón de expresión de p53 .....	85
Figura 23. Patrón de expresión de pRb .....	86
Figura 24. Patrón de expresión de Rb .....	87
Figura 25. Representación de las proteínas con expresión diferencial (estadísticamente significativa) entre las fases consecutivas de la carcinogénesis oral.....	91
Figura 26. Representación gráfica de la expresión del marcador de proliferación tisular ki-67 y del supresor tumoral p16 en distintas etapas consecutivas de la carcinogénesis oral .....	92
Figura 27. Análisis de Cluster 1.....	100

## Índice de tablas

---

Tabla 1. Funciones alteradas de la célula senescente .....	31
Tabla 2. Marcadores actuales de senescencia celular más relacionados con cáncer y precáncer oral. (Tomada de Campo-Trapero y cols 2008) .....	40
Tabla 3. Marcadores de SIO estudiados. Modificada de Collado y Serrano 2006.....	43
Tabla 4. Clasificación TNM y estadio clínico .....	61
Tabla 5. Grado de diferenciación histológica .....	61
Tabla 6. Distribución de las muestras en el TMA 272. ....	63
Tabla 7. Distribución de las muestras en el TMA 273 .....	63
Tabla 8. Descripción de los anticuerpos utilizados para la inmunohistoquímica .....	66
Tabla 9. Cuantificación de la inmunotinción .....	67

---

Tabla 10. Características demográficas de los pacientes .....	70
Tabla 11. Localización de las muestras tomadas.....	71
Tabla 12. Características de las leucoplasias .....	71
Tabla 13. Características de los carcinomas de células escamosas.....	72
Tabla 14. Expresión de actina.....	74
Tabla 15. Expresión de CDK6.....	75
Tabla 16. Expresión de ciclina D1 .....	76
Tabla 17. Expresión de E2F.....	77
Tabla 18. Expresión de hTERT .....	78
Tabla 19. Expresión de maspina .....	79
Tabla 20. Expresión de MDM2 .....	80
Tabla 21. Expresión de p14ARF .....	81
Tabla 22. Expresión de p15INK4b.....	82
Tabla 23. Expresión de p16 INK4a .....	83
Tabla 24. Expresión de p21 CIP1 .....	84
Tabla 25. Expresión de p53 .....	85
Tabla 26. Expresión de pRb .....	86
Tabla 27. Expresión de Rb .....	87
Tabla 28. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con una expresión progresivamente ascendente (CDK6, ciclina D1) .....	89
Tabla 29. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con una leve disminución en la fase de leucoplasia con displasia (Rb, p53).....	89
Tabla 30. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con disminución en la fase de leucoplasia sin displasia (actina) .....	89
Tabla 31. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con expresión “tipo meseta” (aumentada en las etapas de leucoplasia y disminuida en sano y carcinoma) (maspina, MDM2, pRb, p14, p15, p16, p21) .....	90
Tabla 32. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con con una expresión progresivamente descendente (E2F, hTERT).....	90

---

Tabla 33. Representación gráfica de la expresión del marcador de proliferación tisular ki-67 en distintas etapas consecutivas de la carcinogénesis oral.....	93
Tabla 34. Representación gráfica de la expresión del supresor tumoral p16 en distintas etapas consecutivas de la carcinogénesis oral.....	93
Tabla 35. Cuantificación de la inmunotinción de ki-67 y p16.....	93
Tabla 36. Correlaciones globales entre las proteínas.....	95
Tabla 37. Correlación entre las proteínas en el grupo tejido oral normal .....	96
Tabla 38. Correlación entre las proteínas en el grupo leucoplasia oral sin displasia .....	97
Tabla 39. Correlación entre las proteínas en el grupo leucoplasia oral con displasia .....	98
Tabla 40. Correlación entre las proteínas en el grupo carcinoma oral de células escamosas ...	99
Tabla 41. Perfiles proteicos en relación al tejido oral sano.....	101

---

---

## **RESUMEN**

---

---

## DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SENESCENCIA EN LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNIZABLES Y EN CARCINOMAS ORALES DE CÉLULAS ESCAMOSAS

### Justificación

La senescencia inducida por oncogenes (SIO) es el cese irreversible de la replicación de una célula ante un daño del ADN o un estímulo pro-oncogénico.

Investigaciones en modelo animal y posteriormente en humanos (Braig y cols 2005; Chen y cols 2005; Collado y cols 2005; Michaloglou y cols 2005; Lazzerini Denchi y cols 2005), han demostrado que la senescencia inducida por oncogenes ocurre durante etapas iniciales de la carcinogénesis, aún premalignas, y que la evasión de la senescencia conduciría a la transformación maligna de las células. Por lo tanto, sería interesante estudiar la senescencia en distintos estadios de la carcinogénesis oral, partiendo de tejido sano, para poder comprender con más exactitud este mecanismo antitumoral.

Se ha descrito que ciertas condiciones no fisiológicas de cultivo pueden desencadenar también una respuesta senescente (Mooi y Peeper 2006), y que la expresión de los marcadores de senescencia puede variar según el modelo de estudio (animal o humano) (Dimri 2005) y el tipo de tumor (la senescencia es tejido-específica). Por lo tanto, el estudio de la SIO en cáncer oral debería ser llevado a cabo *in vivo*, en modelo humano y en lesiones orales correspondientes a distintos estadios de la carcinogénesis (tejidos orales sanos, lesiones potencialmente malignizables sin y con displasia y carcinomas orales).

La necesidad de emplear marcadores para el estudio de la senescencia se debe a que las células senescentes *in vivo* carecen de rasgos morfológicos distintivos, pese a que *in vitro* sí adoptan una morfología alargada y plana característica. Por lo tanto, es necesario establecer marcadores de senescencia, o perfiles de marcadores asociados, para poder calificar una lesión como senescente.

Además, debido a esta asociación de la senescencia con etapas iniciales de la carcinogénesis, podría utilizarse como una herramienta tanto para el pronóstico, como para el tratamiento de las lesiones precancerosas. Y el desarrollo de fármacos inductores de senescencia podría ser un mecanismo importante para la detección y eliminación de las células con potencial de malignización. Éstas, entrarían en senescencia y serían eliminadas por el propio sistema inmune del organismo, previniendo el desarrollo de un carcinoma oral.

La base de una terapia pro-senescente para el tratamiento del cáncer oral consistiría, por tanto, en re-establecer las vías senescentes, fisiológicas, ya que parece ser que durante la carcinogénesis oral, éstas permanecen intactas, aunque suprimidas. Y hemos visto que hay proteínas nexos entre las vías (Al-Khalaf y Aboussekhra 2013), por lo que posiblemente re-activando sólo algunas de estas proteínas, el mecanismo senescente pueda re-establecerse de

---

nuevo.

Pero para determinar cuáles son estas proteínas que podrían utilizarse para la terapia pro-senescencia, sus funciones y sus interrelaciones, hay que estudiar todas estas vías y proteínas simultáneamente, en humanos, en tejido oral, y de una manera sitio-dependiente, como desarrollamos en nuestro estudio.

## Objetivos

El objetivo general del estudio es determinar si existen perfiles proteicos o proteínas relacionadas con las vías de senescencia inducida por oncogenes que puedan ser considerados marcadores de senescencia debido a una expresión diferencial en tejido oral sano, lesiones orales potencialmente malignizables y carcinomas orales de células escamosas.

Para ello, se proponen como objetivos específicos:

- 1) Caracterizar la expresión de 19 proteínas relacionadas con las vías senescentes en cuatro grupos de tejido oral (tejido sano, leucoplasia sin y con displasia y carcinoma oral de células escamosas).
- 2) Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos.
- 3) Determinar qué muestras de tejido concordarían con un estado senescente basándonos en una expresión elevada de p16 y disminuida de ki-67.
- 4) Analizar si existen correlaciones entre las proteínas en los distintos grupos.
- 5) Determinar si existen perfiles de expresión proteicos característicos de senescencia oral.

## Material y métodos

Se diseñó un estudio en humanos de tipo observacional analítico transversal consistente en cuatro grupos de estudio que representan las principales fases consecutivas de la carcinogénesis oral de células escamosas. Estos grupos son: tejido oral sano o TOS, leucoplasia sin displasia o LOD-, leucoplasia oral con displasia o LOD+ y carcinoma oral de células escamosas o COCE.

Las variables respuesta serían las proteínas relacionadas con las vías de senescencia expresadas en los distintos grupos (actina, CDK4, CDK6, ciclina D1, DCR2, Dec1, E2F, hTERT, H-Ras, maspina, MDM2, p14<sup>ARF</sup>; p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup>, p53, , pRb, Rb, RAR-β).

Se incluyeron en el estudio 123 biopsias correspondientes a 123 pacientes, procedentes del Hospital Gregorio Marañón de Madrid y de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. Previamente se había obtenido la aprobación de los comités éticos correspondientes y los pacientes habían firmado un consentimiento informado.

---

Las biopsias fueron fijadas en formaldehído e incluidas en parafina. Con ellas se confeccionaron dos *tissue microarrays (TMA)*, con un total de 43 TOS, 28 LOD-, 23 LOD+ y 29 COCE, por duplicado, al que se añadieron muestras de páncreas, amígdala, placenta, riñón y pulmón como controles. Estos *TMA* se cortaron con un grosor de 3 micras. Una sección fue teñida con hematoxilina/eosina y el resto mediante inmunohistoquímica para cada una de las proteínas de estudio.

Las secciones de cilindro que no contenían epitelio o aquellas con menos del 50% del tejido original se descartaron para el análisis. El análisis del grado de tinción de cada proteína la realizamos dos miembros del equipo cegados a los datos clínicos, mediante observación con microscopio óptico.

Se calcularon las medias y porcentajes para la estadística descriptiva. Para determinar las diferencias de expresión de las proteínas entre los grupos, se utilizó la prueba Anova de un factor para comparar las medias intergrupo; y un test no paramétrico de comparaciones múltiples para determinar entre cuáles de ellos las diferencias eran estadísticamente significativas. Se tomaron como significativos los contrastes con p-valores menores de 0,05. Las correlaciones estadísticas entre la expresión de los distintos marcadores entre sí se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Y se empleó el análisis de clusters para determinar los perfiles de expresión de los marcadores proteicos en cada uno de los grupos de estudio.

## **Resultados**

Las proteínas CDK4, DCR2, Dec1, H-Ras y RAR- $\beta$  no pudieron ser optimizadas mediante inmunohistoquímica para los tejidos humanos orales y se descartaron para el análisis.

Se determinaron cinco patrones de expresión para las proteínas, siendo el más frecuente el patrón con forma de “meseta”; es decir, con expresión aumentada en las etapas de leucoplasia y disminuida en tejido sano y carcinoma. Este patrón fue característico de las proteínas: maspina, MDM2, p14, p15, p16, p21 y pRb. Sin embargo, de ellas, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas al pasar de lesiones orales potencialmente malignizables a carcinomas orales para maspina, MDM2, p14 y p15. Y ninguna de las proteínas analizadas mostró diferencias significativas al pasar de leucoplasia sin displasia a leucoplasia con displasia.

Se obtuvo un patrón progresivamente ascendente para CDK6 y ciclina D1, progresivamente descendente para E2F y hTERT, ascendente con una disminución en la fase de leucoplasia sin displasia para actina, y similar pero con disminución en las leucoplasias con displasia para p53 y Rb. De ellas, sólo actina y hTERT mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar leucoplasias con displasia y COCE.

Las proteínas Rb, p21 y p16 no mostraron diferencias de expresión significativas entre los grupos de estudio al comparar las medias.

---

Intentamos determinar las muestras que presentarían un estado senescente basándonos en la coincidencia en una misma muestra de una expresión baja del factor de proliferación celular ki-67 y alta del inhibidor de CDKs p16. No encontramos coincidencia en ninguna de las muestras para estos dos hechos. Y encontramos además que las diferencias de expresión de p16 entre los grupos no son estadísticamente significativas entre ninguno de ellos.

Al correlacionar la expresión de las proteínas entre ellas, en las lesiones potencialmente malignizables encontramos una correlación positiva fuerte de maspina con pRB, p21 y p15.

Las únicas correlaciones negativas significativas las obtuvimos a nivel de la muestra global entre la proteína hTERT y ciclina D1, actina y CDK6.

Y en el análisis de clusters, observamos que maspina es la única proteína aumentada en las lesiones potencialmente malignizables y disminuida en los COCE al compararla con el tejido oral sano.

## Conclusiones

En este estudio transversal en humanos, en el que se compara la expresión de 19 proteínas relacionadas con la senescencia, en cuatro grupos de estudio que representan las fases consecutivas de la carcinogénesis oral, partiendo de tejido oral sano:

1. El patrón de expresión más frecuente para las proteínas relacionadas con las vías de senescencia fue el patrón “en meseta”; es decir, una expresión aumentada en las lesiones orales potencialmente malignizables y disminuida en los carcinomas. Este patrón se obtuvo para: maspina, MDM2, p14, p15, p16, p21 y pRb.
2. De las anteriores, aquellas con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tejido oral sano *versus* leucoplasia oral y de leucoplasia oral *versus* carcinoma oral de células escamosas son: maspina, MDM2, p14 y p15.
3. El inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas p16 no varió su expresión de manera estadísticamente significativa entre ninguna de las etapas de la carcinogénesis, ni siquiera en el grupo de los carcinomas.
4. Cinco de las 19 proteínas no pudieron ser optimizadas para el método inmunohistoquímico en nuestra muestra de estudio. Éstas son: CDK4, DCR2, Dec1, H-Ras y RAR-β.
5. Basándonos en la coincidencia en la misma muestra de una expresión baja del factor de proliferación celular ki-67 y alta del inhibidor de CDKs p16, no podemos determinar

---

que ninguna de las muestras se encuentre en senescencia.

6. En las lesiones potencialmente malignizables, encontramos una correlación positiva fuerte de maspina con pRB, p21 y p15.
7. En el análisis de clusters, maspina era la única proteína con una presencia aumentada en las lesiones potencialmente malignizables y considerablemente disminuida en los carcinomas. Es por tanto esta proteína la que muestra claras diferencias de expresión en todos los análisis.
8. Sería interesante, por tanto, estudiar la proteína maspina como marcador representativo de protección senescente frente al cáncer oral, mediante estudios con un diseño longitudinal y tamaños muestrales mayores.

---

## **SUMMARY**

---

---

## **DETERMINATION OF PROFILES OF EXPRESSION OF SENESCENCE MARKERS IN POTENTIALLY MALIGNANT ORAL LESIONS AND ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS**

### **Justification**

Oncogene induced senescence (OIS) is the irreversible cessation of cell replication when confronted with DNA damage or a pro-oncogenic stimulus.

Research in both animal model and humans (Braig et al 2005; Chen et al 2005; Collado et al 2005; Michaloglou et al 2005; Lazzerini Denchi et al 2005) have shown that oncogene induced senescence (OIS) takes place during early stages of carcinogenesis, even in premalignant stages. They have also shown that evasion of senescence would lead to malignant transformation of cells. Therefore, it would be interesting to study the different stages of senescence in oral carcinogenesis, starting from healthy tissue, in order to more accurately understand the antitumor mechanism.

It has been reported that certain non-physiological culture conditions can also trigger a senescent response (Peeper and Mooi 2006), and that the expression of markers of senescence may vary according to the study model (animal or human) (Dimri 2005) and also according to type of tumor (tissue-specific). Therefore, the study OIS in oral carcinogenesis should be carried out *in vivo*, in human model and in oral lesions corresponding to different stages of carcinogenesis (oral healthy tissue, leukoplakia without dysplasia, oral leukoplakia with dysplasia and oral carcinomas).

The need to use protein markers in senescence study results from the fact that senescent cells, *in vivo*, lack distinctive morphological features, even though, *in vitro*, cells do adopt an elongated and flattened morphology. Therefore, it is necessary to establish senescence markers, or profiles of associated markers, in order to being able to characterize a lesion as senescent.

Furthermore, the association of senescence with early stages of carcinogenesis is useful with regard to the study of oral cancer. Indeed, this association could be used as a tool for both the prognosis and treatment of precancerous lesions. In addition, the development of senescence-inducing drugs could be an important mechanism to detect and remove potentially malignizable cells. Indeed, these cells would enter into senescence and would be eliminated, preventing the development of an oral carcinoma.

Thus, a pro-senescent therapy for the treatment of oral cancer would be based in re-establishing senescent physiological pathways, as it seems that during the oral carcinogenesis they remain intact, although suppressed. Additionally, we have observed that there are proteins that play the role of link between pathways (Al-Khalaf and Aboussekhra 2013). Consequently, if only some of these proteins were reactivated, the senescence mechanism could possibly be re-established.

---

However, in order to identify which proteins could be used for the pro-senescence therapy, as well as their functions and their interrelationships, we have to study all these pathways and proteins simultaneously, in humans, in oral tissue, and in a site-specific way.

## **Objectives**

The general objective of the study is to find protein profiles, or proteins related with the oncogene induced senescence pathways, that may be considered senescence markers due to a differential expression in oral healthy tissue, potentially malignizable oral lesions and oral squamous cell carcinomas.

To do so, the following specific objectives are proposed:

1. Characterize the expression of 19 proteins associated with senescent pathways into four groups of oral tissue (oral healthy tissue, leukoplakia without dysplasia, oral leukoplakia with dysplasia and oral carcinomas);
2. Determine whether there are statistically significant differences in their expression among the four groups;
3. Determine which tissue samples would match with a senescent state, based on high expression of p16 and a low expression of Ki-67;
4. Analyze whether there are correlations between proteins in the different groups;
5. Determine whether there are protein expression profiles that are characteristic of oral senescence.

## **Material and methods**

An analytical, observational, cross-sectional study was designed in humans. It consisted of four study groups, each of them representing the main successive phases of oral squamous cell carcinogenesis. These groups are: healthy oral tissue or HOT, oral leukoplakia without dysplasia or LOD-, oral leukoplakia with dysplasia or LOD+ and oral squamous cell carcinoma or OSCC.

The response variables are the expressed proteins (actin, CDK4, CDK6, cyclin D1, DCR2, Dec1, E2F, hTERT, H-Ras, maspin, MDM2, p14ARF; p15INK4B, p16 INK4a, p21WAF1 / Cip1 / Sdi1, p53, pRb, Rb, RAR- $\beta$ ).

123 biopsies corresponding to 123 patients were included in the study. The biopsies were taken in both the Gregorio Marañón hospital in Madrid and in the School of Dentistry at the Complutense University of Madrid. The necessary approvals had been previously obtained

---

from the corresponding ethics committees. The patients signed the necessary informed consent.

Biopsies were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin. With them, two tissue microarrays (TMA) were prepared, with a total of 43 HOT, 28LOD-, 23 LOD + and 29 OSCC, each of them duplicated. Samples of pancreas, amygdala, placenta, kidney and lung were added as controls. These TMA were cut with a thickness of 3 microns. A section was stained with hematoxylin / eosin. The rest was stained with immunohistochemistry for each protein of the study.

Those cylinder sections containing no epithelium or those with less than 50% of the original tissue were discarded for analysis. The analysis of the degree of staining of each protein was done by two members of the team, blinded to the clinical data, through optical microscope observation.

Averages and percentages were calculated for the descriptive statistics. In order to determine the differences in protein expression between groups, the ANOVA test of a factor was used to compare intergroup means. In addition, a non-parametric test for multiple comparisons was used to determine which ones among the differences were statistically significant. Contrasts with p-values <0.05 will be considered as significant. The statistical correlations between the expression of the different markers were analyzed using the Spearman correlation coefficient. Cluster analysis was used to determine the expression profiles of the protein markers in each of the study groups.

## Results

CDK4, DCR2, Dec1, H-Ras and RAR- $\beta$  proteins could not be optimized by immunohistochemistry for oral human tissue. They were discarded for the analysis.

Five patterns of protein expression were determined. The most frequent pattern was the "plateau"-shaped one. That is, the pattern with increased expression in the stages of leukoplakia and with decreased expression in healthy tissue and carcinoma. This pattern was characteristic of the following proteins: maspin, MDM2, p14, p15, p16, p21 and pRb. However, among these, only statistically significant differences were found when moving from potentially malignizable oral lesions to oral carcinomas, in the case of maspin, MDM2, p14 and p15. In addition, none of the analyzed proteins showed significant differences when moving from leukoplakia without dysplasia to leukoplakia with dysplasia.

A progressively ascending pattern was obtained for CDK6 and cyclin D1, and progressively descending for E2F and hTERT, ascending with a decrease in the leukoplakia without dysplasia to actin phase, and similar but with a decrease in the leukoplakia with dysplasia for p53 and Rb. Of these, only actin and hTERT showed statistically significant differences when comparing leukoplakia with dysplasia and OSCC differences.

---

Proteins Rb, p21 y p16 did not show significant expression differences between the four study groups during the average comparison.

We sought to determine which samples would present a senescent state, based on the coincidence in the same sample of a low expression in the cell proliferation ki-67 factor and a high expression in the p16 CDK inhibitor. We did not find any match in any of the samples for these two facts. We also found that differences in p16 expression between groups were not statistically significant in any of them.

By correlating the expression of proteins between them, we found a strong positive correlation of maspin with pRB, p21 and p15 in potentially malignizable lesions.

Negative correlatios were just foug at the level of the whole simple, but not for illness groups between the protein hTERT and ciclin D1, actin and CDK6.

We also observed in the cluster analysis that maspin is the only increased protein in the potentially malignizable lesions and decreased in OSCC when compared to the healthy oral tissue.

### **Conclusions:**

In this cross-sectional study in humans, in which the expression of 19 senescence-associated proteins is compared, in four study groups representing the consecutive steps of oral carcinogenesis, starting from healthy oral tissue:

1. The most common pattern for proteins related to senescence pathways expression "plateau"-shaped pattern; i.e. the pattern with increased expression in the stages of leukoplakia and with decreased expression in healthy tissue and carcinoma. This pattern was obtained for: Maspin, MDM2, p14, p15, p16, p21 and pRb.
2. From the rest, those with statistically significant differences between the groups of healthy oral tissue versus oral leukoplakia and between oral leukoplakia versus oral squamous cell carcinoma are: Maspin, MDM2, p14 and p15.
3. The inhibitor of cyclins dependent of kinases p16 did not vary its expression in a statistically significantly manner between any of the stages of carcinogenesis, not even in the group of carcinomas.
4. Five of the 19 proteins could not be optimized for the immunohistochemical method in our study sample. These are CDK4, DCR2, Dec1, H-Ras and RAR- $\beta$ .

---

5. Based on the coincidence in the same sample of a low expression of the cell proliferation factor ki-67 and a high expression of the CDK inhibitor p16, we cannot determine that no sample is in senescence.

6. We found a strong positive correlation of maspin with pRB, p21 and p15 in potentially malignizables lesions.

7. In the cluster analysis, maspin was the only protein with an increased presence in the potentially malignizables lesions and a significantly decreased presence in carcinomas. Therefore this is the protein which shows clear differences in expression in all the analysis.

8. Thus, it would be interesting to study the maspin protein as a representative marker of senescent protection against oral cancer through studies with a longitudinal design and larger sample sizes.

## **INTRODUCCIÓN**

---

## CARACTERÍSTICAS Y EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) representa el 4% de todos los tumores humanos, con 263000 nuevos casos al año. Para el 2015, los cálculos de la Sociedad Americana Contra el Cáncer para el cáncer de orofaringe y cavidad oral en Estados Unidos son de una prevalencia de alrededor de 39500 casos, con una mortalidad de 7500 personas. Estos cánceres ocurren más del doble en hombres que en mujeres, siendo similar en personas de raza blanca o negra (American Cancer Society). El carcinoma oral de células escamosas es uno de los cánceres malignos más frecuentes de la cavidad oral, constituyendo el 92,8% de todos los procesos malignos orales. Tras el tratamiento inicial con cirugía y/o radioterapia, la recurrencia o metástasis ocurre en más del 50% de los casos, y en un 80%, en menos de 2 años. (Lo Muzio y cols 2007). A pesar de los avances en los métodos diagnósticos y terapéuticos en los últimos 20 años, este tumor todavía se caracteriza por una elevada tasa de mortalidad.

Hasta la fecha, los principales marcadores pronósticos son: la clasificación TNM, la localización y la histopatología (Lo Muzio y cols 2007). Sin embargo, ninguna de estas modalidades supone un marcador fiable y determinante para valorar el pronóstico y futura respuesta al tratamiento del carcinoma oral. Es por ello que las investigaciones actuales se centran en descubrir nuevos marcadores moleculares que nos puedan proporcionar una mayor predictibilidad en lo relacionado con el manejo del COCE.

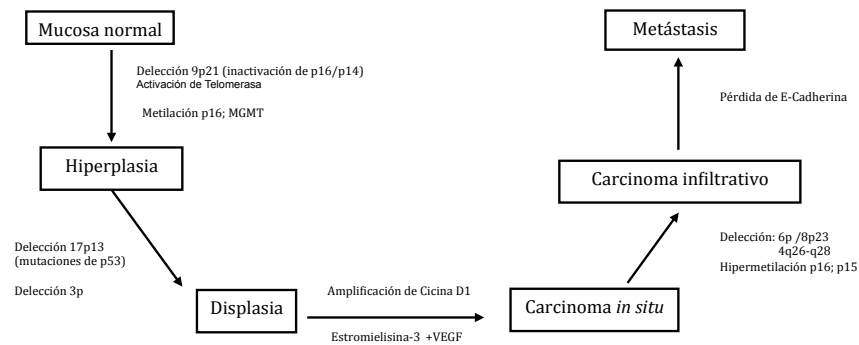
Para la mayoría de los odontólogos y estomatólogos, la inspección visual es el método principal para la detección de posibles lesiones precancerosas o cancerosas (Ziober y cols 2008). Varios estudios han demostrado que puede reducir la mortalidad en pacientes de alto riesgo (consumidores de tabaco y alcohol) (Ziober y cols 2008; Sankaranarayanan y cols 2005; Weinberg y cols 2002). Sin embargo, la inspección visual permite identificar solamente aquellas lesiones ya establecidas, pero no determinar el grado de displasia, el estadio tumoral o si una lesión potencialmente malignizable evolucionará a carcinoma o no (Ziober y cols 2008). Por todo ello, es necesario establecer un sistema de evaluación más efectivo para este tipo de lesiones (Massano y cols 2006). La posibilidad de intervenir antes de llegar a estadios avanzados podría mejorar los resultados del tratamiento (Sudbo y cols 2005).

Estos procesos malignos van en ocasiones precedidos de lesiones potencialmente malignas (pre malignas) como la leucoplasia y la eritroplasia oral. De los datos epidemiológicos bien documentados de los últimos 30 años en diferentes países, la prevalencia de leucoplasia oral varía entre un 1,1% y 11,7%, con un valor medio de 2,9%. En pacientes fumadores la prevalencia de leucoplasia oscila entre un 3,7% y 60,3%. Hasta un 10% de los pacientes con leucoplasia tienen un carcinoma invasivo en la lesión (Femiano y cols 2005). La prevención de la malignización de las leucoplasias se hace indispensable teniendo en cuenta la baja supervivencia del cáncer oral sobre leucoplasias (sólo del 30 al 40% de los pacientes permanecen vivos a los 5 años después del diagnóstico) (American Cancer Society).

Está ampliamente aceptado que la carcinogénesis oral es un proceso molecular muy complejo, con múltiples pasos en los que se va acumulando el daño genético, lo que conlleva una alteración celular y de las señales citoplasmáticas que afectan el ciclo celular y la reparación

del ADN (Bettendorf y cols 2004). Diversos estudios moleculares han referido que se requieren de 6 a 10 alteraciones genéticas para que se produzca una transformación maligna de la célula epitelial de la mucosa oral (Califano y cols 1996; Todd y cols 2002) (**figura 1**).

**Figura 1. Secuencia de alteraciones genéticas implicadas en la transformación maligna de la mucosa sana. (Modificado de Califano y cols 1996)**



Cambios carcinogénicos en el ADN tales como mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones, amplificaciones y metilaciones alteran los transcritos del ARN mensajero (ARNm) de los genes afectados. Estos ARNm afectados pueden mutar, perderse o aumentar. Como consecuencia de los cambios en el ARNm, también se ven afectados sus productos proteicos celulares. Las proteínas celulares de la célula cancerosa pueden expresarse intracelularmente, en la superficie celular o ser secretadas al espacio intercelular, de forma aumentada o disminuida (Ziober y cols 2008).

### Concepto y significado de la displasia epitelial

Se habla de displasia epitelial ante la presencia microscópica de una combinación variable de fenómenos indicativos de un desorden de la maduración epitelial y de una alteración de la proliferación celular. Aunque no existen parámetros consensuados para su determinación objetiva, la valoración del grado de displasia constituye aún la mejor aproximación diagnóstica en la valoración de la capacidad de malignización de las lesiones potencialmente malignizables (Aguirre-Echevarría y Aguirre-Urizar 2008).

Quizá la clasificación del grado de displasia más aceptada actualmente es la descrita por Van der Waal y Axell en 2002, que actualizan en 2009 (van der Waal y cols 2009). En su publicación redefinieron los criterios clínicos e histopatológicos relacionados con la leucoplasia oral. Estos autores propusieron diferenciar sólo dos situaciones: un grado 0 (OIN 0) para los casos sin displasia o con displasia leve; y un grado 1 (OIN1/2) para los casos de displasia epitelial moderada pero no severa. A la displasia severa la consideran sinónima e imposible de diferenciar del carcinoma in situ, y por lo tanto maligna.

La OMS, en cambio, propone cinco situaciones histológicas de displasia de la mucosa oral: hiperplasia de células escamosas, displasia leve, displasia moderada, displasia severa y carcinoma in situ.

Con la intención de encontrar una clasificación más objetiva, se están llevando a cabo estudios inmunohistoquímicos y moleculares que tratan de encontrar marcadores que puedan sustituir, confirmar o predecir la valoración de la displasia epitelial.

### **CARCINOGENÉISIS Y MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO CELULAR**

La carcinogénesis es el mecanismo por el que se producen las transformaciones necesarias para el inicio y desarrollo de un tumor. El proceso comienza a partir de un daño en el material genético celular, que conduce a una alteración de las funciones de los oncogenes y de los genes supresores de tumores, ocasionando células tumorales. Éstas, son el resultado de alteraciones en los circuitos que regulan la proliferación y la homeostasis de las células (Hanahan y Weinberg 2000; Scully y cols 2000 a, b, c) y van a expresar un fenotipo celular que se va a caracterizar por presentar: un aumento de proliferación celular, una pérdida de cohesión entre las células y una mayor capacidad de infiltrar tejidos y de metástasis. La adquisición del fenotipo inmortal es un acontecimiento temprano en el desarrollo del cáncer oral (McGregor y cols 2002). De hecho, la mitad de las células con displasia ya lo presentan.

Existen 6 modificaciones típicas en la fisiología celular que se dan en la patología tumoral (Hanahan y Weinberg 2000):

- Autosuficiencia de las señales de crecimiento
- Insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento
- Evasión de la apoptosis
- Potencial replicativo ilimitado
- Habilidad para promover la angiogénesis
- Capacidad de invasión y metástasis

Una vez se ha producido el daño a nivel genómico, existen dos mecanismos celulares para impedir la proliferación de células con riesgo de transformación maligna. Éstos mecanismos de reparación del daño genómico son la apoptosis y la senescencia replicativa. Las células humanas normales suelen seguir la vía de la senescencia (McGregor y cols 2002).

## APOPTOSIS Y CÁNCER

La apoptosis es la “muerte celular programada”. Normalmente, la destrucción de las células dañadas mediante apoptosis detiene el crecimiento celular, jugando un importante papel en la respuesta eficaz frente a la terapia antitumoral. Por el contrario, el mal funcionamiento del mecanismo apoptótico contribuye a la inmortalidad de las células en replicación y favorece la acumulación secuencial de alteraciones genéticas (Lo Muzio y cols 2007). La apoptosis se puede ver inhibida por proteínas de la familia de la Bcl-2 o IAP (proteína inhibidora de la apoptosis) (Feng y cols 2007).

Los estímulos que conducen a la apoptosis pueden ser de tipo extracelular (citoquinas, radiaciones, falta de señal hormonal) o intracelular (mitosis incompleta, aumento de especies reactivas de oxígeno, aumento del calcio citoplasmático, daño irreparable del ADN). Ambas vías producen la activación de la cascada de las caspasas, que conllevan la hidrólisis de proteínas estructurales y reparadoras del ADN y la activación de enzimas hidrolíticas (Rodier y cols 2007; Feng y cols 2007).

El mecanismo apoptótico es necesario para varios fenómenos (McGregor y cols 2002), como son:

- El desarrollo de órganos y sistemas, para lo que es necesaria la creación de unas células y la destrucción de otras, así como el remodelamiento embrionario.
- El mantenimiento de la homeostasis celular (es de especial importancia la regulación del número de células derivadas de la médula ósea y del aparato digestivo).
- La defensa frente a patógenos y tumores.

Por eso, cuando se altera este mecanismo, pueden ocurrir malformaciones, defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas o la aparición de tumores.

## CÁNCER Y CICLO CELULAR

El conjunto de acontecimientos que precede la división celular se denominan mitosis, y el periodo de tiempo entre una mitosis y la siguiente es la interfase, en la que la célula sólo experimenta un aumento de tamaño.

Se entiende por ciclo celular la secuencia de procesos por los que una célula duplica su contenido y se divide en dos. Clásicamente se distinguen cuatro fases, dos de ellas funcionales (S y M), y dos preparatorias (G1 y G2) (**figura 2**):

Figura 2. Fases del ciclo celular



Fase G<sub>1</sub>: La célula dobla su tamaño y su masa.

Fase S: Fase de síntesis o replicación del ADN. Cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas (dos moléculas de ADN de doble cadena), para que al dividirse en dos células hijas, éstas sean diploides.

Fase G<sub>2</sub>: Es el periodo entre la finalización de la replicación del ADN y el inicio de la división celular.

Fase M: Es la fase de mitosis o división celular en dos. Se compone de cinco etapas:

- La profase, en la cual los cromosomas replicados se condensan y el huso mitótico comienza a formarse fuera de la membrana nuclear.
- La prometafase, que se caracteriza por la desaparición de dicha membrana.
- La metafase, en la que los cromosomas se colocan en el ecuador del huso mitótico formando la placa mitótica.
- La anafase, en la que las dos cromátidas hijas se separan y emigran hacia polos opuestos de la célula guiadas por los microtúbulos que componen el huso mitótico.

- e. La telofase, que es el final de la mitosis. En ella se forma una membrana nuclear alrededor de cada grupo cromosómico resultante de la anafase.

Estas cinco etapas junto con la citocinesis o división citoplásmica forman la fase M del ciclo celular.

La duración del ciclo celular varía según el tipo histológico.

En la fase G<sub>0</sub>, o fase de reposo, a la que se accede desde G<sub>1</sub>, las células se mantienen metabólicamente activas pero no se dividen.

El primer signo visible de que una célula está a punto de entrar en mitosis es la condensación de los cromosomas en el núcleo.

El sistema de control del ciclo celular se encarga de la activación de sistemas enzimáticos y otras proteínas que hacen que cada proceso se dé en su justo momento, de igual manera, los desactiva una vez que se ha completado, asegurando que no comience una fase sin haber finalizado la anterior. Dentro del sistema de control se deben tener en cuenta las condiciones internas de la célula así como señales extracelulares que en ocasiones provienen de otras células vecinas. El conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo del ciclo celular ha avanzado de un modo espectacular en los últimos quince años. Si fallan los mecanismos de control del ciclo celular, se pueden ocasionar neoplasias.

Actualmente están definidos tres puntos de control del ciclo celular:

- 1) Control R: Al final de la fase G<sub>1</sub>. En él se verifica que la célula reciba el estímulo de factores de crecimiento necesarios para la activación del ciclo, que no haya defectos en el ADN que podrían transmitirse a las células hijas y que su tamaño es el adecuado antes de que comience la fase S.
- 2) Control 2: En la fase G<sub>2</sub>. Aquí se comprueba si la replicación del ADN se ha completado y si el tamaño celular es el adecuado para que comience la mitosis.
- 3) Control M: En la metafase de la fase de mitosis. Se asegura de que los cromosomas estén alineados sobre el huso.

## SENESCENCIA Y CÁNCER ORAL

### ¿Qué es la senescencia?

El término senescencia se aplicó por primera vez al fenómeno que provocaba la detención irreversible de la proliferación celular bajo condiciones no fisiológicas e in vitro (Hayflick y Moorhead 1961). Actualmente, el concepto se aplica de manera general a la detención irreversible de la proliferación celular debida a diferentes causas de estrés celular.

Algunas de estas causas de estrés son las responsables de la transformación maligna de las células. Por lo tanto, la senescencia celular podría actuar como una barrera frente a la

progresión a la malignidad en aquellas células que hayan sufrido un daño o estrés suficiente como para alterar su ciclo celular, pero insuficiente como para provocar su suicidio o apoptosis.

Se ha descrito que el proceso de la carcinogénesis comprende una serie de cambios que finalmente permiten a las células tumorales evadir el fenómeno senescente (Campisi 2000; Rodier y cols 2007; Ben-Porath y cols 2005; Collado y cols 2005). Varios autores han encontrado células senescentes en lesiones premalignas de pulmón, páncreas y piel, y sin embargo no se han observado en carcinomas de tales tejidos. Parece que cuando una célula pierde su respuesta senescente pasa de un estado benigno (lesión potencialmente malignizable) a un estadio de malignidad (carcinoma) (Campisi 2005; Campo-Trapero y cols 2008). Sin embargo, la complejidad del proceso carcinogénico no parece indicar que esto se produzca como un proceso causa-efecto, sino como una expresión más de la carcinogénesis (Collado y cols 2005).

Aún así, las células tumorales aún mantendrían la capacidad para entrar en senescencia bajo determinadas condiciones. Por lo tanto, los tratamientos anticancerosos activarían las vías de señalización del daño celular, que inducirían la apoptosis o la senescencia, según la magnitud de este daño (Larsson 2011).

Las células de la cavidad oral tienen una vida replicativa limitada (Campisi 1997). El proceso que limita este potencial replicativo de las células se conoce como senescencia celular o replicativa. Se ha visto que sólo tres tipos celulares escapan a la senescencia replicativa. Estos son: algunas células madre, toda la línea germinal y muchas células tumorales malignas (Campisi 1997).

### **Características de las células senescentes**

#### *¿Qué células pueden volverse senescentes?*

La mayoría de las células que pueden dividirse, incluidas algunas células tumorales, pueden entrar en senescencia. La excepción serían, posiblemente, las células madre embrionarias (Miura y cols 2004; Rodier y Campisi 2011).

#### *¿Qué características especiales presentan las células senescentes?*

Las células senescentes difieren de sus predecesoras en varios aspectos, aunque ninguna de sus características es específica de ellas de manera exclusiva, y no todas muestran todas las características. Las descritas hasta ahora son:

- 1) El cese replicativo es definitivo y no puede ser estimulada para volver a entrar en el ciclo celular por mitógenos fisiológicos; es decir, que presentan una falta de respuesta a los factores de crecimiento (Hayflick y Moorehead 1961). Aunque algunas células que no expresan p16INK4a pueden retomar la replicación celular si se les inactiva el supresor tumoral p53 (Beauséjour y cols 2003).

- 2) Son resistentes a las señales apoptóticas.
- 3) Mantienen su actividad metabólica.
- 4) Adquieren funciones alteradas (Rayess y cols 2012; Campisi, 2000) (**tabla 1**).

**Tabla 1. Funciones alteradas de la célula senescente**

<b>FUNCIONES ALTERADAS DE LA CÉLULA SENESCENTE (Rayess y cols 2012)</b>
Agregación proteínica en el retículo endoplasmático
Disfunción de las mitocondrias y los lisosomas
Diminución de la producción de calnexina (proteína responsable de la glicosilación del retículo endoplasmático)
Aumento del calcio citoplasmático (que altera el retículo endoplasmático, responsable de su almacenamiento)
Aumento de los niveles de radicales libres (que dañan las mitocondrias)
Disminución de la autofagia celular (cuyo papel es la degradación de los orgánulos disfuncionales)
Acumulación de lipofuscina en los lisosomas (que inhibe la degradación de proteínas)
Aumento del nivel de beta-galactosidasa lisosomal

5) Sufren 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* son indistinguibles, a diferencia de que nunca observaremos ninguna de ellas en proceso de mitosis (Hayflick 1965).

6) Expresan Beta-galactosidasa asociada a senescencia. Esto representa un aumento en la masa lisosomal (Rayess y cols 2012; Lee y cols 2006; Dimri y cols 1995).

7) Expresan p16INK4a, un supresor tumoral que activa a su vez al supresor tumoral pRb, que forma foci de heterocromatina (Shi y cols 2013); y estos, silencian genes pro-proliferativos (Narita y cols 2003).

8) Adquisición del fenotipo secretor asociado a senescencia. Las células senescentes secretan factores de crecimiento, proteasas, citoquinas y otros factores con actividad autocrina y paracrina (Chandler y Peters 2013; Brondello y cols 2012; Coppé y cols 2010; Kuilman y cols 2008; Acosta y cols 2008).

9) Foci nuclear con daños en el ADN. Incluye telómeros disfuncionales (Herbig y cols 2004; Kim y cols 2004).

10) Foci nuclear con heterocromatina.

### Causas de senescencia

El mecanismo por el que una célula adquiere un fenotipo senescente no es del todo conocido, aunque se sabe que influye el acortamiento crítico de alguno de sus telómeros (Ben-Porath y

cols 2004). Ciertos tipos de daños en el ADN, así como señales mitogénicas inapropiadas pueden conducir también al fenotipo senescente (Campisi 2000; Chen y cols 1994; Venable y cols 1995; Serrano y cols 1997; Robles y cols 1998; Daynes y cols 2003).

Las células humanas están expuestas a varios tipos de estrés que pueden ocasionar su muerte o bien su transformación maligna (Hanahan y Weinberg 2000). Se estima que cada gen está mutado una vez por cada 20000 células (Serrano 2010).

Como se ha explicado anteriormente, las células tienen diferentes mecanismos para reparar el daño sufrido. Éstos incluyen: la apoptosis y, según hallazgos relativamente recientes, también la senescencia (Serrano 2010).

La senescencia celular puede ser desencadenada por diferentes clases de estrés de origen extrínseco o intrínseco (Prieur y Peeper 2008).

Tipos de estrés que pueden desencadenar senescencia:

### **Estrés espontáneo:**

- Disfunción de los telómeros (Prieur y Peeper 2008)
- Activación de oncogenes (Prieur y Peeper 2008)
- Inactivación de genes supresores tumorales (Prieur y Peeper 2008)
- Daño oxidativo (Serrano 2010)
- Daño del ADN (Serrano 2010)
- Cultivo celular (Hayflick y Moorhead 1961) (Collado y Serrano 2006)

### **Estrés inducido:**

- Fármacos quimioterapéuticos citotóxicos (como doxorubicino o cisplatino, que afectan la estructura del ADN; o taxol o vincristino, que afecta los microtúbulos) (Collado y Serrano 2006) (Shay y Roninson 2004)
- Radioterapia (Shay y Roninson 2004)
- Ablación hormonal (Shay y Roninson 2004)

Actualmente se considera que la respuesta senescente se desencadena por una combinación de al menos tres mecanismos:

- Acortamiento de los telómeros
- Sobrerregulación del locus CDKN2A (codifica INK4A y ARF)
- Acumulación de daño celular

La contribución relativa de estos mecanismos a la senescencia depende tanto de las condiciones de cultivo como del tipo celular.

Tales eventos culminan en la activación de una red de genes supresores tumorales (Prieur y Peeper 2008).

Se ha visto, en estudios con animales, que las células senescentes pueden ser eliminadas por células fagocíticas de manera similar a lo que ocurre con las células apoptóticas, contribuyendo de esta manera también a la detención de la evolución del tumor (Serrano 2010).

### **Senescencia y envejecimiento**

Muchos autores han defendido el papel de la senescencia como proceso responsable del envejecimiento celular (Schmidt 1999; Gruber y cols 2007). Parece que las células senescentes se acumulan con la edad en los tejidos humanos (Campisi 2000; Rayess y cols 2012; Krishnamurthy y cols 2004); y pueden incluso favorecer los fenotipos cancerosos (Golomb y cols 2015; Rodier y cols 2007; Ben-Porath y cols 2005; Kang y cols 2005). Algunos autores opinan que el envejecimiento es uno de los principales factores para la transformación maligna, tanto por la acumulación de células senescentes como por el aumento de la inflamación con la edad (Golomb y cols 2015).

CONSECUENCIAS DEL ENVEJECIMIENTO (Golomb y cols 2015):

- Aumento de los mediadores pro-inflamatorios
- Respuesta anti-inflamatoria más potente, con aumento de IL4/IL10 hacia una respuesta Th2.
- Menor capacidad de regeneración o reparación tisular
- Mayor acumulación de células senescentes
- Mayor progresión tumoral

El regulador del ciclo celular p16 se considera uno de los mejores biomarcadores de envejecimiento, ya que está suprimido en la embriogénesis temprana y se va induciendo progresivamente con la edad (Martin y cols 2014).

### **Senescencia y tabaco**

Algunos autores han descrito que el tabaco puede inhibir la senescencia de las células afectadas, favoreciendo de esta manera su transformación maligna. Zhang describió que el tabaco inhibía la senescencia inducida en queratinocitos orales humanos en cultivo (Zhang y cols 2007). Sin embargo, otros autores hallaron, sobre el mismo modelo de estudio, que la areca estimulaba la detención de las células en la fase G1 del ciclo celular, así como fenotipos senescentes (Lu y cols 2006).

### **Senescencia e inflamación**

Se ha postulado que ya que el fenotipo senescente también se caracteriza por la secreción de factores proinflamatorios, puede que exista alguna relación entre la inflamación de los tejidos y la senescencia (Xue y cols 2007; Ventura y cols 2007).

Además, ya se ha explicado el papel de las células del sistema inmune en la eliminación de las células senescentes, con la consecuente resolución del tumor. Aunque, por otro lado, la progresión tumoral también se asocia a un aumento de la inflamación y su consecuente acumulación de células del sistema inmune (linfocitos T, macrófagos y mastocitos), así como a una senescencia celular excesiva (Golomb y cols 2015).

### Niveles de expresión de los oncogenes

Para que se desencadene la senescencia inducida por oncogenes no es suficiente con la expresión de uno o varios de los oncogenes involucrados en el desarrollo tumoral, sino que éstos deben estar sobreexpresados muy por encima de sus niveles endógenos normales. De la misma manera, niveles de expresión endógenos de un oncogén son extremadamente ineficaces para la generación de un tumor (Collado y Serrano 2006).

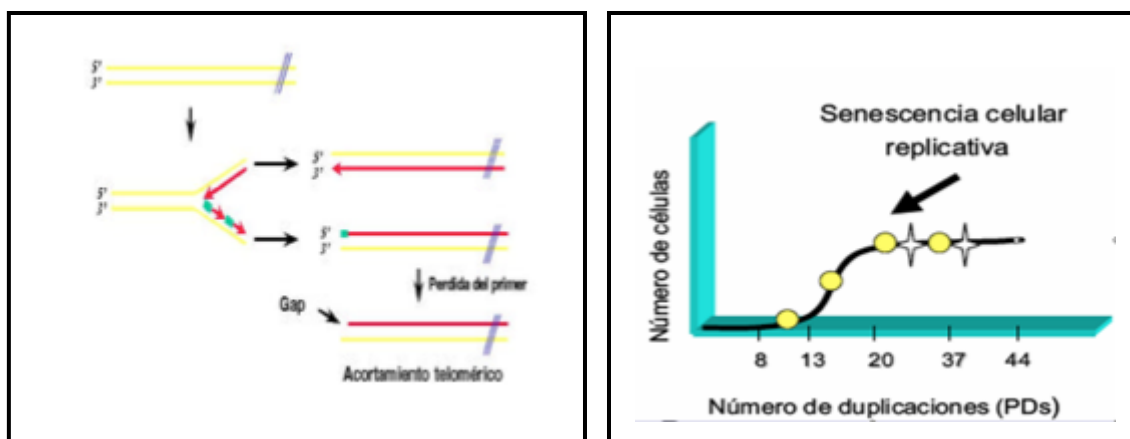
Por ejemplo, la inducción de senescencia por K-RAS oncogénico estudiada in vitro ocurre sólo si éste está sobreexpresado, pero no así si se expresa a su nivel habitual.

### Tipos de senescencia:

#### a) Senescencia replicativa:

Este fenómeno fue descrito por primera vez por Hayflick y Moorhead en 1961 (Hayflick y Moorhead 1961). Estos autores encontraron que, a diferencia de las células cancerosas, las células normales tienen una capacidad proliferativa limitada que finaliza con la detección estable del ciclo celular. Hayflick describió que los fibroblastos que cultivaba in vitro dejaban de dividirse tras un número determinado de divisiones celulares, lo que se llamó el “límite Hayflick”. Este número oscilaba entre 50 y 100 duplicaciones, y se reducía a medida que la edad del donante aumentaba. (Figura 3).

Figura 3. Límite Hayflick

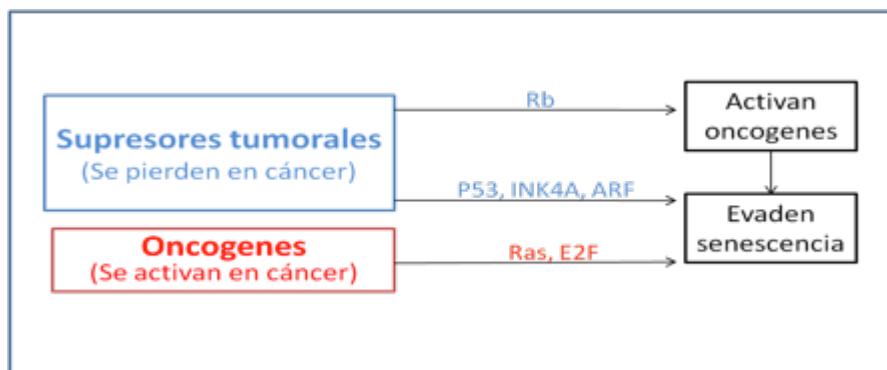


Después se encontró que este cese replicativo era consecuencia del acortamiento progresivo de los telómeros que se produce tras cada división celular (Collado y cols 2007) (Shay y Wright 2000). Cuando los telómeros se acortan hasta alcanzar una longitud mínima crítica, se desencadena una “respuesta al daño del ADN”. Éste ocasionaría su disfunción y cese replicativo.

b) Senescencia inducida por oncogenes (SIO):

La senescencia es prevalente en las lesiones premalignas, y la progresión a la malignidad requiere la evasión de la senescencia. Sin embargo, los tumores malignos pueden reentrar en senescencia por el restablecimiento de la función de genes supresores tumorales o por la inactivación de oncogenes (Collado y Serrano 2010). También la quimioterapia estándar puede inducir senescencia (Collado y Serrano 2010) (**figura 4**).

**Figura 4. Mecanismos de evasión de senescencia en cáncer**



Muchos estudios han confirmado que la SIO previene la transformación oncogénica de las células in vitro. Sin embargo, se ha debatido mucho sobre si existe correlación in vivo. Evidencia reciente indica que la SIO in vivo corresponde a un mecanismo protector principal contra el cáncer (Priour y Peeper 2008).

La carcinogénesis puede dividirse en tres etapas principales (Serrano 2010):

- 1ª) Etapa pretumoral (proliferación inicial de células portadores de oncogenes)
- 2ª) Etapa premaligna (formación de un tumor no invasivo)
- 3ª) Etapa maligna (formación de un tumor localmente invasivo y metastásico)

La mayoría de las células tumorales entran en senescencia en la etapa premaligna, donde las señales inductoras de senescencia alcanzan suficiente intensidad para ser efectivas (Serrano 2010). Sin embargo, algunos autores (Campaner y cols 2010; Lin y cols 2010), han demostrado en modelo animal que es posible adelantar el punto crítico que desencadena la senescencia a la etapa pretumoral.

## **Evolución en la investigación de la SIO a lo largo del tiempo**

1961: Descripción de la senescencia replicativa por Hayflick y Moorhead, en fibroblastos en cultivo (Hayflick y Moorhead 1961). Primera vez que se describe la senescencia celular.

1997: Sobreexpresión de HRAS<sup>G12V</sup> en SIO: En la descripción original, en 1997, de células animales y humanas que habían sufrido Senescencia Inducida por Oncogenes (SIO) en cultivo, se observó la sobreexpresión de Ras oncogénico (HRAS<sup>G12V</sup>), proponiendo a la senescencia como mecanismo supresor tumoral (Serrano y cols 1997). Primera vez que se describe la senescencia inducida por oncogenes *in vitro*.

2005: Primeros hallazgos sobre la existencia de senescencia asociada a estadios premalignos en modelo animal y humano (Braig y cols 2005; Chen y cols 2005; Collado y cols 2005; Lazzerini Denchi y cols 2005; Michaloglou y cols 2005). Las primeras identificaciones de células senescentes se obtuvieron de lesiones premalignas (adenomas de pulmón, neoplasias intraductales pancreáticas o PIN y nevus melanocíticos). Por el contrario, no existían células senescentes en sus correspondientes tumores malignos (adenocarcinomas de pulmón, adenocarcinomas pancreáticos y melanomas, respectivamente) (Chen y cols 2005, Collado y cols 2005; Michaloglou y cols 2005; Gray-Schopfer y cols 2006). Se observó que la pérdida de marcadores senescentes (genes supresores tumorales) coincidía con la progresión maligna (Chen y cols 2005; Braig y cols 2005).

2006: Demostración del papel de la respuesta al daño del ADN en la senescencia inducida por oncogenes (Di Micco y cols 2006; Bartkova y cols 2006).

2007: Se emplea ingeniería genética para restaurar la función de un supresor tumoral perdido en cáncer, en modelo animal, con la consecuente resolución del tumor por senescencia (Ventura y cols 2007).

2007: Eliminación artificial de un oncogén para resolver el tumor por senescencia. Se demuestra también en modelo animal (Wu y cols 2007).

2007: Identificación de células del sistema inmune como las encargadas de la resolución del tumor al eliminar las células senescentes por fagocitosis (Ventura y cols 2007; Xue y cols 2007).

2008: Importancia del papel de la red de citoquinas en la inducción de la senescencia (Acosta y cols 2008; Kuilman y cols 2008).

2008: Se confirma que la senescencia también puede tener un papel pro-carcinogénico (Krtolica y cols 2001; Coppé y cols 2008).

2009: Se demuestra que el daño persistente del ADN es el responsable de la secreción de las citoquinas inflamatorias asociadas a senescencia (Rodier y cols 2009)

2009: En desarrollo la creación de fármacos basados en la resolución artificial del supresor tumoral p53 para desencadenar senescencia como terapia anticáncer (Brown y cols 2009).

2015: En desarrollo el uso de la senescencia inducida terapéuticamente como herramienta en el tratamiento del cáncer (Lee y Lee 2014).

## Senescencia y tratamiento anticáncer

Se ha comprobado que varias de las terapias utilizadas actualmente para el tratamiento del cáncer producen, entre otros mecanismos, la senescencia de las células tumorales (Shay y Roninson 2004; Wang y cols 1998; Michishita y cols 1999; Park y cols 2000; Suzuki y cols 2001; Elmore y cols 2002; Han y cols 2002; Haq y cols 2002; te Poele y cols 2002).

- Agentes terapéuticos que producen senescencia:

Cabe destacar que los agentes terapéuticos que producen una mayor respuesta senescente son aquellos que actúan modificando la estructura del ADN, como el doxorubicino, aphidicloro, cisplatino, radiación ionizante, cytarabina y etoposido. Lo hacen de manera más débil los que afectan a los microtúbulos, como el taxol o vincristina (Shay y Roninson 2004). También desencadenan senescencia el TGF- $\beta$  (Shay y Roninson 2004; Katakura y cols 1999), los antiestrógenos (Shay y Roninson 2004; Christov y cols, 2003), y los “agentes diferenciadores”, que incluyen el butirato de sodio (Shay y Roninson 2004; Terao y cols 2001) y los retinoides.

- Estrategias basadas en restaurar genes supresores tumorales:

En estudios experimentales en animales, ya se ha estudiado la eficacia antitumoral de restaurar el supresor tumoral p53 una vez perdido. Se observó que la mayoría de los carcinomas que se desarrollaron en ausencia de p53 desaparecían al restaurar p53, asociados a una respuesta senescente y una eficaz eliminación de estas células por el sistema inmune (justificado mediante la presencia de neutrófilos, macrófagos y natural killers) (Collado y Serrano 2010; Ventura y cols 2007, Xue y cols 2007, Brown y cols 2009). Además, es importante señalar que la respuesta senescente o apoptótica, según los casos, era selectiva con las células tumorales, sin involucrar a las células sanas.

- Estrategias basadas en inactivar oncogenes:

Otra aproximación posible para desencadenar senescencia en tumores sería, en lugar de restaurar la función de supresores tumorales inactivados o perdidos, la inactivación de oncogenes que estén sobreexpresados en cáncer. Esto se llevó a cabo también en modelo animal y con el oncogen Myc. Se observó que al eliminar la expresión del oncogén Myc, responsable en estos casos del inicio tumoral, se resolvía el carcinoma a través de una respuesta senescente (Collado y Serrano 2010; Wu y cols 2007). Cabe destacar que la inactivación de oncogenes puede desencadenar senescencia incluso cuando el oncogén silenciado no es el responsable del inicio del tumor (Soucek y cols 2008).

- Quimioterapia como inductora de senescencia:

Hasta ahora se pensaba que la quimioterapia actuaba produciendo apoptosis en las células sobre las que se la dirigía. Los problemas más graves con los que se encontraban los oncólogos eran tanto la toxicidad que producía la quimioterapia en las células sanas, como la falta de eficacia en las células tumorales que desarrollaban alteraciones a favor de su supervivencia.

Los fármacos desencadenantes de senescencia podrían suponer una solución a estos dos problemas ya que actuarían mediante un mecanismo menos agresivo para la célula que su suicidio, y además, según algunos estudios (Ventura y cols 2007), sería selectivo para las células cancerosas, disminuyéndose así su toxicidad.

### **Inconvenientes de la senescencia**

La senescencia forma parte de cuatro procesos biológicos principales: la supresión tumoral, la promoción tumoral, aunque parezca contradictorio, la reparación tisular, y la inflamación asociada al envejecimiento (Rodier y Campisi 2011).

Es importante resaltar que, aunque la senescencia suponga una barrera para la progresión tumoral, las células senescentes se encuentran en un estado de latencia desde el que pueden volver a sufrir transformación maligna si no son eliminadas por el sistema inmune.

Además, el fenotipo senescente se caracteriza por la secreción de numerosas citoquinas inflamatorias, quimioquinas y enzimas remodeladoras tisulares. Se ha descrito que algunas de ellas podrían estimular a células tumorales malignas cercanas (Collado y Serrano 2010). En referencia a este punto, Krtolica y Chang describen que las células senescentes secretan factores que pueden estimular la proliferación y progresión maligna de las células vecinas (Krtolica y cols 2001; Chang y cols 2002). Entre ellos estarían proteínas con actividades paracrinas de tipo antiapoptótico, mitogénico y angiogénico (Chang y cols 2002; Nickoloff y cols 2004). Por lo tanto, es posible que la presencia prolongada de células senescentes pueda favorecer el desarrollo de células tumorales a partir de lesiones benignas (Rodier y cols 2007).

Por otra parte, existen mecanismos redundantes que conducen a la senescencia celular, no sólo uno, lo que dificulta su estudio y comprensión.

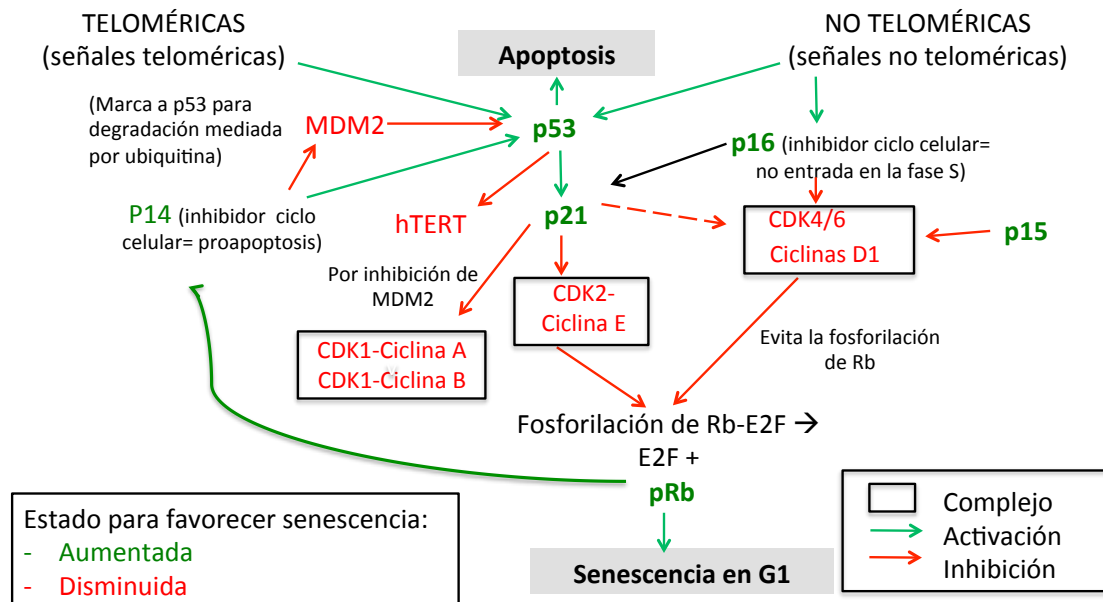
### **Vías y marcadores de senescencia**

Actualmente se conocen dos vías que conducen a la SIO, la ruta ARF/p53/p21 y la ruta p16/Rb/E2F, además de una tercera vía menos conocida a través de los receptores del ácido retinoico (Nickoloff y cols 2004) (**Figura 5**). No se sabe por qué hay células que cuando sufren un estrés oncogénico siempre acaban en apoptosis (por ejemplo, células hematopoyéticas y células del tracto digestivo) siguiendo la ruta ARF/p53/PUMA y otras acaban en senescencia siguiendo alguna de las dos vías que inducen la respuesta senescente (Nickoloff y cols 2004).

La proteína p53 es capaz de detener el ciclo celular en respuesta a lesiones del ADN para establecer los mecanismos necesarios para su reparación, y en caso de lesiones irreparables del ADN, p53 induce apoptosis. Hay 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 es así porque esas células han entrado en senescencia a través de

la vía p16-pRb, que es una vía irreversible para la célula aunque exista inactivación de p53, pRb o ambas (Campisi 2005).

Figura 5. Esquema de las dos principales vías de senescencia.



Vía de p53-ARF: p53 es un mediador crucial de las respuestas celulares a daños en el ADN, incluyendo también la respuesta senescente, ya que la pérdida de la función p53 retrasa la senescencia replicativa de células humanas. Los telómeros disfuncionales también activan muchos componentes de la respuesta mediada por p53, y la respuesta senescente a los telómeros disfuncionales requiere de la integridad de esta vía. Las ROS (*Reactive Oxygen Species*) incluyen iones de oxígeno y radicales libre, provocando efectos mutagénicos en la vía RAS y también inducen la senescencia celular (Todd y cols 2002; Lee y cols 1999).

Vía de p16-pRb: Aunque la inactivación de p53 revierte el arresto celular en algunas células, fracasa en otras y esto es porque se ha visto que esas células expresan p16, que es un inhibidor del ciclo celular y un regulador positivo de pRb. p16 es inducido por una gran variedad de estímulos estresantes, incluida la sobreexpresión de oncogenes como RAS. p16 impide la reversibilidad de la senescencia por inactivación de p53. Así pues, este supresor de tumores (p16) y presumiblemente la vía pRb que activa, proporciona una formidable barrera a la proliferación celular, que no puede ser derrotada por la pérdida de la función de p53 (Guerra y cols 2011; Campisi 2005; Todd y cols 2002).

Según su función, aparecen en verde las proteínas cuya expresión aumentada favorecería la senescencia, y en rojo aquellas cuya expresión disminuida favorecería la senescencia. Las flechas verdes significan que activan a la proteína a la que se dirigen; y las rojas, que inhiben a la proteína.

Destacan como marcadores potenciales de senescencia en las lesiones precancerosas a nivel oral los siguientes: **p53, p16, p14, p15, p21, DCR2, E2F, actina, maspina, ciclina D1, Rb, RAR, MDM2, hTERT, DEC1, CDK 4, CDK 6 y beta-galactosidasa** (Campo-Trapero y cols 2008; Itahana y cols 2007; Todd y cols 2002). Algunos de ellos están bajo estudio (**Tabla 2**):

**Tabla 2. Marcadores actuales de senescencia celular más relacionados con cáncer y precáncer oral. (Tomada de Campo-Trapero y cols 2008)**

<b>Marcador</b>	<b>Descripción/ efecto</b>	<b>Bibliografía</b>
<b>SA-<math>\beta</math>-Gal</b>	Enzima expresada en células senescentes.	Braig, 2005 Collado, 2005 Collado, 2006
<b>SAHFs</b>	Alteración de cromatina relacionada con irreversibilidad de senescencia	Narita, 2003 Braig, 2005
<b>p14<sup>ARF</sup></b>	Inhibidor de la MDM2 y por tanto activador de p53. (denominada p19 <sup>ARF</sup> en ratones)	Collado, 2005
<b>p16<sup>INK4a</sup></b>	Inhibidor de CDK 4 y CDK 6 y por tanto evita la fosforilación de pRb.	Campisi, 2005 Collado, 2005 Braig, 2005
<b>Ciclina D<sub>1</sub> (gen CCND1)</b>	Activador de la CDK 4 y CDK6	Campisi, 2000 y 2001
<b>p53</b>	Factor de transcripción de genes implicados en el control negativo de la proliferación celular y la apoptosis (p.ej p21, bax)	Campisi, 2001 Chen, 2005
<b>pRb</b>	Controlador negativo del ciclo celular mediante la inhibición del factor de transcripción E2F.	Campisi, 2005
<b>p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup></b>	Inhibidor universal de las CDKs. Regulada positivamente por p53 (no exclusivamente). Promotor de la diferenciación y la maduración celular al inhibir la división celular. Induce la expresión de algunos factores protumorigénicos	Chen, 2005
<b>H-Ras</b>	Cuando esta sobreexpresada induce senescencia por activación de p16 y p53.	Campisi, 2005 Collado, 2005
<b>Dec1 (gen BHLHB2)</b>	Expresada en células en senescencia de piel, pulmón y páncreas (in vivo-ratón)	Collado, 2005 Collado, 2006
<b>p15<sup>INK4b</sup> (gen CDKN2B)</b>	Expresada en células en senescencia de piel, pulmón y páncreas (in vivo-ratón)	Malumbres, 2000 Collado, 2005
<b>DcR2 (gen TNFRSF110D)</b>	Expresada en células en senescencia de piel, pulmón y páncreas (in vivo-ratón)	Liu, 2005 Collado, 2005
<b>G-actina</b>	Se acumula en el núcleo de fibroblastos senescentes (in vitro)	Kwak, 2004
<b>Maspina</b>	Proteína expresada en queratinocitos senescentes (in vitro) y queratinocitos de edad avanzada (in vivo-clínico)	Nickoloff, 2004
<b>hTERT</b>	Proteína componente de la telomerasa (por telomerasa reverse transcriptase)	Cerni, 2000
<b>RAR-<math>\beta</math></b>	Receptor del ácido retinoico. Activa una vía de senescencia probablemente independiente de p16 y p21.	McGregor, 2002

Está bien establecido por tanto, que las vías pRb-p16INK4a y p53-ARF juegan un papel importante en mantener la respuesta senescente y que son activadas por productos del locus INK4a/ARF. Este locus codifica 3 importantes genes supresores de tumores p14ARF, p15INK4b, y p16INK4a. El gen p16INK4a, gen relacionado con el ciclo celular, codifica la proteína **p16**, que se une competitivamente a la proteína- kinasa dependiente de ciclina 4 (**CDK4**) y después durante la fase G1 del ciclo celular inhibe la interacción de la CDK4 y **ciclina D1** para estimular el avance del ciclo celular (Jin y cols 2000; Zhang y cols 2006). La proteína p16 está frecuentemente sobreexpresada en células senescentes en cultivo e inactivada en una gran variedad de cánceres humanos (Zhang y cols 2006). P14Arf comparte un exón común, el 2, con p16INK4a, pero tiene diferente el exón 1b y se traduce en un ORF diferente. La pérdida de **p14** en ratones knockout también se traduce en la formación de tumores. p15INK4b se localiza de forma centromérica al locus del gen p14/p16 y codifica proteínas que son conocidas como las mejores inhibidoras de la proliferación celular. Es un regulador negativo del crecimiento y un efector vertical en la cadena, del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Hannon y cols 1994).

En el proceso senescente, los complejos **pRb-E2F**, o lo que es lo mismo la pRb activa, van a producir el desarrollo de focos densos de heterocromatina, que produce la represión de varios genes implicados en el avance del ciclo celular. Además, un vez formados esos focos de heterocromatina parece que no necesitan la activación de p16 o pRb para seguir en esa disposición, lo que mantiene de manera permanente el estado senescente (Campisi 2005) (**Figura 5**). pRb es un regulador del ciclo celular, regulado a su vez por kinasas dependientes de ciclinas (CDKs). pRb forma complejos principalmente con ciclina D1 y D3. La actividad de ciclina D1 podría estar regulada a su vez por su asociación con Rb (Dowdy y cols 1993).

A pesar de que la inactivación de **p53**, **p21** y **p16** se ha observado en la mayoría de los cánceres, también se ha demostrado que esta inactivación no elimina totalmente la respuesta senescente, lo que implicaría a otras vías desconocidas hacia la ruta senescente (Chang y cols 1999; te Poole y cols 2002). Mediante microarrays de cDNA se han visto algunos de los genes sobreexpresados con funciones inhibidoras de crecimiento y aparentemente independientes de p21, p53 y p16. Entre ellos se encuentran el BTG1 (supresor tumoral), BTG2, EPLIN, maspina, IGFBP-6, MIC-1 y amfirregulina (Chang y cols 2002). RAS oncogénico sobreexpresado puede provocar una respuesta dependiente de p53, en este caso por la producción de altos niveles de ADN dañado por ROS. Sin embargo RAS oncogénico también puede inducir p16, que es un activador de la vía pRB, lo que proporciona una segunda barrera a la proliferación de células potencialmente oncogénicas. La inactivación de p53 en al menos algunas células humanas senescentes revierte completamente el arresto senescente. Del mismo modo, la inactivación del gen codificante p21, una diana para la transactivación de p53 e inhibidor de la progresión del ciclo celular, provoca que las células entren en senescencia replicativa dependiente de telómeros. Por lo tanto, al menos en algunas células, la inducción de senescencia por daño en el ADN, disfunción de los telómeros y posiblemente sobreexpresión de oncogenes convergen en la vía p53, que es necesaria y suficiente para establecer y mantener el arresto senescente (**Figura 5**). Aunque este estado senescente no puede ser revertido por señales fisiológicas, en esas células puede ser revertida por la pérdida de la función de p53 (Campisi 2000; Campisi 2005). Por otra parte, **p21** es una proteína inhibidora de las kinasas dependientes de ciclina

(CDKs) (Chen y cols 1998), y mediadora principal de los efectos de p53 en la expresión génica (Chang y cols 2002).

El gen CDKN2A, que codifica la proteína **p16**, se localiza en el locus 9p21, una de las áreas más vulnerables del genoma humano en el cáncer oral. En un altísimo porcentaje de carcinomas orales (más del 80%) se demuestra una falta de función de p16 (Wu y cols 1999), lo que resalta la importancia de esta proteína en el mantenimiento de una homeostasis celular normal. La proteína p16 (inhibidor del ciclo celular) es importante para la inhibición del complejo ciclina D1-kinasas dependientes de ciclinas y esto conlleva la inhibición subsiguiente del factor de transcripción E2F, con influencia en la transcripción de genes importantes para la síntesis de ADN (p. ej c-myc). La expresión de p16 se ha observado en la mucosa oral displásica y en los carcinomas *in situ* (estudio clínico) pero no en los carcinomas invasivos (Natarajan y cols., 2003). De igual forma, el transcrito alternativo del gen CDKN2A, **p14 ARF**, está también frecuentemente suprimido en lesiones orales malignas (Wu y cols 1999, Moles 2008). Esta proteína p14 ARF inhibe a la proteína **MDM2**, que a su vez facilita la degradación de p53 (gen supresor tumoral), con lo cual se aumenta su acción sobre PUMA o p21 con acción apoptótica o senescente. La activación de p53 y p21 es transitoria y sus niveles de expresión decrecen una vez que se ha alcanzado el estado senescente. En ese momento se empieza a sobreexpresar la proteína p16INK4a, que parece la responsable del mantenimiento de la parada de replicación permanente.

P14ARF, p15INK4B y p16INK4A Y DCR2 han sido identificados como marcadores de senescencia (Collado y cols 2005). Los tres primeros marcadores son importantes en la detención en G1 y están frecuentemente mutados o delecionados en varias neoplasias. DCR2 puede inducir de forma selectiva la apoptosis en células cancerígenas. Empleando tinciones con anticuerpos frente a P14ARF, p15INK4B y p16INK4A Y DCR2, se ha constatado una gran abundancia de células positivas en lesiones premalignas de pulmón, mientras que los tumores malignos eran esencialmente negativos (Collado y cols 2005; Zhang y cols 2006).

Se ha observado mediante microarrays de DNA la sobreexpresión de una serie de genes en células senescentes (en cultivos de fibroblastos con inducción de oncogén ras). De ellos los principales productos proteicos vuelven a ser **p15<sup>INK4b</sup>**, **Dec1**, **Dcr2**. (Collado y cols 2005). Tales marcadores han sido demostrados en lesiones premalignas de diferentes tejidos (piel, pulmón y páncreas) de ratones previamente inducidos para mutaciones de H-ras y K-ras (Collado y cols 2005). **p15INK4b** (*CDKN2B*) es un inhibidor de CDKs; **Dec1** (*BHLHB2/SHARP2/Stra 13*), un factor de transcripción implicado en el control de los ritmos circadianos; **Mcl1** (*MCL1*), un gen antiapoptótico miembro de la familia Bcl2; y **Dcr2** (*TNFRSF10D*) (*Decoy receptor2*) es uno de los receptores señuelo del ligando-inducido por apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL por tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor). DCR2 suprime la apoptosis inducida por TRAIL y parece regular la quimiosensibilidad. Suele estar expresado en la mayoría de los tejidos normales, pero su expresión es frecuentemente silenciada o infrarregulada por hipermetilación del promotor en numerosos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer cervical, de mama, neuroblastoma, mesotelioma maligno y cáncer de próstata (Zhang y cols 2006).

**Maspina** está considerada como un supresor tumoral de las células epiteliales, con actividad anti-invasiva y antiangiogénica, cuyo ARNm y expresión proteica están aumentadas en los queratinocitos en senescencia (Nickoloff y cols 2004). Su intensidad de expresión en piel se ha correlacionado también con la edad cronológica (Nickoloff y cols 2004).

La forma normal de p53 produce una represión de **hTERT**, lo que evita la inmortalización de la célula (McGregor y cols 2002). Un estudio sobre tumores de cabeza y cuello, observó que la prevalencia de mutaciones de p53 previas a la invasión no se incrementaba según el estadio clínico del tumor y que por lo tanto dichas alteraciones carecían de significado pronóstico (Bosch y cols 2004).

El marcador de senescencia más aceptado y consistente es, sin embargo, **SABG** (*Senescence-Associated Beta-Galactosidase*), que ya se ha utilizado para demostrar senescencia en una amplia variedad de tumores (Itahana y cols 2007).

Otros marcadores de OIS son las proteínas involucradas en el mecanismo de detención del ciclo celular:

- Productos del locus CDKN2A: INK4A y ARF: Son marcadores útiles incluso en ausencia de SABG.
- p21 y p27: Son marcadores más informativos para modelos particulares *in vivo*.
- Moléculas involucradas bien en la respuesta al daño celular, o bien en la formación de foci de heterocromatina asociados a senescencia (*SAHF*).

En la **tabla 3** se recogen las proteínas con mayor soporte científico para ser considerados marcadores de Senescencia Inducida por Oncogenes (SIO).

**Tabla 3. Marcadores de SIO estudiados. Modificada de Collado y Serrano 2006**

MARCADOR	ENSAYO	IN VITRO	IN VIVO
SABG	Histoquímica	Dimri et al 1995	Braig et al 2005; Michaloglou et al 2005; Collado et al 2005; Chen et al 2005
p16INK4a	Inmunohistoquímica	Alcorta et al 1996	Braig et al 2005; Michaloglou et al 2005; Collado et al 2005; Lazzarini Denchi et al 2005
p15INK4b	Inmunohistoquímica	Malumbres et al 2000	Collado et al 2005
p53	Inmunohistoquímica	Afshari et al 1993	Chen et al 2005
ARF	Inmunohistoquímica	Kamijo et al 1997	Chen et al 2005; Collado et al 2005; Lazzarini Denchi et al 2005
p21	Inmunohistoquímica	Tahara et al 1995	Chen et al 2005
DEC1	Inmunohistoquímica	Michaloglou et al 2005	Michaloglou et al 2005
DCR1	Inmunohistoquímica	Michaloglou et al 2005	Michaloglou et al 2005

La determinación del fenómeno senescente por estos marcadores debe corroborarse mediante la identificación simultánea de bajos niveles de proliferación celular (Por ejemplo, Ki67 bajo o bromodeoxyuridine o BrdU bajo).

### Beta-galactosidasa asociada a senescencia (SABG por Senescence-Associated B-Galactosidase )

SA-beta-gal, por *Senescence Associated- beta-galactosidase*, es un marcador muy útil debido a que distingue células senescentes de las quiescentes incluso en poblaciones celulares heterogéneas o en tejidos envejecidos. No se puede analizar mediante inmunohistoquímica, requiriendo en su lugar una tinción histológica sencilla mediante el sustrato artificial X-gal (Itahana y cols 2007; Gruber y cols 2007).

Las técnicas histológicas clásicas, como el formaldehído y la parafina, aunque preservan correctamente la morfología de los tejidos, eliminan completamente la actividad de la beta-galactosidasa, ya que precisa analizarse en ARN.

El ensayo SABG consiste en la detección citoquímica de la actividad de la beta-galactosidasa a pH 6.0. Esta actividad deriva del aumento del contenido lisosomal de las células senescentes, que permite la detección de la beta-galactosidasa lisosomal a este pH subóptimo (el óptimo sería un pH de 4.0).

La actividad de la beta-galactosidasa se acepta como marcador de senescencia tanto in vitro como in vivo, aunque su base bioquímica aún es desconocida. Además, existe evidencia de una reacción positiva de SABG en determinadas condiciones de estrés celular no relacionados con la senescencia (Severino et al 2000).

### H-RAS

El oncogen que se utilizó originariamente para la descripción de la OIS in vitro fue **HRAS<sup>G12V</sup>**. Serrano y cols observaron, de manera casual hace más de diez años, un fenotipo similar al senescente en células normales en cultivo que sobreexpresaron la versión oncogénica de HRAS (HRAS<sup>G12V</sup>) (Serrano y cols 1997). Se vio que la detección del ciclo celular se había producido por la sobreexpresión de dos supresores tumorales cruciales: INK4A (que activa la familia Rb) y ARF (que activa p53).

Se ha propuesto que la inducción de la senescencia por HRAS es dosis-dependiente, de manera que una baja expresión del oncogén conduciría a una hiperproliferación celular, mientras que el aumento de expresión estimularía la senescencia de la célula (Sarkisian 2007).

La vía de la familia Ras más relevante para la inducción de la senescencia es la **Raf-Mek** (Collado y Serrano 2010).

Existe controversia con el papel de **Kras<sup>G12V</sup>** en la inducción de la senescencia, ya que mientras algunos autores encuentran que Kras oncogénico estimula la senescencia en lesiones premalignas de pulmón (S.Ryeom) y páncreas (C. Carriere y M. Korc), otros no encuentran evidencia para los mismos tipos de tumores (M. Caldwell y D. Tuveson) (Collado y Serrano, 2010).

La forma oncogénica **Braf**<sup>V600E</sup> también induce senescencia en tumores de pulmón y nevos melanocíticos (Dankort 2007 y cols; Dhomen y cols 2009).

También la forma transgénica de expresión de **Nras**<sup>G12D</sup> en tejido linfoide, conduce a senescencia si se estimulan los linfocitos con quimioterapia (Braig y cols 2005).

Sarkisian demostró que la progresión tumoral hacia la malignidad producida a través de HRAS oncogénico, era dosis-dependiente. Estudió HRAS en cáncer de mama in vivo y determinó que la formación del tumor maligno requería altos niveles de expresión del oncogen y la evasión de la senescencia por la delección genética de Cdkn2 o Trp53 (Sarkisian 2007).

### hTERT

Es una ADN-polimerasa ARN-dependiente que previene el acortamiento de los telómeros, que son secuencias repetidas de ADN situadas al final de todos los cromosomas y que se van acortando en cada división celular. Un aumento en la actividad de la telomerasa indica que las células tumorales han superado el mecanismo senescente de control de la replicación celular (Schliephake 2003).

Su expresión está disminuida en la senescencia: Sabemos que la actividad de la telomerasa y la expresión de hTERT disminuyen en los queratinocitos orales que entran en senescencia en cultivo (Kang y cols 2009). También se ha demostrado que esta expresión aumenta en las displasia orales que pasan de un estado senescente a una inmortalidad celular (progresión maligna) (McGregor y cols 2002).

Su evidencia en cáncer oral es la siguiente:

La mitad de las displasias orales son inmortales, lo que se asocia con pérdida de expresión de RAR beta y p16, mutaciones de p53 y aumento de los niveles de telomerasa o hTERT (McGregor y cols 2002).

La reactivación de hTERT sólo no es suficiente para la inmortalidad celular, sino que requiere otros factores, entre los que destaca la pérdida de p16, pero no así las mutaciones de p53. (Producen la activación ectópica de hTERT mediante un vector de activación retroviral para ver si hTERT es suficiente para la inmortalidad celular). (Muntoni y cols 2003)

### P53 y MDM2 (por "murine doble minute 2")

Es una proteína con cinco dominios estructurales y funcionales, cuyo dominio N-terminal se encarga de la activación de otros genes.

Regula negativamente la transcripción de genes anti-apoptóticos como BCL-2 (Mirzayans y cols 2012), y activa proteínas pro-apoptóticas (como las caspasas) y pro-senescencia (como p21) (Korwek y Alster 2014) (Hasegawa y cols 2009).

P53 es un polipéptido de 53 kD que actúa como factor de transcripción para controlar el ciclo celular, bien deteniendo las células en la fase G1 mediante la activación de p21, o bien activando la apoptosis por distintas vías. La producción de p53 está regulada mediante la

inducción de un feed-back negativo a través de MDM-2, una proteína que se une a p53 produciendo su degradación (Suzuki y cols 2011; Schliephake, 2003; Hitahana y cols 2001).

Es uno de los genes más influyentes en la carcinogénesis humana. La proteína p53 está involucrada en el control del ciclo celular, la estimulación de la apoptosis (Shay y Roninson 2004) y la preservación de la estabilidad genética. Su expresión es mayor en los carcinomas más indiferenciados, aunque las mutaciones del gen p53 pueden considerarse mejores indicadores de recurrencia que la expresión de la proteína. También se consideran indicadores más fiables los niveles de p53 en suero que los determinados mediante inmunohistoquímica en los tejidos (Massano 2006). Está aumentado en el COCE, pero no en el inicio de la displasia (McGregor 2002). P53 es una diana atractiva para la terapia génica. (Massano 2006)

Tras investigaciones en modelo animal sobre la restauración artificial de p53 en tumores ya establecidos, con la consecuente resolución del cáncer, ya se están desarrollando fármacos anticáncer basados en este principio (Collado y Serrano 2010; Brown y cols 2009).

### P21<sup>CIP1</sup>

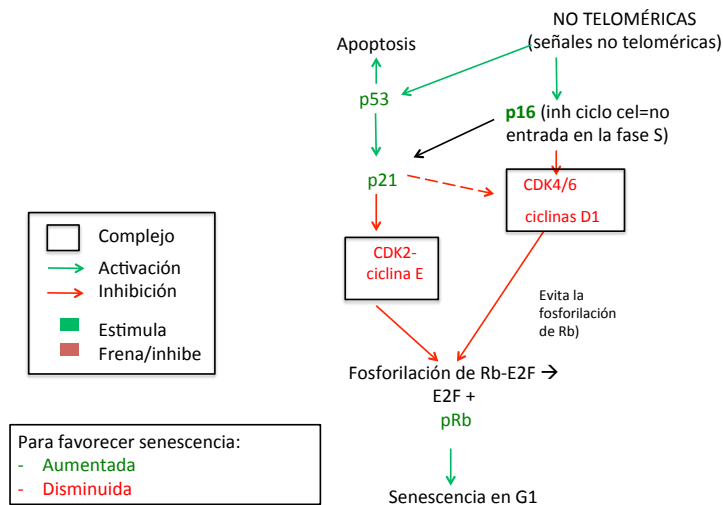
Es un inhibidor del ciclo celular al frenar las kinasas ciclina-dependientes, deteniendo la progresión del ciclo celular. La proteína p21 es un producto de los genes WAF1, CIP1 o SD11. La expresión de la proteína se correlaciona de forma inversa con el parámetro T (tamaño del tumor) y el estadio clínico, pero no con el parámetro N (nódulo), la diferenciación celular o las variables apoptóticas (Massano 2006). Inhibe la apoptosis por mecanismos tanto intracelulares como paracrinos (Shay y Roninson 2004).

### P16<sup>INK4A</sup>

Es un **inhibidor del ciclo celular** que regula la progresión del ciclo celular en G1-S. Es por tanto promotor de senescencia (Romagosa y cols 2011).

Su papel en el ciclo celular se debe a que es inhibidor de CDK, ya que se une a CDK4 y 6, inhibiendo su asociación con ciclina D1. La inhibición del complejo CDK4/6-ciclina D1 evita la fosforilación de pRb, que no se separaría de E2F, por lo que quedaría E2F inactivada (**figura 6**).

**Figura 6. Relaciones de p16 en las vías que conducen a la senescencia**



Las **anormalidades genéticas** que **inactivan el gen de p16** podrían conferir ventajas al crecimiento celular que contribuyeran a la carcinogénesis (Hardisson, 2003). El principal motivo de inactivación de p16 es la hipermetilación de su gen promotor (Ohta y cols 2009). Otros motivos de su inactivación pueden ser las mutaciones o la alteración en el número de copias del gen (Lim y cols 2014). La hipermetilación puede considerarse actualmente, uno de los principales determinantes del “epigenoma” o perfil epigenético. La hipermetilación de p14 o p16 es un hallazgo específico del cáncer oral, que se encuentra en los carcinomas pero no en los controles sanos. Esta hipermetilación es, además, un fenómeno temprano en el proceso de cancerización, ya que se encuentra en las lesiones premalignas y en los bordes del tumor. Parece que la hipermetilación de p16 podría tener un valor predictivo tanto para la progresión de las lesiones premalignas, de las ya establecidas, recurrencia y supervivencia en el cáncer oral (al-Kaabi y cols 2014). Las deleciones de p16 parecen ser cruciales para la progresión maligna, influyendo en la supervivencia, recurrencia y presencia de metástasis nodales. Los desequilibrios en los alelos de 9p21 señalan un mal pronóstico (Massano 2006).

**p16 actúa como nexo entre las vías de senescencia pRb/p16 y p14/p15/p21.** Se ha confirmado el papel de p16 como regulador positivo de p21, a través de la proteína AUF1, a nivel post-transcripcional. Esta proteína se une a ambas y reduce su estabilidad, por lo que p16 y p21 se correlacionan positivamente y AUF1, con ellas, negativamente (Al-Khalaf y Aboussekhra 2013). Ambas proteínas son dos importantes supresores de tumores a través de su función inhibidora de CDKs, regulando el paso de G1 a S en el ciclo celular. p21 es codificada por el gen CDKN1A y p16 por CDKN2A. Ambas compiten por la unión a CDK4. Por lo tanto, podemos considerarlo el nexo entre las dos vías más comúnmente relacionadas con la senescencia inducida por oncogenes.

Muchos autores han sugerido un papel causal del virus del papiloma humano en la carcinogénesis oral (McCord y cols 2014; Mirghani y cols 2015; Nankivell y cols 2014; Lim y cols 2007). Se ha estimado una prevalencia tres veces mayor de serotipos de alto riesgo de este

virus en lesiones orales potencialmente malignizables y carcinomas orales (Nankivell y cols 2014). La expresión alta mediante inmunohistoquímica de p16 en COCEs, ha sido confirmada por algunos autores como un **marcador subrogado de presencia de virus de papiloma humano** de alto riesgo (serotipo 16), como alternativa a la detección del virus por PCR (Duncan y cols 2013; Kaminagakura y cols 2012). Sin embargo, otros estudios no encontraron tan clara esta asociación (Harris y cols 2011; Nankivell y cols 2014).

### P14<sup>ARF</sup>

Esta proteína se denomina p14<sup>ARF</sup> en humanos o p19<sup>arf</sup> en ratones. También se llama ARF. Es codificada por el locus INK4A-ARF (o CDKN2a), en el cromosoma 9p21, que codifica para p14 y p16 (Nam y Kin 2008). Este locus INK4A/ARF se inactiva de manera secundaria a la inactivación de p53 en los cánceres humanos (Sailasree y cols 2008).

Su expresión está aumentada en la senescencia. La evidencia en cáncer oral es la siguiente:

- Alteraciones por delección o metilación en el 30% de los casos de COCE. La metilación de p14 se asoció con menor tasa de recurrencia tumoral y buen pronóstico clínico. (Sailasree y cols 2008).
- Pronóstico favorable: En análisis multivariante, la positividad nuclear y nucleolar a p14 fue un predictor independiente de mayor supervivencia libre de tumor y supervivencia global (Inmunohistoquímica, en COCE lengua) (Kwong 2005).
- Las alteraciones en los locus de p14 y p16 son sucesos muy frecuentes en el paso de lesión malignizable a maligna (tasas de inactivación del 70-85%). Son muchos más frecuentes las alteraciones de p16. (28 displasias severas, en parafina. Estudian delección, mutación, LOH e hipermetilación de p14 y p16) (Kresty 2002).

### P15

p15(INK4B) está localizado en el cromosoma 9p21, que también codifica para p14 y p16.

Su expresión también está aumentada en senescencia, y se dispone de la siguiente evidencia en cáncer oral:

- Existe una pérdida frecuente de este marcador de senescencia en COCE: El 87.5% de las muestras mostraron alteraciones en al menos un marcador (p14, p15 o p16). Éstas conducían a la inactivación de la proteína. Las alteraciones estudiadas fueron la delección, mutación o metilación. El orden fue, de mayor a menor frecuencia: p16>p14>p15. (32 COCE; técnicas: deletion screening, PCR-SSCP, methylation-specific-PCR y cycle sequencing) (Shintani 2001).
- Tras detener de manera artificial (con mAb225) el ciclo celular de una línea celular de COCE en la fase G1, se observa que ha aumentado el nivel de expresión de p15(INK4B), sugiriendo que este efecto antiproliferativo pueda haber estado mediado por p15 y p27 (Kiyota 2002).

### Bcl-2

Bcl-2 es una proteína antiapoptótica que interacciona y es regulada por p53. Su sobreexpresión contribuye a la expansión de las células neoplásicas. Está aumentada en el 50% de los cánceres humanos. Al promover la supervivencia celular, Bcl-2 facilita la adquisición de mutaciones y la transformación maligna. Su gen está localizado en el cromosoma 18q21 (Lo Muzio, 2007). Inhibe la apoptosis (Shay y Roninson 2004).

### Retinoides

Los retinoides son derivados sintéticos o naturales de la vitamina A.

Afectan a la transcripción de los genes, por lo que de alguna manera regulan el crecimiento y la diferenciación celular.

Frenan el crecimiento de las células tumorales induciendo o su diferenciación, o su apoptosis, o bien la detención de su replicación (Shay y Roninson 2004).

Este efecto de los retinoides se ha observado en modelo animal y humano, tanto in vitro como in vivo (Shay y Roninson 2004; Christov y cols 2003; Wainwright y cols 2001).

### Maspina

Es un miembro no inhibidor de la superfamilia inhibidora de serin-proteasas. Su nombre se debe a la homología con las serpinas mamarias (en inglés *maspin* por mammary serpins) y se localiza en el cromosoma 18q21 (Sheng 2004).

Maspina es un **supresor tumoral** por su **efecto inhibitorio de la progresión de un tumor**, una vez establecido. Inhibe la angiogénesis inducida por tumor, la motilidad de las células tumorales, la invasión y la metástasis. También es sensible a la apoptosis inducida por fármacos (Marioni y cols 2008; Iezzi y cols 2007).

Maspina se expresa en varios tipos de tejido sano, como el mamario, próstata, placenta, testículo, colon, intestino, riñón, lengua, timo y epidermis (Takeda y cols 2014; Wang y cols 2013). De ahí que se puedan emplear éstos como controles. Se ha descrito que tiene una expresión citoplasmática (Takeda y cols 2004), aunque puede ser secretada o incluso constituir una proteína de superficie celular (Sheng 2004). Algunos autores han encontrado la expresión nuclear asociada a un buen pronóstico y la citoplasmática a un pronóstico malo (o un fenotipo más invasor) (Mohsin y cols 2003, en tejido mamario; Marioni y cols 2005 en laringe; y Reshma y cols 2014, en glándulas salivales). En los adenocarcinomas (Reshma y cols 2014), el cambio en el nivel de expresión de maspina parece asociarse al paso de ésta del núcleo al citoplasma.

### Ciclina D1

Las ciclinas forman complejos de heterodímeros con kinasas ciclina-dependientes (CDKs: cdk2-Cyclin A, cdk2-Cyclin B, cdk4-Cyclin D y cdk2-Cyclin E), que activan y desactivan las ciclinas por fosforilación y desfosforilación, respectivamente. La activación de ciclinas adelanta el ciclo

celular, aumentando la proliferación celular. Las CDKs también están reguladas mediante fosforilación/desfosforilación a través de inhibidores de ciclin-quinasas (Schliephake 2003).

La ciclina A es crucial para la síntesis de ADN en la fase S y la progresión de G2 a M. Su sobreexpresión se correlaciona con un mal pronóstico tumoral, enfermedad avanzada, gran tamaño del tumor, metástasis ganglionar y recurrencia (Massano 2006).

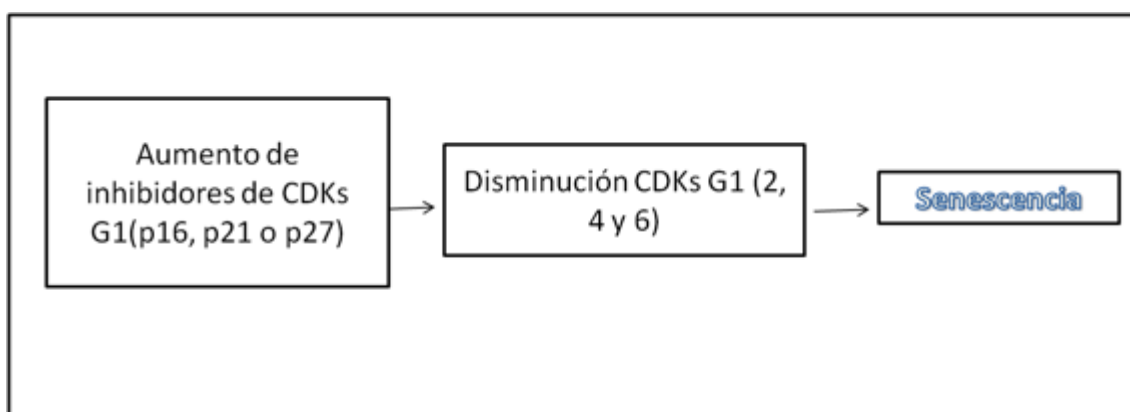
La ciclina D1 es un proto-oncogén que regula el ciclo celular, fosforila Rb y promueve la transición G1-S. Su actividad es inhibida por varios genes supresores de tumores, incluyendo p16, p21 y p27. La amplificación y sobreexpresión de este gen son factores pronósticos independientes en varios tumores, incluyendo el COCE. Una expresión aumentada de ciclina D1 se asocia con la presencia de metástasis de ganglios regionales y con estadíos avanzados del tumor (Massano y cols 2006).

Para la ciclina D1, varios autores encuentran una sobreexpresión de la proteína en cáncer oral (Liu y cols 2009) e incluso en lesiones premalignas (Papadimitrakopoulou 2009), habiéndose relacionado esta sobreexpresión con un mal pronóstico en la mayoría de los estudios (Liu y cols 2009; Jaworska y cols 2008; Myo y cols 2005; De Vicente y cols 2008). Con la intención de explicar esta sobreexpresión, se han estudiado sus dos polimorfismos, A870G y C1722G (Sathyan y cols 2008), pero no se han obtenido respuestas definitivas.

*CDKs (quinasas dependientes de ciclinas)*

Algunos autores (Lin y cols 2010; Campaner y cols 2010) creen que el punto de inflexión para que se desencadene la senescencia son las CDKs 2, 4 y 6, que median la fase inicial G1 del ciclo celular. El estrés inductor de la senescencia inhibiría estas CDKs mediante el aumento de la expresión de proteínas inhibidoras de CDKs (p16, p21 y p27) (Serrano 2010). Aunque debido a la alta redundancia de estas tres CDKs, la eliminación de alguna de ellas no tiene grandes efectos (Serrano 2010) (**figura 7**).

**Figura 7. Mecanismo de producción de senescencia por CDKs**



Por lo tanto, es concebible que si inhibimos las CDKs G1, podríamos inducir senescencia en las células tumorales.

En cuanto a su presencia en carcinomas orales de células escamosas, se ha detectado una hiperactividad de CDK6, aunque no de CDK4. Y al tratarse de una localización nuclear, queda demostrada su actividad en los carcinomas (Piboonniyom y cols 2002).

### **El marcador de proliferación celular ki-67 en la senescencia**

Ki-67 es una proteína nuclear no histónica expresada en las células durante las fases activas del ciclo celular (G1,S,G2,M), y ausente en las células en estado de reposo (G0). Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal ki-67 permite la detección inmunohistoquímica de células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de crecimiento celular. Por lo tanto, Ki-67 puede emplearse para medir la fracción de crecimiento en los tejidos normales y en las neoplasias malignas. Estudios previos han demostrado que los altos índices de ki-67 observados en carcinomas orales de células escamosas estaban correlacionados con la gravedad de la enfermedad y con un pronóstico desfavorable (Jaworska y cols 2008; Mielcarek-Kuchta y cols 2003).

La capa basal del epitelio oral es la zona donde en condiciones normales se ubica el compartimento celular en proliferación, mientras que la capa suprabasal incluye las zonas de maduración celular. La detección de Ki-67 en la capa suprabasal es un marcador objetivo de la presencia de displasia epitelial (Mielcarek-Kuchta y cols 2003).

## JUSTIFICACIÓN

---

A partir de la revisión bibliográfica anterior, podemos afirmar que es biológicamente plausible que la senescencia inducida por oncogenes (SIO) actúe como un mecanismo supresor de tumores, similar en ciertos aspectos a la apoptosis celular.

Investigaciones en modelo animal y posteriormente en humanos, han demostrado que la SIO ocurre durante etapas iniciales de la carcinogénesis, aún premalignas, y que la evasión de la senescencia conduciría a la transformación maligna de las células. Por lo tanto, sería interesante estudiar la senescencia en distintos estadios de la carcinogénesis oral, partiendo de tejido sano, para poder comprender con más exactitud este mecanismo antitumoral. Se ha descrito que ciertas condiciones no fisiológicas de cultivo pueden desencadenar también una respuesta senescente (Mooi y Peeper 2006), y que la expresión de los marcadores de senescencia puede variar según el modelo de estudio (animal o humano) (Dimri 2005) y el tipo de tumor (es tejido-específica). Por lo tanto, el estudio de la SIO en cáncer oral debería ser llevado a cabo *in vivo*, en modelo humano y en lesiones orales correspondientes a distintos estadios de la carcinogénesis (tejidos orales sanos, leucoplasias sin displasia, leucoplasias con displasia y carcinomas orales).

La necesidad de emplear marcadores para el estudio de la senescencia se debe a que las células senescentes *in vivo* carecen de rasgos morfológicos distintivos, pese a que *in vitro* sí adoptan una morfología alargada y plana característica. Por lo tanto, es necesario establecer marcadores de senescencia, o perfiles de marcadores asociados, para poder calificar una lesión como senescente.

Con respecto a la utilidad en el cáncer oral, debido a esta asociación de la senescencia con etapas iniciales de la carcinogénesis, podría utilizarse como una herramienta tanto para el pronóstico, como para el tratamiento de las lesiones potencialmente malignizables. Ya que las células senescentes no sólo detienen su crecimiento proliferativo, sino que también son eliminadas por fagocitos, el desarrollo de fármacos inductores de senescencia podría ser una herramienta importante para la detención y eliminación de las células tumorales. Además, el desarrollo de marcadores de senescencia podría servir también para monitorizar la respuesta al tratamiento. La base de una terapia pro-senescente para el tratamiento del cáncer oral consistiría en re-establecer las vías senescentes, fisiológicas, ya que parece ser que durante la carcinogénesis oral, éstas permanecen intactas, aunque suprimidas. Y hemos visto que hay proteínas nexos entre las vías, por lo que posiblemente re-activando sólo algunas de estas proteínas, el mecanismo senescente pueda establecerse de nuevo. Pero para determinar cuáles son estas proteínas que podrían utilizarse para la terapia pro-senescencia, sus funciones y sus interrelaciones, hay que estudiar todas estas vías y proteínas simultáneamente, en humanos, en tejido oral, y de una manera sitio-dependiente, como desarrollaremos en esta memoria.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

---

Nuestra hipótesis de trabajo considera que la senescencia inducida por oncogenes forma parte del mecanismo fisiológico supresor de tumores. El fenómeno senescente estaría por tanto elevado en las lesiones orales potencialmente malignizables, y no así en tejidos orales sanos ni en carcinomas orales de células escamosas, que habrían conseguido evadir la senescencia.

Las proteínas involucradas en las vías de senescencia inducida por oncogenes, se expresarán por tanto de forma diferente en los tejidos orales sanos, en las lesiones orales potencialmente malignizables y en los carcinomas orales de células escamosas. Su expresión será mayor en las lesiones potencialmente malignizables.

Las proteínas involucradas en las vías de senescencia tendrán también asociaciones significativas entre ellas.

Esta expresión diferencial de las proteínas en las distintas etapas de la carcinogénesis oral, partiendo de tejidos sanos controles, y sus asociaciones, permitirá determinar perfiles proteicos asociados a senescencia.

Aquellas proteínas o perfiles proteicos que demuestren diferencias de expresión significativas podrán utilizarse como marcadores de senescencia en cáncer oral, para futuros usos pronósticos o terapéuticos.

## **OBJETIVOS**

---

### OBJETIVO GENERAL:

Basándonos en la hipótesis propuesta y en las limitaciones inherentes al diseño del estudio, se plantea el siguiente objetivo principal:

**Determinar si existen perfiles proteicos o proteínas relacionadas con las vías de senescencia inducida por oncogenes que puedan ser considerados marcadores de senescencia debido a una expresión diferencial en tejido oral sano, lesiones orales potencialmente malignizables y carcinomas orales de células escamosas.**

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Para conseguir llegar al objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la expresión de 19 proteínas (actina, CDK4, CDK6, ciclina D1, DCR2, Dec1, E2F, hTERT, H-Ras, maspina, MDM2, p14<sup>ARF</sup>; p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup>, p53, , pRb, Rb, RAR-β) relacionadas con el fenotipo senescente o con las vías de senescencia, mediante inmunohistoquímica, sobre cortes de *tissue microarray* en cuatro tipos de tejido oral (tejido oral sano, leucoplasia oral sin displasia, leucoplasia oral con displasia y carcinoma oral de células escamosas).
2. Comparar la expresión de estas proteínas entre los cuatro grupos de estudio (que corresponden a tejido oral sano, leucoplasia sin displasia, leucoplasia con displasia y carcinoma oral de células escamosas), para determinar si existe una expresión diferencial estadísticamente significativa entre ellos, centrándonos especialmente en la progresión de lesión potencialmente malignizable a carcinoma.
3. Determinar, basándonos en la expresión elevada del inhibidor del ciclo celular p16 y disminuida del factor de proliferación celular Ki67, qué muestras de tejido concordarían con un estado senescente del mismo.
4. Analizar si pudieran existir interacciones o correlaciones entre la expresión de las proteínas estudiadas.
5. Determinar perfiles de expresión proteicos característicos de senescencia, o aquella/s proteínas que, basándonos en los resultados de los puntos anteriores y en un análisis de clusters, puedan ser estudiadas como dianas para una terapia antitumoral pro-senescente en el carcinoma oral de células escamosas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio en humanos de tipo observacional analítico transversal consistente en cuatro grupos de estudio que representan las principales fases consecutivas de la carcinogénesis del carcinoma de células escamosas. Estos grupos son:

- 1) Tejido oral sano (TOS)
- 2) Lesiones orales potencialmente malignizables sin displasia (leucoplasia sin displasia-LOD-)
- 3) Lesiones orales potencialmente malignizables con displasia (leucoplasia con displasia-LOD+)
- 4) Carcinoma oral de células escamosas (COCE)

Al tratarse de un estudio transversal, no existe intervención ni seguimiento.

La variable exposición sería el nivel de enfermedad (grupo de estudio: sano o normal, leucoplasia sin displasia, leucoplasia con displasia y carcinoma). Las variables respuesta serían las proteínas expresadas (actina, CDK4, CDK6, ciclina D1, DCR2, Dec1, E2F, hTERT, H-Ras, maspina, MDM2, p14<sup>ARF</sup>; p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup>, p53, , pRb, Rb, RAR-β).

La técnica elegida para analizar la expresión de las proteínas ha sido la inmunohistoquímica, ya que es la que más frecuentemente se utiliza en los estudios revisados y además tiene una estabilidad en el tiempo que facilita su análisis y cuantificación y es menos sensible a la técnica que otros métodos de análisis.

## 2. SELECCIÓN DE CASOS, PACIENTES

Se incluyeron en el estudio 123 muestras correspondientes a 123 pacientes.

Las muestras de tejido oral sano se obtuvieron en el Máster de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Estas muestras correspondían a fragmentos orales extirpados en el transcurso de cirugías periodontales resectivas, que iban a ser desechados, y fueron donados por los pacientes para su análisis, tras firmar un consentimiento informado (**anexo 2**). Las muestras de lesiones potencialmente malignizables y las de carcinomas procedían de un medio hospitalario. Se obtuvieron del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

Las biopsias hospitalarias estaban ya incluidas en parafina. Las procedentes de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid fueron fijadas en formaldehído en el momento de la toma y posteriormente embebidas en parafina también en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

Se recogió información clínica de los pacientes de forma manual, a partir de las historias archivadas en el Hospital; y del mismo modo, se obtuvo la información necesaria directamente de los pacientes tratados en el Máster de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UCM

que permitieron el análisis de sus muestras. Se contemplaron las siguientes variables para todas las muestras: edad, sexo, tabaco, alcohol, localización de la muestra. Para las leucoplasias con displasia se recogió además el grado de displasia (leve/moderado/severo); y para los COCE, el tipo clínico, histológico y la clasificación TNM (**ver anexo 1**).

Con el objetivo de optimizar el análisis de las muestras, se confeccionaron dos *tissue microarrays* (TMA 272 y TMA 273) con muestras de tejido oral sano, TOS (n=43), de leucoplasia oral sin displasia, LOD- (n= 28), de leucoplasia oral con displasia, LOD+ (n= 23) y de carcinoma oral de células escamosas, COCE (n= 29).

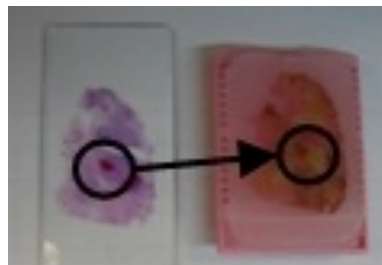
Para mantener la confidencialidad de los datos de los pacientes se sustituyeron todos los identificadores de los pacientes por códigos numéricos.

El empleo del tejido biopsiado fue aprobado por los Comités éticos correspondientes (código interno nº E-09/263) y se obtuvieron los consentimientos informados por parte de los pacientes (**ver anexos 2 y 3**).

### 3. DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS DE DISPLASIA DE LAS LESIONES POTENCIALMENTE MALIGNIZABLES

Un especialista en patología oral del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón (P. A. E.) determinó las zonas epiteliales más características de displasia oral o carcinoma mediante observación con microscopio óptico. El mismo patólogo indicó mediante rotulación varias zonas representativas de cada una de las muestras, de donde se extraerían los dos cilindros que serían incluidos en los *tissue microarrays*. El marcaje se realizó tanto en los bloques de parafina como en los portaobjetos teñidos con hematoxilina/eosina (**figura 8**). El patólogo desconocía en todo momento los datos clínicos de los pacientes de los que provenía la muestra.

**Figura 8.** Selección de las zonas más representativas de cada muestra para su inclusión en los *tissue microarrays*, mediante observación con microscopio de tinciones con *hematoxilina-eosina*



#### 3.1. Clasificación de la displasia y clasificación tumoral

Para la clasificación del tipo de displasia no se empleó la clasificación *OIN* (por *Oral Intraepithelial Neoplasia*), descrita por Van der Waal, otorgándose en su lugar los grados de leve/ moderada/ severa propuestos posteriormente por Carinci y colaboradores en 2005. La

clasificación TNM de los tumores corresponde a los criterios de la *International Union Against Cancer* (Sobin y cols, 1997) (tablas 4 y 5).

**Tabla 4. Clasificación TNM y estadio clínico**

TABLA 1

**Clasificación TNM y estadiaje**

Tumor primario (T)	
TX	Sin información sobre el tumor primario
T0	Sin evidencia del tumor primario
TIS	Carcinoma <i>in situ</i>
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

Modificada de Aguirre-Urtizar<sup>48</sup>.

**Tabla 5. Grado de diferenciación histológica**

GRADO DE DIFERENCIACIÓN HISTOLÓGICA	
GX	No se puede establecer grado de diferenciación
G1	Bien diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pobremente diferenciado
G4	Indiferenciado

#### 4. CONSTRUCCIÓN DEL *TISSUE MICROARRAY* (TMA) CON TEJIDOS ORALES BENIGNOS, LESIONES ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES (LEUCOPLASIAS CON Y SIN DISPLASIA) Y CARCINOMAS ORALES

La construcción de los *tissue microarrays* con las muestras identificadas con marcadores anónimos se llevó a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), situado en Madrid.

El receptor de los cilindros es un bloque de parafina normal que debe ser alisado previamente para que los cilindros tengan el mismo ángulo de entrada en el bloque. Las muestras del estudio se introdujeron por duplicado, repartidas en dos *tissue microarrays*, ordenadas según un programa de números aleatorios, con la intención de minimizar los sesgos inherentes a la técnica de inmunotinción. El TMA 272 se preparó con 120 cilindros, correspondientes a 60 pacientes. El TMA 273 se confeccionó con 126, correspondientes a 63 pacientes. Además se añadieron, por duplicado, muestras de páncreas, amígdala, placenta, riñón y pulmón como controles internos tanto para los TMAs como para las muestras, y una muestra extra de amígdala (A) para controlar la orientación de cada TMA (**tablas 6 y 7**). La distribución de las muestras incluidas en cada uno de los *tissue microarray* fue la siguiente:

- TMA 272: 20 TON , 14 LOD-, 11 LOD+ y 15 COCE.
- TMA 273: 23 TON, 14 LOD-, 12 LOD+ y 14 COCE.

**Tabla 6. Distribución de las muestras en el TMA 272.**

	LS7	S1	N8	C12	C2	LC42	LS12	C11	C1	LC43	LS11	LS1	N12	N1
<b>A</b>	LS8	S2	N9	C13	C3	LC45	LS25	C12	C2	LC42	LS12	LS2	N14	N2
	LS9	S3	N10	C14	C4	LC46	LS26	C13	C3	LC45	LS25	LS3	N16	N3
	LS10	S4	N11	C15	C5	LC47	LC29	C14	C4	LC46	LS26	LS4	N17	N5
	LS11	LS1	N12	N1	C6		LC30	C15	C5	LC47	LC29	LS5	N18	N6
	<b>páncreas</b>	LS2	N14	N2	C7		LC31	<b>páncreas</b>	C6		LC30	LS6	N19	N7
	<b>amígdala</b>	LS3	N16	N3	C8		LC32	<b>amígdala</b>	C7		LC31	LS7	S1	N8
	<b>placenta</b>	LS4	N17	N5	C9		LC33	<b>placenta</b>	C8		LC32	LS8	S2	N9
	<b>riñón</b>	LS5	N18	N6	C10		LC34	<b>riñón</b>	C9		LC33	LS9	S3	N10
	<b>pulmón</b>	LS6	N19	N7	C11	C1	LC43	<b>pulmón</b>	C10		LC34	LS10	S4	N11

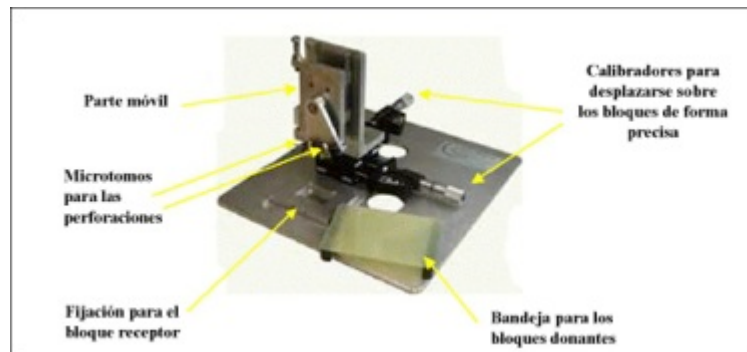
**Tabla 7. Distribución de las muestras en el TMA 273**

	LS16	S22	S11	C27	C17	LC39	LS21	C26	C16	LC38	LS20	S26	S15	S5
<b>A</b>	LS17	S23	S12	C28	C18	LC40	LS22	C27	C17	LC39	LS21	S27	S16	S6
	LS18	S24	S13	C29	C19	LC41	LS23	C28	C18	LC40	LS22	S28	S17	S7
	LS19	S25	S14		C20	LC44	LS24	C29	C19	LC41	LS23	LS13	S19	S8
	LS20	S26	S15	S5	C21	LC48	LS27		C20	LC44	LS24	LS14	S20	S9
	<b>pancreas</b>	S27	S16	S6	C22	LC49	LS28	<b>pancreas</b>	C21	LC48	LS27	LS15	S21	S10
	<b>amígdala</b>	S28	S17	S7	C23	LC50	LC35	<b>amígdala</b>	C22	LC49	LS28	LS16	S22	S11
	<b>placenta</b>	LS13	S19	S8	C24	LC51	LC36	<b>placenta</b>	C23	LC50	LC35	LS17	S23	S12
	<b>riñón</b>	LS14	S20	S9	C25		LC37	<b>riñón</b>	C24	LC51	LC36	LS18	S24	S13
	<b>pulmón</b>	LS15	S21	S10	C26	C16	LC38	<b>pulmón</b>	C25		LC37	LS19	S25	S14

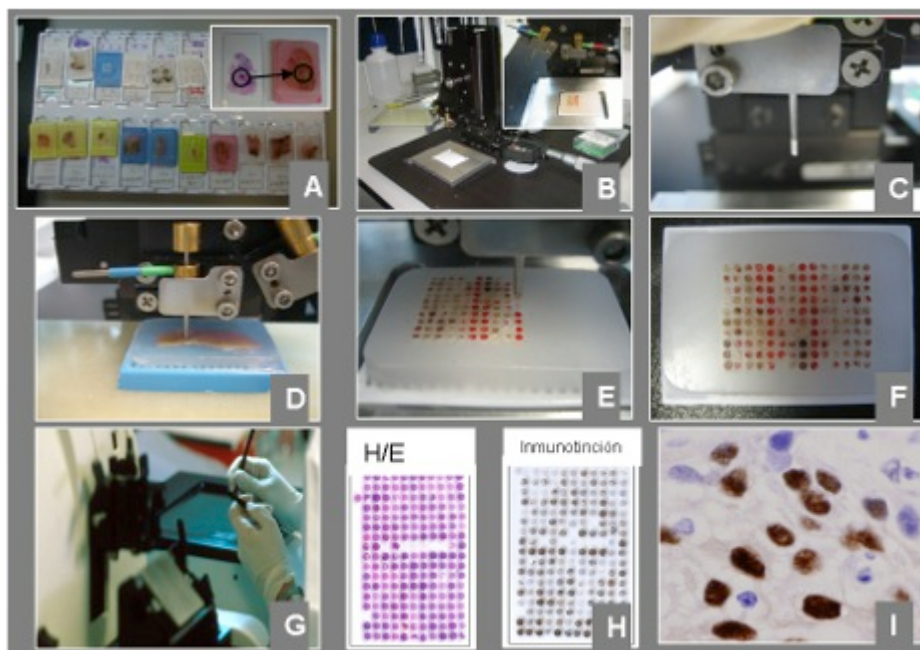
La fabricación de los TMAs se realizó mediante un aparato de *tissue microarray* manual (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) (**figura 9**), siguiendo la sistemática clásica (**figura 10**) (Huang y cols, 2005). Cada cilindro era de 1 mm de diámetro y estaba espaciado mediante

micrometría digital de sus vecinos 1,5 mm. Los dos *tissue microarray* fueron preparados por M. L. D. tras un entrenamiento por parte del personal del Servicio de Inmunohistoquímica del CNIO. Una vez terminado el proceso de transferencia de los cilindros, los *TMA*s fueron incubados durante 6 minutos a 64°C para facilitar la fusión de los cilindros de parafina con la del bloque receptor. Posteriormente fueron enfriados y cortados con un grosor de 3 micras. Una sección fue teñida con hematoxilina/eosina y el resto con la técnica de la inmunohistoquímica para cada una de las proteínas de estudio.

**Figura 9. Aparato manual para la fabricación de *TMA*s, de Beecher**



**Figura 10. Construcción y análisis de un *TMA* a partir de muestras fijadas en formaldehído y embebidas en parafina**



- A) Marcaje de la zona de interés en portaobjetos y parafinas. B) Fijación del bloque receptor en el microtomo. C) Confección del cilindro receptor. D) Toma de la región marcada. E) Colocación en el cilindro preconfeccionado. F) Recogida del resto de las muestras en el bloque receptor de la misma manera que los pasos A-E. G) Corte del *TMA*. H) Tinción con hematoxilina/eosina y/o inmunotinción. I) Visualización mediante microscopio de la tinción de cada uno de los cilindros.

## 5. TÉCNICA DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

Se analizó la inmunorreacción de todas las proteínas propuestas (actina, CDK4, CDK6, ciclina D1, DCR2, Dec1, E2F, hTERT, H-Ras, maspina, MDM2, p14<sup>ARF</sup>; p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup>, p53, , pRb, Rb, RAR-β). Estas proteínas, o bien forman parte de alguna de las vías que conducen a la senescencia celular, o bien son expresadas en células senescentes, permitiendo la identificación de esta células. También estudiamos Ki-67 como control, ya que nos indica si existe proliferación celular o no, en caso de que fallen los marcadores de células senescentes.

Primero se realizó la desparafinación e hidratación de las muestras. Se llevó a cabo una etapa *HIER (Heat-Induced Epitope Retrieval)* en una solución buffer de citrato de sodio, con una solución de citrato trisódico 0,01M o TE (Tris-EDTA) 1Mm, a pH=8. Se calentó posteriormente durante 20 minutos a 98°C en una estufa PT LINK de DAKO. Tras el calentamiento, las secciones fueron lavadas en agua fría circulante durante 5 minutos. Después se pasaron por *Tris-buffered-saline (TBS)* pH=7.4 y se incubaron con los anticuerpos correspondientes (**tabla 8**).

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, la inmunodetección se realizó con *EnVision-FLEX* de DAKO, con el cromógeno diaminobenzidina como sustrato. Para todo el proceso de inmunotinción se empleó el aparato automático *Autostainer Plus Link*, de DAKO.

La incubación omitiendo los anticuerpos específicos, así como la incubación incluyendo anticuerpos no relacionados fueron utilizados como control de la técnica.

Los clones seleccionados debían pasar, previamente a su empleo sobre las secciones de los *TMA*s, por un proceso de optimización que demuestre que son óptimos para su uso sobre el tejido estudiado. De todos ellos, no se consiguieron optimizar: H-RAS, DCR2, RAR-beta, CDK4 y DEC1, que quedaron descartados para la obtención de resultados concluyentes.

Tabla 8. Descripción de los anticuerpos utilizados para la inmunohistoquímica

Anticuerpo	Clon	Fuente
Ciclina D1	SP4	NeoMarkers
Maspina	Polyclonal rabbit	Santa Cruz
Actina	1A4	Dako
Rb	G3-245BD	BD PharMingen
pRb	Policlonal	Santa Cruz
p53	DO-7	Novocastra
MDM2	IF2	Calbiochem
Ki-67	MIB 1	DAKO
hTERT	44-F2	Novocastra
CDK6	98D-H8	CNIO
P14	Policlonal	Abcam
P15	SPM 303	Abcam
P16	E6H4	MTM
P21	EA10	Calbiochem
E2F	KH20-KH95	UPSTATE
H-RAS	No optimizado	
DCR2	No optimizado	
RAR-beta	No optimizado	
CDK4	No optimizado	
DEC1	No optimizado	

## 6. ANÁLISIS DE LOS TISSUE MICROARRAYS

Las secciones de cilindro que no contenían epitelio o aquellas con menos del 50% del tejido original se descartaron para el análisis de la inmunotinción, por considerarse muestras no representativas.

De los cilindros que quedaron intactos tras el proceso de la inmunohistoquímica, se analizó el grado de tinción en cada uno de ellos. Esto se realizó en la Unidad de Inmunohistoquímica del CNIO, mediante observación (a 10x, 40x y 100x) por microscopio óptico de cada uno de los cilindros de forma independiente. Fue llevada cabo por dos miembros del equipo (M. L. D y L. S. V.), cegados en todo momento a los datos clínicos de las muestras a analizar y calibrados de forma independiente.

Los grados de tinción determinados para cada uno de los marcadores son los descritos en la tabla (Tabla 9).

Los cilindros no representativos se marcaron con NV (no valorables). Sólo se excluyó la muestra completa cuando sus dos cilindros fueron no valorables.

Tabla 9. Cuantificación de la inmunotinción

Anticuerpo	Cuantificación de la inmunotinción
<b>Ciclina D1</b>	0= Ausencia total 1= Células basales 2= Células epiteliales no sólo basales
<b>Maspina</b>	0= Sólo citoplasma 1= <50% núcleos 2= > 50% núcleos
<b>Actina</b>	0= Negativo 1= <50% 2= >50%
<b>Rb</b>	0= <5% núcleos 1= <50% núcleos 2= >50% núcleos
<b>pRb</b>	0= <5% núcleos 1= <50% núcleos 2= >50% núcleos
<b>p53</b>	0= Ausencia total 1= <30% núcleos 2= 30-60% núcleos 3= >60% núcleos
<b>MDM2</b>	Positivo= >20% núcleos Negativo= <20% núcleos
<b>Ki-67</b>	0= <10% núcleos 1= 10-30% núcleos 2= 30-60% núcleos 3= >60% núcleos
<b>hTERT</b>	0 = Nada 1= Nucleolo débil 2= Nucleolo + núcleo
<b>CDK6</b>	0: negativo o muy débil 1: <50% núcleos 2: >50% núcleos
<b>P14</b>	0= Nada o sólo citoplasma 1= Nucleolo 2= Núcleo y nucleolo débil o pocos teñidos 3= Núcleo y nucleolo intenso o muchos teñidos
<b>P15</b>	0= Nada 1= Núcleo débil 2= Núcleo fuerte
<b>P16</b>	0 = negativo 1= + <30% núcleos 2= + >30% núcleos
<b>P21</b>	0 = < 20% 1= 20-50% 2= > 50%
<b>E2F</b>	0= Negativo 1=Positivo por debajo del epitelio 2=Positivo por encima del epitelio

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se trata de un estudio analítico observacional transversal, con cuatro grupos que pretenden representar las fases consecutivas de un proceso.

Consideramos a las variables de estudio de tipo ordinal, ya que pueden entenderse como categorías que tienen un orden o corresponden a un intervalo en el que la siguiente es mayor que la anterior. Es por ello que en el tratamiento estadístico, se tomarán a veces como variables cualitativas y a veces como cuantitativas. Las variables tienen escalas de dos a cuatro categorías, aunque pueden convertirse en variables binarias si se agrupan las categorías en positivo/negativo para cada una de las proteínas.

La base de datos fue diseñada en hojas de cálculo (Microsoft® Excel), posteriormente analizadas con el programa estadístico SPSS® (versión 15.0.1; SPSS Inc., Chicago, Illinois, EEUU) y Stat View® (versión 5.0.1, SAS Institute, Inc, NC, USA).

En primer lugar, se calcularon las medias y porcentajes para la estadística descriptiva.

Para determinar las diferencias de expresión de las proteínas entre los grupos, se utilizó la prueba Anova de un factor para comparar las medias intergrupo; y un test no paramétrico de comparaciones múltiples para determinar entre cuáles de ellos las diferencias eran estadísticamente significativas. Se tomaran como significativos los contrastes con p-valores < 0,05.

Las correlaciones estadísticas entre la expresión de los distintos marcadores entre sí se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Se empleó el análisis de clusters para determinar los perfiles de expresión de los marcadores proteicos en cada uno de los grupos de estudio.

## **RESULTADOS**

---

Los resultados se presentarán de manera que vayan contestando a los objetivos planteados.

## 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA DE ESTUDIO

En las tablas se recogen los datos clínicos e histopatológicos de los pacientes y muestras incluidas en el estudio.

### 1.1. Ausencia de homogeneidad entre los grupos en cuanto a factores demográficos

Como observamos en la **tabla 10**, la muestra no es homogénea en los distintos grupos de estudio en cuanto a la edad y al sexo. La edad media de los pacientes estudiados era de 58,7 años, siendo considerablemente mayores los de los grupos de leucoplasia con displasia y carcinoma, que corresponden a las etapas más avanzadas del proceso carcinogénico.

En cuanto al consumo de tabaco y alcohol, aparece de nuevo el mismo patrón, con una presencia mayor de fumadores y bebedores en los grupos representativos de etapas de la carcinogénesis oral que presentan ya alteraciones celulares (leucoplasias con displasia y carcinomas orales).

**Tabla 10. Características demográficas de los pacientes**

	MUESTRA TOTAL (N=123)	TEJIDO NORMAL (N=43)	LEUCOPLASIA SIN DISPLASIA (N=28)	LEUCOPLASIA CON DISPLASIA (N=23)	CARCINOMA (N=29)
<b>Edad</b>					
Media	58,7	49,2	47	65,4	68
<b>Sexo</b>					
Hombre	71 (57,7%)	22 (51,2%)	17 (60,7%)	12 (52,2%)	20 (69%)
Mujer	52 (42,3%)	21(48,8%)	11 (39,3%)	11 (47,8%)	9 (31%)
<b>Tabaco</b>					
Fumador		26 (60,5%)	15 (53,6%)	8 (34,8%)	8 (27,6%)
No fumador		16 (37,2%)	10 (35,7%)	4 (17,4%)	4 (13,8%)
Exfumador		1 (2,3%)	3 (10,7%)	11 (47,8%)	17 (58,6%)
<b>Alcohol</b>					
Sí		6 (14%)	8 (28,6%)	6 (26,1%)	11 (38%)
No		37 (86%)	20 (71,4%)	17 (73,9%)	18 (62%)

### 1.2. Localizaciones patológicas más frecuentes a nivel de lengua y suelo de la boca

Los tejidos normales procedían todos de encía, ya que se obtuvieron principalmente de cirugías periodontales resectivas que iban a desechar estos fragmentos. Sin embargo, las localizaciones más frecuentes para las lesiones potencialmente malignizables y para los carcinomas fueron la lengua y el suelo de la boca (**tabla 11**).

**Tabla 11. Localización de las muestras tomadas**

	MUESTRA TOTAL (N=123)	TEJIDO NORMAL (N=43)	LEUCOPLASIA SIN DISPLASIA (N=28)	LEUCOPLASIA CON DISPLASIA (N=23)	CARCINOMA (N=29)
<b>Localización</b>					
Encía	67 (54,5%)	43 (100%)	6 (21,5%)	7 (30,4 %)	11 (37,9%)
Lengua/suelo	39 (31,7%)		16 (57,1%)	7 (30,4%)	16 (55,2%)
Resto	17 (13,8%)		6 (21,4%)	9 (39,1%)	2 (6,9%)

### 1.3. Predominio de leucoplasias homogéneas y de displasia de grado leve

Más de la mitad de las leucoplasias analizadas eran homogéneas (53%), seguidas de las ulceradas (27,4%) y por último, de las exofíticas (19,6%). La distribución era homogénea al comparar entre sí las leucoplasias sin y con displasia. En cuanto al grado de displasia, casi dos tercios de las leucoplasias con displasia presentaban displasia leve (65,2%); una quinta parte, severa; y sólo el 13% mostraban displasia moderada (**tabla 12**).

**Tabla 12. Características de las leucoplasias**

	LEUCOPLASIA SIN DISPLASIA (N=28)	LEUCOPLASIA CON DISPLASIA (N=23)
<b>Tipo de leucoplasia</b>		
Exofítica	5 (17,9%)	5 (21,7%)
Ulcerada	8 (28,6%)	6 (26,1%)
Homogénea	15 (53,6%)	12 (52,2%)
<b>Tipo de displasia</b>		
Leve		15 (65,2%)
Moderada		3 (13%)
Severa		5 (21,7%)

#### 1.4. Carcinomas con estadios clínicos e histológicos variados (tabla 13)

La muestra de carcinomas es variada en cuanto a estadios clínicos e histológicos. El 41,4% eran carcinomas orales grandes, de entre dos y cuatro centímetros de diámetro (estadio T2), el 31% menores de dos centímetros (estadio T1) y el 27,5% tenían un tamaño superior a cuatro centímetros (correspondiente a los estadios T3 y T4 de la clasificación TNM). El 62,1 % de ellos no presentaba ganglios clínicamente afectados; y el 37,9% tenían alguno positivo, aunque menor de seis centímetros (estadios N1 y N2). En el momento del examen ninguno de los casos presentaba metástasis a distancia. La muestra de carcinomas prácticamente se dividía en cuartos en cuanto a estadios clínicos I, II, III y IV. Histológicamente, más de la mitad de los carcinomas orales de células escamosas eran moderadamente diferenciados, el 34,5% pobremente diferenciados y el 13,8% bien diferenciados.

**Tabla 13. Características de los carcinomas de células escamosas**

CARCINOMA (N=29)	
<b>Clasificación TNM</b>	
T1	9 (31,00%)
T2	12 (41,40%)
T3	5 (17,20%)
T4	3 (10,30%)
N0	18 (62,10%)
N1	5 (17,20%)
N2	6 (20,70%)
<b>Estadio clínico</b>	
I	7 (24,10%)
II	7 (24,10%)
III	7 (24,10%)
IV	8 (27,60%)
<b>Tipo histológico</b>	
G1	4 (13,80%)
G2	15 (51,70%)
G3	10 (34,50%)

## 2. EXPRESIÓN DE 19 PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LAS VÍAS DE SENESCENCIA EN LESIONES DE MUCOSA ORAL NORMAL, DE LEUCOPLASIA ORAL CON Y SIN DISPLASIA Y DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (ver tinciones en anexo 4)

Las proteínas CDK4, DCR2, Dec1, H-Ras y RAR- $\beta$  no pudieron ser optimizadas mediante inmunohistoquímica para los tejidos humanos orales y se descartaron para el análisis.

A continuación se desarrollan los resultados de la expresión de las proteínas **actina, CDK6, ciclina D1, E2F, hTERT, maspina, MDM2, p14ARF; p15INK4b, p16 INK4a, p21Waf1/Cip1/Sdi1, p53, pRb y Rb**. Se explicarán de tres maneras para cada uno de los marcadores:

- A través de una tabla que recoge los porcentajes de cada nivel de expresión de la proteína en cada uno de los grupos de estudio.
- Mediante una gráfica en la que se representan las medias de expresión de cada proteínas en los cuatro grupos de estudio (mucosa oral normal, leucoplasia oral sin displasia, leucoplasia oral con displasia y carcinoma oral de células escamosas) para ver su patrón de expresión.
- Con imágenes de las tinciones tomadas con microscopio y/o adquiridas mediante el escaneado y visualización de las muestras con el software OlyVIA (OlyVIA 2.4 de OLYMPUS).

Como podemos observar (**figuras 11 a 24, tablas 14 a 27 y anexo 4**), hay cinco patrones distintos de expresión de las proteínas relacionadas con la senescencia en los grupos de tejidos normales, leucoplasia sin displasia, leucoplasia con displasia y carcinoma:

- Progresivamente ascendente: CDK6 (mayor expresión en leucoplasias y carcinomas), ciclina D1 (lineal).
- Ascendente con leve disminución en la fase de leucoplasia con displasia: p53, Rb.
- Ascendente con disminución en la fase de leucoplasia sin displasia: Actina.
- Meseta (con expresión aumentada en las etapas de leucoplasia y disminuida en tejido sano y carcinoma): maspina, MDM2, p14, p15, p16, p21, pRb.
- Progresivamente descendente: E2F (lineal), hTERT (expresión similar en normales y leucoplasias y disminuida en carcinomas)

## Expresión de actina

Figura 11. Patrón de expresión de actina

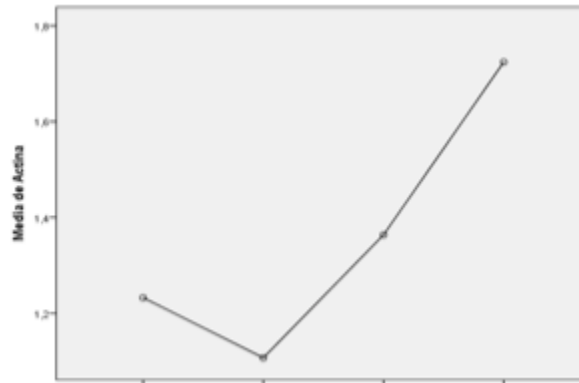


Tabla 14. Expresión de actina

	GRADO DE TINCIÓN- Actina		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal</b>	0 (0%)	33 (76,7%)	10 (23,3%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	1 (3,6%)	23 (82,1%)	4 (14,3%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	0 (0%)	14 (63,6%)	8 (36,4%)
<b>Carcinoma</b>	0 (0%)	8 (27,6%)	21 (72,4%)

\*Valores ausentes (N=1)

## Expresión de CDK6

Figura 12. Patrón de expresión de CDK6

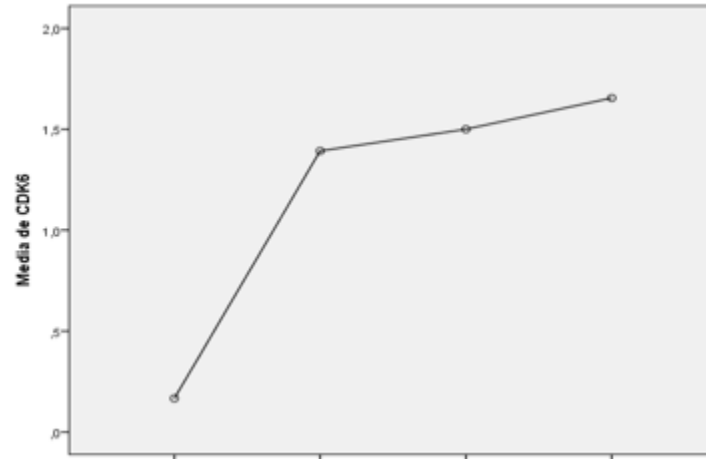


Tabla 15. Expresión de CDK6

	GRADO DE TINCIÓN- CDK6		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal *</b>	35 (83,3%)	7 (16,7%)	0 (0%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	4 (14,3%)	9 (32,1%)	15 (53,6%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	0 (0%)	10 (50%)	10 (50%)
<b>Carcinoma</b>	2 (6,9%)	6 (20,7%)	21 (72,4%)

\*Valores ausentes (N=4)

## Expresión de ciclina D1

Figura 13. Patrón de expresión de ciclina D1

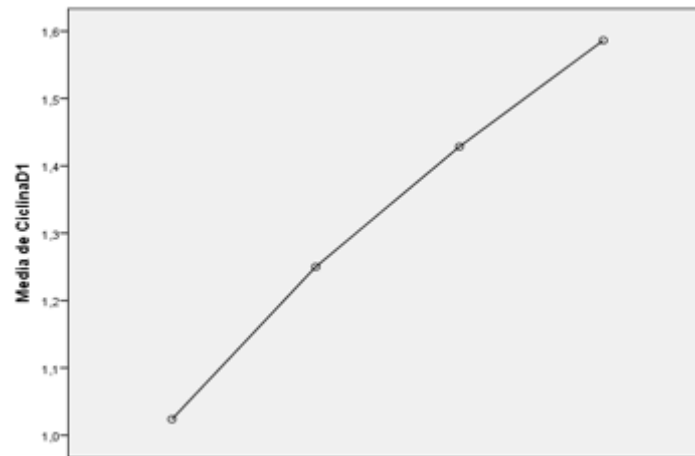


Tabla 16. Expresión de ciclina D1

	GRADO DE TINCIÓN- CICLINA D1		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal *</b>	0 (0%)	41 (97,6%)	1 (2,4%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	0 (0%)	21 (75%)	7 (25%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	0 (0%)	12 (57,1%)	9 (42,9%)
<b>Carcinoma</b>	1 (3,4%)	10 (34,5%)	18 (62,1%)

\*Valores ausentes (N=3)

## Expresión de E2F1

Figura 14. Patrón de expresión de E2F1

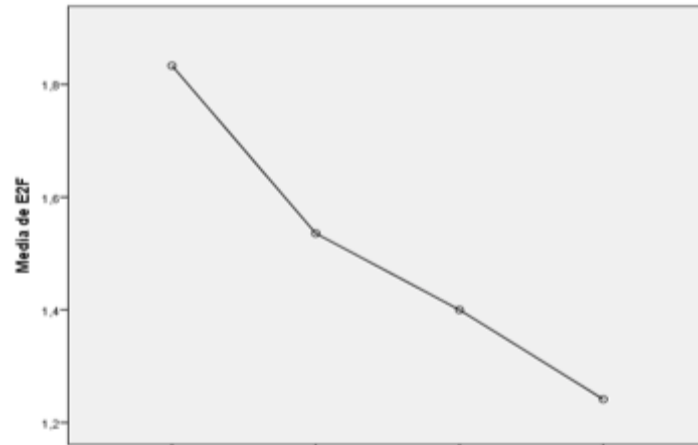


Tabla 17. Expresión de E2F1

	GRADO DE TINCIÓN- E2F		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal *</b>	2 (4,8%)	3 (7,1%)	37 (88,1%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	3 (10,7%)	7 (25%)	18 (64,3%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	4 (20%)	4 (20%)	12 (60%)
<b>Carcinoma</b>	4 (13,8%)	14 (48,3%)	11 (37,9%)

\*Valores ausentes (N=4)

## Expresión de hTERT

Figura 15. Patrón de expresión de hTERT

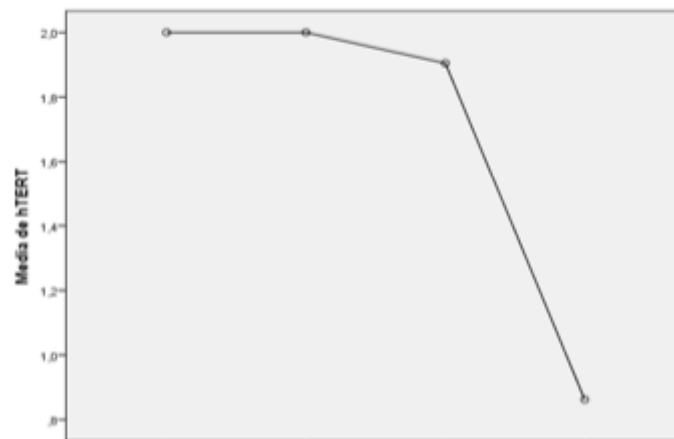


Tabla 18. Expresión de hTERT

	GRADO DE TINCIÓN- hTERT		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal *</b>	0 (0%)	0 (0%)	42 (100%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	0 (0%)	0 (0%)	28 (100%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	1 (4,8%)	0 (0%)	20 (95,2%)
<b>Carcinoma</b>	9 (31%)	15 (51,7%)	5 (17,3%)

\*Valores ausentes (N=3)

## Expresión de maspina

Figura 16. Patrón de expresión de maspina

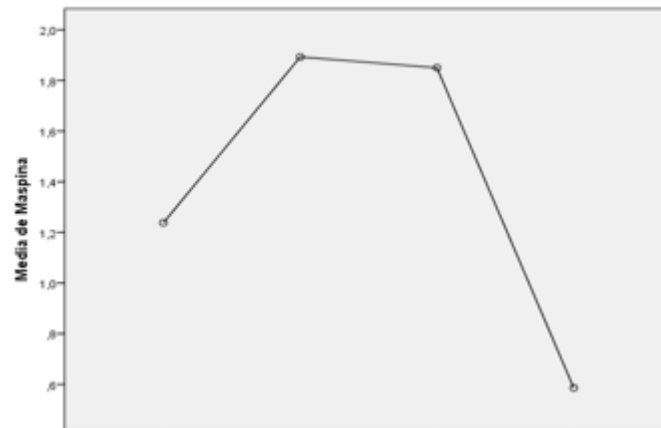


Tabla 19. Expresión de maspina

	GRADO DE TINCIÓN- MASPINA		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal *</b>	1 (2,4%)	30 (71,4%)	11 (26,2%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	0 (0%)	3 (10,7%)	25 (89,3%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	0 (0%)	3 (15%)	17 (85%)
<b>Carcinoma</b>	13 (44,8%)	15 (51,7%)	1 (3,4%)

\*Valores ausentes (N=4)

## Expresión de MDM2

Figura 17. Patrón de expresión de MDM2

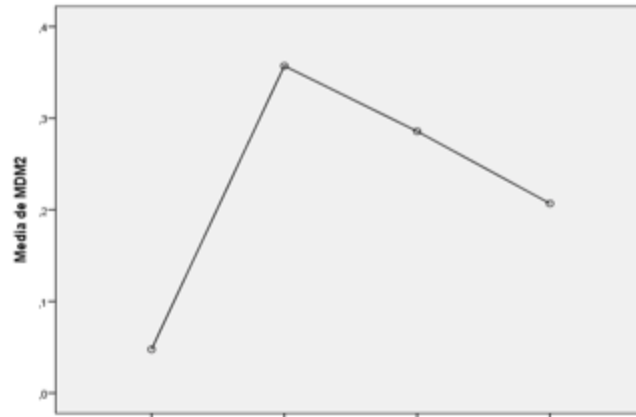


Tabla 20. Expresión de MDM2

	GRADO DE TINCIÓN-MDM2	
	0	1
<b>Tejido oral normal *</b>	40 (95,2%)	2 (4,8%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	18 (64,3%)	10 (35,7%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	15 (71,4%)	6 (28,6%)
<b>Carcinoma</b>	23 (79,3%)	6 (20,7%)

\*Valores ausentes (N=3)

## Expresión de p14ARF

Figura 18. Patrón de expresión de p14ARF

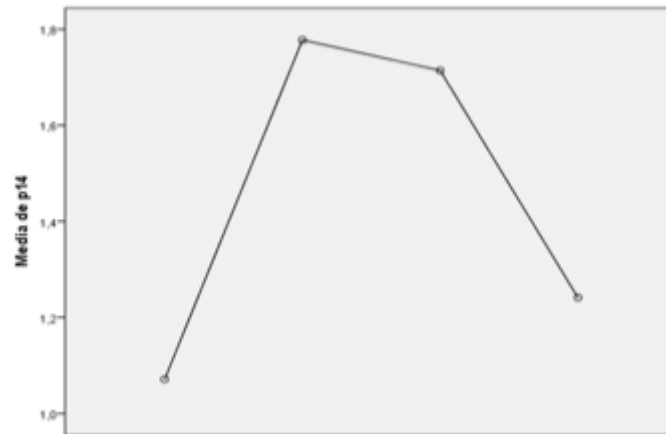


Tabla 21. Expresión de p14ARF

	GRADO DE TINCIÓN- p14			
	0	1	2	3
<b>Tejido oral normal *</b>	0 (0%)	39 (92,9%)	3 (7,1%)	0 (0%)
<b>Leucoplasia sin displasia *</b>	0 (0%)	7 (25,9%)	19 (70,4%)	1 (3,7%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	0 (0%)	6 (28,6%)	15 (71,4%)	0 (0%)
<b>Carcinoma</b>	8 (27,6%)	9 (31%)	9 (31%)	3 (10,4%)

\*Valores ausentes (N=4)

## Expresión de p15INK4b

Figura 19. Patrón de expresión de p15INK4b

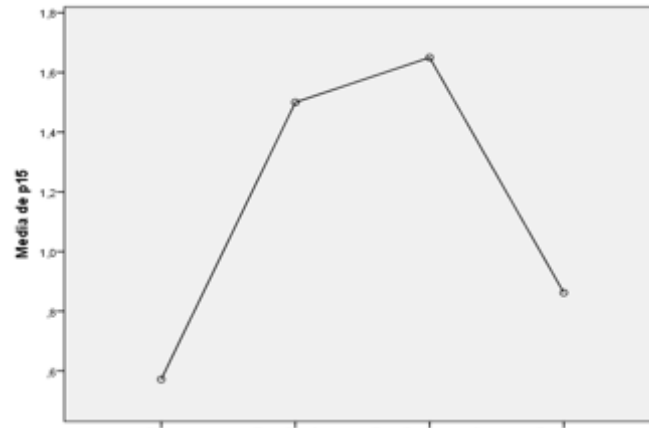


Tabla 22. Expresión de p15INK4b

	GRADO DE TINCIÓN- p15		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal *</b>	20 (47,6%)	20 (47,6%)	2 (4,8%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	4 (14,3%)	6 (21,4%)	18 (64,3%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	0 (0%)	7 (35%)	13 (65%)
<b>Carcinoma</b>	10 (34,5%)	13 (44,8%)	6 (20,7%)

\*Valores ausentes (N=4)

## Expresión de p16INK4a

Figura 20. Patrón de expresión de p16 INK4a



Tabla 23. Expresión de p16 INK4a

	GRADO DE TINCIÓN- p16		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal</b>	36 (83,7%)	7 (16,3%)	0 (0%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	19 (67,9%)	9 (32,1%)	0 (0%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	13 (59,1%)	9 (40,9%)	0 (0%)
<b>Carcinoma</b>	22 (75,9%)	6 (20,7%)	1 (3,4%)

\*Valores ausentes (N=1)

## Expresión de p21CIP1

Figura 21. Patrón de expresión de p21 CIP1

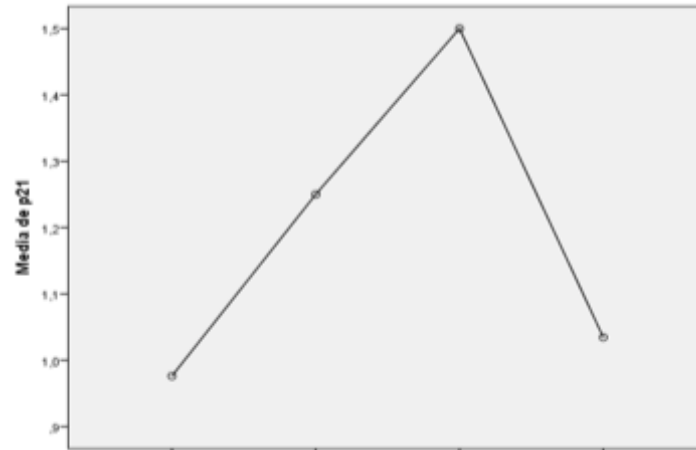


Tabla 24. Expresión de p21 CIP1

	GRADO DE TINCIÓN- p21		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal *</b>	19 (45,2%)	5 (11,9%)	18 (42,9%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	5 (17,9%)	11 (39,3%)	12 (42,9%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	2 (10%)	6 (30%)	12 (60%)
<b>Carcinoma</b>	11 (37,9%)	6 (20,7%)	12 (41,4%)

\*Valores ausentes (N=4)

## Expresión de p53

Figura 22. Patrón de expresión de p53

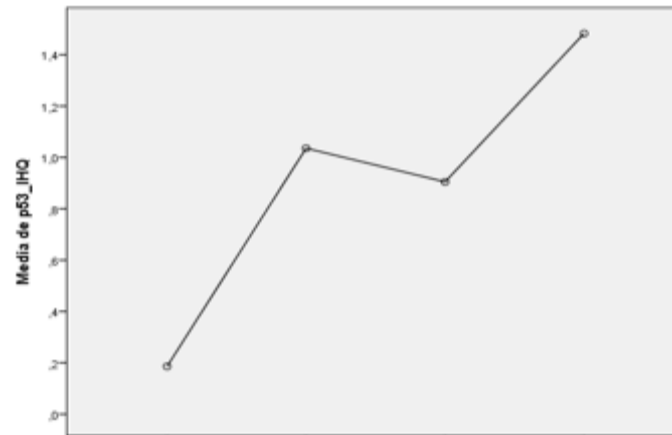


Tabla 25. Expresión de p53

	GRADO DE TINCIÓN- p53			
	0	1	2	3
Tejido oral normal	35 (81,4%)	8 (18,6%)	0 (0%)	0 (0%)
Leucoplasia sin displasia	6 (21,4%)	18 (64,3%)	1 (3,6%)	3 (10,7%)
Leucoplasia con displasia *	8 (38,1%)	8 (38,1%)	4 (19%)	1 (4,8%)
Carcinoma	9 (31%)	6 (20,7%)	5 (17,3%)	9 (31%)

\*Valores ausentes (N=2)

## Expresión de pRb

Figura 23. Patrón de expresión de pRb



Tabla 26. Expresión de pRb

	GRADO DE TINCIÓN- pRb		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal</b>	0 (0%)	13 (30,2%)	30 (69,8%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	0 (0%)	1 (3,6%)	27 (96,4%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	0 (0%)	0 (0%)	21 (100%)
<b>Carcinoma</b>	1 (3,4%)	5 (17,2%)	23 (79,3%)

\*Valores ausentes (N=2)

## Expresión de Rb

Figura 24. Patrón de expresión de Rb

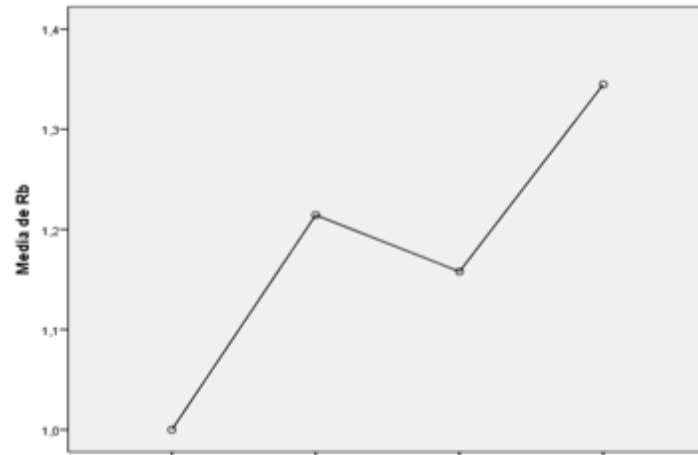


Tabla 27. Expresión de Rb

	GRADO DE TINCIÓN- Rb		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal *</b>	6 (14,6%)	29 (70,7%)	6 (14,6%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	1 (3,6%)	20 (71,4%)	7 (25%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	0 (0%)	16 (84,2%)	3 (15,8%)
<b>Carcinoma</b>	5 (17,3%)	9 (31%)	15 (51,7%)

\*Valores ausentes (N=6)

### 3. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CADA PROTEÍNA ENTRE LOS CUATRO GRUPOS DE ESTUDIO PARA DETERMINAR SI EXISTE UNA EXPRESIÓN DIFERENCIAL SIGNIFICATIVA ENTRE ELLOS

Se utilizó la prueba estadística ANOVA de un factor para la comparación de las medias de expresión de cada una de las proteínas entre los cuatro grupos (tejido normal, leucoplasia sin displasia, leucoplasia con displasia y carcinoma). Con ello se pretendía determinar si realmente estas proteínas se expresan de manera diferencial en las distintas etapas de la carcinogénesis. Las proteínas que mostraron diferencias de expresión significativas entre los grupos son, ordenadas de mayores a menores diferencias intergrupo totales (mayor diferencia en la expresión a mayor valor de F):

- **hTERT** (F=61,7), **CDK6** (F= 54), **maspina** (F=49,2), **p15** (F=18,3), **p53** (F=14,5), **ciclina D1** (F=11,3), **actina** (F=10,7), **p14** (F=10,4), **E2F** (F=5,2), **pRb** (F=4,5) y **MDM2** (F=4,05).

No mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio las siguientes proteínas:

- Rb, p21, y p16.

Al no expresarse estas proteínas de manera diferencial en nuestros grupos de estudio, las descartaremos como marcadores desde este momento.

Para determinar entre qué grupos se hallan estas diferencias significativas, se utilizó un test no paramétrico de comparaciones múltiples. En las tablas aparecen reflejados los grupos entre los que se hallaron diferencias estadísticamente significativas para cada una de las proteínas estudiadas. Las proteínas han sido agrupadas en tablas según su patrón de expresión, para facilitar el análisis. Por lo tanto, al comparar la expresión de las proteínas entre los grupos (**tablas 28 a 32**), encontramos las siguientes diferencias de expresión estadísticamente significativas (DES):

- DES entre los grupos de tejido oral sano y leucoplasia sin displasia para las proteínas: CDK6, p53, maspina, MDM2, p14, p15.
- DES entre los grupos de tejido oral sano y leucoplasia con displasia para las proteínas: CDK6, ciclina D1, p53, maspina, p14, p15.
- DES entre los grupos de tejido oral sano y carcinoma oral de células escamosas para las proteínas: CDK6, ciclina D1, p53, actina, maspina, E2F, hTERT.
- DES entre los grupos de leucoplasia sin displasia y leucoplasia con displasia para las proteínas: Ninguna proteína mostró DES al comparar estos grupos.
- DES entre los grupos de leucoplasia sin displasia y carcinoma oral de células escamosas para las proteínas: ciclina D1, actina, maspina, p14, p15.
- DES entre los grupos de leucoplasia con displasia y carcinoma oral de células escamosas para las proteínas: actina, maspina, p14, p15, hTERT.

**Tabla 28. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con una expresión progresivamente ascendente (CDK6, ciclina D1)**

Grupos a comparar		Proteína (P valor)	
		CDK6	Ciclina D1
Tejido sano	Leucoplasia sin displasia	0.00000*	0.11274
Tejido sano	Leucoplasia con displasia	0.00000*	0.00958*
Tejido sano	Carcinoma	0.00000*	0.00008*
Leucoplasia sin displasia	Leucoplasia con displasia	0.70227	0.28996
Leucoplasia sin displasia	Carcinoma	0.38187	0.03375*
Leucoplasia con displasia	Carcinoma	0.68305	0.37504

\* Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados

**Tabla 29. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con una leve disminución en la fase de leucoplasia con displasia (Rb, p53)**

Grupos a comparar		Proteína (P valor)	
		Rb	p53
Tejido sano	Leucoplasia sin displasia	0.21911	0.00006*
Tejido sano	Leucoplasia con displasia	0.46231	0.00288*
Tejido sano	Carcinoma	0.02977*	0.00000*
Leucoplasia sin displasia	Leucoplasia con displasia	0.74343	0.52391
Leucoplasia sin displasia	Carcinoma	0.40072	0.50242
Leucoplasia con displasia	Carcinoma	0.27795	0.20550

\* Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados

**Tabla 30. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con disminución en la fase de leucoplasia sin displasia (actina)**

Grupos a comparar		Proteína (P valor)
		Actina
Tejido sano	Leucoplasia sin displasia	0.42543
Tejido sano	Leucoplasia con displasia	0.39221
Tejido sano	Carcinoma	0.00077*
Leucoplasia sin displasia	Leucoplasia con displasia	0.14249
Leucoplasia sin displasia	Carcinoma	0.00016*
Leucoplasia con displasia	Carcinoma	0.04033*

\* Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados

**Tabla 31. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con expresión “tipo meseta” (aumentada en las etapas de leucoplasia y disminuida en sano y carcinoma) (maspina, MDM2, pRb, p14, p15, p16, p21)**

Grupos a comparar		Proteína (P valor)						
		Maspina	MDM2	pRb	p14	p15	p16	p21
Tejido sano	Leucoplasia sin displasia	0.00006*	0.02865*	0.06033	0.00002*	0.00000*	0.26367	0.28701
Tejido sano	Leucoplasia con displasia	0.00072*	0.12438	0.05203	0.00019*	0.00000*	0.10790	0.04733*
Tejido sano	Carcinoma	0.00206*	0.25516	0.64941	0.18952	0.09944	0.41679	0.84338
Leucoplasia sin displasia	Leucoplasia con displasia	0.82351	0.66953	0.83237	0.81604	0.55434	0.59856	0.34050
Leucoplasia sin displasia	Carcinoma	0.00000*	0.32800	0.18539	0.00458*	0.00578*	0.76580	0.41863
Leucoplasia con displasia	Carcinoma	0.00000*	0.63517	0.15048	0.01616*	0.00186*	0.41609	0.08858

\* Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados

**Tabla 32. Valores P para las diferencias de expresión de las proteínas con una expresión progresivamente descendente (E2F, hTERT)**

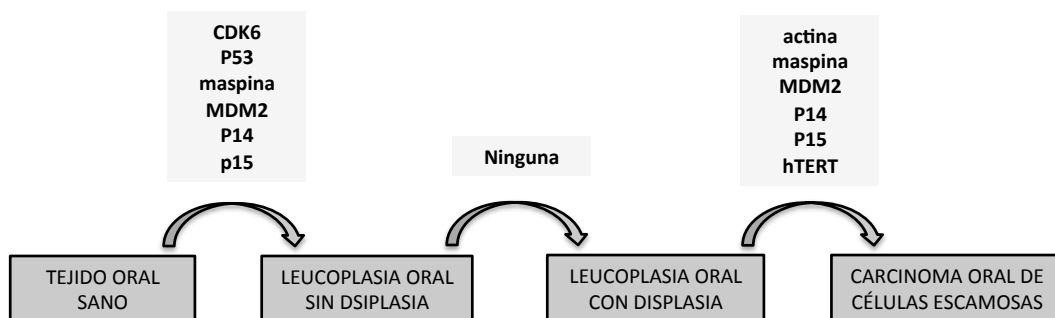
Grupos a comparar		Proteína (P valor)	
		E2F	hTERT
Tejido sano	Leucoplasia sin displasia	0.09930	1.00000
Tejido sano	Leucoplasia con displasia	0.05372	0.72976
Tejido sano	Carcinoma	0.00042*	0.00000*
Leucoplasia sin displasia	Leucoplasia con displasia	0.67696	0.74911
Leucoplasia sin displasia	Carcinoma	0.09359	0.00000*
Leucoplasia con displasia	Carcinoma	0.26970	0.00001*

\* Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados

Para sintetizar estos resultados e ir acotando la selección de proteínas que podrían servir de marcadores de senescencia en la carcinogénesis oral, hemos subrayado los grupos que corresponden a las fases consecutivas de la carcinogénesis, y resaltado en **negrita** las proteínas que se expresan con diferencias significativas (DES) al pasar de una fase a otra (**figura 25**):

- DES entre los grupos de tejido oral sano y leucoplasia sin displasia para las proteínas: **CDK6, p53, maspina, MDM2, p14, p15.**
- DES entre los grupos de leucoplasia sin displasia y leucoplasia con displasia para las proteínas: **Ninguna proteína mostró DES al comparar estos grupos.**
- DES entre los grupos de leucoplasia con displasia y carcinoma oral de células escamosas para las proteínas: **actina, maspina, p14, p15, hTERT.**

**Figura 25. Representación de las proteínas con expresión diferencial (estadísticamente significativa) entre las fases consecutivas de la carcinogénesis oral**



#### 4. MUESTRAS QUE PRESENTARÍAN UN ESTADO SENESCENTE BASÁNDONOS EN UNA EXPRESIÓN BAJA DE Ki67 JUNTO CON UNA EXPRESIÓN ALTA DE p16

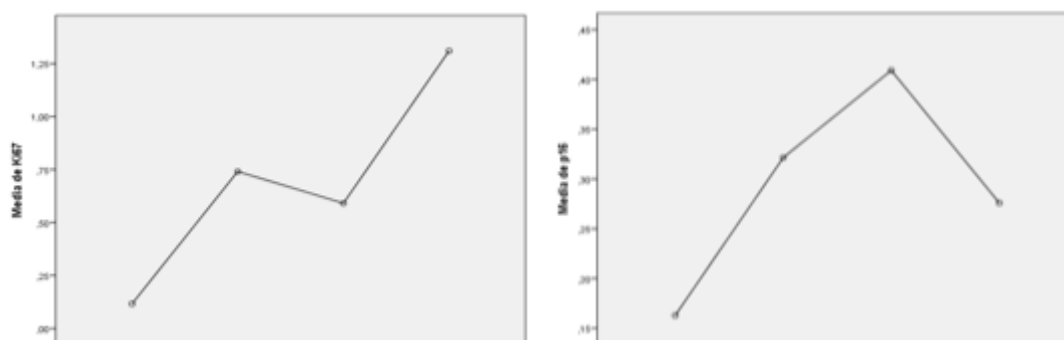
En las **tablas 33 y 34** y en la **figura 26** se muestra la expresión del marcador de proliferación tisular ki-67 y la de la proteína p16 en los cuatros grupos de estudio.

Para la cuantificación de la tinción, tomaremos como valores bajos de proliferación tisular los grados 0 y 1 de ki-67, y como valores altos los grados 2 y 3. En cuanto a p16, esta proteína tiene una expresión basal, que aumenta en ausencia de p53 (Rowland y cols 2002). Por tanto, tomaremos como negativo los valores 0, como expresión basal los valores 1, y como expresión alta, los valores 2. Las correspondencias están en la **tabla 35**.

Si consideramos que aquellos tejidos orales que tengan una expresión baja del factor de proliferación celular ki-67 coincidente con una expresión alta de la proteína p16 presentarán senescencia, los resultados son los siguientes para los cuatro grupos de estudio:

No encontramos coincidencia de estos dos eventos en ninguna de las muestras analizadas. Es decir, a) o ninguna de las 123 muestras presenta senescencia, ni siquiera las de los desórdenes potencialmente malignizables; b) el análisis de estos dos marcadores no permite determinar un estado tisular senescente; o c) la inmunotinción para alguna de las dos proteínas no está bien optimizada.

**Figura 26. Representación gráfica de la expresión del marcador de proliferación tisular ki-67 y del supresor tumoral p16 en distintas etapas consecutivas de la carcinogénesis oral**



**Tabla 33. Representación gráfica de la expresión del marcador de proliferación tisular ki-67 en distintas etapas consecutivas de la carcinogénesis oral**

	GRADO DE TINCIÓN- ki67			
	0	1	2	3
<b>Tejido oral normal</b>	38 (88,4%)	5 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Leucoplasia sin displasia *</b>	10 (37%)	14 (51,9%)	3 (11,1%)	0 (0%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	11 (50%)	9 (40,9%)	2 (9,1%)	0 (0%)
<b>Carcinoma</b>	5 (17,2%)	12 (41,4%)	10 (34,5%)	2 (6,9%)

\*Valores ausentes (N=2)

**Tabla 34. Representación gráfica de la expresión del supresor tumoral p16 en distintas etapas consecutivas de la carcinogénesis oral**

	GRADO DE TINCIÓN- p16		
	0	1	2
<b>Tejido oral normal</b>	36 (83,7%)	7 (16,3%)	0 (0%)
<b>Leucoplasia sin displasia</b>	19 (67,9%)	9 (32,1%)	0 (0%)
<b>Leucoplasia con displasia *</b>	13 (59,1%)	9 (40,9%)	0 (0%)
<b>Carcinoma</b>	22 (75,9%)	6 (20,7%)	1 (3,4%)

\*Valores ausentes (N=1)

**Tabla 35. Cuantificación de la inmunotinción de ki-67 y p16**

Anticuerpo	Cuantificación de la inmunotinción	
<b>Ki-67</b>	0= <10% núcleos	Bajo
	1= 10-30% núcleos	
	2= 30-60% núcleos	Alto
	3= >60% núcleos	
<b>P16</b>	0 = negativo	Negativo
	1= + <30% núcleos	Basal
	2= + >30% núcleos	Alto

## 5. CORRELACIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE LA CARCINOGENÉISIS ORAL

El análisis de la expresión de todas estas proteínas de las distintas vías de senescencia simultáneamente sobre los mismos tejidos nos brinda una oportunidad para determinar las interrelaciones que se producen entre ellas (compensaciones, efectos sinérgicos, correlaciones negativas, etc).

Estudiaremos, por tanto, las correlaciones entre ellas a varios niveles: a) globalmente en toda la muestra de estudio, sin separar por grupo; b) en tejidos orales sanos; c) en leucoplasias orales sin displasia; d) en leucoplasias orales con displasia, e) en carcinomas orales de células escamosas (**tablas 36 a 40**). Se consideran correlaciones fuertes aquellas con valores absolutos mayores de 0,5 (marcadas en rosa más intenso). Las correlaciones negativas aparecen en rojo.

- a) A nivel global de toda la muestra, existe correlación positiva fuerte entre: maspina-hTERT, maspina- p15, pRb-p15, p53-CDK6, p14-p15 y p15-CDK6. Y la correlación es negativa, con valores razonablemente altos, aunque sin superar valores absolutos de 0,5, entre: ciclina D1-hTERT, actina-hTERT, CDK6-hTERT (**tabla 36**).
- b) En tejidos orales sanos, aparece correlación positiva fuerte entre: Rb-pRb, Rb-p21, pRb-p21 y pRb-p15. No hay correlaciones negativas en este grupo (**tabla 37**).
- c) En el grupo de leucoplasias sin displasia, se dan correlaciones fuertes entre: ciclina D1-Rb, ciclina D1-MDM2, maspina-pRb, maspina-p21, maspina-p15, Rb-p53, Rb-MDM2, p53-CDK6, MDM2-p15, MDM2-CDK6, p21-CDK6, p14-p15, p15-CDK6. No existen correlaciones negativas (**tabla 38**).
- d) En las leucoplasias con displasia hay un menor número de proteínas correlacionadas estadísticamente. La correlación es fuerte y positiva entre maspina y p21; y es fuerte pero negativa entre p53-p14 (**tabla 39**).
- e) En los carcinomas de células escamosas se dan correlaciones potentes y sólo positivas entre: pRb-p14, p53-p15, hTERT-p15, p14-p15, p15-CDK6 (**tabla 40**).

Tabla 36. Correlaciones globales entre las proteínas

			CiclinaD1	Maspina	Rb	pRb	p53_IHQ	MDM2	Ki67	p21	Actina	E2F	p16	hTERT	p14	p15	CDK6
Rho de Spearman	CiclinaD1	Coefficiente de correlación	1,000	-,107	,382	,120	,427	,246	,416	,202	,229	-,036	,054	<b>-,338</b>	,128	,250	,424
		Sig. (bilateral)	.	,247	,000	,195	,000	,007	,000	,027	,012	,699	,557	,000	,167	,006	,000
	N	120	118	117	119	120	119	119	119	119	120	118	120	119	118	118	119
	Maspina	Coefficiente de correlación	-,107	1,000	,017	,343	,061	,233	-,115	,276	<b>-,184</b>	,186	,128	<b>,538</b>	,359	<b>,533</b>	,118
		Sig. (bilateral)	,247	.	,855	,000	,511	,011	,216	,003	,045	,044	,165	,000	,000	,000	,202
	N	118	119	117	119	118	119	118	117	118	119	118	119	119	118	119	118
	Rb	Coefficiente de correlación	,382	,017	1,000	,355	,233	,165	,444	,398	,184	-,045	,122	-,127	,053	,263	,413
		Sig. (bilateral)	,000	,855	.	,000	,011	,076	,000	,000	,047	,633	,191	,173	,573	,004	,000
	N	117	117	117	117	117	117	116	116	117	116	116	117	116	117	117	117
	pRb	Coefficiente de correlación	,120	,343	,355	1,000	,219	,170	,170	,376	-,028	,006	,105	,124	,351	<b>,504</b>	,354
		Sig. (bilateral)	,195	,000	,000	.	,016	,064	,064	,000	,759	,950	,254	,178	,000	,000	,000
	N	119	119	117	121	120	119	120	118	121	119	121	121	118	119	119	119
	p53_IHQ	Coefficiente de correlación	,427	,061	,233	,219	1,000	,328	,428	,230	,234	-,059	,155	<b>-,285</b>	,293	,467	<b>,583</b>
		Sig. (bilateral)	,000	,511	,011	,016	.	,000	,000	,012	,010	,523	,090	,002	,001	,000	,000
	N	120	118	117	120	121	119	120	119	121	121	118	121	119	118	119	119
	MDM2	Coefficiente de correlación	,246	,233	,165	,170	,328	1,000	-,171	,224	,065	,076	,212	-,010	,305	,178	,300
		Sig. (bilateral)	,007	,011	,076	,064	,000	.	,062	,015	,478	,416	,020	,918	,001	,000	,001
N	119	119	119	119	120	119	120	119	118	120	118	120	119	119	119	118	
Ki67	Coefficiente de correlación	,416	-,115	,444	-,170	,428	-,171	1,000	-,111	,087	<b>-,228</b>	-,034	<b>-,349</b>	,163	,326	<b>,535</b>	
	Sig. (bilateral)	,000	,216	,000	,064	,000	,062	.	,233	,344	,013	,713	,000	,078	,000	,000	
N	119	118	116	120	120	119	121	118	121	118	121	121	119	118	118	118	
p21	Coefficiente de correlación	,202	,276	,398	,376	,230	,224	,111	1,000	,178	,211	,223	,065	,126	,293	,293	
	Sig. (bilateral)	,027	,003	,000	,000	,012	,015	,233	.	,052	,022	,015	,487	,176	,001	,001	
N	119	117	116	118	119	118	118	119	119	119	117	119	118	117	117	118	
Actina	Coefficiente de correlación	,229	-,184	,184	-,028	,234	,065	-,087	,178	1,000	-,029	,155	<b>-,307</b>	-,175	-,004	,208	
	Sig. (bilateral)	,012	,045	,047	,759	,010	,478	,344	,052	.	,757	,089	,001	,058	,966	,023	
N	120	119	117	121	121	120	121	121	119	122	119	122	120	119	119	119	
E2F	Coefficiente de correlación	-,036	,186	-,045	,006	-,059	,076	-,228	,211	-,029	1,000	,036	,306	-,058	,048	<b>-,193</b>	
	Sig. (bilateral)	,699	,044	,633	,950	,523	,416	,013	,022	,757	.	,695	,001	,534	,604	,036	
N	118	118	116	119	118	118	118	118	117	119	119	119	119	117	118	118	
p16	Coefficiente de correlación	,054	,128	,122	-,105	,155	,212	-,034	,223	,155	,036	1,000	,023	,189	,176	,209	
	Sig. (bilateral)	,557	,165	,191	,254	,090	,020	,713	,015	,089	,695	.	,803	,040	,055	,022	
N	120	119	121	121	121	120	121	121	119	122	119	122	120	119	119	119	
hTERT	Coefficiente de correlación	-,338	,538	-,127	,124	-,285	-,010	-,349	,065	-,307	,306	,023	1,000	,189	,208	<b>-,309</b>	
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,173	,178	,002	,918	,000	,487	,001	,001	,803	.	,040	,023	,001	
N	119	119	117	120	119	119	119	119	118	120	119	120	120	118	119	119	
p14	Coefficiente de correlación	,128	,359	,053	,351	,293	,305	,163	,126	-,175	-,058	,189	,189	1,000	<b>,638</b>	,450	
	Sig. (bilateral)	,167	,000	,573	,000	,001	,001	,078	,176	,058	,534	,040	,040	.	,000	,000	
N	118	118	116	118	118	119	118	118	117	117	119	118	119	118	118	117	
p15	Coefficiente de correlación	,250	,533	,263	,504	,467	,378	,326	,293	-,004	,048	,176	,208	,638	1,000	,601	
	Sig. (bilateral)	,006	,000	,004	,000	,000	,000	,000	,001	,966	,604	,055	,023	,000	.	,000	
N	118	119	117	119	118	119	118	117	119	119	118	119	118	118	119	118	
CDK6	Coefficiente de correlación	,424	,118	,413	,354	,583	,300	,535	,293	,208	-,193	,209	-,309	,450	,601	1,000	
	Sig. (bilateral)	,000	,202	,000	,000	,000	,001	,000	,001	,023	,036	,022	,001	,000	,000	.	
N	119	118	117	119	119	119	118	118	118	119	118	119	119	117	118	119	



Tabla 38. Correlación entre las proteínas en el grupo leucoplasia oral sin displasia

			CiclinaD1	Maspina	Rb	pRb	p53_IHQ	MDM2	Ki67	p21	Actina	E2F	p16	hTERT	p14	p15	CDK6
Rho de Spearman	CiclinaD1	Coefficiente de correlación	1,000	,200	,778	,111	,474	,775	,458	,364	,046	,060	,132		,245	,420	,380
		Sig. (bilateral)	.	,308	,000	,574	,011	,000	,016	,057	,816	,761	,502	.	,218	,026	,046
		N	28	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28
	Maspina	Coefficiente de correlación	,200	1,000	,354	,556	,353	,258	-,141	,533	,354	,253	,238	.	,323	,605	,468
		Sig. (bilateral)	,308	.	,065	,002	,066	,185	,482	,003	,064	,194	,222	.	,101	,001	,012
		N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28
	Rb	Coefficiente de correlación	,778	,354	1,000	,408	,530	,597	,458	,425	,190	,120	,162	.	,196	,489	,393
		Sig. (bilateral)	,000	,065	.	,031	,004	,001	,016	,024	,332	,543	,410	.	,327	,008	,038
		N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28
	pRb	Coefficiente de correlación	,111	,556	,408	1,000	,308	,143	.	,296	,483	,211	,132	.	-,095	,336	,145
		Sig. (bilateral)	,574	,002	,031	.	,111	,466	.	,126	,009	,282	,502	.	,638	,080	,460
		N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28
	p53_IHQ	Coefficiente de correlación	,474	,353	,530	,308	1,000	,461	,219	,407	,330	,046	,100	.	,455	,466	,551
		Sig. (bilateral)	,011	,066	,004	,111	.	,014	,273	,032	,087	,818	,612	.	,017	,012	,002
		N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28
	MDM2	Coefficiente de correlación	,775	,258	,597	,143	,461	1,000	,268	,454	,353	,218	,445	.	,334	,543	,543
		Sig. (bilateral)	,000	,185	,001	,466	,014	.	,176	,015	,065	,266	,018	.	,089	,003	,003
		N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28
	Ki67	Coefficiente de correlación	,458	-,141	,458	.	,219	,268	1,000	,016	-,506	-,148	-,224	.	-,153	,284	,178
		Sig. (bilateral)	,016	,482	,016	.	,273	,176	.	,937	,007	,461	,261	.	,454	,151	,373
N		27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	26	27	27	
p21	Coefficiente de correlación	,364	,533	,425	,296	,407	,454	,016	1,000	,231	,229	,148	.	,308	,460	,543	
	Sig. (bilateral)	,057	,003	,024	,126	,032	,015	,937	.	,238	,242	,451	.	,118	,014	,003	
	N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28	
Actina	Coefficiente de correlación	,046	,354	,190	,483	,330	,353	-,506	,231	1,000	,349	,384	.	,285	,244	,233	
	Sig. (bilateral)	,816	,064	,332	,009	,087	,065	,007	,238	.	,069	,044	.	,149	,211	,233	
	N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28	
E2F	Coefficiente de correlación	,060	,253	,120	,211	,046	,218	-,148	,229	,349	1,000	,223	.	,231	,310	,457	
	Sig. (bilateral)	,761	,194	,543	,282	,818	,266	,461	,242	,069	.	,253	.	,246	,109	,014	
	N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28	
p16	Coefficiente de correlación	,132	,238	,162	,132	,100	,445	-,224	,148	,384	,223	1,000	.	,342	,234	,237	
	Sig. (bilateral)	,502	,222	,410	,502	,612	,018	,261	,451	,044	,253	.	.	,081	,231	,226	
	N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28	
hTERT	Coefficiente de correlación	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Sig. (bilateral)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28	
p14	Coefficiente de correlación	,245	,323	,196	-,095	,455	,334	-,153	,308	,285	,231	,342	.	1,000	,513	,491	
	Sig. (bilateral)	,218	,101	,327	,638	,017	,089	,454	,118	,149	,246	,081	.	.	,006	,009	
	N	27	27	27	27	27	27	26	27	27	27	27	27	27	27	27	
p15	Coefficiente de correlación	,420	,605	,489	,336	,466	,543	,284	,460	,244	,310	,234	.	,513	1,000	,843	
	Sig. (bilateral)	,026	,001	,008	,080	,012	,003	,151	,014	,211	,109	,231	.	,006	.	,000	
	N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28	
CDK6	Coefficiente de correlación	,380	,468	,393	,145	,551	,543	,178	,543	,233	,457	,237	.	,491	,843	1,000	
	Sig. (bilateral)	,046	,012	,038	,460	,002	,003	,373	,003	,233	,014	,226	.	,009	,000	.	
	N	28	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27	28	28	

**Tabla 39. Correlación entre las proteínas en el grupo leucoplasia oral con displasia**

			CiclinaD1	Maspina	Rb	pRb	p53_IHQ	MDM2	Ki67	p21	Actina	E2F	p16	hTERT	p14	p15	CDK6
Rho de Spearman	CiclinaD1	Coefficiente de correlación	1,000	,077	-,077	.	,228	-,290	-,273	-,080	,113	,372	-,085	,187	-,066	,121	,000
		Sig. (bilateral)	.	,754	,754	.	,320	,215	,231	,737	,625	,116	,714	,429	,783	,623	1,000
		N	21	19	19	20	21	20	21	20	21	19	21	20	20	19	20
	Maspina	Coefficiente de correlación	,077	1,000	-,208	.	,153	,275	-,429	,502	,015	,328	,099	.	,031	,279	-,122
		Sig. (bilateral)	,754	.	,392	.	,531	,241	,059	,034	,951	,170	,679	.	,898	,234	,620
		N	19	20	19	20	19	20	20	18	20	19	20	20	20	20	19
	Rb	Coefficiente de correlación	-,077	-,208	1,000	.	-,307	,069	-,175	,067	-,031	-,264	-,077	.	,294	,294	,411
		Sig. (bilateral)	,754	,392	.	.	,201	,779	,475	,792	,898	,290	,754	.	,222	,222	,081
		N	19	19	19	19	19	19	19	18	19	18	19	19	19	19	19
	pRb	Coefficiente de correlación	.	.	.	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		Sig. (bilateral)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		N	20	20	19	21	20	20	21	19	21	20	21	21	20	20	20
	p53_IHQ	Coefficiente de correlación	,228	,153	-,307	.	1,000	-,159	-,035	,327	,276	,325	-,103	-,042	-,512	-,120	,009
		Sig. (bilateral)	,320	,531	,201	.	.	,502	,880	,159	,227	,175	,656	,860	,021	,624	,969
		N	21	19	19	20	21	20	21	20	21	19	21	20	20	19	20
	MDM2	Coefficiente de correlación	-,290	,275	,069	.	-,159	1,000	-,270	,428	-,062	-,241	,304	.	-,067	,023	-,151
		Sig. (bilateral)	,215	,241	,779	.	,502	.	,236	,067	,789	,321	,180	.	,774	,924	,537
		N	20	20	19	20	21	20	21	19	21	19	21	20	21	20	19
	Ki67	Coefficiente de correlación	-,273	-,429	,175	.	-,035	-,270	1,000	-,406	-,232	-,205	-,227	,225	-,019	,231	,086
		Sig. (bilateral)	,231	,059	,475	.	,880	,236	.	,075	,299	,385	,310	,327	,934	,327	,718
		N	21	20	19	21	21	21	22	20	22	20	22	21	21	20	20
p21	Coefficiente de correlación	-,080	,502	,067	.	,327	,428	-,406	1,000	,125	,006	,468	-,178	-,074	,119	,182	
	Sig. (bilateral)	,737	,034	,792	.	,159	,067	,075	.	,599	,980	,038	,467	,762	,638	,457	
	N	20	18	18	19	20	19	20	20	20	18	20	19	19	18	19	
Actina	Coefficiente de correlación	,113	,015	-,031	.	,276	-,062	-,232	,125	1,000	-,083	-,052	,158	-,372	-,121	-,105	
	Sig. (bilateral)	,625	,951	,898	.	,227	,789	,299	,599	.	,728	,817	,494	,097	,612	,660	
	N	21	20	19	21	21	21	22	20	22	20	22	21	21	20	20	
E2F	Coefficiente de correlación	,372	,328	-,264	.	,325	-,241	-,205	,006	-,083	1,000	,159	,363	-,036	-,120	,130	
	Sig. (bilateral)	,116	,170	,290	.	,175	,321	,385	,980	,728	.	,503	,116	,883	,623	,596	
	N	19	19	18	20	19	19	20	18	20	20	20	20	19	19	19	
p16	Coefficiente de correlación	-,085	,099	-,077	.	-,103	,304	-,227	,468	-,052	,159	1,000	,194	-,091	,032	,204	
	Sig. (bilateral)	,714	,679	,754	.	,656	,180	,310	,038	,817	,503	.	,400	,694	,895	,388	
	N	21	20	19	21	21	21	22	20	22	20	22	21	21	20	20	
hTERT	Coefficiente de correlación	,187	.	.	.	-,042	.	,225	-,178	,158	,363	,194	1,000	.	.	,229	
	Sig. (bilateral)	,429	.	.	.	,860	.	,327	,467	,494	,116	,400	.	.	.	,331	
	N	20	20	19	21	20	20	21	19	21	20	21	21	21	20	20	
p14	Coefficiente de correlación	-,066	,031	,294	.	-,512	-,067	-,019	-,074	-,372	-,036	-,091	.	1,000	,206	,036	
	Sig. (bilateral)	,783	,898	,222	.	,021	,774	,934	,762	,097	,883	,694	.	.	,384	,884	
	N	20	20	19	20	20	21	21	19	21	19	21	20	21	20	19	
p15	Coefficiente de correlación	,121	,279	,294	.	-,120	,023	,231	,119	-,121	-,120	,032	.	,206	1,000	,036	
	Sig. (bilateral)	,623	,234	,222	.	,624	,924	,327	,638	,612	,623	,895	.	,384	.	,884	
	N	19	20	19	20	19	20	20	18	19	19	20	20	20	20	19	
CDK6	Coefficiente de correlación	,000	-,122	,411	.	,009	-,151	,086	,182	-,105	,130	,204	,229	,036	,036	1,000	
	Sig. (bilateral)	1,000	,620	,081	.	,969	,537	,718	,457	,680	,596	,388	,331	,884	,884	.	
	N	20	19	19	20	20	19	20	19	20	19	20	20	19	19	20	



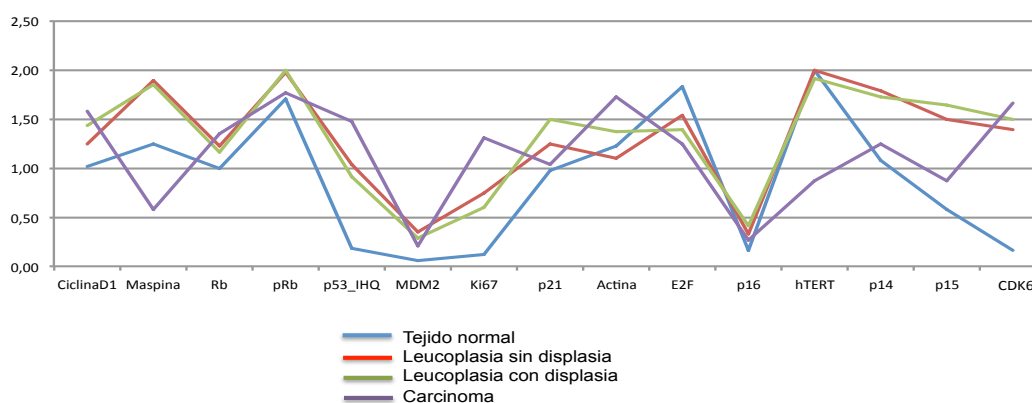
## 6. TIPOLOGÍAS O PERFILES PROTEICOS PARA CADA UNO DE LOS GRUPOS DE ENFERMEDAD Y SELECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MÁS REPRESENTATIVAS

El Análisis Cluster o Análisis de Conglomerados es una técnica estadística multivariante que agrupa elementos o variables de tal manera que se consiga la mayor homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos. Se trata, por tanto, de una técnica principalmente descriptiva, no explicativa, ya que no permite establecer inferencias estadísticas. La gráfica cluster depende de todas y cada una de las variables utilizadas, por lo que la adición o eliminación de alguna de ellas puede alterar completamente la gráfica obtenida.

Por este motivo, se realizaron seis análisis cluster. El análisis 1 para 4 grupos y 15 proteínas; el 2, para 4 grupos y 15 proteínas tipificadas; el 3, para 4 grupos y 5 factores; en el 4, se excluyeron Rb, p21 y p16 por no tener expresión diferencial significativa entre los grupos; el 5 fue de 3 grupos y 15 proteínas; y el cluster 6, para 3 grupos y 10 proteínas. En este último se excluyeron Rb, p21 y p16 por los motivos anteriormente explicados, y actina y E2F por no ser significativos en el análisis cluster 5. Los perfiles de los grupos obtenidos son las medias de los valores de expresión de las proteínas en cada grupo.

En la **figura 28** se muestran los resultados más completos y representativos, los del análisis de cluster 1, para los cuatro grupos de estudio y las 15 proteínas. De las 15 proteínas, 14 están relacionadas con las vías de senescencia, y una de ellas, ki-67, es un marcador de proliferación celular.

**Figura 27. Análisis de Cluster 1**



Si eliminamos las tres proteínas que no tuvieron diferencias significativas en la expresión intergrupo (p16, p21, Rb), así como las dos no significativas en el análisis cluster 5 (actina, E2F), los perfiles proteicos obtenidos para los distintos grupos serían los siguientes (**tabla 41**):

**Tabla 41. Perfiles proteicos en relación al tejido oral sano**

PERFILES PROTEICOS EN RELACIÓN AL TEJIDO SANO					
LEUCOPLASIA SIN DISPLASIA (LOD-)		LEUCOPLASIA CON DISPLASIA (LOD+)		CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (COCE)	
Aumentado	Disminuido	Aumentado	Disminuido	Aumentado	Disminuido
actina		actina		actina	Maspina
maspina		maspina		pRb	hTERT
pRb		pRb		p53	
p53		p53		MDM2	
MDM2		MDM2		p14	
p14		p14		p15	
p15		p15		CDK6	
CDK6		CDK6			

Observamos que, con respecto al tejido sano control, las mismas proteínas estarían aumentadas tanto en leucoplasias sin como con displasia. Éstas son: actina, maspina, los supresores tumorales pRb y p53, MDM2, p14, p15 y la ciclina mediadora de la entrada en el ciclo celular CDK6. Si comparamos los perfiles proteicos del grupo de carcinomas con el tejido sano, encontramos las mismas proteínas aumentadas, excepto maspina, que esta vez disminuye su expresión en carcinomas. Además, aparece disminuido el marcador de telomerasa hTERT.

## **DISCUSIÓN**

---

## **Relevancia clínica del estudio de la senescencia en cáncer oral y lesiones orales potencialmente malignizables**

La senescencia inducida por oncogenes (SIO) es el cese definitivo de la capacidad de replicación de una célula. Y se produce principalmente por un estrés o daño celular leve, para evitar su propagación a las células hijas durante la mitosis.

Está demostrado *in vivo*, en distintos tipos de tumores, que la senescencia es un mecanismo anticáncer crucial, ya que evita la replicación de células dañadas con riesgo de transformación maligna (Gorgoulis y Halazonetis 2010). Sin embargo, la evidencia acumulada confirma la participación de la senescencia en distintos procesos biológicos, como la supresión tumoral, la reparación tisular o la inflamación asociada al envejecimiento. Pero, aunque parezca contradictorio, la senescencia también juega un papel en la progresión del cáncer (Rodier y Campisi 2011) debido principalmente al fenotipo senescente pro-inflamatorio que la rodea (Collado y Serrano 2010). Por ello, es importante llegar a comprender con exactitud todas las vías que conducen a la senescencia celular, para utilizarla como herramienta en el diagnóstico, pronóstico y también tratamiento del cáncer oral.

### **Objetivos y aplicación clínica**

El objetivo principal del estudio es determinar el perfil o perfiles de expresión de las proteínas implicadas en la senescencia, como mecanismo supresor tumoral, en las distintas etapas de la carcinogénesis oral.

Estos perfiles permitirán seleccionar los potenciales marcadores de los que dependerá la evolución de una lesión oral potencialmente malignizable a un carcinoma oral de células escamosas. Es decir, una vez seleccionados los potenciales marcadores mediante este diseño de estudio que incluye tejido sano control, mediante el desarrollo de estudios longitudinales, se podrá determinar su significado pronóstico, lo que facilitará la toma de decisiones terapéuticas frente a la presencia en un paciente de una lesión potencialmente malignizable.

Del mismo modo, una vez determinado el papel de esos marcadores, podrían incluso emplearse como herramientas de tratamiento, activando la expresión de aquellas proteínas pro-senescencia, y suprimiendo la expresión de las pro-carcinogénicas. Es lo que se llama la terapia antitumoral pro-senescente.

### **Diseño del estudio**

Se diseñó un estudio transversal consistente en cuatro grupos: 1) tejido oral sano (TOS), 2) leucoplasia sin displasia (LOD-), 3) leucoplasia con displasia (LOS+) y 4) carcinoma oral de

células escamosas (COCE). Estos grupos, pese a tratarse de un estudio transversal, pretenden representar fases consecutivas de la carcinogénesis oral. Aunque hubiera sido preferible un estudio longitudinal, este diseño no es posible por la incapacidad de predecir la evolución de una lesión con potencial de malignización desde el estado de salud en humanos, lo que hace imposible realizar un estudio de tipo longitudinal prospectivo, que sería el ideal. Sería posible realizar uno retrospectivo, pero aún así careceríamos de biopsias de tejido sano del mismo paciente.

Se eligió un modelo de estudio humano porque algunos marcadores de las vías de senescencia no son los mismos en modelos animales, por lo que no sería un análisis comparable. Por ejemplo, p14 humana sería la correspondiente a p19 en ratón. Además, las células de ratón no senescen a través de la vía telomérica (Guerra y cols 2011). Se descartó hacerlo *in vitro* para evitar la senescencia replicativa que ocurre en los cultivos celulares por estrés (Hayflick y Moorehead 1961; Mooi y Peeper 2006).

Se incluyeron en el estudio las principales proteínas descritas en la literatura sobre las vías de senescencia (Collado y Serrano 2006; Campo-Trapero y cols 2008; Guerra y cols 2011; Todd y cols 2002; Campisi 2005, Lee y cols 1999), a diferencia de los estudios previos, que analizan sólo algunas de ella. Y se analizó su expresión no sólo en los carcinomas orales sino también en tejidos sanos y en lesiones potencialmente malignizables, sin y con displasia epitelial.

La técnica elegida para el análisis de la expresión de cada proteína fue la inmunohistoquímica sobre cortes de *tissue microarray*. Los *tissue microarray* (TMAs) permitieron englobar todas las muestras en dos únicos bloques de parafina, por duplicado. Esto consigue disminuir los sesgos inherentes a los distintos procesos de tinción, así como un ahorro de material y reactivos. El empleo de la inmunohistoquímica permitió una comparación de los resultados con los de estudios previos, cuya técnica de elección suele ser ésta (Sinha y cols 2014; Yoshizawa y cols 2009; Abrahao y cols 2011, Nasser y cols 2011, Harris y cols 2011). La estabilidad en el tiempo de la tinción permitió además escanear los resultados obtenidos mediante un programa informático.

Aunque las células senescentes tienen características especiales para distinguirlas, ninguna de ellas es exclusiva para determinar que se trata de un proceso senescente, sobre todo si excluimos la expresión de SA-beta-galactosidasa, que sólo puede obtenerse del análisis del ARN, que no es posible en muestras fijadas en formaldehído (Itahana y cols 2007). Esta es una de las razones por las que es necesario determinar marcadores de senescencia fiables.

Por tanto, nuestro estudio aporta las siguientes novedades frente a la literatura publicada previamente:

- Analiza una selección amplia (19 proteínas) de posibles marcadores de las distintas vías que conducen a la senescencia, cuando los estudios previos se centran en pocas proteínas, estudiadas de manera simultánea.
- Estudia la expresión de estos potenciales marcadores en cuatro grupos de estudio representativos de las distintas etapas de la carcinogénesis oral, incluido el tejido sano.

Mientras que los estudios publicados se centran principalmente en la etapa de carcinoma, y su evolución, cuando sería interesante hacerlo en todas las fases del proceso, para poder entender los mecanismos que determinan el paso de un tejido sano a una lesión con potencial de malignización, o para ser capaces de predecir qué lesiones potencialmente malignizables lo harán y cuáles no. De ahí la importancia de estudiar también la expresión proteica en todas estas etapas previas al carcinoma oral.

- 
- Las distintas proteínas se analizan en cortes de tissue microarray, preparado previamente, para determinar la expresión de cada proteína en la misma región del tejido, y poder correlacionarlas entre sí correctamente. Sabemos que la senescencia es tejido-dependiente y lugar-dependiente, dos factores que podemos controlar si estudiamos las proteínas mediante cortes de un mismo *tissue microarray*.
- A día de hoy, existen publicaciones con diseños similares para estudiar marcadores de senescencia en la carcinogénesis oral, algunas con grandes tamaños muestrales como ventaja (Soni y cols 2005) pero ninguno que analice la amplia gama de proteínas de las vías senescentes que estudiamos en este trabajo de investigación.

### Existencia de variables modificadoras

Existen variables que pueden influir en la expresión de los marcadores de senescencia que estudiamos. Entre ellos destacan la edad avanzada (Rayess y cols 2012; Krishnamurthy y cols 2004; Nickoloff y cols 2004), el tabaco (Tsygankov y cols 2009) o alcohol y la inflamación (Guerra y cols 2011; Lee y cols 2009; Krtolica y cols 2001). El análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas de la muestra nos indica que nuestros resultados se pueden ver influidos por estas variables.

La muestra no es homogénea en los distintos grupos de estudio en cuanto a factores como la edad, que tiene una media superior en los grupos representativos de estadios tumorales más avanzados. Se ha descrito el envejecimiento como uno de los factores que pueden influir en la senescencia (Golomb y cols 2015; Rayess y cols 2012; Ohtani y cols 2009; Rodier y cols 2007; Gruber y cols 2007; Ben-Porath y cols 2005; Kang y cols 2005; Krishnamurthy y cols 2004). Del mismo modo, el consumo tabáquico y alcohólico, presente o pasado, era más frecuente en los grupos con displasia o alteraciones celulares malignas ya establecidas. Y está ampliamente aceptado el papel que estos factores de riesgo tienen en la carcinogénesis oral (American Cancer Society).

En cuanto a la obtención de las muestras a nivel oral, todos los fragmentos tisulares analizados en el grupo de tejido normal procedían principalmente de rodets de cirugías periodontales resectivas. Por tanto, es probable que estos tejidos, considerados sanos, presenten cierta inflamación, ya que se obtuvieron de pacientes con periodontitis no del todo estabilizada que por ello requerían tratamiento periodontal quirúrgico. Y se ha postulado que, ya que el

fenotipo senescente también secreta factores pro-inflamatorios, puede que exista relación entre la senescencia y la inflamación tisular (Xue y cols 2007; Ventura y cols 2007).

### Expresión de las proteínas involucradas en las vías de senescencia

Cinco de las 19 proteínas estudiadas no pudieron ser optimizadas para ser analizadas por inmunohistoquímica en tejidos humanos orales. Éstas fueron **CDK4**, **DCR2**, **Dec1**, **H-Ras** y **RAR-β**. Es por ello que no podemos descartarlas en cuanto a su papel en la senescencia a nivel oral, pero nosotros no las podremos tener en cuenta para la determinación de los perfiles proteicos senescentes, suponiendo esto una limitación para los resultados del estudio.

Para el resto de las proteínas estudiadas, hemos obtenidos distintos patrones de expresión, siendo el más frecuente el **patrón en “meseta”**. Este patrón consiste en un aumento de la proteína en las lesiones orales potencialmente malignizables, al compararlas con el tejido normal o los carcinomas orales. Este patrón es el propuesto en la literatura para las proteínas pro-senescencia (Nasser y cols 2011; Collado y Serrano 2006; Braig y cols 2005; Chen y cols 2005; Collado y cols 2005; Lazzerini Denchi y cols 2005; Michaloglou y cols 2005), ya que supondría un intento de frenar la transformación maligna en aquellas lesiones orales aún premalignas. Nuestros resultados coinciden en esta suposición para las proteínas maspina, MDM2, p14, p15, p16, p21 y pRb. Aunque sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para maspina, MDM2, p14 y p15 ( $p < 0.05$  en todas ellas).

Al estudiar si las diferencias de expresión de las proteínas entre los cuatro grupos de estudio son significativas, obtenemos **resultados de expresión diferencial inesperados** para tres de ellas. La comparación de medias resuelve que **Rb**, **p21** y **p16** no se expresan de manera distinta en nuestro estudio entre ninguna de las etapas de la carcinogénesis. Como estas tres proteínas están interconectadas de manera cercana en las vías senescentes (Collado y cols 2010), esto podría explicar que los resultados para las tres sean similares. El inhibidor de CDKs p21 es un nexo importante entre las vías p16/pRb y p14/p53/p21, al estar regulado positivamente por p16 (Al-Khalaf y cols 2013).

Nuestros resultados coinciden con lo obtenido por Queiroz y colaboradores para p16 y p21, en un estudio con un diseño similar al nuestro pero para un número inferior de variables proteicas analizadas (Queiroz y cols 2010). Sin embargo, los resultados publicados previamente para p16 son muy variados, aunque con una tendencia a una expresión baja tanto en lesiones orales potencialmente malignizables (Nankivell y cols 2014) como en carcinomas orales (Pérez-Sayáns y cols 2013; Suzuki y cols 2006).

Un **patrón de expresión inesperado** es también el encontrado para **E2F1** y **hTERT**. En nuestro estudio se expresan de manera progresivamente descendente desde la etapa de tejido oral sano hasta la de carcinoma oral.

E2F1 está poco estudiada en cáncer oral, y se ha investigado principalmente en cultivos de líneas celulares (Shi y cols 2013), pero no tanto en estudios clínicos. E2F1 es un factor de

transcripción del ciclo celular, por lo que nuestros resultados son coherentes con la literatura en cuanto a la infraexpresión en las lesiones potencialmente malignizables, que se mantendrían aún en un estado senescente (Du y cols 2008; Shi y cols 2013). Sin embargo, nosotros hallamos una expresión aún menor en carcinomas, en contra de lo publicado previamente, que indica generalmente una sobreexpresión en esta etapa (Du y cols 2013). Puede que la causa sea un posible papel de E2F1 en la inducción de la apoptosis, según lo propuesto por algunos autores (Yuan y cols 2012), que alteraría su expresión en esta etapa.

La transcriptasa inversa de la telomerasa hTERT (subunidad catalítica de la telomerasa) actuaría por otra vía paralela a la de la senescencia inducida por oncogenes, ya que depende del acortamiento de los telómeros (Cesare y Karlseder 2012). La mayoría de los artículos publicados en cáncer oral la investigan como diana terapéutica para detener la invasión del carcinoma, tanto en cultivos celulares como en modelo animal (Park y cols 2014; Liu y cols 2011). En contra de esto y de lo publicado en cáncer oral, donde su expresión debería estar aumentada (McGregor y cols 2002), nosotros encontramos una infraexpresión en COCE, con diferencias estadísticamente significativas frente a la expresión en tejido sano ( $p=0,00000$ ) y leucoplasias con displasia ( $p=0,00001$ ). En cambio, coincidimos con la literatura en una infraexpresión de hTERT en las lesiones potencialmente malignizables al compararlas con tejido sano (Kang y cols 2009), aunque sin obtener diferencias significativas.

Para dos de las proteínas estudiadas, **ciclina D1** y **CDK6**, encontramos un patrón de expresión progresivamente ascendente al pasar de tejido sano a lesiones potencialmente malignizables, y de éstas a carcinomas orales. Se trata de un patrón que únicamente se confirma estadísticamente de manera consecutiva para las diferencias de expresión de CDK6 entre las fases de tejido sano a leucoplasia sin displasia ( $p<0,05$ ).

Ciclina D1 es activadora de las kinasas CDK4 y CDK6 (Campisi 2000). La activación de las ciclinas promovería el avance del ciclo celular, por lo que, a diferencia de los resultados obtenidos en nuestro estudio, sería lógico pensar que tanto ciclina D1 como CDK6 estarían disminuidos durante la senescencia; es decir, en las lesiones potencialmente malignizables. Nuestros resultados sí concuerdan con la literatura en la sobreexpresión de ciclina D1 en los carcinomas orales (Liu y cols 2009; de Vicente y cols 2008). De hecho, en estudios en carcinomas orales de células escamosas, se ha asociado una expresión aumentada de ciclina D1 con un pronóstico tumoral desfavorable (Massano y cols 2006).

CDK6 es un mediador directo muy abundante de la fase G1 del ciclo celular (Campaner y cols 2010), que se ve inhibido por proteínas pro-senescentes como p16 y p21 (Serrano y cols 2010), ya explicadas anteriormente. Corroboramos de nuevo lo publicado en cáncer oral en cuanto a la sobreexpresión de CDK6 en carcinomas de células escamosas (Piboonnyom y cols 2002).

**Actina** es una proteína con 6 isoformas que difieren principalmente en los aminoácidos de los residuos N-terminales, que son las zonas antigénicas más importantes de la proteína. El anticuerpo que hemos utilizado para analizar actina ("Monoclonal mouse anti-human smooth muscle actin, clone 1-A4) detecta células del músculo liso, miofibroblastos y células mioepiteliales. Según lo publicado, las funciones del citoesqueleto de actina estarán relacionadas con la motilidad y los cambios morfológicos de las células durante el ciclo celular,

así como con la organización del citoplasma (Guirado Blanco y cols 2002). Modelos experimentales en animales han demostrado una relación inversa entre los niveles de expresión de actina, en este caso del tipo b y el grado de diferenciación celular. Es decir, que estaría aumentado en los fenómenos carcinogénicos y se relacionaría con un potencial metastásico mayor (Evers y cols 2000). En cuanto a la implicación de actina en el cáncer oral, como hemos dicho, es un marcador de miofibroblastos. Y los miofibroblastos son células con propiedades contráctiles involucradas en fenómenos inflamatorios, cicatriciales y fibróticos. Los miofibroblastos deben desaparecer una vez que la reparación del tejido ha terminado. Sin embargo, se ha determinado una presencia significativamente mayor de miofibroblastos en carcinomas orales de células escamosas al compararlo con la presencia de éstos en fibrosis oral submucosas, con y sin displasia (Rao y cols. 2014). El mecanismo propuesto por el que los miofibroblastos favorecerían la transformación maligna, principalmente las fases de invasión y metástasis, sería la degradación de la matriz celular (Rao y cols. 2014). Se ha visto en distintos tipos tisulares (mama, riñón, hígado, pulmón, ojo y membranas serosas) que los miofibroblastos podrían estar involucrados en la transición epitelio-mesenquimal de la fibrosis. Por ello, podrían utilizarse como marcador de progresión en en la carcinogénesis. Esta transición se produce al perder las células epiteliales su capacidad de cohesión intercellular, trasladándose del epitelio al corion. En algunos cánceres, como el de mama, se ha estimado que este fenómeno ocurre en el 18% de los tumores, asociándose con un comportamiento más agresivo (Scanlon y cols 2013; Petersen y cols. 2003).

En el carcinoma oral de células escamosas existe un tejido reactivo que rodea al tumor. Este tejido está compuesto por miofibroblastos, ya que se comporta como un tejido muscular, expresando actina. Estos miofibroblastos se han denominado también fibroblastos asociados al cáncer (*CAF* por "*cancer-associated fibroblasts*") (Scanlon y cols. 2013). La expresión de actina es mayor en los fibroblastos maduros que en los jóvenes. Estos fibroblastos crecen más rápido en el carcinoma de células escamosas que en el tejido oral sano; por tanto, la expresión de actina en los carcinomas estaría aumentada (Lim y cols. 2011). Nuestros resultados concuerdan con la literatura en un aumento de expresión de actina en el grupo de carcinomas orales frente a tejidos sanos y lesiones potencialmente malignizables. Obtenemos además diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión en leucoplasias orales con y sin displasia *versus* carcinomas orales de células escamosas ( $p= 0,04$  y  $p=0,00016$ , respectivamente).

**p14 y p15** tendrían también una expresión aumentada en las lesiones orales potencialmente malignizables, según lo descrito en la literatura (Sailasree y cols 2008; Shintani y cols 2011). Esto concuerda con lo obtenido en nuestro estudio y con el patrón de expresión "en meseta" que siguen ambas proteínas, con diferencias estadísticamente significativas al pasar de tejido sano a leucoplasia sin displasia y de leucoplasia con displasia a carcinoma oral ( $p<0,05$ ). p14 es un inhibidor del ciclo celular que activa **p53** e inactiva **MDM2**. MDM2 es, a su vez, regulador negativo de p53 (Hasegawa y cols 2009). p53 es un gen muy estudiado en la carcinogénesis humana pero con resultados muy controvertidos. Es una proteína involucrada en el control del ciclo celular, la estimulación de la apoptosis y la preservación de la estabilidad genética (Shay y Roninson 2004). En nuestro estudio, tiene una expresión diferencial mayor en las leucoplasias orales que en el tejido sano, y su expresión aumenta aún más en los carcinomas

orales. Esto coincide con lo publicado anteriormente en cancer oral (McGregor y cols 2006; Massano y cols 2006).

Parece que p14 se inactiva de manera secundaria a la inactivación de p53 en los cánceres humanos (Sailasree y cols 2008), lo que confirmamos también en nuestro estudio.

**Los resultados, sin duda, más relevantes los obtenemos para la proteína maspina.** Esta proteína se ha estudiado ya en muchos tipos de cánceres, como el de glándulas salivares (Reshma y cols 2014, Ghazy y cols 2011; Schwarz y cols 2008), el de esófago (Wang y cols 2013), los sarcomas de tejido blando (Takeda y cols 2014), el cáncer gástrico (Kim y cols 2012), el de pulmón (Smith y cols 2003; Heighway y cols 2003), el de ovario (Solomon y cols 2006), el cáncer de colon (Payne y cols 2011; Song y cols 2002), el de próstata (Machtens y cols 2001), el de mama (Umekita y Yoshida 2003; Maass y cols 2001), el de tracto urinario (Rau y cols 2011) o el melanoma (Chua y cols 2009). Aunque los resultados sobre su potencial pronóstico son a veces contradictorios (Takeda y cols 2014; Ghazy y cols 2011; Umekita y Yoshida 2003), parece que la mayoría de los autores consideran el papel de maspina como supresora tumoral (Reshma y cols 2014; Wang y cols 2013; y cols 2003; Machtens y cols 2001). Entre sus efectos antitumorales están principalmente aquellos relacionados con la progresión de un carcinoma. Por tanto, en la literatura parece que maspina sería un supresor tumoral en los estadios más avanzados de un carcinoma, pero no en un estadio temprano. En cambio, en nuestros resultados en tejido oral, obtenemos una sobreexpresión en las lesiones potencialmente malignizables pero una infraexpresión en los carcinomas, con diferencias estadísticamente significativas. Obtenemos un valor de  $p=00006$  al comparar tejidos orales sanos *versus* leucoplasias sin displasia; no hallamos diferencias significativas entre leucoplasias con y sin displasia ( $p=0,82$ ); y de nuevo aparecen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de leucoplasias con displasia y los carcinomas orales de células escamosas ( $p= 0,00000$ ). Esto concuerda con los aumentos de expresión hallados en lesiones potencialmente malignizables en otros tejidos, como los adenomas de colon (Song y cols 2002), pulmón (Smith y cols 2003) o pólipos preneoplásicos intestinales (Payne y cols 2011). Y en estadios tumorales orales avanzados, algunos autores, al igual que nosotros, encontraban un descenso o incluso desaparición de la expresión de maspina (Yoshizawa y cols 2009).

Sin embargo, nivel oral, maspina apenas está estudiada; y los estudios que hemos encontrado la analizan principalmente en carcinomas (Yoshizawa y cols 2009; Marioni y cols 2011; Iezzi y cols 2007; Cho y cols 2007; Yasumatsu y cols 2001; Xia y cols 2001), y no en lesiones potencialmente malignizables.

En los estudios en carcinomas orales de células escamosas, maspina se solía expresar en todos los estadios tumorales, detectándose tanto en núcleo como en citoplasma (Iezzi y cols 2007; Xia y cols 2000), a diferencia de lo publicado sobre su localización en otros tipos de tejidos, que abogan por una expresión nuclear cuando se asocia a buen pronóstico y citoplasmática si el pronóstico va a ser malo (Mohsin y cols 2003; Marioni y cols 2005; Reshma y cols 2014). En los estudios en carcinomas orales de células escamosas, algunos autores no hallaban correlación entre la expresión de la proteína y el pronóstico de la lesión (Cho y cols 2007); otros, sin embargo, correlacionan su sobreexpresión tanto con un mejor (Yasumatsu y cols 2001; Marioni y cols 2008; Iezzi y cols 2007) como peor pronóstico (Vered y cols 2009).

Consideramos que estas diferencias probablemente se deban, por una parte, a que maspina tiene distintos patrones de localización. Se expresa de manera primaria en el citoplasma, pero también puede observarse en el núcleo, las vesículas secretoras y la superficie celular. Por tanto, puede que esta partición subcelular de la proteína influya en su función (Marioni y cols 2008) y también en su detección. Por otra parte, se ha cuestionado si maspina podría tener roles distintos según el tipo de tejido donde se analice. Nosotros no compartimos esta opinión, ya que en el COCE, aunque la mayoría de los estudios (Yasumatsu y cols 2001; Marioni y cols 2008; Iezzi y cols 2007) indican un posible papel protector de la maspina frente a la evolución del proceso carcinogénico, otros observan lo contrario (Vered y cols 2009) o ni siquiera encuentran correlación (Cho y cols 2007).

### **Correlación entre las proteínas y las vías de senescencia**

Al estudiar las correlaciones entre las proteínas, observamos que éstas varían en función de la etapa de la carcinogénesis en la que las analizamos, existiendo incluso correlaciones negativas como hTERT con clicina D1, actina y CDK6 a nivel de la muestra completa, que desaparecen si analizamos la correlación en cada una de las etapas. También se dan correlaciones negativas entre p53 y p14 en la fase de leucoplasia con displasia.

Estas diferencias en la correlación entre las proteínas puede deberse a que, aunque las dos principales vías de senescencia parecen regularse de manera independiente, los estudios nos indican que existen proteínas que actúan como nexos. Este es el caso de p16, que conecta con la vía de p53 a través de p21 (Al-Khalaf y Aboussekhra 2013). Y también podríamos considerar como nexo entre las dos vías a E2F, que actuaría a modo de retroalimentación de las vías a través de la activación de p14 (Aksoy y cols 2012; Guerra y cols 2011).

Además, hemos explicado previamente que siempre existe una expresión basal de p16, pero que ésta aumenta en ausencia de actividad de p53, y vuelve a sus niveles normales si aparece de nuevo expresión de p53 (Rowland y cols 2002). Por tanto, parece que la actividad de p16 y p53 está interconectada, y que ambas vías son mecanismos de senescencia complementarios para el control de los tumores. Nosotros, en cambio, no encontramos correlación de p16 con ninguna otra proteína.

Para maspina, de nuevo encontramos resultados interesantes en cuanto a su correlación con otras proteínas de las vías senescentes. Es una proteína para la que no hallamos correlaciones con otras proteínas en tejidos orales sanos ni en carcinomas orales de células escamosas. Sin embargo, es una de las que más se correlacionan en las lesiones potencialmente malignizables. En nuestro estudio, maspina está correlacionada de manera positiva con pRb, p21 y p15 en las leucoplasias sin displasia y de nuevo con p21 en las leucoplasias con displasia. Aunque la mutación de maspina no es frecuente, se ha descrito un polimorfismo (Ser 176 R Pro) que puede afectar a las interacciones de maspina con otras proteínas, ya que está localizado en la zona reactiva de la superficie de la proteína (Jang y cols 2008). Este polimorfismo podría explicar las diferencias en cuanto a la correlación de maspina.

De nuevo, en el análisis de clusters, observamos que maspina es la única proteína aumentada en las lesiones potencialmente malignizables y disminuida en los carcinomas al compararla con el tejido oral sano.

Por todo ello, parece que los resultados nos indican una clara tendencia a determinar que maspina sea un marcador importante de senescencia a nivel de los tejidos orales. En primer lugar, porque sigue el patrón de meseta, que supone una expresión mayor en las lesiones orales potencialmente malignizables respecto de aquella en tejidos orales sanos y carcinomas orales de células escamosas. En segundo lugar, porque las diferencias de expresión entre los grupos son estadísticamente significativas al comparar sanos *versus* leucoplasia sin displasia y leucoplasia con displasia *versus* carcinomas. En tercer lugar, porque en el análisis de clusters, maspina era la única proteína de las estudiadas con una presencia aumentada en las lesiones potencialmente malignizables y considerablemente disminuida en los carcinomas al compararla con los tejidos orales sanos.

Y en cuanto a la determinación de perfiles de expresión senescentes en la carcinogénesis oral, maspina mostró correlaciones positivas significativas en los grupos de lesiones orales potencialmente malignizables con pRB, p21 y p15. HTERT también obtiene resultados prometedores en nuestro estudio, pero no sería un marcador tanto de senescencia inducida por oncogenes como de senescencia replicativa.

### **Perspectivas para futuras investigaciones**

Una vez hemos seleccionado las proteínas que presentan perfiles de senescencia específicos, en nuestro caso principalmente maspina, sería recomendable realizar estudios retrospectivos de carcinomas orales de células escamosas que tuvieran biopsias previas con resultado de lesiones potencialmente malignizables y con pronósticos conocidos sobre supervivencia libre de tumor y recidiva al cabo de los años. Así averiguaríamos el significado pronóstico exacto de las proteínas ya seleccionadas en este estudio.

Además, la comprensión de los mecanismos senescentes, y el establecimiento de las proteínas clave en este proceso, nos permitirá investigar en el futuro sobre terapias pro-senescencia para combatir la carcinogénesis oral. Y no sólo eso, nos permitiría poder activar estos mecanismos senescentes en lesiones orales aún no malignizadas, previniendo su transformación maligna.

## **CONCLUSIONES**

---

En este estudio transversal en humanos, en el que se compara la expresión de 19 proteínas relacionadas con la senescencia, en cuatro grupos de estudio que representan las fases consecutivas de la carcinogénesis oral, partiendo de tejido oral sano:

1. El patrón de expresión más frecuente para las proteínas relacionadas con las vías de senescencia fue el patrón “en meseta”; es decir, una expresión aumentada en las lesiones orales potencialmente malignizables y disminuida en los carcinomas. Este patrón se obtuvo para: maspina, MDM2, p14, p15, p16, p21 y pRb.
2. De las anteriores, aquellas con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tejido oral sano *versus* leucoplasia oral y de leucoplasia oral *versus* carcinoma oral de células escamosas son: maspina, MDM2, p14 y p15.
3. El inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas p16 no varió su expresión de manera estadísticamente significativa entre ninguna de las etapas de la carcinogénesis, ni siquiera en el grupo de los carcinomas.
4. Cinco de las 19 proteínas no pudieron ser optimizadas para el método inmunohistoquímico en nuestra muestra de estudio. Éstas son: CDK4, DCR2, Dec1, HRas y RAR- $\beta$ .
5. Basándonos en la coincidencia en la misma muestra de una expresión baja del factor de proliferación celular ki-67 y alta del inhibidor de CDKs p16, no podemos determinar que ninguna de las muestras se encuentre en senescencia.
6. En las lesiones potencialmente malignizables, encontramos una correlación positiva fuerte de maspina con pRB, p21 y p15.
7. En el análisis de clusters, maspina era la única proteína con una presencia aumentada en las lesiones potencialmente malignizables y considerablemente disminuida en los carcinomas. Es por tanto esta proteína la que muestra claras diferencias de expresión en todos los análisis.
8. Sería interesante, por tanto, estudiar la proteína maspina como marcador representativo de protección senescente frente al cáncer oral, mediante estudios con un diseño longitudinal y tamaños muestrales mayores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 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. *Braz Oral Res.* 2011;25(1):34-41.
- Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell.* 2008; 133: 1006–18. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.038.
- Aguirre Echebarría P, Aguirre Urizar JM. Displasia epitelial. Concepto y significación. *Av. Odontoestomatol* 2008; 24 (1): 81-88. Aguirre-Echeverría y Aguirre-Urizar 2008
- Aksoy O, Chicas A, Zeng T, Zhao Z, McCurrach M, Wang X, et al. The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes Dev.* 2012;15;26(14):1546-57. doi: 10.1101/gad.196238.112.
- Al-Kaabi A, van Bockel LW, Pothen AJ, Willems SM. p16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Dis Markers.* 2014; 2014: 260549. doi: 10.1155/2014/260549.
- Al-Khalaf HH, Aboussekhra A. p16INK4A Positively Regulates p21WAF1 Expression by suppressing AUF1-dependent mRNA decay. *PLoS ONE.* 2013; 8(7): e70133. doi:10.1371/journal.pone.0070133
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015.* Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2015.
- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006; 444:633-637.
- 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: 4212–22. doi:10.1093/emboj/cdg417
- Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37(5): 961-76.
- Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest.* 2004; 113(1): 8-13.
- Bettendorf O, Piffkò J, Bänkfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol* 2004;40(2):110-9.
- Bosch FX, Ritter D, Enders C, Flechtenmacher C, Abel U, Dietz A, et al. Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. *Int J Cancer.* 2004;111(4):530-8.

- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 2005; 436(7051): 660-5.
- Brondello JM, Prieur A, Philipot D, Lemaitre JM, Lenaers G, Piette J et al. Cellular senescence and the myth of Janus]. [Article in French]. *Med Sci (Paris)*. 2012; 28(3): 288-96. doi: 10.1051/medsci/2012283017.
- Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* 2009;9(12):862-73. doi: 10.1038/nrc2763.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996;56(11):2488-92.
- Campaner S, Doni M, Verrecchia A, Fagà G, Bianchi L, Amati B. Myc, cdk2 and cellular senescence: Old players, new game. *Cell Cycle* 2010;9(18):3655-61.
- Campisi J. Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science*. 2005; 309(5736): 886-7
- Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*. 2000; 14(1):183-8.
- Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer*. 1997; 33(5): 703-9.
- Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, Llamas-Martínez S, Lo Muzio L, Bascones-Martínez A. Cellular senescence in oral cancer and precancer and treatment implications: a review. *Acta Oncol*. 2008; 47(8): 1464-74.
- Cesare AJ, Karlseder J. A three-state model of telomere control over human proliferative boundaries. *Curr Opin Cell Biol*. 2012 Dec;24(6):731-8. doi: 10.1016/j.ceb.2012.08.007.
- Chandler H, Peters G. Stressing the cell cycle in senescence and aging. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25(6): 765-71. doi: 10.1016/j.ceb.2013.07.005.
- Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J, et al. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 1999 Aug26;18(34):4808-18.
- Chang BD, Swift ME, Shen M, Fang J, Broude EV, Roninson IB. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(1): 389-94.
- Chen Q, Ames B.N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1994; 91: 4130-34.
- Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN. Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J*. 1998; 332(15): 43-50.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005; 436(7051): 725-30. 19.

Cho JH, Kim HS, Park CS, Kim JK, Jung KY, Shin BK et al. Maspin expression in early oral tongue cancer and its relation to expression of mutant-type p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Oral Oncol*. 2007; 43(3): 272-7.

Christov K, Ikui A, Shilkaitis A, Green A, Yao R, You M, et al. Cell proliferation, apoptosis, and expression of cyclin D1 and cyclin E as potential biomarkers in tamoxifen-treated mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2003;77(3):253-64.

Chua R1, Setzer S, Govindarajan B, Sexton D, Cohen C, Arbiser JL. Maspin expression, angiogenesis, prognostic parameters, and outcome in malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60(5):758-66. doi: 10.1016/j.jaad.2009.01.018

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.

Collado M, Serrano M. The senescent side of tumor suppression. *Cell Cycle*. 2005; 4(12): 1722-4.

Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 2006;6(6):472-6.

Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007;130(2):223-33.

Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 2010;10(1):51-7. doi: 10.1038/nrc2772.

Coppé, JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One*. 2010; 5: e9188. doi:10.1371/journal.pone.0009188.

Coppe´ JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008; 6:2853-2868.

Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K, McMahon M. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev*. 2007;21(4):379-84.

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.

De Vicente JC, Herrero-Zapatero A, Fresno MF y 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: 301-308.

Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell*. 2009;15(4):294-303. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.022.

Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006;444:638-642.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(20): 9363-7

Dimri GP. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*. 2005;7(6):505-12.

Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*. 1993; 73(3): 499-511.

Du Y, Zhang S, Wang Z, Zhou W, Luan M, Yang X et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by NS398 in oral squamous cell carcinoma cells via downregulation of E2 promoter-binding factor-1. *Oncol Rep*. 2008; 20(3): 605-11.

Duncan LD, Winkler M, Carlson ER, Heidel RE, Kang E, Webb D. p16 immunohistochemistry can be used to detect human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 71(8): 1367-75. doi: 10.1016/j.joms.2013.02.019.

Elmore LW, Rehder CW, Di X, McChesney PA, Jackfffook CK, Gewirtz DA, et al. Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem*. 2002;277(38):35509-15.

Evers EE, Zondag GC, Malliri A, Price LS, Ten Klooster JP, Vander Kammen RA, et al. Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer* 2000;36(10):1269-74).

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.

Feng W, Xiao J, Zhang Z, Rosen DG, Brown RE, Liu J et al. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. *Mod Pathol* 2007;20(9):961-6.

Ghazy SE, Helmy IM, Baghdadi HM. Maspin and MCM2 immunoprofiling in salivary gland carcinomas. *Diagn Pathol*. 2011; 6: 89. doi: 10.1186/1746-1596-6-89.

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 and Differentiation*. 2015; 22: 1764–1774; doi:10.1038/cdd.2015.21

González-Moles MA, Gil-Montoya JA, Ruiz-Ávila I. Bases moleculares de la cancerización de cavidad oral. *Av. Odontoestomatol* 2008; 24 (1): 55-60.

Gourgoulis VG, Halazonetis TD. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the Response. *Current Opinion in Cell Biology* 2010, 22:816–27.

Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, et al. Cellular senescence in naevi and immortalization in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer*. 2006;95(4):496-505.

Gruber HE, Ingram JA, Norton HJ, Hanley EN Jr. Senescence in cells of the aging and degenerating intervertebral disc: immunolocalization of senescence-associated beta-galactosidase in human and sand rat discs. *Spine*. 2007; 32(3): 321-7.

Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porras I, Cañamero M. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*. 2011;19(6):728-39. doi: 10.1016/j.ccr.2011.05.011.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994;371(6494):257-61.

Haq R, Brenton JD, Takahashi M, Finan D, Finkielstein A, Damaraju S, et al. Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer Res*. 2002;62(17):5076-82.

Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2003;260(9):502-8.

Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Hayes DN, Couch ME, Kimple RJ. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck*. 2011; 33(11): 1622-7. doi: 10.1002/hed.21650.

Hasegawa H, Yamada Y, Iha H, Tsukasaki K, Nagai K, Atogami S et al. Activation of p53 by Nutlin-3a, an antagonist of MDM2, induces apoptosis and cellular senescence in adult T-cell leukemia cells. *Leukemia*. 2009; 23(11): 2090-101. doi: 10.1038/leu.2009.171.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. 1965; 37: 614–36. doi:10.1016/0014-4827(65)90211-9

Hayflick L y Moorhead PS: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621, 1961.

Heighway, J, Knapp T, Boyce L, Brennand S, Field JK, Betticher DC et al. Expression profiling of primary non-small cell lung cancer for target identification. *Oncogene* 2002;21:7749-63.

Herbig U, Jobling WA, Chen BP, 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: 501–13. doi:10.1016/S1097-2765(04)00256-4

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.

Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem.* 2001; 268(10): 2784-9.

Jang HL, Nam E, Lee KH, Yeom S, Son HJ, Park C. Maspin polymorphism associated with apoptosis susceptibility and in vivo tumorigenesis. *Int J Mol Med.* 2008;22(3):333-8.

Jaworska M, Kołosza Z, Liszka J, Nikiel B, Goleń M, Lange D, et al. Prognostic molecular markers in oral and lip squamous cell carcinoma- evaluation of expression and its significance. *Otolaryngol Pol.* 2008; 62(2): 175-81.

Jin M, Piao Z, Kim NG, et al. p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2000; 89: 60–8.

Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int J Cancer.* 2012;130(8):1726-32. doi: 10.1002/ijc.26185.

Kang X, Chen W, Kim RH, Kang MK, Park NH. Regulation of the hTERT promoter activity by MSH2, the hnRNPs K and D, and GRHL2 in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncogene.* 2009; 28(4): 565-74. doi: 10.1038/onc.2008.404.

Katakura Y, Nakata E, Miura T, Shirahata S. Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;255(1):110-5.

Kim, SH, Beausejour C, Davalos AR, Kaminker P, Heo SJ, Campisi J. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 43799–804. doi:10.1074/jbc.M408650200

Kim M, Ju H, Lim B, Kang C. Maspin genetically and functionally associates with gastric cancer by regulating cell cycle progression. *Carcinogenesis.* 2012; 33(12):2344-50. doi: 10.1093/carcin/bgs280.

Korwek Z, Alster O. The role of the DNA damage response in apoptosis and cell senescence. *Postepy Biochem.* 2014; 60(2): 248-62.

Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clinical Invest.* 2004; 114: 1299–07.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(21): 12072-7.

Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 2008; 133: 1019–1031. doi:10.1016/j.cell.2008.03.039

Larsson LG. Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence. *Semin Cancer Biol.* 2011; 21(6): 367-76. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.10.005.

Lazzerini Denchi E, Attwooll C, Pasini D, Helin K. Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Mol Cell Biol*. 2005;25(7):2660-72.

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.

Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006; 5: 187–95. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x

Lee J, Lee HJ, Park JD, Lee SK, Lee SI, Lim HD et al. Anti-cancer activity of highly purified sulfur in immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Toxicol In Vitro*. 2009; 22(1): 87-95.

Lee M, Lee JS. Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. *BMB Rep*. 2014 Feb;47(2):51-9.

Lezzi G, Piattelli A, Rubini C, Goteri G, Artese L, Perrotti V, et al. Maspin expression in oral squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg*. 2007:1039-43.

Lim AM, Do H, Young RJ, Wong SQ, Angel C, Collins M et al. Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome. *Int J Cancer*. 2014; 135(4): 887-95. doi: 10.1002/ijc.28727.

Lim KP, Cirillo N, Hassona. Fibroblast gene expression profile reflects the stage of tumour progression in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2011;223:459-469.

Lim KP, Hamid S, Lau SH, Teo SH, Cheong SC. HPV infection and the alterations of the pRB pathway in oral carcinogenesis. *Oncol Rep*. 2007; 17(6): 1321-6.

Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, et al. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature*. 2010;464(7287):374-9. doi: 10.1038/nature08815. Erratum in: *Nature*. 2010;466(7304):398.

Liu X, Huang H, Wang J, Wang C, Wang M, Zhang B et al. Dendrimers-delivered short hairpin RNA targeting hTERT inhibits oral cancer cell growth in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*. 2011; 82(1): 17-23. doi: 10.1016/j.bcp.2011.03.017.

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):341-7.

Lu SY, Chang KW, Liu CJ, Tseng YH, Lu HH, Lee SY, et al. Ripe areca nut extract induces G1 phase arrests and senescence-associated phenotypes in normal human oral keratinocyte. *Carcinogenesis*. 2006;27(6):1273-84.

Maass N, Teffner M, Rosel F, Pawaresch R, Jonat W, Nagasaki K, et al. Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol* 2001;195:321-6.

Machtens S, Serth J, Bokemeyer C, Bathke W, Minssen A, Kollmannsberger C, et al. Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features. *Int J Cancer* 2001;95, 337-42.

Marioni G, Blandamura S, Lionello M, Giacomelli L, Staffieri C, Fasanaro E et al. Nuclear maspin expression relates to a better prognosis in elderly patients with laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2011;131(11):1220-5.

Marioni G, Staffieri A, Blandamura S. Maspin expression in head and neck carcinoma: subcellular localization matters. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39(3): 279-80. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00868.x.

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: S97-104.

Marioni G, Blandamura S, Giacomelli L, Calgaro N, Segato P, Leo G, et al. Nuclear expression of maspin is associated with a lower recurrence rate and a longer disease-free interval after surgery for squamous cell carcinoma of the larynx. *Histopathology* 2005;46: 576-82.

Martin N, Beach D, Gil J. Ageing as developmental decay: insights from p16(INK4a.). *Trends Mol Med.* 2014; 20(12): 667-674. doi: 10.1016/j.molmed.2014.09.008

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

McCord C, Xu J, Xu W, Qiu X, Muhanna N, Irish J, et al. Association of human papilloma virus with atypical and malignant oral papillary lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;117(6):722-32. doi: 10.1016/j.oooo.2014.02.003.

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.

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005; 436: 720–24.

Michishita E, Nakabayashi K, Suzuki T, Kaul SC, Ogino H, Fujii M, et al. 5-Bromodeoxyuridine induces senescence-like phenomena in mammalian cells regardless of cell type or species. *J Biochem.* 1999;126(6):1052-9.

Mielcarek-Kuchta D, Olofsson J, Golusinski W. p53, Ki67 and cyclin D1 as prognosticators of lymph node metastases in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003; 260(10): 549-54.

Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 170325. doi: 10.1155/2012/170325.

Mirghani H, Amen F, Moreau F, Lacau St Guily J. Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma? *Oral Oncol.* 2015;51(3):229-36. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.11.011.

Miura T, Mattson MP, Rao MS. Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging Cell.* 2004; 3: 333–43. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00134.x

Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, Craig, Allred D. Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. *J Pathol* 2003;199, 432-5.

Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(10):1037-46.

Myo K, Uzawa N, Miyamoto R, Sonoda I, Yuki Y, Amagasa T. Cyclin D1 gene numerical aberration is a predictive marker for occult cervical lymph node metastasis in TNM Stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 2005; 104: 2709-16.

Nankivell P, Williams H, Webster K, Pearson D, High A, MacLennan K et al. Investigation of p16(INK4a) as a prognostic biomarker in oral epithelial dysplasia. *Oral Pathol Med.* 2014; 43(4): 245-9. doi: 10.1111/jop.12128.

Narita M, Nunez S, Heard et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003; 113: 703-16.

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. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40(8): 629-35. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01026.x.

Natarajan E, Saeb M, Crum CP, Woo SB, McKee PH, Rheinwald JG. Co-expression of p16(INK4A) and laminin 5 gamma2 by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas in vivo and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *Am J Pathol.* 2003;163(2):477-91.

Nickoloff BJ, Lingen MW, Chang BD, 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.

Ohta S, Uemura H, Matsui Y, Ishiguro H, Fujinami K, Kondo K. Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107(1): 81-91. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.08.027.

Ohtani N, Mann DJ and Hara E: Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci* 100: 792-797, 2009.

Park YJ, Kim EK, Moon S, Hong DP, Bae JY, Kim J. Human telomerase reverse transcriptase is a promising target for cancer inhibition in squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2014; 34(11): 6389-95.

Park JI, Jeong JS, Han JY, Kim DI, Gao YH, Park SC, et al. Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000 Aug;126(8):455-60.

Payne CM, Holubec H, Crowley-Skillicorn C, Nguyen H, Bernstein H, Wilcox G, et al. Maspin is a deoxycholate-inducible, anti-apoptotic stress-response protein differentially expressed during colon carcinogenesis. *Clin Exp Gastroenterol.* 2011;4:239-53.

Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García 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.

Petersen OW, Nielsen EL, Gudjonsson T. Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer Can Provide a Nonmalignant Stroma. *Am J Pathol* 2003, 162:391–402.

Piboonniyom SO, Timmermann S, Hinds P, Münger K. Aberrations in the MTS1 tumor suppressor locus in oral squamous cell carcinoma lines preferentially affect the INK4A gene and result in increased cdk6 activity. *Oral Oncol.* 2002; 38(2): 179-86.

Prieur A, Peeper DS. Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(2):150-5. doi: 10.1016/j.ceb.2008.01.007.

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): 2799-803.

Rao K B, Malathi N, Narashiman S. Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(4):ZC14-7.

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.

Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer.* 2012; 130(8): 1715–25. doi:10.1002/ijc.27316.

Reshma V, Rao K, Priya N S, Umadevi H S, Smitha T, Sheethal H S. Expression of maspin in benign and malignant salivary gland tumors: An immunohistochemical study. *Indian J Dent Res* 2014;25:346-51.

Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene.* 1998; 16: 1113–23.

Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011; 192(4): 547-56. doi: 10.1083/jcb.201009094.

Rodier F, Coppe´ JP, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Munoz DP, Raza SR. Persistent DNA damage signaling triggers senescence associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009, 11:973-979.

Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(22): 7475-84.

Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Leonart ME, Castellvi J et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 2011; 30(18): 2087-97. doi: 10.1038/onc.2010.614.

Rowland BD, Denissov SG, Douma S, Stunnenberg HG, Bernards R, Peeper DS. E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest. *Cancer Cell.* 2002; 2:55–65.

Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G, et al. Trivandrum Oral Cancer Screening Study Group. Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomized controlled trial. *Lancet.* 2005; 365: 1927–33.

Sarkisian CJ, Keister BA, Stairs DB, Boxer RB, Moody SE, Chodosh LA. Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 2007;9(5):493-505.

Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T and Kannan S: CCND1 polymorphisms (A870G and C1722G) modulate its protein expression and survival in oral carcinoma. *Oral Oncol* 2008;44: 689-97.

Scanlon CS1, Van Tubergen EA, Inglehart RC, et al. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J Dent Res.* 2013;92(2):114-21.

Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer—a review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32(3):233-45.

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. (a)

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. (b)

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. (c)

Schmidt K. Physiology and pathophysiology of senescence. *Int J Vitam Nutr Res.* 1999; 69(3): 150-3.

Schwarz S, Ettl T, Kleinsasser N, Hartmann A, Reichert TE, Driemel O. Loss of Maspin expression is a negative prognostic factor in common salivary gland tumors. *Oral Oncol.* 2008;44(6):563-70.

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: 593–602.

Serrano M. Shifting senescence into quiescence by turning up p53. *Cell Cycle* 2010;9(21):4256-7.

Serrano M. Cancer: a lower bar for senescence. *Nature*. 2010;464(7287):363-4.

Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res*. 2000;257(1):162-71.

Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(1):72-6.

Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*. 2004;23(16):2919-33.

Sheng S. The promise and challenge toward the clinical application of maspin in cancer. *Front Biosci*. 2004 Sep 1; 9: 2733-45.

Shi X, Tian B, Liu L, Gao Y, Ma C, Mwachie N et al. Rb protein is essential to the senescence-associated heterochromatic foci formation induced by HMGA2 in primary WI38 cells. *J Genet Genomics*. 2013; 40(8): 391-8. doi: 10.1016/j.jgg.2013.05.007.

Sinha P, Thorstad WT, Nussenbaum B, Haughey BH, Adkins DR, Kallogjeri D, et al. Distant Metastasis in p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: A critical analysis of patterns and outcomes. *Oral Oncol*. 2014; 50(1): 45–51.

Smith SL, Watson SG, Ratschiller D, Gugger M, Betticher DC, Heighway J. Maspin - the most commonly-expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer - is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions. *Oncogene* 2002;22,8677-87.

Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. New York: Wiley-Liss. 1997

Solomon LA, Munkarah AR, Schimp VL, Arabi MH, Morris RT, Nassar H, et al. Maspin expression and localization impact on angiogenesis and prognosis in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;101(3):385-9.

Song SY, Lee SK, Kim DH, Son HJ, Kim HJ, Lim YJ, et al. Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density. *Dig Dis Sci* 2002;47:1831-5.

Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2005; 68(4-6): 314-25.

Soucek L, Whitfield J, Martins CP, Finch AJ, Murphy DJ, Sodir NM, et al. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature*. 2008;455(7213):679-83. doi: 10.1038/nature07260.

Sudbø J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int J Cancer*. 2005;115(3):339-45.

Suzuki H, Sugimura H, Hashimoto K. p16INK4A in oral squamous cell carcinomas--a correlation with biological behaviors: immunohistochemical and FISH analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 64(11): 1617-23.

Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:978312. doi: 10.1155/2011/978312.

Suzuki T, Yokozaki H, Kuniyasu H, Hayashi K, Naka K, Ono S et al. Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 2001; 88(6): 992-7.

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. doi: 10.1186/s13000-014-0205-9.

te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2002;62(6):1876-83.

Terao Y, Nishida J, Horiuchi S, Rong F, Ueoka Y, Matsuda T, et al. Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells. *Int J Cancer*. 2001;94(2):257-67.

Tsygankov D, Liu Y, Sanoff HK, Sharpless NE, Elston TC. A quantitative model for agedependent expression of the p16INK4a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 16562-7.

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.

Umekita Y, Yoshida H. Expression of maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma. *Histopathology*. 2003 Jun;42(6):541-5.

van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5): 317-23. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.016.

Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM. Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem*. 1995; 270: 30701-8.

Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*. 2007;445(7128):661-5.

Vered M, Allon I, Dayan D. Maspin, p53, p63, and Ki-67 in epithelial lesions of the tongue: from hyperplasia through dysplasia to carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009; 38(3): 314-20. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00698.x.

Wainwright LJ, Lasorella A, Iavarone A. Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9396-400.

Wang X, Wong SC, Pan J, Tsao SW, Fung KH, Kwong DL, et al. Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res*. 1998;58(22):5019-22.

Wang Y, Sheng S, Zhang J, Dzinic S, Li S, Fang F et al. Elevated maspin expression is associated with better overall survival in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). *PLoS One*. 2013; 8(5): e63581. doi: 10.1371/journal.pone.0063581.

Weinberg MA, Estefan DJ. Assessing oral malignancies. *Am Fam Physician*. 2002; 65: 1379–84.

Wu CL, Roz L, McKown S, Sloan P, Read AP, Holland S. DNA studies underestimate the major role of CDKN2A inactivation in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999; 25(1): 16-25.

Wu CH, van Riggelen J, Yetil A, Fan AC, Bachireddy P, Felsher DW. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(32):13028-33.

Xia, W, Lau YK, Hu MC, Li L, Johnston DA, Sheng S et al. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2000;19, 2398-2403.

Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007;445(7128):656-60. Erratum in: *Nature*. 2011;473(7348):544.

Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N, Kumamoto Y, Kuratomi Y, Tomita K, et al: Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001;23: 962-966.

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. *J Oral Pathol Med*. 2009; 38(6): 535-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00762.x.

Yuan H, Jiang F, Wang R, Shen M, Chen N. Lentivirus-mediated RNA interference of E2F-1 suppresses Tca8113 cell proliferation. *Mol Med Rep*. 2012; 5(2): 420-6. doi: 10.3892/mmr.2011.668.

Zhang Z, Rosen DG, Yao JL, Huang J, Liu J. Expression of p14ARF, p15INK4b, p16INK4a and DCR2 increases during prostate cancer progression. *Mod Pathol*. 2006; 19(10): 1339-43.

Zhang Z, Mitra RS, Henson BS, Datta NS, McCauley LK, Kumar P et al. Rap1GAP inhibits tumor growth in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2006 Feb; 168(2): 585-96.

Zhang L, Wu R, Dingle RW, 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.

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): 111-2

## ANEXO 1: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

### Diagnóstico

Mucosa normal     Leucoplasia sin displ     Leucoplasia con displ     COCE

### Datos del paciente

Nombre (siglas):.....

Fecha de nacimiento (edad): .....

Sexo (H/M): ..... Raza: .....

Patología sistémica: .....

.....

Medicación: .....

.....

### Tabaco:

- No fumador

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

- Fumador  ¿Desde cuándo? ..... ¿cuánto tiempo? .....¿cuántos/día? .....

### Alcohol:

- Tipo:..... Cantidad: .....

Otras drogas/otros hábitos: .....

### Leucoplasia:

Tipo clínico (homogénea/no): .....

Tipo histológico: displasia (no/leve/moderada/severa): .....

Clasificación OIN (grado 1/2/3): .....

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

Profesional responsable del diagnóstico: .....

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

### COCE:

Tipo clínico (ulcerado/exofítico...): .....

Tipo histológico (bien/mal diferenciado): .....

Clasificación TNM: .....

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

Profesional responsable del diagnóstico: .....

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

## **ANEXO 2: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

---

☞ Mi médico u odontólogo me ha propuesto para participar en un proyecto de estudio de marcadores de senescencia. El objetivo de este estudio es determinar la posibilidad de que dichos marcadores sirvan para hacer un pronóstico más preciso y precoz de la evolución de lesiones premalignas orales. Debido a que en este momento se desconocen los resultados del estudio que se va a realizar, mis lesiones serán tratadas de acuerdo a las terapias que en este momento están aprobadas y son de reconocida eficacia.

☞ Como participante de este estudio, he sido informado acerca del objetivo de los exámenes que se piensan realizar con la técnica quirúrgica realizada y las muestras que se tomarán en el momento de la cirugía.

☞ Entiendo que durante el procedimiento quirúrgico que se me vaya a realizar como parte del tratamiento habitual indicado en mi caso, parte del material mucoso se utilizará como biopsia para el estudio de marcadores de senescencia. Éste procederá bien de mucosa que se vaya a desechar procedente de una cirugía periodontal o de implantes dentales, o bien de un fragmento de material de biopsia que se tome para diagnosticar una lesión oral.

☞ No tengo obligación alguna de mi parte con quienes realizan este estudio y puedo retirarme en el momento que yo desee o juzgue conveniente. Esto no será motivo para que no se me atienda debidamente en el futuro si solicito los servicios de atención médica u odontológica.

☞ También deseo que la información que se obtenga de este estudio sea confidencial y no se divulguen los resultados en sitios diferentes de una publicación científica o a las autoridades de salud.

☞ Entiendo que puedo realizar todas las preguntas que considere necesarias.

☞ He recibido suficiente información sobre el estudio

Conforme con todo lo anteriormente expuesto, presto de forma voluntaria mi conformidad para participar en este estudio.

Firma del paciente

Firma del profesional

Fdo (Nombre y DNI):.....

Lugar y fecha.....

---

Revocación:

Deseo retirar mi consentimiento para la utilización de mis muestras en el estudio.

Firma del paciente

Firma del profesional

Fdo (Nombre y DNI):.....

Lugar y fecha.....

---

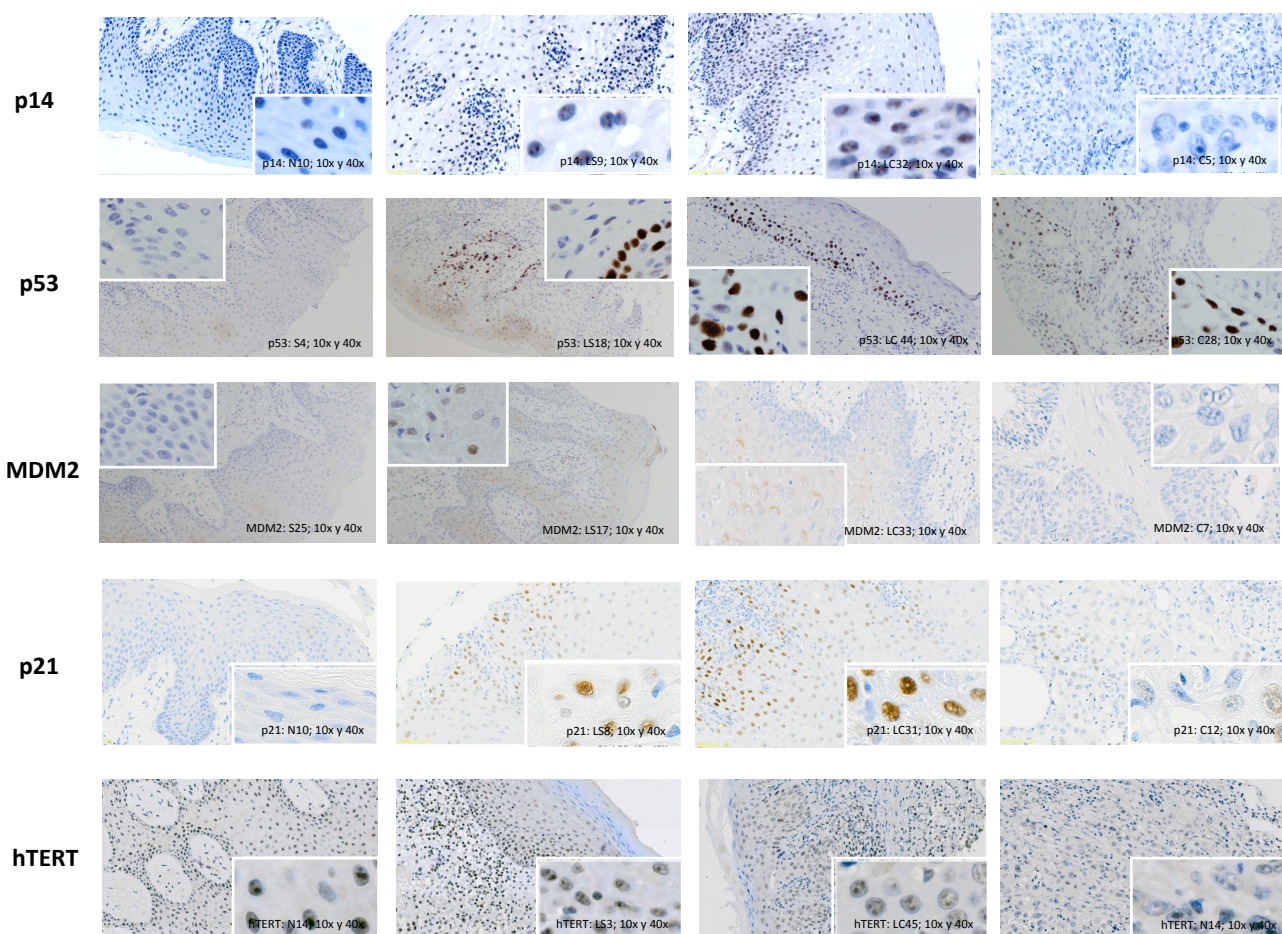
## **ANEXO 3. APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO**

---

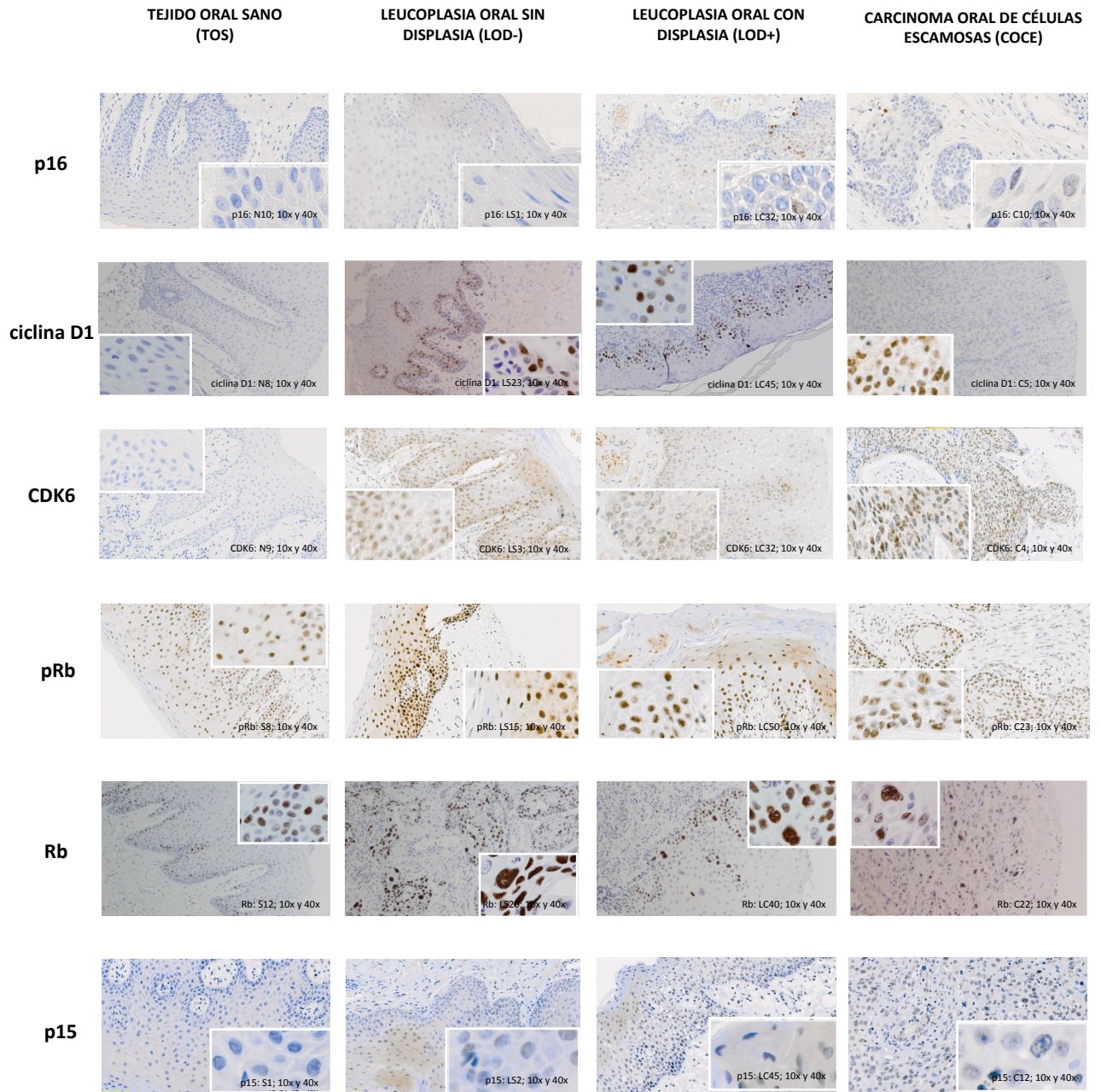
Código interno nº E-09/263 del Hospital Clínico San Carlos

# ANEXO 4. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

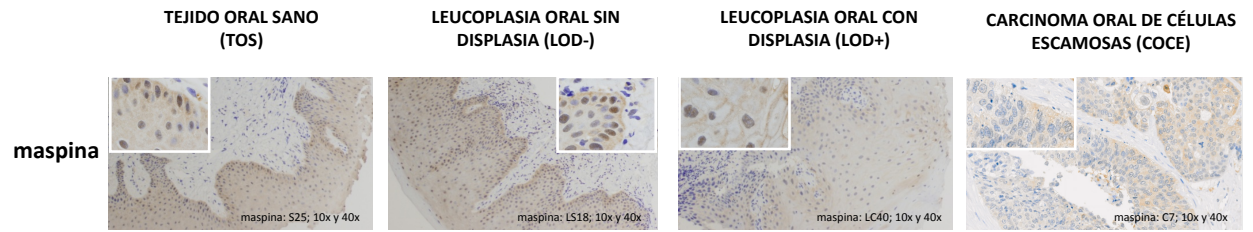
## Expresión de los marcadores de senescencia de la vía ARF-p53



## Expresión de los marcadores de senescencia de la vía p16-pRb



## Expresión de maspina



## **ANEXO 5. PUBLICACIÓN DEL ESTUDIO PILOTO**

## Differences in the expression of five senescence markers in oral cancer, oral leukoplakia and control samples in humans

ANTONIO BASCONES-MARTÍNEZ<sup>1</sup>, MERCEDES LÓPEZ-DURÁN<sup>1</sup>, JORGE CANO-SÁNCHEZ<sup>1</sup>,  
 LYDIA SÁNCHEZ-VERDE<sup>2</sup>, ANA DÍEZ-RODRÍGUEZ<sup>2</sup>, PABLO AGUIRRE-ECHEBARRÍA<sup>3</sup>,  
 EMILIO ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ<sup>3</sup>, MIGUEL ANGEL GONZÁLEZ-MOLES<sup>4</sup>, JAIME BASCONES-ILUNDAIN<sup>1</sup>,  
 LORENZO LO MUZIO<sup>5,6</sup> and JULIÁN CAMPO-TRAPERO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Surgery, Oral Medicine and Periodontology, Dental School, Complutense University of Madrid;

<sup>2</sup>Immunohistochemistry and Histology Unit, CNIO (Spanish National Cancer Centre); <sup>3</sup>Department of Pathology, Hospital Gregorio Marañón, Madrid; <sup>4</sup>Department of Oral Medicine, Dental School, Granada University, Granada, Spain; <sup>5</sup>Department of Surgical Sciences, University of Foggia, Foggia;

<sup>6</sup>IRCCS CROB - National Cancer Institute of Oncology of Basilicata, Rionero in Vulture, Potenza, Italy

Received December 11, 2011; Accepted January 30, 2012

DOI: 10.3892/ol.2012.649

**Abstract.** Oncogene-induced senescence (OIS) may be a response to oncogenic activation, acting as a natural barrier against carcinogenesis at a premalignant stage. Thus, numerous cells in premalignant lesions enter senescence, but none or few in malignant tumours. This event could be due to the loss of senescence pathway effectors, including p16 (INK4a)-pRb or ARF-p53. The aim of this study was to characterize and compare the expression of certain senescent markers between oral precancer and cancer tissue samples. The expression of cyclin D1, Rb, maspin, p53 and mouse double minute 2 (MDM2) was analyzed in 20 paraffin-embedded tissue samples of normal oral mucosa (NOM), 14 samples of oral leukoplakia without dysplasia (OLD-), 11 samples of leukoplakia with dysplasia (OLD+) and 15 samples of oral squamous cell carcinoma (OSCC) by immunohistochemistry in tissue arrays. The expression of p16-pRb pathway markers, cyclin D1, maspin and Rb, was more frequent in OLD+ samples than in OSCC samples, although a statistical significance was only observed for maspin ( $P=0.036$ ). Cyclin D1 expression was also significantly more frequent in OLD- samples vs. NOM samples. For the ARF-p53 pathway, the expression of p53 and MDM2 was significantly more frequent in the OLD- samples compared to in the NOM ones. These findings may indicate a role for cellular senescence in oral carcinogenesis, considering maspin

as a reliable senescence marker and prognostic factor in oral premalignant lesions.

### Introduction

Cellular senescence was first reported in cultured human fibroblasts (1). Hayflick and Moorhead observed permanent replication arrest in phase G1 of the cell cycle following a certain number of replications, but without loss of viability or metabolic capacity (1). This physiological limit is thought to be a mechanism for avoiding cell immortality or preventing prolongation of the replicative life of cells, which would increase their susceptibility to gain successive mutations, and thus favour their progression to malignancy (2). It was recently demonstrated that this suppression of the proliferative capacity of cells may also be triggered by oncogene-induced senescence (OIS) (2). Various studies of premalignant lesions have proposed a role for OIS as an anti-oncogenic response *in vivo*, describing senescent cells in premalignant lesions, but not in tumours, and concluding that OIS may act as a barrier against malignant transformation. Accordingly, only cells that lose this senescent response are transformed from a benign state (pre-malignant lesion) to malignancy (carcinoma). However, given the complexity of the carcinogenic process, this does not appear to be a cause-effect correlation, but rather a further expression of carcinogenesis (2,3).

Three pathways have been reported to induce senescence: the ARF/p53/p21 pathway, also involved in apoptosis; the p16/Rb/E2F pathway, more specifically related to senescence; and a third, less well-documented pathway via retinoic acid receptors (4). The expression of molecular markers of these pathways in different types of carcinomas have been studied and correlated with prognosis. To test the hypothesis that OIS acts as an anti-carcinogenic barrier in the premalignant stage, we compared the expression of these markers between premalignant and malignant oral lesions. The potential value of findings would be to offer a basis for predicting the malignant

*Correspondence to:* Ms. Mercedes Lopez-Duran, Department of Oral Surgery, Oral Medicine and Periodontology, Dental School, Complutense University of Madrid, Plaza de Ramón y Cajal, 3. Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain  
 E-mail: lopezduran.m@gmail.com

**Key words:** senescence, oral cancer, oral leukoplakia, cyclin D1, maspin, Rb, p53, MDM2

# **ANEXO 6. RESULTADO DE LA ESTANCIA EN EL TRINITY COLLEGE (DUBLÍN, IRLANDA) PARA LA MENCIÓN EUROPEA**

---

## **RELATIONSHIP BETWEEN ORAL INFLAMMATION AND ONCOGENE INDUCED SENESENCE IN HUMAN ORAL SAMPLES**

### **INTRODUCTION AND JUSTIFICATION:**

Oral squamous cells carcinoma is responsible worldwide over half of the 500000 new cases of head and neck cancer per year, with a five-year survival rate of only 55% (Parkin et al. 1999). It has been demonstrated that the suppression of the proliferative capacity of cells may be triggered by oncogene-induced senescence (OIS) (Ohtani et al 2009) and various studies of premalignant lesions have proposed a role for OIS as an anti-oncogenic response in vivo (Collado et al, 2005, 2010).

It has already been demonstrated that senescence represents a true barrier to the progression of many types of cancer, including oral squamous cell carcinoma (Braig et al 2005; Chen et al 2005; Collado et al. 2005; Michaloglou et al. 2005 in animal models). And it has been previously clarified that p16INK4a, located on the INK4a locus on chromosome 9p21, is the true tumor suppressor gene in man against malignant transformation. Thus, understanding the mechanisms by which oral cancer evades senescence and the risk factors for this progression should become a priority in the oral cancer research. It has recently been confirmed that some precancerous lesions in different human tissues have a propensity to progress to malignancy in the presence of inflammation of those tissues (Guerra et al. 2011 in pancreatitis). This would be due to the fact that inflammation eliminates the senescence program characteristic of benign lesions which are fighting against cancer progression. Moreover, some epidemiological studies have proposed a positive implication of NSAIDs in the diminishment of cancer risk (Bonifazi et al. 2010; Bradley et al., 2010; Rothwell et al, 2011 in pancreatic cancer). So, if we can demonstrate the negative role of periodontal inflammation for the transition from a premalignant oral lesion to a carcinoma, periodontal treatment should be part of the therapy in oral premalignant lesions as leukoplakias.

The anticancer barrier of senescence in oral keratinocytes consists in two different steps. The first one is mediated by p16ink4a and results in the replicative arrest of the affected cells without producing its death. The second stage is triggered when the first step has been overcome and cells have escaped from replicative arrest. In the case of p16ink4a, it is frequently due to epigenetic silencing more than to deletions or mutations. At this time, senescence would be maintained mediated by TP53 (Hunter et al., 2011).

## **HYPOTHESIS**

It has not been studied the effect of gingival inflammation in oncogene induced senescence of oral tissues, while it has been proved that inflammation blocks senescence in other tissues, favouring the malignant progression of premalignant lesions. So, according to these studies, the presence of moderate to severe inflammation in oral premalignant lesions would be negatively correlated with the senescence phenomenon.

## **OBJECTIVES:**

The main aim of this study is to determine if the presence of histological inflammation in oral leukoplakias samples affects the oncogene induced senescence program mediated by p16INK4a. First, it has to be verified that the analyzed oral leukoplakias samples have a higher expression of several markers involved in senescence pathways, when compared with normal gingival samples or oral squamous cell carcinoma samples.

## **MATERIAL AND METHODS**

Two different analyses were performed to achieve the objectives of the study.

### **Study of the differential expression of markers involved in senescence pathways in oral leukoplakias, normal gingiva and oral squamous cells carcinomas**

With the aim of confirming that the human oral leukoplakias confront the malignant progression by means of the senescence program, the expression of five proteins involved in the senescence pathways was studied.

The selected proteins were Maspin, P14, P15, P16 and P53. The expression of Ki67, a marker of cellular proliferation, was also analyzed in conjunction with the senescence markers, to assess the establishment of replicative arrest. The expression of the six proteins was visualized by means of immunohistochemistry. The comparisons were performed between four groups of samples embedded in paraffin. These groups were composed of 43 human samples of normal gingiva (NG), 28 of oral leukoplakias without dysplasia (OLD-), 23 with dysplasia (OLD+) and 30 samples of oral squamous cells carcinomas (OSCC).

### **HUMAN SAMPLES**

Samples from patients who had undergone oral biopsies due to suspicion of oral carcinoma were collected from the histopathology files of the Gregorio Marañón Hospital in Madrid and the Department of Surgical Sciences of the University of Foggia, Italy. NG samples were obtained from the discarded gingival tissue during resective periodontal surgeries performed in the Faculty of Dentistry, Complutense University of Madrid. A final sample size of 124 patients was included in the study.

Informed consent was obtained and data confidentiality was maintained by replacing all patient identifiers with numerical codes. The use of biopsied tissue was approved by the institutional Ethics Committee (E-09/263 from Hospital Clínico San Carlos).

Data were gathered from patient clinical records with respect to their age, gender, medication, systemic disease, tobacco use, personal history of oral cancer and on the site from which the sample derived.

#### HISTOPATHOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Samples that were not embedded in paraffin were embedded after fixation in 10% buffered formalin.

Two tissue arrays were constructed to include the entire sample. Each patient was represented in the tissue array by means of two cylindrical blocks of tissue taken from selected areas of the original paraffin-embedded samples, at the discretion of a pathologist. The tissue array organization was determined by a random numbers list generated by a computer.

Both tissue arrays were serially sectioned (3 microns). One section per tissue array was stained with hematoxylin and eosin and the rest were intended for immunohistochemical studies.

For the immunohistochemical study, samples were first deparaffinised and hydrated. A HIER (Heat-Induced Epitope Retrieval) stage was conducted in a sodium citrate buffer solution with 0.01 M trisodium citrate solution or 1 mM TE (Tris-EDTA) at pH 8.0. It was then heated for 20 min at 98°C in a PT Link (Dako, Carpinteria, CA, USA) oven. Following heating, sections were rinsed in cold running water for 5 min, then passed through Tris-buffered saline (TBS) at pH 7.4. The sections were then incubated with the corresponding antibodies. Ki67 immunolabeling was performed with MIB 1 (1:100 mouse, DAKO), Maspin was stained with H-130 (1:500 rabbit polyclonal, Santa Cruz), P14 with ab3642 (1:50 rabbit polyclonal, Abcam), P15 with SPM303 (1:2 prediluted, Abcam) and P53 with DO-7 (1:200 mouse, Novocastra). Following incubation with the primary antibodies, EnVision-FLEX (Dako) was used in Dako Autostainer Plus Link automatic equipment for the immunodetection of all markers with the exception of Maspin, using diaminobenzidine chromogen as the substrate. Maspin was visualized by using the Leica Vision Bio System with a Leica BOND MAX immunostainer. Maspin antigen retrieval was performed with EDTA, using the same immunostainer. For the controls, incubations were performed with omission of the specific antibodies and with the inclusion of unrelated antibodies.

#### TISSUE ARRAYS ANALYSIS

Cylinder sections with no epithelium or containing less of 50% of the original tissue were considered as non-representative samples and excluded from the immunostaining analysis. The degree of staining was determined in all cylinders remaining intact following the immunohistochemistry by an optical microscopy study (magnification, x10, x40 and x100) of each cylinder. The staining was conducted by two members of the team, blinded at all times to the clinical data corresponding to the samples. A sample was only excluded when both cylinders were non-assessable.

#### **Study of the relationship between histological inflammation and senescence expression in oral leukoplakias**

For this part of the study, only the 51 samples comprising the leukoplakias groups were analysed. 28 samples were leukoplakias without dysplasia and 23 with dysplasia of different degrees. According to previous studies, premalignant lesions (in this case oral leukoplakias) would accumulate a high number

of senescent cells, which should also be confirmed with the results of the preceding part of the study. To analyze the relationship between inflammation and senescence in these premalignant lesions, the diagnosis of both senescence and histological inflammation were first settled.

#### DIAGNOSIS OF CELLULAR SENESENCE

Cellular senescence was determined through immunohistochemistry analysis. We examined the expression of P16INK4a as a marker of senescence and Ki67 as a marker of cellular proliferation, following the procedures that were previously described. The presence of oncogene induced senescence in a sample was determined when both a high expression of p16INK4a and a low expression of Ki67 coincided in the same sample.

#### DIAGNOSIS OF HISTOLOGICAL TISSUE INFLAMMATION

Inflammation of the leukoplakias samples was assessed histologically. It was graded as absent, low, moderate or severe. Parameters that were evaluated for this categorization were: presence and intensity of the inflammatory infiltrate, composition and CD3 lymphocytes level. These parameters were determined by means of an optical microscopy study of the hematoxylin/eosin stained samples and the CD3 lymphocytes counting was done through immunofluorescent analysis and confocal microscope visualization. The immunofluorescent analysis and visualization was carried out at the Biomedical Science Institute, Trinity College, Dublin; Ireland.

#### **Statistical analysis:**

Stat View v.5.0.1 (SAS Institute, Inc., NC, USA) and Statgraphics Plus v. 5.1 (Statistical Graphics Corp., Oswego, NY, USA) were used for the statistical analyses. The Kruskal Wallis test, a non-parametric test of multiple comparisons, was used to study the differential expression of markers involved in senescence pathways, as well as Ki67, among the groups (NG, OLD-, OLD+ and OSCC). To analyze the relationship between histological inflammation and senescence expression in oral leukoplakias, contingency tables were generated and the Chi-squared test was used.  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

## **RESULTS**

### **Study of the differential expression of markers involved in senescence pathways in oral leukoplakias, normal gingiva and oral squamous cells carcinomas**

Table 1 shows the immunohistochemistry results for Maspin, P14, P15, P16, P53 and Ki67. Results for the statistical comparisons of the markers expression between the four groups are reported in tables 2, 3, 4, 5, 6 and 7. Maspin, P14 and P15 expression was increased in leukoplakias groups compared with normal gingiva or oral squamous cells carcinomas, with statistically significant differences between the groups. The fact that these proteins involved in the senescence pathways are overexpressed in leukoplakias but not in normal or carcinomas samples indicates that the senescence program is specially working in the leukoplakias group. However, for the marker P16, there were no statistically

significant differences in its expression between the four groups. P53 expression also differed between groups, showing statistically significant differences between the normal gingival group and the leukoplakias or carcinomas groups.

The expression of Ki67 confirmed a lower level of cell proliferation in the leukoplakias groups when compared with carcinomas lesions, what support the idea of the senescent program in these premalignant lesions.

### **Study of the relationship between histological inflammation and senescence expression in oral leukoplakias**

Contingency tables were built to study the relationship between histological inflammation and senescence expression in the groups of oral leukoplakias, where the senescence program has previously been proved to be increased.

Table 8 describes the histological characteristics of the leukoplakias samples in terms of inflammation. Two of the 51 samples could not been evaluated in this part of the study. One sample from the leukoplakias with dysplasia group could not be evaluated for P16 and Ki67, and another one from the non dysplastic group was damaged for Ki67 evaluation.

The analysis of Ki67 and P16 revealed that 17 from the 49 evaluated leukoplakias samples (34.7% of the leukoplakias) were positive for senescence. 8 samples were leukoplakias with dysplasia and 9 without dysplasia. They represented 34.8% and 32.1% of leukoplakias with and without dysplasia, respectively.

Statistical analysis revealed that inflammatory infiltrate intensity in leukoplakias samples was not related with senescence ( $P=0.426$ ). However, there was a statistically significant difference in the level of CD3 lymphocytes in senescent versus non senescent samples, so that senescent samples had a moderate to severe expression of CD3 lymphocytes in the 100% of the cases ( $P=0.028$ ). When analyzing independently the two groups of leukoplakias, with and without dysplasia, for the association between inflammatory infiltrate intensity and senescence, neither was the association significant. However, leukoplakias with dysplasias had a higher prevalence of moderate to severe inflammation than those without dysplasia, both in samples with or without senescence.

### **DISCUSSION**

It has been proved that oncogene induced senescence suppose a barrier against malignant transformation in several tissues. Recently, it has also been proposed that inflammation contributes to development of carcinoma by inhibiting oncogene induced senescence, and that oncogene induced senescence reappears after recovery from the inflammatory injury (Guerra et al. 2011). However, most of these studies have been developed in animal models and none in terms of inflammation refers to oral cavity. The importance of limiting the results and conclusions obtained from the studies to specific models and human tissues are based on the differences that have been found between various tumor types and study models. That reveals that senescence frequently acts in a tissue context-dependent way.

The most representative marker of senescence is senescence-associated-beta-galactosidase (SA-B-gal). However, this marker can only be measured in fresh tissues. For this reason, the setting of senescence in the study has been based on the parallel and opposite expression of Ki67 and P16ink4a, as described in other studies (Guerra et al. 2011). However, this could suppose a limitation, as inflammatory conditions can result in increased Ki67 staining, as described by Lingen et al (Lingen et al, 2011). Moreover, P16 expression has also been described to be altered in several carcinogenic processes, and data regarding the direction (loss or overexpression) of P16 expression are conflicting (Gologan et al, 2005; Bradley et al 2006; Krimpenfort et al. 2001). Regarding this alteration, the lack of statistically significant differences we found for the expression of P16 between groups could be explained by the frequent epigenetic silencing of P16 in the carcinogenesis process. Fortunately, these differences were significant for three of the other markers (Maspin, P14 and P15), which allowed us to affirm that senescence phenomenon increased in oral premalignant lesions but disappears in established carcinomas.

As to the results in terms of inflammation, several hypothesis have been proposed to understand the connections between cellular senescence and inflammation. Braun et al described a negative effect of senescence in transplanted tissues, arguing that cell cycle inhibitors as P16ink4a limited the regenerative capability of the wound (Braun et al. 2012). On the other hand, it has also been described a negative blocking effect of acute inflammation over oncogene induced senescence (Guerra et al. 2011). Future research could be focused on the effect of antiinflammatory treatment (by means of periodontal treatment or anti-inflammatory drugs) to re-establish the OIS in the premalignant oral lesions. Periodontal treatment with an antiinflammatory aim could maintain senescence program in oral premalignant lesions to avoid the progression to a malignant form.

We can conclude that the senescent program present in oral premalignant lesions (leukoplakias) is abrogated in malignant lesions, as proved by the differential expression of Maspin, P14 and P15 in oral leukoplakias when compared with normal gingiva and oral squamous cells carcinomas. Gingival inflammation in these tissues seems not to affect the senescent program mediated by p16ink4a.

#### **Conflict of Interest and Sources of Funding Statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

This study was funded by the Fundación Mutua Madrileña, 5251146, Madrid, Spain.

#### **REFERENCES**

- Bonifazi, M., Gallus, S., Bosetti, C., Polese, J., Serraino, D., Talamini, R., Negri, E., and La Vecchia, C. (2010). Aspirin use and pancreatic cancer risk. *Eur. J. Cancer Prev.* 19, 352–354.
- Bradley, M.C., Hughes, C.M., Cantwell, M.M., Napolitano, G., and Murray, L.J. (2010). Non-steroidal anti- Inflammatory drugs and pancreatic cancer risk: a nested case—control study. *Br. J. Cancer* 102, 1415–1421.
- Bradley KT, Budnick SD, Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol.* 2006 Oct;19(10):1310-6.
- Braig M, Lee S, Lodenkemper C, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 005;436:660-5.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005;436:725-30.

Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005;436:642.

Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* 10, 51–57.

Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al: Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642, 2005.

Gallo O, Santucci M, Franchi A. Cumulative prognostic value of p16 / CDKN2 and p53 oncoprotein expression in premalignant laryngeal lesions. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1161–1163.

Gologan O, Barnes EL, Hunt JL. Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jun;29(6):792-6.

Guerra C, Collado M, Navas C, et al. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*. 2011 Jun 14;19(6):728-39.

Hunter K, Parkinson EK, Thakker N. An overview of the molecular pathology of head and neck cancer, and its clinical implications. *Periodontol 2000*. 2011 Oct;57(1):132-49.

Krimpenfort, P., Quon, K.C., Mooi, W.J., Loonstra, A., and Berns, A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413, 83–86.

Lingen MW, Pinto A, Mendes RA, et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Dis*. 2011 Apr;17 Suppl 1:7-22.

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436:720-4.

Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1037–1046.

Ohtani N, Mann DJ and Hara E: Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci* 100: 792-797, 2009.

Parkin DM, Pisani P and Ferlay J: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49: 33-64, 1999.

Rothwell, P.M., Fowkes, F.G.R., Belch, J.F.F., Ogawa, H., Warlow, Ch.P., and Meade, T.W. (2011). Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 377, 31–41.

Tables and figures

Table 1: Expression of senescence markers Maspin, P14, P15, P16 and P53; and the marker of cell proliferation Ki67.

	THRESHOLD	NG	LOD-	LOD+	OSCC
Maspin	0	1	0	0	13
	1	30	3	3	16
	2	11	25	17	1
	NV	–	–	2	–
P14	0	0	0	0	8
	1	39	7	6	10
	2	3	19	15	9
	3	0	1	0	3
	NV	1	1	1	–
P15	0	20	4	0	10
	1	20	6	7	13
	2	2	18	13	7
	NV	1	–	3	–
P16	0	36	19	13	22
	1	7	9	9	7
	2	0	0	0	1
	NV	–	–	1	–
P53	0	35	6	8	9
	1	8	18	8	7
	2	0	1	4	5
	3	0	3	3	9
	NV	–	–	2	–
Ki67	0	38	10	11	6
	1	5	14	9	12
	2	0	3	2	10
	3	0	0	0	2
	NV	–	1	1	–

NG: normal gingiva; OLD+: leukoplakia with dysplasia, OLD-: leukoplakia without dysplasia; OSCC: oral squamous cell carcinoma; NV: non valuable sample.

Table 2. Comparisons of Maspin expression between the four groups

GRUPO (I)	GRUPO (J)	DIF (I, J)	Z (I, J)	P-VALOR	SIG.
1	2	-34.2262	-4.03293	0.00006	*
1	3	-31.9548	-3.38132	0.00072	*
1	4	25.6286	3.08213	0.00206	*
2	3	2.2714	0.22304	0.82351	
2	4	59.8548	6.54835	0.00000	*
3	4	57.5833	5.73449	0.00000	*

Table 3. Comparisons of P14 expression between the four groups

GRUPO (I)	GRUPO (J)	DIF (I, J)	Z (I, J)	P-VALOR	SIG.
1	2	-37.0688	-4.32014	0.00002	*
1	3	-34.7143	-3.73405	0.00019	*
1	4	-10.9095	-1.31199	0.18952	
2	3	2.3545	0.23264	0.81604	
2	4	26.1593	2.83490	0.00458	*
3	4	23.8048	2.40523	0.01616	

Table 4. Comparisons of P15 expression between the four groups

GRUPO (I)	GRUPO (J)	DIF (I, J)	Z (I, J)	P-VALOR	SIG.
1	2	-38.9286	-4.58702	0.00000	*
1	3	-44.9500	-4.75643	0.00000	*
1	4	-13.7000	-1.64758	0.09944	
2	3	-6.0214	-0.59126	0.55434	
2	4	25.2286	2.76011	0.00578	*
3	4	31.2500	3.11206	0.00186	*

Table 5. Comparisons of P16 expression between the four groups

GRUPO (I)	GRUPO (J)	DIF (I, J)	Z (I, J)	P-VALOR	SIG.
1	2	-9.6769	-1.11776	0.26367	
1	3	-15.0243	-1.60772	0.10790	
1	4	-6.8864	-0.81200	0.41679	
2	3	-5.3474	-0.52647	0.59856	
2	4	2.7905	0.29787	0.76580	
3	4	8.1379	0.81322	0.41609	

Table 6. Comparisons of P53 expression between the four groups

GRUPO (I)	GRUPO (J)	DIF (I, J)	Z (I, J)	P-VALOR	SIG.
1	2	-34.5586	-4.02437	0.00006	*
1	3	-28.0526	-2.97979	0.00288	*
1	4	-40.7907	-4.84901	0.00000	*
2	3	6.5060	0.63732	0.52391	
2	4	-6.2321	-0.67069	0.50242	
3	4	-12.7381	-1.26604	0.20550	

Table 7. Comparisons of Ki67 expression between the four groups

GRUPO (I)	GRUPO (J)	DIF (I, J)	Z (I, J)	P-VALOR	SIG.
1	2	-30.0065	-3.45573	0.00055	*
1	3	-22.6453	-2.44301	0.01457	
1	4	-47.4620	-5.64206	0.00000	*
2	3	7.3611	0.72476	0.46860	
2	4	-17.4556	-1.86079	0.06277	
3	4	-24.8167	-2.50018	0.01241	

Table 8. Histological characteristics of the leukoplakias samples in terms of inflammation and senescence

	<b>Inflammatory infiltrate intensity</b>				<b>CD3 intensity</b>		
	<u>Absent</u>	<u>Low</u>	<u>Moderate</u>	<u>Severe</u>	<u>Absent/low</u>	<u>Moderate/severe</u>	
<b>Senescence NEGATIVE</b>	4/32 (12.5%)	11/32 (34.4%)	12/32 (37.5%)	5/32 (15.6%)	7/22 (31.81%)	15/22	(68.18%)
<b>Senescence POSITIVE</b>	1/17 (5.88%)	9/17 (52.9%)	7/17 (41.17%)	0 (0%)	0 (0%)	12/12	(100%)

