



Departamento de Biología Celular e Histología

**Estudio del perfil de expresión de microRNAs de la
enfermedad liquenoide oral y análisis comparativo
con el carcinoma oral de células escamosas**

Trabajo dirigido por:

Dr. José Manuel Aguirre Urizar

Dr. Xabier Marichalar Mendia

Para optar por el Grado de Doctor de:

Amaia Setién Olarra

2016

AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer cuando entré por primera vez por las puertas de la Facultad de Odontología. Era el final del año 2012, plena crisis y como miles de jóvenes de repente me ví sin trabajo y sin saber si volvería a tener una oportunidad de dedicarme a lo mío, la biología. Yo, que venía de haber estado trabajando durante varios años en el mundo de la fisiología vegetal, que trabajaba con plantas, concretamente con “pinitos”, de repente entraba en un mundo totalmente distinto, el de la biología molecular y la medicina bucal, con conceptos y palabras de los que jamás había oído hablar, enfermedad liquenoide oral, ameloblastoma, modificación bisulfito, *TLDA card*..... Tenía muchas dudas, no sabía si sería capaz de sacar a delante lo que el profesor Aguirre me estaba proponiendo...Y aquí estoy, casi 4 años después escribiendo estas líneas, por lo que no puedo hacer otra cosa que pensar en todo lo que me ha ocurrido durante estos años y todo lo que debo de agradecer a un gran número de personas.

En primer lugar debo la realización de esta tesis y mi más sentido agradecimiento a mis directores de tesis. Ha sido un orgullo teneros como jefes.

Aguirre, muchas gracias por darme la oportunidad de seguir en lo que me gusta. Tengo que agradecerle el haber creído en mí para hacer la tesis, el darme la oportunidad de entrar en este laboratorio y haber podido aprender tanto, y el tener paciencia con mis días de ceño fruncido. Y como no, gracias por darme la oportunidad de conocer Río de Janeiro. ¡Gracias, gracias y mil veces gracias!

Xabi, además de un buen jefe y un gran compañero de laboratorio se que me llevo un buen amigo. Eres una bellísima persona, siempre dispuesto a ayudar a los demás y se que tienes un futuro muy prometedor, sinceramente, Becket. Eskerrik asko, nire une txarretan hor egoteagatik, eta batez ere, euskararekin laguntzeagatik. Kar, kar, kar. Benetan, mila esker!

Y aunque ya no estén con nosotros Ame, Naiara, ¡Gracias! Os debo un montón, sin vosotras esta tesis no hubiese sido la misma. Sois dos trabajadoras inagotables de las que tomar ejemplo. Vuestra pasión por la ciencia es totalmente inspiradora y lo único que puedo decir es que es una pena que este país pierda a científicas de vuestro

calibre. Buena suerte en vuestra nueva andadura. Y Natalia, que ahora estás en otro camino, “morado”. Espero que todo te vaya muy bien.

A los siguientes que quisiera agradecer es al “grupo”: Agurne, Álvaro, Andoni, Asier, Bego, Carmen, Coca, Janire, Jose, Mari José Lartitegi y Rafa.

No me puedo olvidar de Marian. Desde el momento en el que entré, me hiciste sentir una más del grupo, tratándome con cariño y respeto. Nunca se me olvidarán tus visitas al despachito- hornito para preguntar por tus chicos del labo. ¡Gracias por todo!

Y como olvidarme de los chicos del master de patología oral: Ana María, Javi, María, Mari Carmen, Yrania y Zummaly. Me viene a la memoria el primer año con María y Javi. ¿Os acordáis de aquellas tardes eternas en la uni haciendo el máster de investigación biomédica? ¡Cuántas anécdotas!

Agradezco también a Marian Martínez de Pancorbo por abrirme sus puertas en el laboratorio de Gasteiz y al grupo de investigación BIOMICs.

También quiero agradecer el apoyo técnico y humano de los SGIker (UPV/EHU, MINECO, GV/EJ, FEDER y FSE).

Agradecer también a los doctores Fernando Unda, Guillermo Quindós y Javier Meana por permitirme utilizar sus equipamientos siempre que lo he necesitado.

Y por supuesto, como hay vida fuera de este pequeño laboratorio de la uni, agradecer a todos aquellos que me habéis ayudado de forma directa o indirecta en el día a día. Sin vuestro apoyo y ánimos está experiencia se me hubiera hecho demasiado cuesta arriba.

En primer lugar, Eskerrik asko Txikitin!! He puesto a prueba tu paciencia durante estos años y sin duda has aprobado y con creces. Gracias por estar allí, por aguantar mis cruces de claves, mis lloros y mis histerias repentinas. Sé que está última temporada he estado un poco insufrible pero tu no has dejado de animarme con tu sonrisa de pillo. Han sido años bonitos e intensos y espero que sean muchísimos más. Te podría

escribir rato largo pero creo que con esta frase te lo digo todo: Bizitza zer da ba, zure albotik urrun banago?

Mi kutxipandi: Adritxumis, Antxo, Depulina, Itxatxo, Joetones y Melanita. Habéis pasado de ser mis pequeñas saltamontes a mis jóvenes castoras, y no os preocupéis que para el próximo cambio de década se me ocurrirá un nuevo mote. Me habéis escuchado siempre que lo he necesitado, con buena cara aunque no entendieseis nada de lo que os explicaba, y eso se merece un gran mila esker! FOREVER YOUNG!

Anus, Aran (casualidad que estemos en la misma situación), Jou, Leiremari, Ledi, se que no nos vemos todo lo que nos gustaría con nuestras agendas de ministro y por la lejanía, pero no podía pasar la oportunidad de dejar impreso en un libro nuestra frase: Gora Laida!

Todas vosotras sois mis amigas y sois imprescindibles en mi vida. Asko maite zaituztet!

Por último quiero agradecer a mi familia.

Aita-ama gracias por apoyarme en mi elección. Desde que en el colegio dije que quería ser bióloga, no lo dudasteis nunca y me animasteis a seguir mi sueño. Sabiais que no era un camino fácil pero me enseñasteis a no rendirme y si estoy hoy aquí es por vosotros. A mi hermano Xabi, a mi cuñada Paloma y a mi iseko Marisa, gracias por estar a mi lado para todo lo que he necesitado.

Y por último, un agradecimiento con especial cariño a mi sobri Lexuri. Eres todavía muy txiki y no sabes ni que estoy haciendo, pero gracias por todas esas cenas de miércoles, después de una jornada maratoniiana viendo juntas Bob Esponja tiradas en el sofá. Gracias por hacerme por unas horas volver a ser una niña y olvidarme de las preocupaciones del día a día.

Gracias, Eskerrik asko!!

Amaia

ÍNDICE

1 ABREVIATURAS	25
2 INTRODUCCIÓN	29
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
4 ANTECEDENTES	37
4.1. Cáncer oral	37
4.1.1. Aspectos generales	37
4.1.2. Aspectos etiopatogénicos	38
4.1.3. Aspectos clínicos	38
4.1.4. Aspectos histopatológicos	39
4.1.5. Aspectos terapéuticos y pronósticos	41
4.2. Trastornos orales potencialmente malignos	41
4.2.1. Enfermedad liquenoide oral	43
4.2.1.1. ELO. Aspectos etiopatogénicos	45
4.2.1.2. ELO. Aspectos clínicos	47
4.2.1.3. ELO. Aspectos histopatológicos	49
4.2.1.4 ELO. Aspectos terapéuticos y pronósticos	51
4.2.1.5. Enfermedad liquenoide oral: Aspectos moleculares	52
4.3. MicroRNAs	54
4.3.1. Aspectos generales	54
4.3.2. Biogénesis y procesamiento	56
4.3.3. Alteraciones en la expresión de microRNAs asociadas al Cáncer	59
4.3.4. microRNAs asociados a procesos oncológicos	61
4.3.5. microRNAs en Cáncer oral	64
4.3.6. microRNAs en el Precáncer Oral	69
4.3.7. Estrategias terapéuticas	74
4.3.7.1. Estrategias para la subexpresión de los microRNAs	74
4.3.7.2. Estrategias para la sobreexpresión de microRNAs	75

5 PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	79
5.1. Material y Métodos Grupos analizados	79
5.1.1. Grupos analizados	79
5.1.1.1. Grupo ELO	79
5.1.1.2. Grupo COCE	79
5.1.1.3. Grupo Control	80
5.1.2. Protocolo clinicopatológico	80
5.1.3. Comité de Ética	80
5.1.4. Material: Tipos de muestra	80
5.2. Extracción y cuantificación de RNA	80
5.3. Análisis de expresión de microRNAs	85
5.3.1. Método	86
5.3.2. Reactivos, equipamiento y soluciones utilizadas	87
5.3.3. Realizar la reacción de PCR a tiempo real	90
5.4. qRT-PCR ensayos TaqMan® específicos	92
5.4.1. Método	93
5.5. Análisis estadístico	95
5.5.1. Análisis estadístico de los <i>TLDA cards</i> , validación biológica y Ontología de genes	95
5.6. Búsqueda bibliográfica	96
6 RESULTADOS	101
6.1. Características clinicopatológicas de las muestras	101
6.2. Identificación de los perfiles de expresión de los microRNAs	104
6.2.1. Verificación de la calidad y análisis de las muestras	104
6.2.2. Identificación de los perfiles de expresión aberrantes en los grupos ELO y COCE	104
6.2.3. Validación biológica de los perfiles de expresión de los microRNAs	108

6.2.4. Expresión de cada microRNA entre el grupo ELO y el grupo COCE	109
6.2.5. Expresión de los microRNAs en base a la clasificación en subgrupos de la ELO	116
6.3. Análisis <i>in silico</i> (Ontología de genes)	119
7 DISCUSIÓN	127
7.1. En relación con las características clinicopatológicas de las muestras	127
7.2. En relación con la metodología de trabajo	129
7.3. En relación con la caracterización del perfil de expresión aberrante de microRNAs en la enfermedad liquenoide oral	130
7.4. En relación con la caracterización del perfil de expresión aberrante de microRNAs en los subtipos de ELO	136
7.5. En relación con la expresión aberrante de los microRNAs comunes en la ELO y el COCE	137
7.6. En relación con el análisis <i>in silico</i> (Ontología de Genes)	138
8 CONCLUSIONES	143
9 BIBLIOGRAFIA	147
10 ANEXO	173

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AKT: Proteína quinasa B
AMO: Oligonucleótidos anti-microRNA
CAPV: Comunidad autónoma del País Vasco
CCECC: Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello
cDNA: DNA complementario
CMH-I: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
CMH-II: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
CO: Cáncer oral
COCE: Carcinoma oral de células escamosas
CpG: Citosina fosfo guanina
Ct: Ciclo umbral
CTL: Linfocitos T citotóxicos
dCt: Diferencia de Cts
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTP: Desoxiribonucleótidos
EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidérmico
ELO c: ELO compatible
ELO t: ELO típico
ELO: Enfermedad liquenoide oral
FC: *Fold change*
FFEP: Biopsias orales fijadas en formaldehído y embebidas en parafina
g: Fuerza centrífuga relativa
GO: Gene ontology
HIF: Factor inducible por hipoxia
HPV: Virus del papiloma humano
hsa: Homo sapiens
ICAM: Molécula de adhesión intercelular
IGF-1: Factor de crecimiento insulínico
IFN-γ: Interferón gamma
IGFBP-5: Factor de crecimiento similar a la insulina
IL: Interleucina
IRAK 1: Quinasa asociada al receptor de la interleucina
IRS: Sutrato del receptor de la insulina
LLO: Lesión liquenoide oral
LOH: Pérdida de heterocigosidad
LPO: Liqueen plano oral
LPS: Lipopolisacárido
MEF2C: Factor potenciador específico de miocito 2C
min: Minuto
miR: microRNA
miRISC: Complejo inductor del silenciamiento de microRNA
miRNA: microRNA
ml: Mililitro

mM: Milimolar
MMP: Metaloproteinasa de matriz
mRNA: RNA mensajero
n: Número de muestras
NCOA1: Receptor nuclear coactivador 1
NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ng: Nanogramo
nm: Nanometro
NRIP1: Proteína de interacción con receptores nucleares 1
nt: Nucleótido
OG: Ontología de genes
OMS: Organización mundial de la salud
OncomiR: microRNA que actúa como oncogen
p.m.: Peso molecular
PCDC4: Inhibidor de transformación neoplásica
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pre-microRNA: microRNA precursor
pri-microRNA: microRNA primario
PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
qPCR: PCR cuantitativa
RAF1: proto-oncogen serina/treonina quinasa
RISC: Complejo inductor del silenciamiento del RNA
RNA: Ácido ribonucléico
rpm: Revoluciones por minuto
RT: Reacción de transcripción inversa
SDS: Sistema de detección de secuencia
seg: Segundo
SERPINB5: Inhibidor serina proteasa
SOD: Superóxido dismutasa
TAp63: Proteína tumoral p63
TGF- β : Factor de crecimiento tumoral
TGFBRII: Receptor de TGF- beta 2
TLDA: TaqMan[®] Low Density Array
TLR: Receptor de tipo Toll
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TOPM: Trastornos orales potencialmente malignos
TPM1: Tropomiosina alfa
TRAF 6: Factor asociado al receptor TNF
U: Unidades
UTR: Región no traducida
VHC: Virus de la hepatitis C
 μ l: Microlitro
 μ m: Micrometro

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer oral (CO) constituye un importante problema de salud, ocupando el puesto 11 dentro de los cánceres más comunes a nivel mundial con una tasa de mortalidad superior al 50% (Warnakulasuriya, 2009; Sankaranarayanan, 2015). Existe una variación geográfica en la incidencia del cáncer oral, mostrando la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) una elevada incidencia si se compara con otras regiones de España y Europa (Izarzugaza *et al.*, 2001; Warnakulasuriya, 2009; Izarzugaza *et al.*, 2010; Sankaranarayanan, 2015).

El CO tiene una particularidad que lo hace especial, ya que en el 20% de las ocasiones viene precedido por otros procesos de la mucosa oral, que genéricamente se conocen como “trastornos orales potencialmente malignos”, entre los que destacan la leucoplasia oral y la enfermedad liquenoide oral (ELO) (Mignogna *et al.*, 2007; Aguirre Urizar, 2008; van der Waal, 2009).

Clásicamente se ha considerado a la ELO como un proceso inflamatorio crónico de base inmunológica y origen probablemente autoinmune, que aparece hasta en el 2% de la población y afecta principalmente a las mujeres perimenopáusicas, y precisando para su diagnóstico de datos clínicos e histopatológicos (Scully & Carrozzo, 2008; Cortes-Ramirez *et al.*, 2009; van der Waal, 2009). Actualmente, la ELO es el estado precanceroso oral más frecuente en nuestro medio, no obstante no existen todavía datos fiables que permitan predecir el riesgo de malignización y poder establecer medidas preventivas efectivas para evitarlo (van der Meij & van der Waal, 2003; Gonzalez-Moles *et al.*, 2008).

La carcinogénesis oral es un proceso multietapa caracterizado por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que provocan una progresiva transformación maligna de las células normales (Warnakulasuriya, 2009). Por ello, gran parte de la actividad investigadora va encaminada a la identificación de alteraciones moleculares asociadas al desarrollo del cáncer con el fin de identificar biomarcadores útiles en la detección precoz de la enfermedad. En este sentido, se ha puesto de manifiesto el potencial de algunos marcadores epigenéticos como la metilación del DNA, la modificación de las histonas o la expresión del RNA no-codificante, en el diagnóstico, la terapéutica y el pronóstico del cáncer oral (Gasche & Goel, 2012).

Los microRNAs son moléculas de RNA no codificante que regulan la expresión génica de forma post-transcripcional. Se unen de manera parcialmente complementaria a la

región 3' del RNA mensajero provocando la represión transcripcional o la degradación directa del mRNA (Filipowicz *et al.*, 2008; Bartel, 2009). Se estima que los cerca de 2000 microRNAs descritos, son capaces de regular la expresión del 60% de los genes humanos y a su vez, de regular procesos biológicos como el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). De esta forma se han constatado que los microRNAs juegan un papel importante en el cáncer, pudiendo actuar como oncogenes o como genes supresores (Kent & Mendell, 2006).

El análisis de los perfiles de expresión de los microRNAs es particularmente interesante desde el punto de vista diagnóstico, debido a que pueden ser fácilmente estudiados tanto en tejidos clínicamente accesibles como en fluidos biológicos (saliva o sangre) (Brase *et al.*, 2010). Actualmente se considera que el estudio de los perfiles de expresión de los microRNAs en el cáncer representa una metodología importante tanto como marcador molecular sensible para definir estados de riesgo, como para realizar un diagnóstico temprano, la clasificación de los tumores, la predicción de la respuesta al tratamiento y el diseño de nuevas estrategias terapéuticas (Blenkiron *et al.*, 2007; Barbarotto *et al.*, 2008).

La necesidad y el interés de establecer técnicas fiables para la caracterización de los trastornos orales potencialmente malignos y del cáncer oral se justifican por la existencia de unas tasas elevadas de estos trastornos en nuestro medio.

Por ello, el estudio de las alteraciones en la expresión de los microRNAs en los grupos de riesgo de desarrollar un cáncer oral, como son los pacientes diagnosticados de ELO, tiene un gran interés. Con estos hallazgos podremos instaurar un protocolo preventivo y una terapéutica mejor, menos cruenta y más efectiva, que mejore las cifras de mortalidad y morbilidad de esta patología neoplásica maligna.

3. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

El cáncer oral es el resultado de la acumulación de diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas (carcinogénesis oral), que en algunas ocasiones se producen desde trastornos orales potencialmente malignos como la enfermedad liquenoide oral. Dentro de estas alteraciones, podrían tener una gran importancia las que están relacionadas con la expresión del RNA no codificante.

El estudio de los perfiles de expresión de los microRNAs nos puede permitir comprender mejor los procesos involucrados en la transformación maligna de estos trastornos e incluso predecir su posible aparición.

Nuestra hipótesis de partida es que existe un perfil de expresión de microRNAs específico para la enfermedad liquenoide oral cuya identificación nos puede permitir relacionarlo con el potencial riesgo de malignización.

3.2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es determinar los perfiles de expresión de los microRNAs en muestras de la enfermedad liquenoide oral y compararlas con las del carcinoma oral de células escamosas.

Para abordar este objetivo, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar los perfiles de expresión aberrantes de microRNAs presentes en la enfermedad liquenoide oral.
2. Identificar los perfiles de expresión aberrantes de microRNAs presentes en el carcinoma oral de células escamosas.

3. Seleccionar y validar los microRNAs que aparezcan alterados en la enfermedad liquenoide oral y el carcinoma oral de células escamosas.
4. Identificar los procesos biológicos en los que están implicados los microRNAs alterados presentes en la enfermedad liquenoide oral y el carcinoma oral de células escamosas.

4. ANTECEDENTES

4.1. Cáncer oral

Más del 90% del cáncer oral corresponde al carcinoma oral de células escamosas (Scully & Bagan, 2009; Poh *et al.*, 2011).

4.1.1. Aspectos generales

El cáncer oral (CO) ocupa la posición 11 en el conjunto global de los cánceres en el mundo, aunque su incidencia es muy variada de acuerdo a la región geográfica en que se analice (Sankaranarayanan, 2015). Los tumores malignos de la cavidad oral suponen un 4% del total de tumores malignos del organismo, del cual el 90% corresponden a carcinoma oral de células escamosas (COCE) (Scully & Bagan, 2009; Poh *et al.*, 2011).

A nivel mundial presenta una incidencia anual de 300.000 nuevos casos, y 145.000 muertes en el año 2012 (Bray *et al.*, 2013; Ferlay *et al.*, 2013). Dos terceras partes de los casos se dan en los países en vías de desarrollo, con un mayor porcentaje en los países del sur de Asia (Sri Lanka, India, Pakistán y Bangladesh) (Ferlay *et al.*, 2013). En Europa el cáncer oral ocupa la séptima posición entre los tipos de cáncer más comunes, con una incidencia de 42.573 hombres diagnosticados frente a 18.843 mujeres en el año 2012 (Ferlay *et al.*, 2013; Sankaranarayanan, 2015).

Los países del sur de Europa, entre los que se encuentra España, presentan una incidencia de nivel intermedio o alto, comparándolo con el resto del continente (Ferlay *et al.*, 2013; Sankaranarayanan, 2015). Para España, se estima una incidencia media de 2,2 casos por 100.000 habitantes para los hombres y de 1,4 casos por 100.000 habitantes para las mujeres (Sociedad Española de Oncología Médica). En la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) la cifra de cáncer oral en la población masculina es mayor a la media española (22,6 por 100.000 en hombres), constituyendo una de las zonas con mayor incidencia a nivel europeo (Lopez de Munain *et al.*, 2014). Además, destaca la presencia de un incremento en la cifra de cáncer oral en las mujeres en los últimos años (7,2 por 100.000 mujeres) (Lopez de Munain *et al.*, 2014).

La edad de los pacientes que sufren un COCE se sitúa entre los 50 y 70 años en la mayor parte de los casos. La observación en pacientes menores de 30 años es excepcional, sin embargo, se ha observado un incremento en la aparición en mujeres jóvenes, en las que no parece estar relacionado con el hábito tabáquico (Bagán, 2010).

4.1.2. Aspectos etiopatogénicos

La carcinogénesis oral es un proceso multifactorial en el que están involucrados distintos agentes ambientales y genéticos que constituye una modificación de la homeostasis celular por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que afectan a la reparación del ADN y al ciclo celular (Califano *et al.*, 1996; Ha & Califano, 2003; Warnakulasuriya, 2009).

Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de un COCE son el tabaco y el alcohol, estimándose que más del 70% de los pacientes con un CO presentan una historia previa de consumo del alcohol y tabaco (Ortholan *et al.*, 2009). Recientemente la infección por el virus del papiloma humano se ha valorado como un factor de riesgo para el cáncer oral (Kingma *et al.*, 2010; Hocking *et al.*, 2011) , en el mismo sentido que otros factores como la presencia de levaduras del género *Cándida* (Krogh *et al.*, 1987; Gainza-Cirauqui *et al.*, 2013).

Los procesos infecciosos e inflamatorios crónicos pueden tener un papel importante en el desarrollo del COCE (Bergmann *et al.*, 2011). La inflamación crónica causaría daño genético e induciría la proliferación tisular (Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2006). El aumento de citoquinas y de los factores de crecimiento promovería o facilitaría la carcinogénesis oral, y se produciría daño oxidativo en el ADN (Mignogna *et al.*, 2004; Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2006; Chuang *et al.*, 2012).

Se ha visto que muchos canceres se originan en zonas que han sufrido inflamaciones crónicas debido a agentes infecciosos como el caso del cáncer gástrico y el *Helicobacter pylori*, el cáncer de cérvix y el HPV, el hepatocarcinoma y la hepatitis C (Bergmann *et al.*, 2011 Chuang *et al.*, 2012). La higiene oral y el estado de los dientes podrían ser considerados como otros factores de riesgo, ya que se ha observado que los pacientes con cáncer oral presentan muy mala higiene oral y los dientes en muy mal estado (Scully & Bagan, 2009). La dieta también se ha visto que esta implicada en el desarrollo de un cáncer oral ya que se ha observado su asociación con una baja ingesta de frutas y de verduras (Scully & Bagan, 2009).

4.1.3. Aspectos clínicos

Clinicamente, los individuos que presentan un carcinoma oral de células escamosas inicial no suelen presentar síntomas pero si signos, siendo los más habituales la

presencia de lesiones rojas, rojas–blancas o blancas (Figura 4.1). Sin embargo, en etapas avanzadas la mayoría de los pacientes presentan también síntomas como dolor, dificultad para hablar, pérdida de peso, ulceración, tumefacción, etc. (Barnes *et al.*, 2005).

En cuanto a la localización, los tumores pueden presentarse en cualquier parte de la cavidad oral, siendo los sitios más comunes en nuestro medio la lengua (25%), el labio (24%), la orofaringe (19%), el suelo de la boca (10%) y la encía (3%) (Izarzugaza *et al.*, 2001; Martínez-Conde *et al.*, 2001). Tanto en los hombres como en las mujeres la localización intraoral más frecuente es la lengua (Izarzugaza *et al.*, 2001; Martínez-Conde *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que de un 10 a un 35% de los pacientes con un COCE desarrollan un segundo tumor maligno en el tracto aerodigestivo superior (van Oijen & Slootweg, 2000).



Figura 4.1. Lesión tumoral roja y blanca en el lateral de la lengua.

4.1.4. Aspectos histopatológicos

La histopatología del COCE se caracteriza por la proliferación de nidos, cordones o islotes neoplásicos que recuerdan en mayor o menor grado el epitelio escamoso de donde derivan y que penetran en el tejido conectivo (Figura 4.2 y 4.3). (Bagán, 2010).

Se han propuesto diversas clasificaciones, siendo la más aceptada la de la OMS que los divide en tres grados de malignidad:

Bien diferenciados: Histológicamente presentan una gran semejanza con las células epiteliales, abundante formación de queratina en forma de perlas córneas o queratinización celular individual. La atipia celular es mínima al igual que la mitosis. Se observa un infiltrado inflamatorio crónico peritumoral bastante marcado, formado por linfocitos y células plasmáticas (Figura 4.2).

Moderadamente diferenciados: Histológicamente presentan menor semejanza con las células epiteliales y el grado de atipia nuclear y la mitosis es mayor. Existe una notable disminución de las perlas córneas y la queratinización individual.

Poco diferenciados: Histológicamente poca similitud con las células epiteliales. Existe gran pleomorfismo nuclear y un elevado número de mitosis (Figura 4.3)

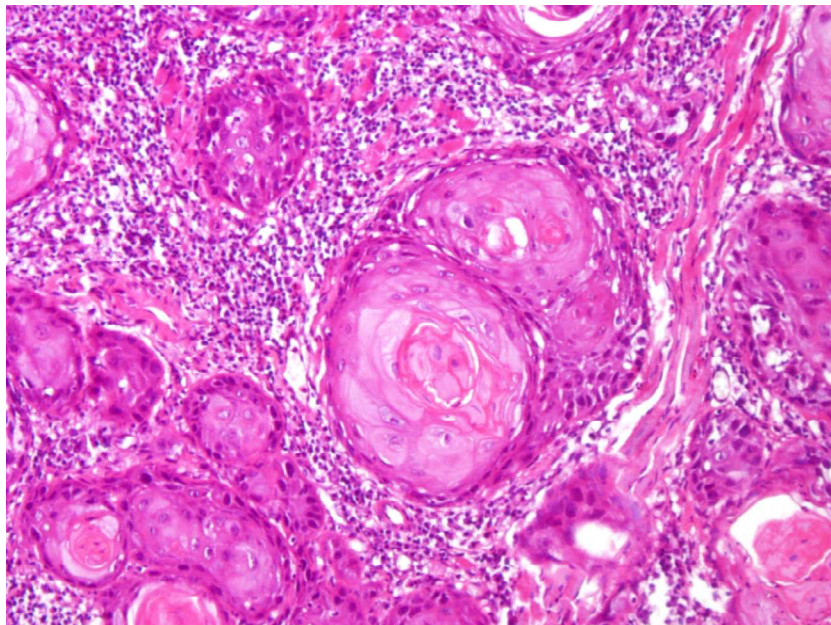


Figura 4.2. Aspecto histopatológico de un carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado.

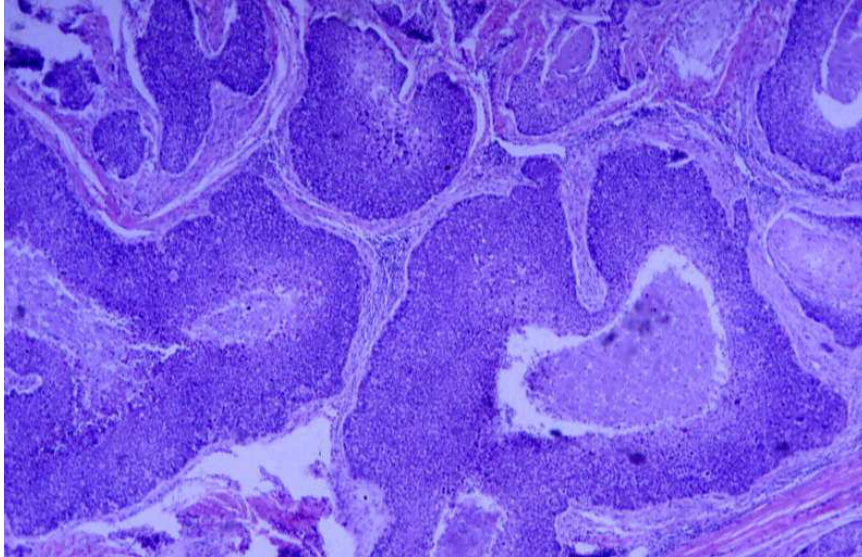


Figura 4.3. Aspecto histopatológico de un carcinoma oral de células escamosas indiferenciado.

4.1.5. Aspectos terapéuticos y pronósticos

Tanto el tratamiento como la supervivencia del cáncer oral, van a depender de la realización de un adecuado diagnóstico, de la localización del tumor primario y de la extensión clínica (Barnes *et al.*, 2005). La afectación de los ganglios linfáticos cervicofaciales es un elemento crucial en la terapéutica y el pronóstico de este cáncer. El tratamiento más habitual incluye la cirugía y/o la radioterapia. El tratamiento con quimioterapia se considera un tratamiento paliativo más que curativo primario. En general, el cáncer oral mantiene todavía un pronóstico general negativo, ya que la supervivencia media a los 5 años no supera el 50%, manteniendo altas tasas de mortalidad y morbilidad (Brandwein-Gensler *et al.*, 2005; Layland *et al.*, 2005).

4.2. Trastornos orales potencialmente malignos

La OMS define a una lesión precancerosa como un tejido de morfología alterada, más propenso a cancerizarse que el tejido equivalente de apariencia normal (Warnakulasuriya *et al.*, 2007).

Suele mostrar las siguientes condiciones:

- Estas áreas de tejido que muestran ciertas alteraciones identificadas como precancerosas, malignizan a lo largo de su seguimiento.
- Algunas de estas alteraciones, particularmente las lesiones blancas y rojas, coexisten en los márgenes del carcinoma oral de células escamosas.

- Una proporción de la lesión debe de compartir cambios morfológicos y citológicos como los observados en epitelios que muestran signos de malignidad pero no de invasión.

- Algunas de las alteraciones cromosómicas, genómicas y moleculares que se encuentran en los cánceres orales invasivos son detectadas en estas fases presuntamente precancerosas o premalignas.

Desde el año 1978 la OMS clasificaba al precáncer oral como lesiones o condiciones precancerosas. Se clasificaban como lesiones a los tejidos morfológicamente alterados donde es más posible que aparezca un cáncer oral que en la mucosa aparentemente normal, mientras que una condición precancerosa sería un estado general asociado a un incremento significativo del riesgo para padecer cáncer (Warnakulasuriya *et al.*, 2007).

Se consideran lesiones precancerosas orales a la leucoplasia y la eritroplasia y como procesos precancerosos a la queilitis actínica, el lupus eritematoso y el liquen plano (Warnakulasuriya *et al.*, 2007).

Desde la Reunión del Consenso de Londres del año 2005 se ha recomendado abandonar esta distinción entre lesiones y condiciones y emplear para todos estos procesos el término “trastornos orales potencialmente malignos (TOPM)” (Warnakulasuriya, Johnson, & van der Waal, 2007; van der Waal, 2009) ya que no todas las lesiones que engloba este término se van a transformar en cáncer y algunas de ellas tienen un mayor potencial de malignización. Además los trastornos orales potencialmente malignos de la mucosa oral son indicadores de riesgo a sufrir futuras malignizaciones en otra zona de la mucosa oral con una apariencia clínica normal (Warnakulasuriya, Johnson, & van der Waal, 2007; van der Waal, 2009).

La lesión precancerosa oral que antecede de manera más común al COCE es la leucoplasia oral. La leucoplasia oral es una lesión común que se observa entre el 2 y el 3,5% de la población general occidental, siendo más frecuente en las personas adultas entre los 50 y 60 años y entre los hombres (Warnakulasuriya, Johnson, & van der Waal, 2007; van der Waal, 2009). El índice general de transformación maligna de una leucoplasia se sitúa entre el 5 y el 20% de los casos, aunque las cifras varían ampliamente en la literatura (Bagan Sebastian *et al.* 1995).

La enfermedad liquenoide oral (ELO) es sinónimo del liquen plano oral (LPO) y se presenta hasta en el 2% de la población, con predilección por el sexo femenino, principalmente en edad perimenopáusica (Aguirre Urizar, 2008; Cortes-Ramirez *et al.*, 2009), muestra un riesgo de malignización más bajo que varía de 0,4% a 6,5% (Lanfranchi-Tizeira *et al.*, 2003; Eisen *et al.*, 2005; Lodi *et al.*, 2005) y es el trastorno oral potencialmente maligno más frecuente en nuestro medio.

4.2.1. Enfermedad liquenoide oral

Clásicamente, se ha considerado como liquen plano oral (LPO) a un trastorno oral potencialmente maligno de carácter inflamatorio crónico y origen probablemente autoinmune; que aparece hasta en el 2% de la población, y afecta principalmente a las mujeres perimenopáusicas (Chainani-Wu *et al.*, 2001; Al-Hashimi *et al.*, 2007; van der Waal, 2009).

En el año 2008 el Profesor Aguirre (Aguirre Urizar, 2008) propuso una nueva nomenclatura y clasificación para los procesos orales que presentaban pápulas blancas reticulares en la mucosa oral, agrupándolos bajo la denominación de “enfermedad liquenoide oral” (Aguirre Urizar, 2008). Esta enfermedad incluye a distintos trastornos mucosos orales de base inmunológica que muestran características clínicas e histopatológicas similares pero que tienen una distinta etiología y, lo que es más importante un variable riesgo de transformación maligna (Aguirre Urizar, 2008; van der Meij & van der Waal, 2007). Los principales subtipos de la ELO son el liquen plano oral (LPO) y la lesión liquenoide oral (LLO) (Aguirre Urizar, 2008).



Figura 4.4. Lesión papular reticular blanca típica de ELO.

La lesión clínica característica de todos estos procesos es la pápula blanca lineal, con un patrón reticular y generalmente asintomática (Figura 4.4). No obstante, cuando se acompaña de lesiones atróficas y erosivas suele ser sintomática (Lodi *et al.*, 2005). Las lesiones suelen presentar un patrón bilateral y simétrico, característico en los casos típicos de LPO y que no aparece en los casos de LLO (Chainani-Wu *et al.*, 2001) (Figura 4.5).



Figura 4.5. Lesiones papulares y erosivas bilaterales en un paciente con LPO..

La etiología de estos procesos es desconocida, aunque existe un acuerdo general en considerarlos inmunológicos. Los linfocitos T CD8 citotóxicos y los T CD4 facilitadores se acumularían en la lámina propia y en la submucosa superficial, tras ser activados por diferentes mecanismos y producirían degeneración basal y apoptosis celular (Sugerman *et al.*, 2002; Lodi *et al.*, 2005; Mignogna *et al.*, 2006; Roopashree *et al.*, 2010).

Los procesos que no cumplen los requisitos clínicos típicos, denominados lesiones liquenoides orales (LLO), suelen adoptar un patrón unilateral y/o asimétrico (van der Meij & van der Waal, 2003; Aguirre Urizar, 2008; Cortes-Ramirez *et al.*, 2009). Estas lesiones pueden ser reactivas cuando existe una causa reconocible (p. ej. amalgama de plata, fármacos), o idiopáticas cuando no se identifica ningún factor causante (Aguirre Urizar, 2008). El diagnóstico es clinicopatológico y el tratamiento de la ELO es sintomático con antiinflamatorios y está indicado en los pacientes que presentan lesiones atróficas, erosivas y ulcerativas. Los fármacos más utilizados son los inmunosupresores e inmunomoduladores locales y sistémicos, preferentemente los corticoides (Lodi *et al.*, 2005; Al-Hashimi *et al.*, 2007; Carbone *et al.*, 2009). El dato

más importante de estos procesos es su posible transformación maligna en un carcinoma oral de células escamosas, aunque es un aspecto controvertido desde hace mucho tiempo (Eisen, 2002; Mattsson *et al.*, 2002; Lanfranchi-Tizeira, Aguas, & Sano, 2003; Gandolfo *et al.*, 2004; van der Meij *et al.*, 2007). En los últimos años las LLO han sido objeto de un interés especial, ya que parecen presentar un mayor riesgo de transformación maligna que el LPO clásico (van der Meij, Mast, & van der Waal, 2003).

4.2.1.1. ELO. Aspectos etiopatogénicos

En la actualidad, se considera que se trata de un complejo proceso inmunológico multifactorial, con factores genéticos, psicológicos, infecciosos, etc., que podrían actuar como agentes causales o precipitantes (Eisen, 2002; Lodi *et al.*, 2005). En esta enfermedad los linfocitos T CD8 citotóxicos serían atraídos y activados por uno o más antígenos (aún desconocidos) asociados al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-I), expresados por los queratinocitos. Los linfocitos T CD4 colaboradores, a su vez serían atraídos y activados por el complejo de histocompatibilidad de clase II (CMH-II) asociado a las células de Langerhans y/o a los queratinocitos (Lodi *et al.*, 2005; Roopashree *et al.*, 2010). También participan diferentes citoquinas (IL-2, IL-12), el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Algunos polimorfismos de estas citoquinas se han relacionado con una mayor susceptibilidad a la enfermedad (Carrozzo *et al.*, 2004; Kimkong *et al.*, 2012). El TNF- α secretado por los linfocitos CD8 y por los mastocitos, provocaría apoptosis de los queratinocitos y estimularía la sobreexpresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales del plexo vascular subepitelial, que participarían también en el proceso inflamatorio (Lodi *et al.*, 2005; Kimkong *et al.*, 2011; Kimkong *et al.*, 2012). Probablemente, estos procesos sean el resultado de la implicación de diferentes antígenos que pueden ser extrínsecos o intrínsecos (Roopashree *et al.*, 2010). Solo en una minoría de pacientes, se puede identificar factores precipitantes, como la presencia de restauraciones de amalgama de plata o la toma de fármacos, como antiinflamatorios no esteroideos o inhibidores de la conversión de angiotensina, o por estrés, etc. (Scully *et al.*, 2000).

Se cree que existen dos vías productoras del daño tisular (Sugerman *et al.*, 2002; Mignogna *et al.*, 2004). La primera a través de un antígeno específico, donde los queratinocitos basales y las células de Langerhans presentarían antígenos asociados a

CMH-I y II que estimularían a los linfocitos CD8 a secretar TNF- α y a los linfocitos CD4 a secretar IL-2 e INF- γ , que producirían un daño continuo en los queratinocitos (Sugerman *et al.*, 2002; Mignogna *et al.*, 2004; Lodi *et al.*, 2005). La segunda a través de mecanismos no específicos, que provocarían degranulación de los mastocitos y posterior activación de las metaloproteinasas (MMP), que degradarían la matriz extracelular y la membrana basal (Walsh, 2003; Mignogna *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2011) . Se ha observado que más del 60% de los mastocitos presentes están degranulados en comparación con la mucosa no afectada (Lodi *et al.*, 2005; Juneja *et al.*, 2006). La degranulación mastocitaria es una fuente importante de quimasa y triptasa, y de proteasas activadoras de las MMP 1, 3 y 9 (Walsh, 2003). Además, algunos mediadores liberados por los mastocitos participarían en la migración de linfocitos a través del epitelio (Lodi *et al.*, 2005). El TNF- α estimularía la sobreexpresión de ciertas moléculas (CD62E, CD54, CD106), necesarias para la adhesión de los linfocitos a la pared vascular y su posterior extravasación (Walsh, 2003). La quimasa y la triptasa activarían la MMP 9 derivada de los linfocitos T, provocando daño en el colágeno IV y en la membrana basal (Walsh, 2003; Lodi *et al.*, 2005; Roopashree *et al.*, 2010). También se ha observado que los linfocitos T secretarían la citoquina RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), que es la encargada de atraer a los mastocitos y de estimular su degranulación, lo que provocaría la atracción y activación de los linfocitos T, que además de provocar apoptosis de los queratinocitos, segregarían más citoquinas RANTES (Roopashree *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011).

En la ELO se produciría apoptosis de los queratinocitos mediante 3 posibles mecanismos (Sugerman *et al.*, 2002; Roopashree *et al.*, 2010):

- 1) Por el TNF- α secretado que se uniría al receptor R1 del TNF- α en la superficie de los queratinocitos.
- 2) Por la unión entre CD95L (Fas ligando) expresado por células T y el CD95 (Fas) expresado por los queratinocitos.
- 3) Por la entrada en los queratinocitos de granzima B por poros creados por perforina (Roopashree *et al.*, 2010).

Todos estos mecanismos desencadenarían finalmente la cascada enzimática de las caspasas y la apoptosis (Sugerman *et al.*, 2002).

Se han descritos diferentes mecanismos para justificar la cronicidad de estas lesiones, entre los que cabe destacar la actuación de las citoquinas RANTES y las diferencias en las células de Langerhans de la mucosa oral, que tendrían una mayor capacidad de estimular a los linfocitos T que las de la piel (Hasseus *et al.*, 1999; Hasseus *et al.*, 2004). Además, se ha descrito una mayor supervivencia de los linfocitos (Hasseus *et al.*, 2004; Bascones-Ilundain *et al.*, 2006), la cual se ha relacionado con un aumento de la proteína osteopontina (Liu *et al.*, 2011).

4.2.1.2. ELO. Aspectos clínicos

Esta enfermedad afecta principalmente a las mujeres entre la quinta y sexta décadas de la vida (Eisen, 2002; Mattsson, Jontell, & Holmstrup, 2002; Gandolfo *et al.*, 2004; Aguirre Urizar, 2008; Carbone *et al.*, 2009; Bermejo-Fenoll *et al.*, 2010), y para ser diagnosticada, debe presentar las típicas pápulas lineales blancas.

En general, se consideran dos principales formas clínicas en esta enfermedad: la reticular, con pápulas blancas, y la erosivo-ulcerativa con ulceraciones. No obstante, se han descrito otras presentaciones: en placa, atrófica y ampollar (Al-Hashimi *et al.*, 2007).

A la forma reticular típica con pápulas blancas lineales formando un encaje blanco (estrías de Wickham), se le ha denominado “liquen reticular”. Estas lesiones papulares representan el dato clínico fundamental e imprescindible para poder hacer el diagnóstico de ELO, sea del tipo que sea (van der Meij & van der Waal, 2003; Aguirre Urizar, 2008). La característica de las lesiones papulares puede no ser evidente en algunos lugares, como el dorso de la lengua, donde son comunes las placas atróficas. La forma reticular generalmente no causa síntomas o una ligera sensación de tirantez, y en muchos casos, puede pasar desapercibida, siendo detectada de manera casual (Schlosser, 2010). La forma erosiva-ulcerativa (Figura 4.6) es menos común, pero es más importante para los pacientes, ya que por lo general es sintomática. Los síntomas son variables y van desde una incomodidad ligera hasta un intenso dolor. Se reconocen ulceraciones irregulares, preferentemente en aquellas áreas sometidas a traumatismos como la zona media yugal y los márgenes linguales (Walsh, 2003; Al-Hashimi *et al.*, 2007).



Figura 4.6. Lesiones papulares, atróficas y erosivo-ulcerativas en paladar.

El patrón habitual de afectación clínica es bilateral y simétrico en los casos típicos (LPO) (Chainani-Wu *et al.*, 2001). En el caso de las LLOs si la causa es una restauración de amalgama suele estar en relación topográfica directa con la misma (Cobos-Fuentes *et al.*, 2009), y en la mayoría de los casos las lesiones no suelen ser bilaterales ni simétricas. No obstante, las LLOs pueden mostrar características similares al LPO, por lo que se hace imprescindible realizar un examen clínico e histopatológico minucioso en todos los casos (Thornhill *et al.*, 2006) (Figura 4.7).



Figura 4.7. Lesión liquenoide unilateral.

Los pacientes con ELO pueden presentar lesiones extraorales: vulvo-vaginales (25%) o cutáneas (15%) (Eisen, 2002). Estos casos constituirían las variantes de liquen plano mucoso y muco-cutáneo (Aguirre Urizar, 2008).

Las lesiones en la piel aparecen como pápulas de color púrpura, poligonal, pruriginoso, por lo general, en las extremidades. Otros lugares de afectación extraoral son las uñas, el cuero cabelludo, el glande y la mucosa esofágica (Eisen, 2002). También se han descrito casos aislados de afectación ocular, urinaria, nasal, laríngea, gástrica y anal (Evans *et al.*, 2000; Scully & Carrozzo, 2008).

Se debe realizar siempre un diagnóstico diferencial exhaustivo ante un caso de ELO, en primer lugar con el carcinoma oral de células escamosas. También debe diferenciarse del lupus eritematoso discoide, de la leucoplasia, del penfigoide mucoso, de lesiones de mordisqueo, eritema multiforme, etc. Las formas múltiples con áreas en placa pueden parecer áreas de leucoplasia, y deben diferenciarse de un modo especial de la leucoplasia multifocal proliferativa (Scully & Carrozzo, 2008).

La ELO es un proceso crónico y dinámico, con modificaciones de su aspecto clínico, por lo que debe ser valorada periódicamente utilizando escalas que analicen su evolución y la respuesta al tratamiento (Lopez-Jornet & Camacho-Alonso, 2010).

Un aspecto muy interesante de estos procesos es su asociación a otras enfermedades sistémicas, como la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) (Carrozzo & Gandolfo, 2003). Se considera que los linfocitos T específicos para la hepatitis C pueden tener un papel en la patogénesis de algunos casos de LPO (Carrozzo & Gandolfo, 2003). Los pacientes con LPO presentan cinco veces más riesgo de estar infectados por VHC que los controles sanos (Lodi *et al.*, 2010). La asociación con el antígeno de histocompatibilidad de clase II-DR6 podría explicar en parte la peculiar heterogeneidad geográfica de esta asociación (Carrozzo *et al.*, 2005).

4.2.1.3. ELO. Aspectos histopatológicos

En el diagnóstico de estos procesos es fundamental unir los aspectos clínicos y los histopatológicos, tanto para confirmar la sospecha clínica como para excluir la existencia de displasia epitelial o de otro proceso similar, incluido el cáncer. Sin embargo, se ha demostrado que la evaluación histológica puede ser muy subjetiva

(van der Meij *et al.*, 1999) y que aproximadamente en la mitad de los casos la correlación clínico patológica suele ser pobre (van der Meij & van der Waal, 2003).

El LPO clásico (LPO típico) se caracteriza histopatológicamente por la presencia de degeneración hidrópica de las células de la capa basal y un infiltrado inflamatorio crónico en la lámina propia de disposición “en banda”, constituido principalmente por linfocitos T (van der Meij & van der Waal, 2003; Aguirre Urizar, 2008). No obstante, el aspecto histológico no es patognomónico y se puede observar en otros procesos mucosos, como el penfigoide mucoso, el lupus eritematoso discoide, etc. (Thornhill *et al.*, 2006).

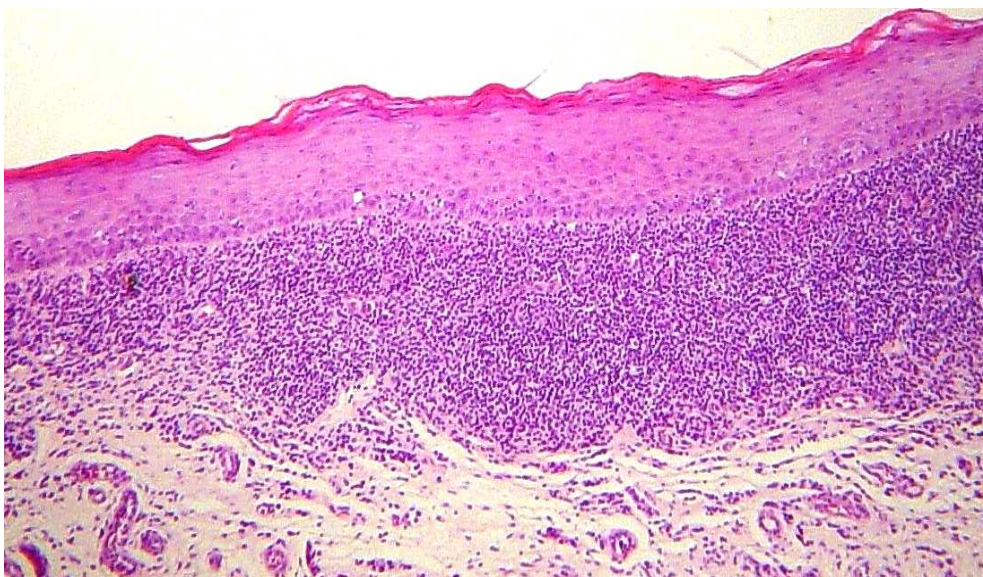


Figura 4.8. Infiltración inflamatoria linfocitaria en el corion y degeneración basal.

En 2003, van der Meij y van der Waal (van der Meij & van der Waal, 2003) señalaban una serie de criterios clínicos e histopatológicos para diferenciar el LPO y las LLO. Consideran como LLO a todas las lesiones que no cumplen los “criterios típicos” de LPO, a las que denominan “compatibles”. Algunos autores (Thornhill *et al.*, 2006; Cobos-Fuentes *et al.*, 2009; Schlosser, 2010) señalan que es casi imposible diferenciar histológicamente el LPO y LLO. No obstante, existirían algunos datos sugestivos de LLO, como la presencia de un infiltrado inflamatorio más profundo, o la existencia de inflamación perivascular con abundancia de células plasmáticas y neutrófilos (van den Haute *et al.*, 1989; Thornhill *et al.*, 2006).

En algunos casos, puede ser útil realizar inmunofluorescencia directa, que muestra un patrón lineal o globular de depósito de fibrinógeno en la membrana basal (Helander & Rogers, 1994).

Todas las biopsias de ELO que presenten datos histopatológicos de displasia epitelial en el momento del diagnóstico, deben tener una consideración diferente (Cortes-Ramirez *et al.*, 2009). Deben excluirse el equívoco término de “displasia liquenoide” del diagnóstico histopatológico de ELO y de cualquier trastorno oral potencialmente maligno (van der Meij & van der Waal, 2003).

4.2.1.4 ELO. Aspectos terapéuticos y pronósticos

Todavía no existe un tratamiento curativo para la ELO y en la actualidad únicamente disponemos de tratamiento paliativos.

El tratamiento está indicado en las lesiones sintomáticas, atróficas, erosivas y/o ulcerativas.

Aunque se han utilizado diversos tratamientos, los más útiles son los agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tanto locales como sistémicos (Lodi *et al.*, 2005; Al-Hashimi *et al.*, 2007; Scully & Carrozzo, 2008). Los fármacos más utilizados son los corticoides tópicos de media potencia, como la fluocinolona o la triamcinolona, o bien, en los casos más graves y recalcitrantes, los de alta potencia, como el clobetasol (Thongprasom *et al.*, 2003; Aguirre *et al.*, 2004; Lodi *et al.*, 2005; Al-Hashimi *et al.*, 2007). Se señala (Lodi *et al.*, 2005) que los corticoides sistémicos deberían reservarse para los brotes agudos y para los casos con lesiones muy extensas, ya que son más frecuentes los efectos adversos asociados.

La duración del tratamiento dependerá directamente de la efectividad de la terapia y de la evolución de las lesiones. Es común que una terapia mantenida con inmunosupresores se asocie a la aparición de candidiasis oral (Lodi *et al.*, 2005; Al-Hashimi *et al.*, 2007). Por ello, en muchos casos hay que asociar a los corticoides un tratamiento antifúngico con nistatina o miconazol (Aguirre Urizar, 2002).

La ELO es una enfermedad crónica que influye en la calidad de vida de los pacientes de una manera significativa por lo que es importante dar apoyo psicológico, así como controlar los procesos sistémicos asociados y mantener una buena salud oral general (Farhi & Dupin, 2010; Lopez-Jornet & Camacho-Alonso, 2010).

4.2.1.5. Enfermedad liquenoide oral: Aspectos moleculares

Existen numerosos trabajos que analizan las características moleculares de este desorden y sin embargo, aún no se ha llegado a un consenso. En la literatura nos encontramos con numerosos trabajos que investigan marcadores relacionados con el cáncer como las mutaciones de p53, inestabilidad de microsatelites o la metilación aberrante de los promotores, pero los resultados son contradictorios.

A. Criterios inmunohistoquímicos

La proteína p53 normal, actúa como supresora tumoral inhibiendo la proliferación y la transformación mediada por oncogenes. La inactivación de p53 es un evento frecuente en el COCE y está causada por mutaciones, presencia del virus del papiloma humano y otras alteraciones moleculares acaecidas en la ruta de p53 (Gasco & Crook, 2003).

La mayoría de los estudios en relación con la expresión de p53, han encontrado una mayor sobreexpresión de p53 en la ELO que en mucosa normal (Meek, 2004; Chaiyarit *et al.*, 2005; Gonzalez-Moles *et al.*, 2008; Ebrahimi *et al.*, 2011).

La importancia de la sobreexpresión inmunohistoquímica de p53 como marcador de mutaciones fue discutida por Schifter *et al.* (Schifter *et al.*, 1998) que observaron que en algunos casos existía una sobreexpresión pero sin embargo no aparecían mutaciones en el gen.

Debido a que la expresión de p53 se ha identificado como respuesta al daño sobre el ADN (Meek, 2004), algunos autores (Sousa *et al.*, 2009; Safadi *et al.*, 2010) señalan que la sobreexpresión de p53 en el ELO es indicativo del potencial premaligno de este trastorno.

Otro marcador que se ha asociado con la malignización es el EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) cuya sobreexpresión podría indicar un riesgo precoz de carcinogénesis oral (Grandis & Tweardy, 1993). En relación a este marcador y la enfermedad liquenoide oral, existen datos contradictorios en cuanto a niveles de expresión. Por un lado, Cortés-Ramírez *et al.* (Cortes-Ramirez *et al.*, 2014) observaron una sobreexpresión del marcador EGFR en las muestras de ELO en contraposición a los resultados de Ebrahimi *et al.* (Ebrahimi *et al.*, 2008) quienes observaron una baja expresión de EGFR en muestras de ELO comparándolas con tejido sano.

B. Criterios moleculares

Está generalmente aceptada la idea de que la transformación de un tejido normal en un tejido maligno se produce por una acumulación de cambios genéticos en los oncogenes y en los genes supresores de tumores (Fearon & Vogelstein, 1990). La pérdida alélica, frecuente en determinados *loci* en diferentes tipos de cáncer humano, ha aportado pruebas sólidas sobre la existencia de varios genes supresores de tumores en cada cromosoma donde se detectó una deleción (Numasawa *et al.*, 2005). Estudios citogenéticos y moleculares han identificado anomalías cromosómicas incluyendo la deleción parcial de *loci* específicos (Suzuki *et al.*, 1995). En particular, se consideran para la identificación de premalignidad oral el análisis de los cromosomas 3p, 9p, 11q y 17p (Gonzalez-Moles *et al.*, 2012). En este sentido, Rosin *et al.* (Rosin *et al.*, 2000) observaron que el riesgo relativo de malignización de las lesiones premalignas orales aumentaba 3,8 veces si éstas presentaban pérdida de heterocigosidad (LOH) en 3p y/o 9p. Además, si las lesiones presentaban LOH adicionales en 4q, 8p, 11q o 17p el riesgo relativo de desarrollar un COCE aumentaba a 33 veces (Rosin *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayoría de los estudios indican que la pérdida de heterocigosidad es un evento poco común en el liquen plano oral (Accurso *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). No obstante, el grupo de Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2001) encontró que la pérdida de heterocigosidad, en el cromosoma 9, era un evento usual en la enfermedad liquenoide oral (Kim *et al.*, 2001).

En relación a los cambios de aneuploidia del ADN, Femiano *et al.* (Femiano & Scully, 2005) y más tarde Hosni *et al.* (Hosni *et al.*, 2010) encontraron cambios en algunas lesiones atróficas de ELO, sin embargo en el estudio llevado a cabo por Acha-Sagredo *et al.* (Acha-Sagredo *et al.*, 2011) no se observaron diferencias estadísticamente significativas. En los últimos años se ha estudiado el efecto de la metilación en diversos genes extrayendo material genético de lesiones tumorales, lesiones premalignas o tejido subrogado. La metilación puede ser detectada tanto en tumores como en las lesiones premalignas e incluso en el tejido clínicamente e histológicamente sano, lo que sugiere que puede ocurrir en estadios tempranos en la carcinogénesis oral y que podría servir como biomarcador de esta enfermedad maligna (Ha & Califano, 2006).

En relación con la presencia de alteraciones epigenéticas en la enfermedad liquenoide oral, hasta este momento han sido publicados muy pocos estudios en esta temática,

siendo los resultados inconsistentes (Ruesga *et al.*, 2007; Gassling *et al.*, 2013; Bediaga *et al.*, 2014). Esta variabilidad en cuanto a los resultados puede deberse al reducido tamaño muestral empleado, a la selección "*a priori*" de los genes a analizar, o a los diversos criterios empleados para clasificar las lesiones (Ruesga *et al.*, 2007; Dang *et al.*, 2013). En la actualidad, gran parte de la actividad investigadora va encaminada a la identificación de alteraciones moleculares asociadas al desarrollo del cáncer con el fin de identificar biomarcadores útiles en la detección precoz de la enfermedad. En este sentido, se ha puesto de manifiesto el potencial de los microRNAs en el diagnóstico, pronóstico y uso terapéutico en el cáncer.

Los microRNAs son moléculas de RNA no codificantes que regulan la expresión génica de forma post-transcripcional. Se unen de manera parcialmente complementaria a la región 3' del RNA mensajero provocando la represión transcripcional o la degradación directa del mRNA. Se estima que los cerca de 2000 microRNAs descritos son capaces de regular la expresión del 60% de los genes humanos. Están involucrados en procesos biológicos como el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular (Miska, 2005; Filipowicz *et al.*, 2008; Bartel, 2009; Kozomara & Griffiths-Jones, 2014).

Se ha constatado que los microRNAs juegan un papel importante en el cáncer, pudiendo actuar como oncogenes o genes supresores (Kent & Mendell, 2006)

En relación al cáncer oral, algunos estudios (Calin & Croce, 2006; Volinia *et al.*, 2006; Childs *et al.*, 2009) han analizado los perfiles de expresión de microRNAs observando diferencias entre los tejidos tumorales y los normales, lo que sugiere que los microRNAs podrían tener utilidad en la detección precoz y el diagnóstico del cáncer y de los trastornos orales potencialmente malignos (Lu *et al.*, 2005; Blenkiron *et al.*, 2007; Cervigne *et al.*, 2009; Towle *et al.*, 2013).

4.3. MicroRNAs

4.3.1. Aspectos generales

En estos últimos años, el descubrimiento de unas pequeñas moléculas de RNA llamadas microRNAs ha atraído la atención en la investigación oncológica.

Los microRNA son moléculas de RNA monocatenario de unos 21 a 25 pares de bases de longitud que se transcriben pero que no se traducen a proteína, y que regulan la expresión génica de forma post-transcripcional. Los microRNAs se unen de manera

parcialmente complementaria a la región 3' del RNA mensajero (mRNA) provocando la represión transcripcional o la degradación directa de este, aunque para activar la respuesta es necesaria la unión de varios de ellos, ya que la unión de uno solo no produce efectos significativos (Filipowicz *et al.*, 2008; Bartel, 2009).

Un mRNA puede estar regulado por diferentes microRNAs y a su vez un único microRNA puede controlar la actividad de cientos de mRNA distintos. Los microRNAs se pueden encontrar como unidades transcripcionales individuales, *clusters* de distintos microRNAs, dentro de intrones de genes que codifican para proteínas e incluso otros pueden ser genes policistrónicos como los que forman partes del Hox *cluster* (grupo de genes relacionados que se encargan de regular la morfogénesis) (Bartel, 2004; Carthew & Sontheimer, 2009).

Estas pequeñas moléculas fueron inicialmente descubiertas en el nematodo *Caenorhabditis elegans* por el grupo de investigación de Victor Ambros en el año 1993 (Bartel, 2004), quienes descubrieron que *lin-4*, un gen que estaba involucrado en la regulación del tiempo de desarrollo larval no codificaba para una proteína pero en cambio producía dos RNAs de distinto tamaño, uno de 22 nucleótidos (nt) y otro de 61. Observaron que la molécula de RNA más larga podía adoptar una conformación en *stem loop* y que era el precursor del más pequeño. Estos investigadores, a su vez, comprobaron que estos RNAs mostraban zonas anti-sentido complementarias a múltiples sitios de la zona 3' UTR del gen *lin-4*. Por lo tanto, el RNA *lin-4* fue el fundador de esta pequeña familia de reguladores génicos (Bartel, 2004), aunque no fue hasta el año 2001 cuando se acuñó por primera vez el término “microRNA” en un conjunto de artículos publicados en Science (Bartel, 2004).

Aunque durante mucho tiempo se creyó que los microRNAs eran exclusivos de los seres pluricelulares, desde hace unos pocos años se sabe que también se expresan en una gran variedad de especies unicelulares (Molnar *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Los microRNAs presentan un patrón de expresión dependiente del tipo celular y del tejido, y muchos de ellos se encuentran bien conservados, lo que nos da una idea de su origen antiguo (Molnar *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007).

El conocimiento de los genes regulados por microRNAs va en aumento, considerándose en la actualidad que los más de 2800 microRNAs descritos, son capaces de regular el 60% de los genes humanos (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014).

4.3.2. Biogénesis y procesamiento

Los genes que codifican para los microRNAs pueden estar localizados dentro de intrones que pueden codificar para proteínas, *mirtrons*, así como también en regiones intergénicas o exones. En el primer caso, la expresión de los microRNAs puede ir correlacionada con la regulación transcripcional de su gen hospedador mientras que en el segundo caso, la expresión de los microRNAs viene regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores (Bartel, 2004).

El procesamiento de los microRNAs comienza en el núcleo y termina en el citoplasma celular, donde van a realizar su función. Los microRNAs se producen a partir de un microRNA precursor (pre-microRNA), que a su vez se forma a partir de un transcrito de microRNA primario (pri-microRNA). Esto ocurre porque las secuencias de DNA que codifican para estos genes son mas largas que los microRNAs procesados maduros, ya que incluyen la región del microRNA y la región complementaria que permite su apareamiento (Bartel, 2004).

Durante la transcripción de estas secuencias en el núcleo, se generan regiones capaces de formar horquillas que dan lugar a un RNA bicatenario primario largo o pri-microRNA. Posteriormente, en el núcleo celular, una enzima de restricción, Drosha, y su co-factor DGCR8 (en los mamíferos) se encargan de cortar las bases de la horquilla formando estructuras cortas de aproximadamente 70 pares de bases en forma de tallo-lazo (stem-loop), los pre-microRNAs (Bartel, 2004).

Los pre-microRNAs son transportados al citoplasma por la exportina 5, donde son transformados en microRNAs maduros gracias a la acción de la endonucleasa Dicer, que los corta en dos moléculas complementarias de 20-25 pares de bases de longitud. Una de las hebras es seleccionada para funcionar como un microRNA maduro, la hebra guía o *antisense*, mientras que la otra, la hebra anti-guía o *sense* es degradada, aunque en algunas ocasiones las dos hebras pasan a ser microRNAs maduros (Figura 4.9) (Du & Zamore 2005; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Bushati & Cohen 2007; Peters & Meister 2007; Rana, 2007).

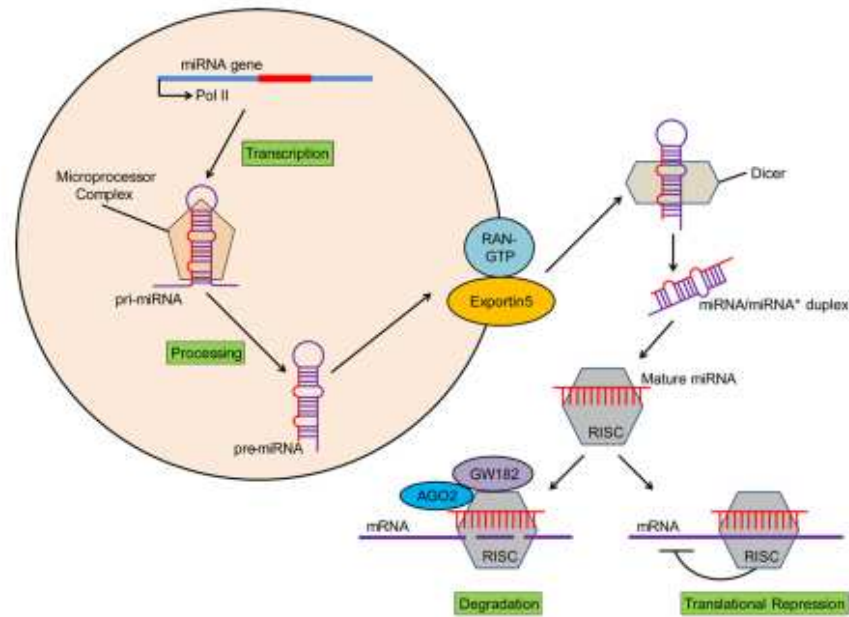


Figura 4.9. Biogénesis convencional de los microRNAs y funciones. Tomada de Gorenchtein *et al.*, 2012.

A su vez, la enzima Dicer también se encarga de iniciar la formación del complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que es la maquinaria catalítica responsable del silenciamiento de genes, ya que los microRNAs se emparejarían de acuerdo con su secuencia con la molécula de mRNA diana complementaria, y en la mayoría de los casos provocaría la inhibición de la traducción de dicho mRNA (Filipowicz *et al.*, 2008). Al complejo RISC cuando actúa con microRNAs, se le conoce como miRISC (Rana, 2007). Cuando la unión del microRNA a su mRNA se da de forma complementaria, se produce la degradación del mRNA diana, mientras que si esta unión no se da de forma complementaria lo que se produce es la inhibición de la traducción del mRNA (Lim *et al.*, 2005).

En estos momentos no se sabe con exactitud qué grado de complementariedad es necesario para el silenciamiento génico de los mRNA diana. No obstante, se cree que la capacidad de los microRNAs para inhibir la traducción depende de la energía libre de unión entre los primeros 8 nucleótidos, la denominada secuencia semilla o *seed sequence*, del extremo 5' del microRNA y del mRNA. Según esta teoría un mismo microRNA puede actuar sobre múltiples zonas 3'UTR de un gran número de genes (Rana, 2007).

En cuanto al número de miRISC que se necesitan para inhibir la traducción, los datos sugieren que se necesitan varias regiones de unión para una interacción microRNA-diana de alta afinidad; ya que si los miRISC, como hemos explicado anteriormente, reconocen la secuencia semilla de unos 8 nucleótidos, la unión que se de será de baja afinidad, por lo que sería lógico pensar que múltiples copias de miRISC podrían unirse a la diana para compensar la unión de baja afinidad entre el miRISC y el mRNA diana (Rana, 2007). Una vez que se ha dado la degradación del mRNA, el mismo microRNA puede volver a reconocer y a destruir otros nuevos mRNA dianas. En general, en este mecanismo la complementariedad se puede dar tanto en regiones codificantes como en regiones 3'UTR, mientras que en el caso de la inhibición de la traducción, la complementariedad se da en la región 3'UTR (Figura 4.10) (Rana, 2007).

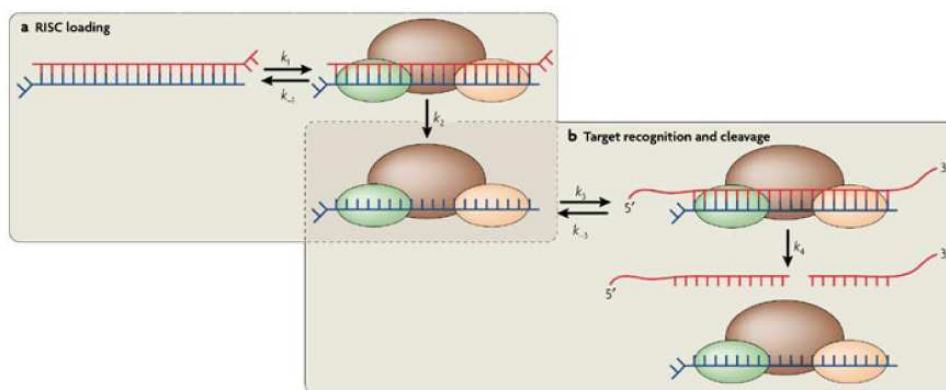


Figura 4.10. Proceso de degradación de un mRNA diana por la unión de un microRNA complementario. Tomada de Rana, 2007.

Sin embargo, de hace unos años a aquí ha surgido una ruta distinta a la convencional que explicaría la biogénesis de los microRNAs que proceden de secuencias intrónicas, los llamados “*mirtron*”. En este caso la maduración la sigue llevando a cabo el enzima Dicer, pero el paso anterior llevado a cabo por la enzima Drosha y su co-factor DGCR8 es sustituido por un fenómeno de *splicing* de fragmentos intrónicos con capacidad para formar horquillas (Okamura *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007) (Figura 4.11).

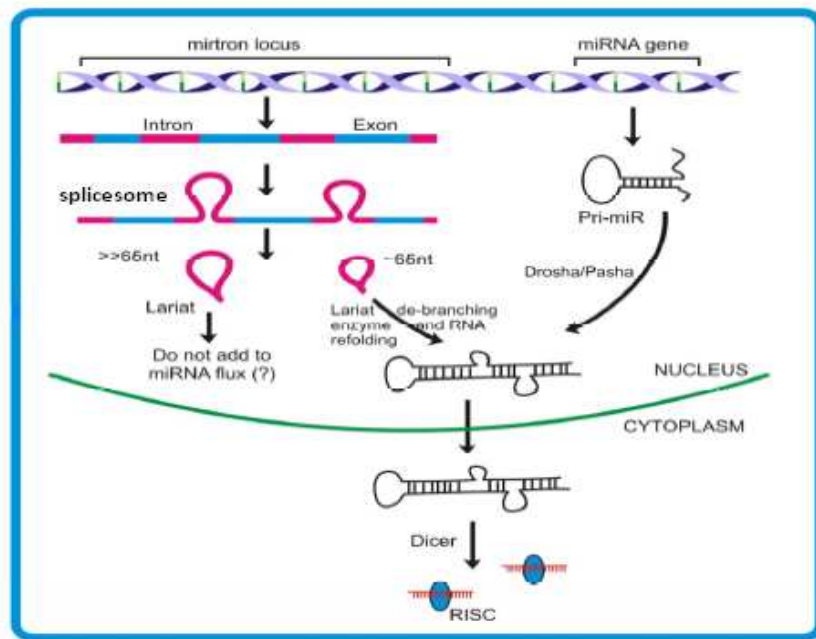


Figura 4.11. Esquema de la ruta canónica y la ruta de los *mirtron*. Tomado de Naqvi *et al.*, 2009.

4.3.3. Alteraciones en la expresión de microRNAs asociadas al Cáncer

Los microRNAs regulan procesos biológicos como el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular, por lo que, la desregulación de su expresión tiene importantes consecuencias para la célula (Miska, 2005).

El gran número de estudios que empieza a haber sobre los microRNAs y su frecuente localización en zonas frágiles del genoma, o en zonas de amplificación o pérdida de heterocigosidad revelan que los microRNAs podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis humana (Budhu *et al.*, 2010). Incluso, sabemos que los microRNAs tienen un papel importante en la progresión celular ya que son capaces de modular la adhesión celular, la matriz celular (Gramantieri *et al.*, 2007; Gramantieri *et al.*, 2009; Chiyomaru *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010), la expresión de los genes relacionados con los mecanismos de hipoxia y los factores vasculares endoteliales (Cascio *et al.*, 2010; Favaro *et al.*, 2010; McCormick *et al.*, 2010).

Dentro de los mecanismos de desregulación de los microRNAs podemos encontrar la alteración en el comportamiento de los factores de transcripción, alteraciones cromosómicas, cambios epigenéticos como la metilación de las islas CpG en

promotores de microRNAs, la modificación de histonas, la presencia de polimorfismos en los pri-, pre-microRNAs y microRNAs maduros y por último problemas en el procesamiento y biogénesis de los microRNAs, lo que llevaría a la aparición de fenotipos cancerosos (Gorenchtein *et al.*, 2012) (Figura 4.12).

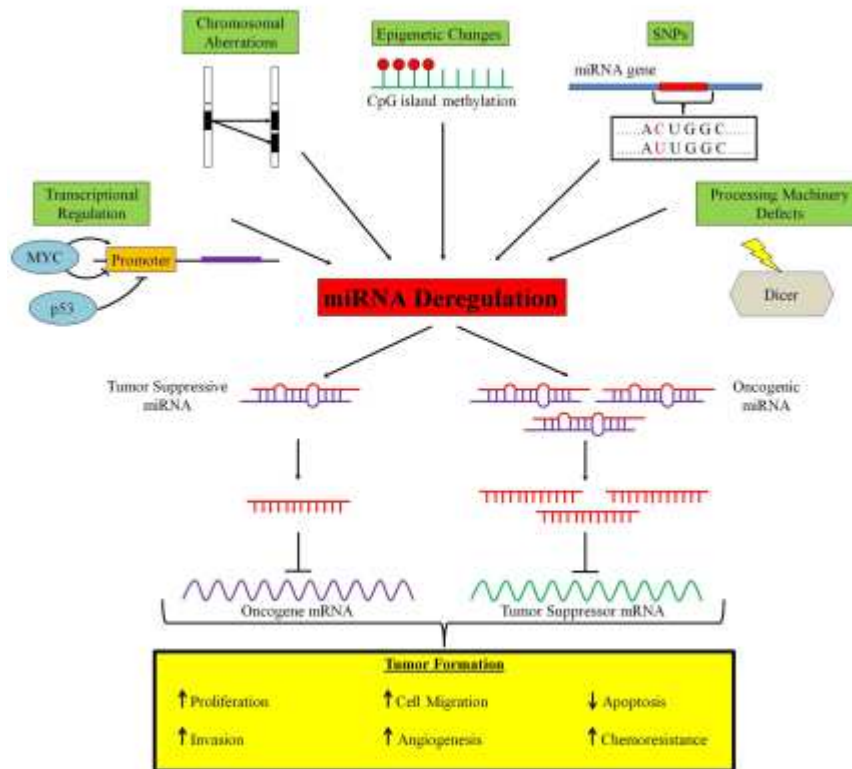


Figura 4.12. Alteraciones en los mecanismos de regulación de los microRNAs en el cáncer. Tomado de Gorenchtein *et al.*, 2012.

Se ha constatado que los microRNAs juegan un papel importante en muchos tipos de cáncer, incluido el carcinoma oral de células escamosas (COCE), pudiendo actuar como oncogenes o como genes supresores tumorales (Kent & Mendell, 2006).

Los microRNAs que regulan los genes supresores tumorales, se denominan "microRNAs oncogénicos". Cuando se encuentran sobreexpresados, inhiben la expresión de los genes supresores tumorales, provocando la iniciación y la progresión tumoral. Por el contrario los microRNAs que regulan los oncogenes, se denominan "microRNA supresor tumoral" y cuando se encuentran subexpresados o eliminados, se produce la sobreexpresión de proteínas oncogénicas, lo que favorece el desarrollo del cáncer (Varol *et al.*, 2011) (Figura 4.13).

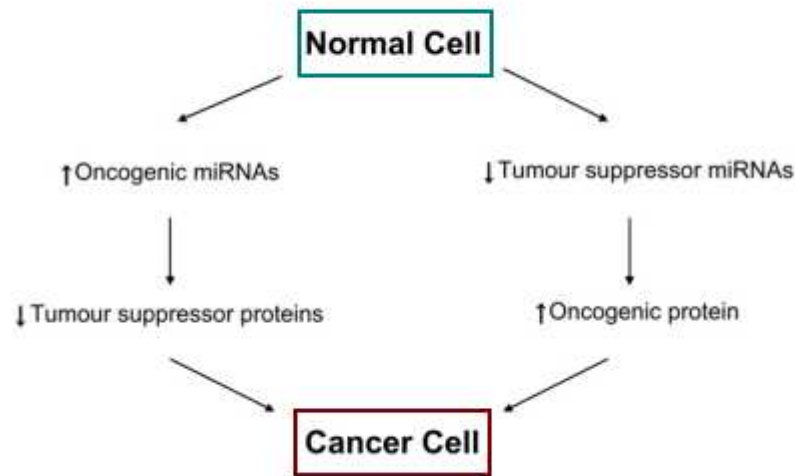


Figura 4.13. microRNAs y su relación con el desarrollo del cáncer. Tomado de Gomes & Gomez, 2008.

Es importante señalar que el análisis de los perfiles de expresión de los microRNAs es particularmente interesante desde el punto de vista diagnóstico ya que para detectarlos de forma precisa no son necesarias grandes cantidades de tejido. Con el material obtenido de una simple biopsia ya sería suficiente, e incluso pueden ser fácilmente estudiados tanto en tejidos en fresco como en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina y en fluidos biológicos (saliva y sangre) (Budhu *et al.*, 2010).

La detección de alteraciones en los perfiles de expresión de microRNAs en fluidos biológicos es muy interesante ya que permitiría obtener información útil con una técnica sencilla y poco invasiva (Budhu *et al.*, 2010).

4.3.4. microRNAs asociados a procesos oncológicos

Se ha demostrado la existencia de diferencias en los perfiles de expresión de microRNAs entre el tejido tumoral y el normal (Calin & Croce, 2006; Volinia *et al.*, 2006; Childs *et al.*, 2009), e incluso, se han identificado perfiles de expresión de microRNAs que permiten distinguir tipos y subtipos tumorales, lo que sugiere que podrían ser de gran utilidad para el diagnóstico y detección precoz del cáncer (Lu *et al.*, 2005; Blenkiron *et al.*, 2007).

Los primeros microRNAs descritos asociados a cáncer fueron: el microRNA-15a y el microRNA-16-1 (supresores tumorales), que se encuentran subexpresados en el cáncer de prostata y la leucemia linfoblástica crónica (Calin *et al.*, 2002) (Tabla 4.1). Estos microRNAs son capaces de unirse a la región 3'UTR de la proteína Bcl-2 (protooncogen) y disminuir su actividad antiapoptótica (Cimmino *et al.*, 2005).

Otro de los microRNAs primeramente descrito fue la familia let-7, que es un supresor tumoral que se ha encontrado subexpresado en algunos cánceres como el de pulmón, de colon y de estómago. Este microRNA tiene como dianas a los oncogenes RAS, MYC y HMGA2 (Calin *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005). Se ha reconocido que en algunos cánceres de pulmón, los valores bajos de este microRNA provocan el aumento de RAS, y que este hecho se correlaciona con un peor pronóstico de esta enfermedad neoplásica (Takamizawa *et al.*, 2004).

En cuanto a los microRNAs que actúan como oncogenes, los primeros microRNAs descritos fueron el microRNA-155 y el *cluster* microRNA-17-92 (Hayashita *et al.*, 2005; Tong & Nemunaitis, 2008; Croce, 2009). El microRNA-155 se encuentra sobreexpresado en el cáncer de colon, de pulmón, de mama, de tiroides y en el linfoma, de tal modo que su alta expresión se correlaciona con una baja supervivencia (Volinia *et al.*, 2006, Croce, 2009).

Por otro lado, se ha visto que algunos microRNAs de la misma familia pueden actuar como oncogenes o supresores de tumores dependiendo del tipo de tejido o célula (Gorenchtein *et al.*, 2012). Así ocurre con el es el caso de microRNA-31 que se encuentra sobreexpresado en el COCE y a su vez subexpresado en el cáncer gástrico (Liu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Todas estas combinaciones están sujetas a cambios epigenéticos que modificarían la expresión final del mRNA diana (Perez-Sayans *et al.*, 2012).

Tabla 4.1. MicroRNAs asociados a Cáncer. Tomado de Budhu *et al.*, 2010.

Tipo de Cáncer	miRNAs	Función
Cáncer de Mama	miRNA-21, miRNA-125b, miRNA-126, miRNA-206, miRNA-335	OncomiR y Supresor Metástasis
Cáncer de Colon	miRNA-21, miRNA-34a	OncomiR y Supresor Tumoral
Cáncer de Pulmón	miRNA-21, miRNA-17-92, miRNA-106b/93/25, Let-7a, miRNA-143, miRNA-145	OncomiR y Supresor Tumoral
Cáncer de Páncreas	miRNA-196a, miRNA-196b	OncomiR
Cáncer de Prostata	miRNA-21, miRNA-15/16, miRNA-145, miRNA-146, miRNA-330, miRNA-205	OncomiR y Supresor Tumoral
Cáncer de Ovarios	miRNA-141, miRNA-200/a/b/c, miRNA-199a/b, miRNA-140, miRNA-145, miRNA-204, miRNA-125a/b	OncomiR y Supresor Tumoral
Cáncer Hepático	miRNA-21, miRNA-224, miRNA-34a, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-106, miRNA-303, miRNA-26a/b, let-7g, miRNA-122, miRNA-422b, miRNA-145, miRNA-199	OncomiR, Supresor Tumoral y Metástasis
Cáncer de Tiroides	miRNA-146, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-181b, miRNA-155, miRNA-224	OncomiR

4.3.5. microRNAs en Cáncer oral

En relación con el cáncer oral, algunos estudios (Henson *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010) han analizado los perfiles de expresión de microRNAs y han constatando la relación de los microRNAs en los procesos de proliferación celular, de apoptosis o de aparición de metástasis. Incluso, desde que se conoce que la expresión de los microRNAs se encuentra alterada en los distintos cánceres, y más concretamente en el cáncer oral, se ha considerado que puede funcionar como biomarcador para confirmar el estado de la enfermedad y su posible progresión (Cervigne *et al.*, 2009) (Tabla 4.2).

Uno de los microRNAs mas extensamente estudiado es el microRNA-21, el cual se encuentra sobreexpresado en varios tipos de cáncer incluyendo el COCE (Croce, 2009). El microRNA-21 juega un papel importante en la regulación del ciclo celular y en la apoptosis. Concretamente, altos niveles de este microRNA se han correlacionado con bajos niveles de α -tropomiosina (TPM1) y de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), genes supresores de tumores que median en el ciclo celular y en la apoptosis (Li *et al.*, 2009). Incluso, se ha observado que la inactivación de este microRNA induce la apoptosis en líneas celulares de cáncer de células escamosas de lengua (Li *et al.*, 2009).

En el estudio de Hsu *et al.* (2012) se constató que los niveles de este microRNA eran significativamente mas altos en la sangre de los pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) que en los pacientes control, e incluso los niveles de este microRNA eran mayores en la sangre de los pacientes, antes de la intervención quirúrgica que después de ella.

Otras dianas de este microRNA serían el inhibidor serina proteasa (SERPINB5), la proteína tumoral p63 (TAp63) y el inhibidor de transformación neoplásica PCDC4, lo que sugiere que podría jugar un papel importante en los procesos de invasión, metástasis y progresión de la enfermedad neoplásica (Zhu *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008; Papagiannakopoulos *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008).

En el trabajo realizado por Fu *et al.* (2011) en CCECC se comprobó que aquellos pacientes que no presentaban sobreexpresión del microRNA-21 tenían un mejor pronóstico que aquellos que la presentaban.

También se ha sugerido que este microRNA podría afectar a la formación de especies reactivas de oxígeno atenuando la actividad del enzima superóxido dismutasa 3 y favoreciendo la tumorigénesis (Zhang *et al.*, 2012). En 2009, Cervigne *et al.* mostraron la primera evidencia de la existencia de cambios en los perfiles de expresión de los microRNAs durante el proceso de cancerización oral. Su propósito era cuantificar los cambios en la expresión de los microRNAs en leucoplasias orales y COCEs de la misma zona e identificar el perfil de expresión de los microRNAs asociados al proceso de malignización. Estos investigadores (Cervigne *et al.*, 2009) obtuvieron un perfil de expresión global de microRNAs que distinguía entre leucoplasias que malignizaban y COCEs y leucoplasias que no malignizaban y el tejido normal.

Pudieron observar un aumento importante de la expresión de algunos microRNAs (microRNA-21, microRNA-181b y microRNA-345) que se asociaba a una mayor severidad de la lesión durante su progresión, por lo que postulan que la sobreexpresión de este grupo de microRNAs juega un papel importante en la transformación maligna de estas lesiones. Estos resultados a su vez nos dan una idea de que las lesiones premalignas que progresan a cáncer presentan la mayoría de las alteraciones genéticas observadas en el cáncer oral (Cervigne *et al.*, 2009).

En cuanto al microRNA-31, Liu *et al.* (2009) comprobaron que se encontraban niveles elevados en líneas celulares de CCECC, y en un trabajo posterior (Liu *et al.*, 2010) estos resultados fueron validados en muestras de saliva y sangre de pacientes con COCE. Además, el microRNA-31 se redujo notablemente en la sangre de los pacientes después de la resección quirúrgica del tumor, lo que sugiere que este marcador se encuentra asociado al tumor. Este estudio (Liu *et al.*, 2010) concluyó que la detección en la sangre del microRNA-31 se puede validar como un marcador para el diagnóstico de un COCE (Liu *et al.*, 2010). Posteriormente, el grupo de Lajer *et al.* (2011) volvieron a observar sobreexpresión de este microRNA en el COCE, sugiriendo que el microRNA-31 podría actuar como un oncogen, e intervenir en la formación de tumores y en los procesos de malignización de la cavidad oral mediante el bloqueo del factor inducible por hipoxia (HIF).

La familia let-7 es un conjunto de al menos 9 genes y recientemente se ha sabido que esta familia de microRNAs está regulada entre otros por el oncogen C-MYC, el cual se suele encontrar sobreexpresado en el CCECC, lo que explicaría que la familia let-7

pueda encontrarse subexpresada en estas neoplasias (Yanaihara *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008). Dentro de las dianas más conocidas de la familia let-7 se encuentran los oncogenes KRAS y HMGA2. Este último oncogen se ha visto que se asocia a un peor pronóstico en el cáncer de pulmón y también al proceso de metástasis (Johnson *et al.*, 2005; Sarhadi *et al.*, 2006; Hebert *et al.*, 2007).

En 2010, Jakymiw *et al.* estudiaron los niveles de expresión del enzima Dicer y del microRNA let-7b en tejido y líneas celulares de COCE, detectando que los niveles de Dicer eran elevados en los dos tipos de muestras al compararlos con los controles, y que a su vez los niveles de microRNA-let 7b se encontraban reducidos. Estos resultados les permiten sugerir que estas diferencias de expresión facilitarían la proliferación celular de las células cancerígenas.

El microRNA-7 ha sido caracterizado como un supresor tumoral en varios cánceres entre los que se incluye el COCE, siendo sus dianas más conocidas: los sustratos del receptor de la insulina IRS1 e IRS2, el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, el protooncogen serina/treonina quinasa RAF1 y la proteína quinasa PAK1 (Kefas *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2009). El estudio llevado a cabo por Jiang *et al.* (2010) en COCE demostró que el microRNA-7 es capaz de provocar subexpresión del receptor del factor de crecimiento IGF1R y por lo tanto atenuar la fosforilación o activación de la proteína quinasa AKT, lo que conlleva una disminución de la proliferación celular, un aumento de la apoptosis y un parón en el ciclo celular (Jiang *et al.*, 2010).

Tabla 4.2. Niveles de expresión y posibles dianas de microRNAs encontrados en Cáncer Oral.

miRNAs	Expresión	Detección	Dianas	Referencias
miRNA-21	sobreexpresado	Tejido, líneas celulares y fluidos biológicos	TPM1, PTEN, PDCD4, p12, SERPINB5, TAp63, SOD3	Hsu <i>et al.</i> (2012); Zhang <i>et al.</i> (2012); Fu <i>et al.</i> (2011); Cervigne <i>et al.</i> (2009); Li <i>et al.</i> (2009); Lu <i>et al.</i> (2008); Papagiannakopoulos <i>et al.</i> (2008); Zhu <i>et al.</i> (2008); Zhu <i>et al.</i> (2007)
miRNA -127	sobreexpresado	Tejido, líneas celulares y fluidos biológicos	Desconocida	Wiklund <i>et al.</i> (2011); Kozaki <i>et al.</i> (2008)
miRNA-31	sobreexpresado	Líneas celulares y fluidos biológicos	HIF, RhoA	Lajer <i>et al.</i> (2011); Liu <i>et al.</i> (2010); Chang <i>et al.</i> (2008)
miRNA-31*	sobreexpresado	Tejido y líneas celulares	RhoA	Chang <i>et al.</i> (2008)
miRNA-211	sobreexpresado	Tejido y líneas celulares	TGFBR2, Smad3, C-MYC, B-Galactosidasa, LacZ operon	Chu <i>et al.</i> (2013); Chang <i>et al.</i> (2008)
miRNA-24	sobreexpresado	Tejido, líneas celulares y fluidos biológicos	p57, DND1, CDKN1B	Lin <i>et al.</i> (2010); Liu <i>et al.</i> (2010)
miRNA-181	sobreexpresado	Tejido, líneas celulares y fluidos biológicos	p27 y bcl-2	Yang <i>et al.</i> (2011)
miRNA-221	sobreexpresado	Tejido y líneas celulares	PTEN, TIMP3, p27	Yang <i>et al.</i> (2011); Avissar <i>et al.</i> (2009)
miRNA-125a/b	subexpresado	Líneas celulares y fluidos biológicos	KLF13, CXCL11, FOXA1	Santhi <i>et al.</i> (2013); Wiklund <i>et al.</i> (2011); Henson <i>et al.</i> (2009); Park <i>et al.</i> (2009)
miRNA-100	subexpresado	Líneas celulares y fluidos biológicos	ID1, EGR2, MMP13, FGFR3	Henson <i>et al.</i> (2009)
miRNA-16/15a	subexpresado	Fluidos biológicos	PKC- α	Maclellan <i>et al.</i> (2012); Jakymiw <i>et al.</i> (2010); Bonci <i>et al.</i> (2008); Calin <i>et al.</i> (2005); Calin <i>et al.</i> (2002)
miRNA-let-7	subexpresado	Tejido y líneas celulares	C-MYC, KRAS, HMGA2, Dicer	Yu <i>et al.</i> (2008); Hebert <i>et al.</i> (2007); Yanaihara <i>et al.</i> (2006)
miRNA-375	subexpresado	Tejido y líneas celulares	PDK1, AEG-1/MTDH, JAK2, YAP y LDHB	Kinoshita <i>et al.</i> (2012); Li <i>et al.</i> (2011); Nohata <i>et al.</i> (2011); Wiklund <i>et al.</i> (2011); Hui <i>et al.</i> (2010); Avissar <i>et al.</i> (2009)

miRNA-17/20a	subexpresado	Lineas celulares	ITGβ8	Chang <i>et al.</i> (2013); Hayashita <i>et al.</i> (2005); Ota <i>et al.</i> (2004)
miRNA-145	subexpresado	Tejido	P53, RAS, C-MYC, Cdk6	Shao <i>et al.</i> (2013); Suh <i>et al.</i> (2011); Chiyomaru <i>et al.</i> (2010); Kent <i>et al.</i> (2010); Ostensfeld <i>et al.</i> (2010); Spizzo <i>et al.</i> (2010); Iorio <i>et al.</i> (2007)
miRNA-137	subexpresado	Lineas celulares	CDK6, E2F6, p16	Hui <i>et al.</i> (2010); Langevin <i>et al.</i> (2010); Kozaki <i>et al.</i> (2008); Han <i>et al.</i> (2007)
miRNA-193a	subexpresado	Lineas celulares	CDK6, E2F7	Hui <i>et al.</i> (2010); Langevin <i>et al.</i> (2010); Kozaki <i>et al.</i> (2008)
miRNA-491	subexpresado	Lineas celulares	GIT1	Huang <i>et al.</i> (2014); Rutnam <i>et al.</i> (2012); Hui <i>et al.</i> (2010); Langevin <i>et al.</i> (2010); Kozaki <i>et al.</i> (2008); Han <i>et al.</i> (2007)
miRNA-133a/b	subexpresado	Lineas celulares	GSTP1, CAV1, PKM2	Mutallip <i>et al.</i> (2011); Nohata <i>et al.</i> (2011); Childs <i>et al.</i> (2009)
miRNA-1	subexpresado	Tejido y lineas celulares	TAGLN2	Mutallip <i>et al.</i> (2011); Nohata <i>et al.</i> (2011); Childs <i>et al.</i> (2009)
miRNA-7	subexpresado	Lineas celulares	IGF1R, IRS1, IRS2, EGFR, RAF1 y PAK1	Jiang <i>et al.</i> (2010); Webster <i>et al.</i> (2009); Kefas <i>et al.</i> (2008); Reddy <i>et al.</i> (2008)
miRNA-124	subexpresado	Lineas celulares	ITGB1	Hunt <i>et al.</i> (2011)
miRNA-181a	subexpresado	Lineas celulares	KRAS	Shin <i>et al.</i> (2011)
miRNA-27b	ambos	Tejido y fluidos biológicos	TCTP	Lo <i>et al.</i> (2012)
miRNA-184	ambos	Tejido, lineas celulares y fluidos biológicos	C-MYC	Santhi <i>et al.</i> (2013); Wong <i>et al.</i> (2008)
miRNA-200	ambos	Tejido, lineas celulares y fluidos biológicos	Caderina desmosomal	Wiklund <i>et al.</i> (2011); Zidar <i>et al.</i> (2011)
miRNA-205	ambos	Tejido, lineas celulares y fluidos biológicos	Desconocido	Wiklund <i>et al.</i> (2011)
miRNA-138	ambos	Lineas celulares	GNAI2,RhoC, ROCK2	Jin <i>et al.</i> (2013); Jiang <i>et al.</i> (2011); Liu <i>et al.</i> (2009); Mitomo <i>et al.</i> (2008); Wong <i>et al.</i> (2008)
miRNA-223	ambos	Tejido, lineas celulares y fluidos biológicos	FBXW7, EPB41L3	Maclellan <i>et al.</i> (2012); Nylander <i>et al.</i> (2012); Hui <i>et al.</i> (2010)
miRNA-222	ambos	Tejido y lineas celulares	MMP1,SOD2, p27	Yang <i>et al.</i> (2011); Liu <i>et al.</i> (2009)

4.3.6. microRNAs en el Precáncer Oral

Existen pocos estudios que hayan analizado los perfiles de expresión de los microRNAs en el precáncer oral que actualmente agrupamos como trastornos orales potencialmente malignos (TOPM) (Cervigne *et al.*, 2009; Towle *et al.*, 2013) (Tabla 4.3).

Recientes estudios (Chen *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2013) sugieren que las alteraciones en los microRNAs están involucradas en muchos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo algunas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como la enfermedad liquenoide oral (ELO). Más concretamente se ha visto la relación entre la respuesta inmune mediada por los linfocitos T y cambios en la expresión de ciertos microRNAs (Chen *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2013).

En 2013, Gassling *et al.* estudiaron el perfil de expresión de microRNAs en pacientes con liquen plano oral (LPO) y pacientes control, observando que 24 microRNAs estaban desregulados. Estos investigadores (Gassling *et al.*, 2013) intentaron unir los microRNAs diferencialmente expresados con sus posibles dianas y obtuvieron 11 potenciales parejas de microRNAs-mRNAs, que se encontraban funcionalmente relacionadas con eventos inflamatorios y premalignos. Estos resultados sugieren que los microRNAs regulan rutas involucradas en esta enfermedad y por lo tanto podrían llegar a ser una importante herramienta terapéutica.

También en 2013, Dang *et al.* descubrieron en los pacientes con LPO que, tanto el microRNA-137 como la proteína p16 se encontraban metiladas, aunque en menor medida que en los pacientes con COCE. También descubrieron que esta metilación en los casos de LPO estaba asociada al epitelio, lo que podría indicar que el proceso de malignización inicial se origina en el epitelio y no en el tejido conectivo.

El microRNA-21, que ya hemos señalado anteriormente, también se encuentra sobreexpresado en la leucoplasia oral, en el LPO y en enfermedades inflamatorias de la piel como la psoriasis y el eccema atópico (Sonkoly *et al.*, 2007; Cervigne *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por Danielsson *et al.* (2012) se comprobó que altos niveles de microRNA-21 se correlacionaban con bajos niveles del mRNA de p53, una proteína que actúa como supresora de tumores. Previamente a este estudio se había observado que la sobreexpresión del microRNA-21 estaba causada por niveles altos de TGF- β (factor de crecimiento tumoral) en el cáncer (Qian *et al.*, 2009). Danielson *et al.* (2012)

también comprobaron que existían niveles altos de las proteínas Smad, unas proteínas que se encuentran en la ruta del TGF- β , lo que podría indicarnos que esta misma situación se produce en la ELO.

En este mismo estudio (Danielsson *et al.*, 2012) observaron que el microRNA-125b se encontraba subexpresado en el LPO, al igual que en el cáncer oral. Se cree que este microRNA puede ser uno de los responsables del componente inflamatorio del LPO ya que interferiría en la regulación del TNF- α , citoquina proinflamatoria involucrada en las enfermedades inflamatorias, provocando el aumento de sus niveles en el LPO (Danielsson *et al.*, 2012). El microRNA-203 también se encontraba sobreexpresado en este estudio (Danielsson *et al.*, 2012). A pesar de estos resultados concluyeron que no había un perfil de microRNAs específico asociado al LPO.

En 2012 Arão *et al.*, comprobaron que los microRNAs, microRNA-146a y microRNA-155, que influyen en la regulación de la respuesta inmune, incluyendo la ruta de señalización mediada por quinasas y factores de transcripción, se encontraban sobreexpresados en el LPO. Otros microRNAs desregulados encontrados en ELO son el microRNA-27b que se encuentra subexpresado y el microRNA-223 y el microRNA-143 que están sobreexpresados. En concreto, Zhang *et al.* (2012) detectaron niveles bajos del microRNA-27b en biopsias orales de pacientes con LPO al compararlas con biopsias de tejido sano, y propusieron que la subexpresión de este microRNA podría ser un factor de predisposición para sufrir esta enfermedad. Se sabe que este microRNA es capaz de regular a la metaloproteinasa de matriz 13 (MMP13) y la ruta del TGF- β e intervenir en la regulación de la diferenciación celular, en la respuesta inmune y en la inflamación crónica (Karbiener *et al.*, 2009; Rogler *et al.*, 2009; Akhtar *et al.*, 2010).

En cuanto a los estudios realizados en la leucoplasia oral podemos destacar el realizado por Yang *et al.* (2013) en el que se comparaba la expresión de microRNAs de biopsias y de saliva de pacientes con leucoplasia que proliferaban, que no proliferan y de controles. Pudieron comprobar que los perfiles de expresión entre tejidos y fluidos era el mismo pero en menor cantidad. También observaron que los microRNAs microRNA-708, miRNA-10b, microRNA-19a, microRNA-30e, microRNA-26a, y microRNA-660 se encontraban sobreexpresados mientras que el microRNA-99, el microRNA-15a, el microRNA-197, el microRNA-145 y el microRNA-150 se encontraban subexpresados. Estos mismos patrones han sido confirmados en otros cánceres

incluidos el COCE (Yang *et al.*, 2013). Sin embargo, vieron que el microRNA-181 b y el microRNA-181c se encontraban subexpresados en la leucoplasia que proliferaba y sobreexpresados en la que no proliferaba. Estos datos contrastan con los obtenidos por Cervigne *et al.* (2009), que encontraron un aumento gradual de la expresión del microRNA-181b durante el proceso de carcinogénesis oral.

En 2013 Yang *et al.* también constataron que había un conjunto de microRNAs que se encontraban sobreexpresados en la leucoplasia que no malignizaba comparándolos con la que malignizaba, entre los que estaban el microRNA-197, el microRNA-let-7, el microRNA-99a/b, el microRNA-126 y el microRNA-145. Estos microRNAs se sabe que actúan como supresores tumorales por lo que pueden tener un rol protector en este tipo de lesiones (Yang *et al.*, 2013).

En otro estudio, Xiao *et al.* (2012) analizaron la expresión de microRNAs en la leucoplasia oral y observaron que el microRNA-31* se encontraba sobreexpresado en el tejido de leucoplasias orales que malignizaron. Por ello, propusieron que la sobreexpresión de este microRNA tendría un papel relevante en la carcinogénesis oral. Se sabe que microRNA-31* interviene en funciones biológicas como la apoptosis y la migración celular, por lo que la modulación de la expresión de este microRNA podría ser suficiente para prevenir la formación de novo o la recurrencia de la leucoplasia oral (Xiao *et al.*, 2012).

En 2014, De Sarkar *et al.* comparan el perfil de expresión de 18 muestras de pacientes con cáncer gingival y su tejido adyacente sano, así como, muestras de pacientes con leucoplasia y liquen plano oral. Observaron que el microRNA-1293, el microRNA -31, el microRNA -31* y el microRNA -7 se encontraban significativamente sobreexpresados, mientras que el microRNA -206, el microRNA -204 y el microRNA -133a se encontraban significativamente subexpresados, en las muestras de cáncer gingival. El microRNA-31 se encontraba sobreexpresado tanto en el cáncer como en la leucoplasia por lo que estos autores (De Sarkar *et al.*, 2014) postulan que este microRNA podría ser un posible biomarcador para la detección de leucoplasias que se malignizan hacia un cáncer gingival. En cuanto a los resultados en el liquen plano oral no encontraron diferencias significativas en los perfiles de expresión de estos microRNAs.

Por último, Cervigne *et al.* (2009) mostraron la primera evidencia de la existencia de cambios en los perfiles de expresión de los microRNAs durante el proceso de

cancerización oral al encontrar un aumento de la expresión del microRNA-21, microRNA-181b y microRNA-345 que se correspondían con una transformación maligna de las lesiones desde la leucoplasia oral al COCE.

Tabla 4.3. Alteraciones de expresión de microRNAs en TOPM.

miRNA	Expresión	TOPM	Dianas	Referencias
miRNA-137	subexpresado	ELO	CDK6, E2F6, p16	Dang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-21	sobreexpresado	ELO y Leucoplasia	TGF- β , p53, p63, Smad	Danielsson <i>et al.</i> (2012); Cervigne <i>et al.</i> (2009); Davis <i>et al.</i> ,(2008)
miRNA-125b	subexpresado	ELO	TGF- β , p53, p63, Smad	Danielsson <i>et al.</i> (2012); Davis <i>et al.</i> (2009)
miRNA-27-b	subexpresado	ELO	MMP13, TGF- β	Zhang <i>et al.</i> (2012); Akhtar <i>et al.</i> (2010); Karbiener <i>et al.</i> (2009); Rogler <i>et al.</i> (2009)
miRNA-203	sobreexpresado	ELO	TGF- β , p53, p63, Smad	Danielsson <i>et al.</i> (2012); Qian <i>et al.</i> (2009)
miRNA-146a	sobreexpresado	ELO	STAT1, IFN- γ	Arao <i>et al.</i> (2012); Lu <i>et al.</i> (2005)
miRNA-155	sobreexpresado	ELO	c-Maf, IFN- γ , SOCS-1	Arao <i>et al.</i> (2012)
miRNA-99	subexpresado	Leucoplasia	SMARCA5	Chang <i>et al.</i> (2013); Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-15a	subexpresado	Leucoplasia	PKC- α	Yang <i>et al.</i> (2013); Maclellan <i>et al.</i> (2012); Bonci <i>et al.</i> (2008); Calin <i>et al.</i> (2005); Calin <i>et al.</i> (2002)
miRNA-150	subexpresado	Leucoplasia	desconocido	Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-let-7	subexpresado	Leucoplasia	C-MYC	Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-126	subexpresado	Leucoplasia	desconocido	Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-708	sobreexpresado	Leucoplasia	desconocido	Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-10b	sobreexpresado	Leucoplasia	desconocido	Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-19a	sobreexpresado	Leucoplasia	desconocido	Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-30e	sobreexpresado	Leucoplasia	desconocido	Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-26a	sobreexpresado	Leucoplasia	desconocido	Yang <i>et al.</i> , 2013
miRNA-660	sobreexpresado	Leucoplasia	desconocido	Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-31	sobreexpresado	Leucoplasia	P13K-AKT	De Sarkar <i>et al.</i> (2014)
miRNA-31*	sobreexpresado	Leucoplasia	FGF3	De Sarkar <i>et al.</i> (2014); Xiao <i>et al.</i> (2012)
miRNA-345	sobreexpresado	Leucoplasia	desconocido	Cervigne <i>et al.</i> (2009)
miRNA-181b/c	ambos	Leucoplasia	HOXA11	Yang <i>et al.</i> (2013); Cervigne <i>et al.</i> (2009)
miRNA-197	ambos	Leucoplasia	desconocido	Yang <i>et al.</i> (2013)
miRNA-145	ambos	Leucoplasia	C-MYC, CDK6	Yang <i>et al.</i> (2013)

4.3.7. Estrategias terapéuticas

Desde que se sabe que los microRNAs se encuentran desregulados en el cáncer, se cree que la normalización de su expresión podría ser un método potencial de tratamiento (Blenkiron *et al.*, 2007; Barbarotto *et al.*, 2008; Rebane & Akdis, 2013). En este sentido, han sido propuestos varios mecanismos terapéuticos.

4.3.7.1. Estrategias para la subexpresión de los microRNAs

Las reglas de Watson y Crick del emparejamiento de bases guían la unión de los microRNAs a sus dianas. Con el fin de eludir esta interacción, los oligonucleótidos anti-microRNA (AMO) se han generado para competir directamente con los microRNAs endógenos (Lanford *et al.*, 2010; Rebane & Akdis, 2013). Sin embargo, la capacidad de los AMOs para inactivar específicamente dianas endógenas ha demostrado ser bastante ineficaz (Budhu *et al.*, 2010). Así, se han generado varias modificaciones de AMOs para mejorar su eficacia y estabilidad, tales como añadir enlaces metilo y metoxietilo al extremo 5' de la molécula (Budhu *et al.*, 2010).

Li *et al.* (2009) introdujeron el oligonucleótido anti-microRNA-21 en líneas celulares de carcinoma de células escamosas de la lengua para subexpresar este microRNA y obtuvieron una reducción de la supervivencia celular y del crecimiento independiente de anclaje y un aumento de la apoptosis *in vitro*.

Otro método para reducir la interacción entre los microRNAs y sus dianas es el uso de microRNAs "sponges". Estas moléculas son microRNAs sintéticos que contienen múltiples sitios de unión para un microRNA endógeno y reprimen familias de microRNAs que comparten la misma secuencia semilla (Budhu *et al.*, 2010).

Estos métodos basados en oligonucleótidos provocan efectos secundarios y toxicidad celular no deseada debido a la capacidad de los microRNAs para regular cientos de genes (Kanasty *et al.*, 2012; Rebane & Akdis, 2013).

Una estrategia llamada microRNA-enmascaramiento es una alternativa diseñada para combatir este efecto. Este método utiliza una secuencia con complementariedad perfecta para el gen diana, de modo que se da una mayor afinidad que la que existe entre el gen diana y su microRNA endógeno. La dificultad de este método reside en que la elección del gen diana debe ser específica con el fin de reducir de forma efectiva la interacción (Budhu *et al.*, 2010).

4.3.7.2. Estrategias para la sobreexpresión de microRNAs

El aumentar la expresión de microRNAs con actividad supresora tumoral es una estrategia para restaurar aquellas funciones celulares que ayudan a la inhibición tumoral (Rebane & Akdis., 2013). Esto se puede lograr a través del uso de vectores de origen vírico o de liposomas (Croce, 2009). Aunque los métodos de introducción dirigida de vectores virales muestran una alta eficiencia de transferencia de genes estos no van directamente al tumor y los elementos virales residuales pueden tener efectos inmunogénicos no deseados (Kozaki *et al.*, 2008).

Los “*mimics*” también se han utilizado para aumentar la expresión de los microRNAs. Estas pequeñas moléculas de ADN de doble hebra, modificadas químicamente, imitan al microRNA maduro endógeno (Kozaki *et al.*, 2008). Este método, a día de hoy, ya se encuentra disponible en el mercado y al contrario que el basado en vectores víricos carece de toxicidad para la célula, por lo que serían unas posibles herramientas prometedoras para el tratamiento de tumores (Kozaki *et al.*, 2008; Bader *et al.*, 2012). La transfección del microRNA-137 o del microRNA-193a se ha realizado en líneas celulares de COCE y se ha comprobado que el crecimiento celular *in vitro* disminuye de forma conspicua (Kozaki *et al.*, 2008).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material y Métodos

Las muestras analizadas corresponden a pacientes diagnosticados de Enfermedad Liquenoide Oral, Carcinoma Oral de Células Escamosas e Hiperplasia Fibrosa en el Servicio Clínica Odontológica de la Universidad del País Vasco/EHU.

5.1.1. Grupos analizados

5.1.1.1. Grupo ELO

En este grupo se incluyeron a un total de 52 muestras de pacientes diagnosticados clinicopatológicamente de enfermedad liquenoide oral (ELO) y que en el momento de la toma no mostraban ninguna lesión sospechosa de cáncer ni de ninguna otra patología en la cavidad oral.

Para la fase de exploración (*screening*) se emplearon 16 biopsias de pacientes diagnosticados de ELO. Este grupo estaba constituido por 9 (56,3%) mujeres y 7 (43,8%) hombres con una edad media de 55,3 años y un rango de edad desde los 36 hasta los 75 años de edad.

Para la fase de validación se emplearon 36 biopsias de pacientes diagnosticados de ELO. Este grupo estaba constituido por 23 (63,9%) mujeres y 13 (36,1%) hombres con una edad media de 57,1 años y un rango que va desde los 34 hasta los 82 años de edad.

5.1.1.2. Grupo COCE

Este grupo lo han formado un total de 36 muestras de pacientes diagnosticados de carcinoma oral de células escamosas (COCE).

Para la fase de *screening* se emplearon 8 muestras biópsicas. Este grupo estaba constituido por 5 (62,5%) mujeres y 3 (37,5%) hombres con una edad media de 59,1 años y un rango de edad desde los 40 hasta los 76 años.

Para la fase de validación, se emplearon 28 biopsias. Este grupo estaba constituido por 18 (64,3%) mujeres y 10 (35,7%) hombres con una edad media de 63,5 años con un rango que va desde los 29 hasta los 89 años de edad.

5.1.1.3. Grupo Control

Se incluyeron 35 biopsias de pacientes adultos mayores de 18 años diagnosticados de Hiperplasia fibrosa irritativa sin inflamación y sin displasia. Para la fase de *screening* se incluyeron 8 biopsias. Este grupo estaba constituido por 4 (50%) mujeres y 4 (50%) hombres, con una edad media de 51,8 años con un mínimo de 35 años y un máximo de 75 años.

Para la fase de validación, se emplearon un total de 27 muestras biópsicas. Este grupo estaba constituido por 11 (40,7%) mujeres y 16 (59,3%) hombres con una edad media de 54,6 años con un rango desde 24 hasta 79 años.

5.1.2. Protocolo clinicopatológico

En todos los casos se siguió el protocolo de diagnóstico clínico de la Unidad de Medicina Bucal del Servicio Clínica Odontológica de la UPV/EHU. De un modo específico en los pacientes con enfermedad liquenoide oral se siguió un protocolo basado en el de la Sociedad Española de Medicina Oral (SEMO) para esta enfermedad.

5.1.3. Comité de Ética

Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por la Comisión de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco/EHU (CEISH/246/2014).

5.1.4. Material: Tipos de muestra

Para llevar a cabo este estudio, se emplearon biopsias orales fijadas en formaldehído y embebidas en parafina (FFEP).

5.2. Extracción y cuantificación de RNA

La extracción se realizó siguiendo el protocolo del *miRNeasy FFPE kit* (Qiagen, UK) en el que se introdujeron algunas modificaciones.

A. Preparación de las muestras

- Uso de Guantes estériles y limpiados con RNase zap™ o una solución equivalente.
- Limpieza del microtomo, de las cuchillas, de las pinzas y de las superficies donde se vaya a trabajar con RNase zap™.

- Cortar una sección de 5 μm de grosor y desecharla (para que no haya contaminaciones por el manejo de los bloques).
- Cortar 10 secciones de 10 μm de grosor por bloque e introducirlas, con ayuda de las pinzas, en tubos Eppendorf de 1,5 ml estériles y que hayan sido previamente etiquetados.
- Cambiar la cuchilla cada dos bloques y cambiar la superficie de la cuchilla para cada bloque (mitad de la superficie de la cuchilla para un bloque y la otra mitad para el otro bloque). Limpiar con RNase zap™ la superficie del microtomo para cada muestra.

A.1. Reactivos, equipamiento y soluciones utilizadas en la preparación de las muestras

- RNase zap™ (Sigma)
- Cuchillas Microtomo R35 type (Feather)
- Microtomo RM2125 (Leica)

B. Extracción de RNA

b.1) Preparación previa a la extracción

- Poner el bloque de calor a 56°C.
- Preparar el *buffer* RPE añadiendo 44ml de etanol absoluto (100%) y mezclar apropiadamente. (Este paso solo se realiza la primera vez que se abre el kit).
- Preparar *DNase I RNase free*
 - Echar 550 μl de *RNase free water* al vial de DNase I (con una punta estéril).
 - Mezclarlo invirtiendo el vial (no usar vortex).
 - Alicuotar en tubos de 0,6 ml y almacenar en el congelador a -20°C.
(En cada tubo alicuotar 50-60 μl).
- Dejar los buffers a temperatura ambiente.
- Poner la centrifuga a 20-25°C.
- Calentar el xileno a 40-50°C usando el baño de agua.

b.2) Desparafinización con xileno

1. Añadir 1 ml de xileno (40-50°C) a cada muestra y mezclar vigorosamente durante aproximadamente 10 segundos.

2. Centrifugar a velocidad máxima durante 5 minutos y descartar el sobrenadante sin dañar el pellet.
3. Añadir 1 ml de xileno (a temperatura ambiente) y mezclar vigorosamente durante aproximadamente 10 segundos.
4. Centrifugar a velocidad máxima durante 5 minutos y descartar el sobrenadante sin dañar el pellet.
5. Añadir 1 ml de etanol absoluto (100%) y mezclar vigorosamente durante aproximadamente 10 segundos.
6. Centrifugar a velocidad máxima durante 5 minutos y descartar el sobrenadante sin dañar el pellet.
7. Mantener las tapas de los tubos Eppendorf abiertas hasta que se evapore totalmente el etanol (se puede usar un concentrador).

b.3) Extracción RNA

1. Añadir 240 µl de *buffer* PKD y mezclar con el vortex.
2. Añadir 10 µl de proteinasa K y mezclar con la ayuda de una pipeta.
3. Incubar a 56°C hasta que el tejido este completamente digerido (normalmente dejar durante 2 horas en un bloque de calor con movimiento, cada 30 minutos revisar que tal va el proceso y agitar con un vortex durante 5 segundos).
4. Incubar a 80 °C durante 15 minutos (Si se está usando solo un bloque de calor, dejar las muestras a temperatura ambiente hasta que el bloque alcance esta temperatura).
5. Incubar 3 minutos en hielo.
6. Centrifugar a 20.000 g durante 15 minutos (13.500 rpm).
7. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga teniendo extremada precaución de no alterar el pellet.
8. Añadir:
 - 1/10 volumen *DNA Booster buffer* (aproximadamente 25 µl).
 - 10 µl DNaseI (preparada anteriormente).
 - Mezclar invirtiendo el tubo (no usar vortex).
9. Centrifugar brevemente para recolectar el líquido residual de las paredes del tubo.

10. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
11. Añadir 500 µl de *buffer* RBC y mezclarlo bien.
12. Transferir el contenido a un nuevo tubo (debe ser >3 ml y estéril).
13. Añadir 1750 µl de etanol (100%) a la muestra y mezclar bien con una pipeta.
14. Transferir 700 µl de la muestra, incluyendo cualquier precipitado que se haya formado, a la columna de centrifugación *RNeasy MinElute spin column*, que se encuentra dentro de un tubo colector de 2 ml. Cerrar bien la tapa.
15. Centrifugar durante 15 segundos a una velocidad ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm).
16. Desechar el sobrenadante.
17. Repetir los pasos 14-16 hasta que toda la muestra haya pasado por la columna de centrifugación *RNeasy MinElute spin column*.
18. Añadir 500 µl de *buffer* RPE a la columna de centrifugación *RNeasy MinElute spin column* (reutilizar el tubo colector).
19. Centrifugar durante 15 segundos a una velocidad ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm).
20. Desechar el sobrenadante.
21. Añadir 500 µl de *buffer* RPE a la columna de centrifugación *RNeasy MinElute spin column* y cerrar bien la tapa.
22. Centrifugar durante 2 minutos a una velocidad ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm).
23. Desechar el tubo colector con el sobrenadante.
24. Poner la columna de centrifugación *RNeasy MinElute spin column* en un nuevo tubo colector de 2 ml y dejar abierta la tapa de la columna (así la membrana de la columna se secará bien).
25. Centrifugar a velocidad máxima durante 5 minutos.
26. Desechar el tubo colector con el sobrenadante.
27. Poner la columna de centrifugación *RNeasy MinElute spin column* en un tubo de 1,5 ml.
28. Añadir 15 µl de *RNAse free water* directamente a la membrana de la columna de centrifugación *RNeasy MinElute spin column* (El agua aproximadamente a 50°C).
29. Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
30. Repetir los pasos 28 y 29.
31. Desechar la columna y almacenar apropiadamente el RNA (-80°C).

C. Reactivos, equipamiento y soluciones utilizadas en la extracción de RNA

C.1) Desparafinización

- Xileno; p.m.=106,17 (Proquinorte, SA)
- Etanol absoluto; p.m.= 46,07 (Merck NC: 100983.1000)
- Termobloque Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Termobloque (VWR)
- Microcentrífuga Biofuge Fresco (Heraeus, SA)
- Agitador vortex (VWR international)
- Cabina móvil de filtración vertical (Indelab)
- RNase zap™ (Sigma)

C.2) Extracción RNA

- Termobloque Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Termobloque (VWR)
- Microcentrífuga Biofuge Fresco (Heraeus SA)
- Microcentrífuga Galaxy mini (VWR)
- Agitador vortex (VWR international)
- Cabina móvil de filtración vertical (Indelab)
- RNase zap™ (Sigma)
- *miRNeasy FFPE Kit (50)* (Qiagen)
 - *RNeasy® MinElute® Spin Columns* (rosas) (cada una en un tubo colector de 2 ml) (Qiagen)
 - Tubos colectores (1,5 ml) (Qiagen)
 - Tubos colectores (2 ml) (Qiagen)
 - *Buffer RBC* (Qiagen)
 - *Buffer PKD* (Qiagen)
 - *Proteinasa K* (Qiagen)
 - *RNase-Free DNase I* (liofilizada) (Qiagen)
 - *RNase-Free Water* (para uso con *RNase-Free DNase I*) (Qiagen)
 - *DNase Booster Buffer* (Qiagen)
 - *Buffer RPE* (concentrado) (Qiagen)
 - *RNase-Free Water* (Qiagen)

D. Cuantificación del RNA

Después de la extracción de RNA se mide la concentración de las muestras (ng/ μ l) y el grado de pureza mediante el uso del Nanodrop™.

El espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 cuantifica muestras de ácidos nucleicos de 1 μ l de volumen con una alta precisión y reproducibilidad. El espectro oscila desde los 220 hasta los 750 nm y utiliza una tecnología de retención de la muestra que emplea la tensión superficial únicamente para mantener la muestra en su lugar. Esto elimina la necesidad de emplear cubetas y otros dispositivos de contención de la muestra.

Para la cuantificación del RNA se emplea el ratio 260/280 que es la relación de la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. Esta relación de absorbancia se utiliza para evaluar la pureza del RNA. Una relación de \sim 1,8 es generalmente aceptada como “pura” para el RNA.

Otro ratio que se emplea para ver el estado de purificación de la muestra es el ratio 260/230. El valor de este ratio para las muestras “puras” es mayor que el valor del ratio 260/280 y está comprendido entre 1,8 y 2,2. Si este valor es ligeramente más bajo, esto nos indica que existen sales o posibles componentes que se han purificado junto con el RNA.

D.1. Método

Para comenzar la cuantificación primeramente hay que realizar la medición del “blanco”. Se llama “blanco” a la solución donde se ha llevado a cabo la resuspensión del RNA tras su extracción, y que no presenta ningún tipo de ácido nucleico. Generalmente el “blanco” suele ser agua milliQ.

- 1.- Tras realizar la medición del blanco, se deposita 1 μ l de la muestra en el lector sin hacer burbujas ya que esto impediría la correcta cuantificación.
- 2.- Se cierra el lector cuidadosamente y se procede a la cuantificación.
- 3.- Se limpia con un paño seco y se vuelven a repetir los pasos 1 y 2 en la siguiente muestra.

5.3. Análisis de expresión de microRNAs

La definición de los perfiles de expresión alterados de microRNAs se realizó en el servicio de genómica de la UPV/EHU, Sgiker mediante el uso *TaqMan*® *Low Density*

Array (Applied Biosystems®). Este array está diseñado para detectar y cuantificar aproximadamente unos 768 miRNAs en el ser humano.

Con esta técnica se puede determinar el perfil de expresión de cientos de microRNAs simultáneamente en un proceso dividido en dos pasos. Durante el primer paso, el RNA total se retrotranscribe a cDNA. Y en un segundo paso se da la PCR a tiempo real usando los ensayos TaqMan®, actualmente altamente optimizados y que proporcionan una gran sensibilidad.

5.3.1. Método

En el primer paso se utiliza el kit TaqMan® MicroRNA RT y los *primers* Megaplex™ RT para poder sintetizar el cDNA de cadena sencilla a partir de las muestras de RNA total. La reacción de transcripción inversa (RT) tiene un volumen final de 7,5 µl y contiene 3 µl (150 ng) RNA total y 4,5 µl de mix de reacción RT.

A. Preparación mix de reacción RT

1. Poner en hielo los siguientes reactivos:

- Megaplex RT *primers*
- Componentes Kit TaqMan® RT
- MgCl₂ (suministrado con el Megaplex™ RT *primers*)

2. Hacer un mix con los siguiente reactivos en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Tabla 5.1. Componentes para el mix de retro-transcripción.

Componentes RT Mix	Volumen por muestra (µl)
Megaplex™ RT <i>primers</i> (10X)	0,8
<i>dNTPs with dTTP</i> (100 mM)	0,2
MultiScribe™ Reverse Transcriptasa (50 U/µl)	1,5
10X RT <i>Buffer</i>	0,8
MgCl ₂ (25mM)	0,9
<i>Rnase inhibitor</i> (20 U/µl)	0,1
<i>Nuclease - free water</i>	0,2

3. Invertir el tubo varias veces para mezclarlo bien y centrifugar brevemente los tubos.
4. En una placa de reacción óptica de 96 pocillos MicroAmp® o en un *strip* de 8 tubos de MicroAmp® pipetear 4,5 µl de la mezcla de reacción RT en cada pocillo o tubo respectivamente.
5. Añadir 3 µl de RNA total en cada pocillo o tubo.
6. Sellar la placa o los tubos con *MicroAmp® Clear Adhesive Film* o *MicroAmp® Optical Strip Caps* respectivamente. Después invertir la placa o los tubos varias veces para mezclar bien y centrifugar brevemente.
7. Incubar 5 minutos en hielo.

B. Reacción de RT

Configurar las siguientes condiciones para correr las muestras.

- Velocidad o modo de rampa: 9700 usando *Std or Max ramp Speedy*. 7900HT usando *Std ramp speed*.
- Volumen de reacción (µl): 7,5
- Condiciones del termociclador (Tabla 5.2)
- Cargar y ejecutar la placa.

Tabla 5.2. Condiciones del termociclador

Paso	Temperatura	Tiempo
40 ciclos	16°C	2 min
	42°C	1 min
	50°C	1 seg
1 ciclo	85°C	5 min
1 ciclo	4°C	∞

5.3.2. Reactivos, equipamiento y soluciones utilizadas

A. Megaplex™ RT *primers*

Es un set de 2 *pools* ya predefinidos (*pool* A y B). Cada *pool* contiene unos 380 *primers* de retrotranscripción para poder realizar de forma simultanea la síntesis de cDNA para microRNAs maduros.

Tabla 5.3. Contenido del Megaplex™ RT *primers*.

Megaplex™ RT <i>primers</i>	Contenido
Megaplex™ RT <i>Human pool</i> A	50 μ l of 10X <i>primers</i>
Megaplex™ RT <i>Human pool</i> B	1000 μ l 25 mM MgCl ₂

B. Ejecutar la reacción de amplificación

Este paso es opcional y su objetivo es la preamplificación del cDNA específico de cada gen para poder incrementar su cantidad y realizar el análisis de expresión de cada microRNA de forma efectiva y precisa.

C. Método

La reacción de preamplificación tiene un volumen final de 25 μ l y contiene 2,5 μ l de producto RT y 22,5 μ l de mezcla de reacción PreAmp.

Preparación del Preamp Reaction Mix

1. Descongelar los Megaplex™ PreAmp *primers* en hielo y mezclar invirtiéndolos seis veces. Centrifugar brevemente.
2. Mezclar el TaqMan® PreAmp Master Mix (2 \times) agitando la botella.
3. Combinar lo siguiente en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Tabla 5.4. Componentes del PreAmp Reaction mix.

Componentes del mix de reacción PreAmp	Volumen por muestra (μ l)
TaqMan® PreAmp <i>Master Mix</i> (2X)	12,5
Megaplex™ PreAmp <i>primers</i> (10X)	2,5
<i>Nuclease - free water</i>	7,5

4. Invertir los tubos varias veces para mezclar bien el contenido y centrifugar brevemente.
5. En una placa de reacción óptica de 96 pocillos MicroAmp® o en un *strip* de 8 tubos de MicroAmp®, pipetear 2,5 µl del producto RT en cada pocillo o tubo respectivamente.
6. Añadir 22,5 µl del PreAmp *reaction mix* en cada pocillo o tubo.
7. Sellar la placa o los tubos con *MicroAmp® Clear Adhesive Film* o *MicroAmp® Optical Strip Caps* respectivamente. Después invertir la placa o los tubos seis veces para mezclar bien y centrifugar brevemente.
8. Incubar 5 minutos en hielo.

Realizar la preamplificación

Configurar las siguientes condiciones para correr las muestras.

- Velocidad o modo de rampa: 9700 usando *Std ramp Speed*.
- Volumen de reacción (µl): 25.
- Condiciones del termociclador:

Tabla 5.5. Condiciones termociclador

Paso	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95°C	10 min
1 ciclo	55°C	2 min
	72°C	2 min
12 ciclo	95°C	15 seg
	60°C	4 min
1 ciclo	99,9°C	10 min
1 ciclo	4°C	∞

Diluir la reacción

1. Quitar la placa o los tubos del termociclador.
2. Centrifugar brevemente.
3. Añadir 75 µl de 0.1× TE pH 8,0 a cada pocillo o tubo.
4. Sellar la placa o los tubos, y luego invertir varias veces para mezclar bien el contenido y centrifugar brevemente.

D. Reactivos, equipamiento y soluciones utilizadas

Megaplex™ PreAmp *primers*

Set de 2 *pools* (A y B) con *primers forward* y *reverse* específicos de cada gen destinado para el uso de cantidades muy pequeñas de material de partida.

5.3.3. Realizar la reacción de PCR a tiempo real

A. PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real es una variante de la PCR convencional utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN.

La PCR a tiempo real permite que el producto a amplificar sea detectado según progresa la reacción. Esto es posible incluyendo en la reacción una molécula que emita fluorescencia, de modo que cuanta más cantidad de ADN se encuentre, mayor es la señal de fluorescencia, ya que el incremento de la fluorescencia es proporcional al incremento de la cantidad de copias de ADN amplificadas en la reacción.

Los sistemas en tiempo real para PCR mejoraron gracias a la introducción de sondas con marcajes de fluorocromos que utilizan la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de DNA. La existencia de estas sondas fluorogénicas permitió desarrollar un método en tiempo real para detectar únicamente productos de amplificación específicos.

Los reactivos TaqMan® utilizan una sonda fluorogénica para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la PCR. El método se basa en la construcción de una sonda oligonucleótida con un fluoróforo unido al extremo 5' y un *quencher* (apantallador) en el extremo 3'. Mientras la sonda está intacta, la proximidad del *quencher* reduce enormemente la fluorescencia que emite el fluoróforo por medio de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET; resonancia de Förster, Förster, V. T. 1948) a través del espacio. Si la diana está presente, la polimerasa se topa con la sonda y la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del *quencher* del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia. La fluorescencia está relacionada con la cantidad de amplicón producido. En cada ciclo, se separan más moléculas del fluoróforo de sus respectivas sondas, lo que produce un aumento de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la

cantidad de amplicón producido. Cuanto más alto sea el número inicial de copias de la diana de ácido nucleico, antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia.

Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción de retro-transcripción, puede determinarse la cantidad de miRNA de una muestra mediante una cuantificación relativa. Dicha cuantificación se denomina relativa ya que se compara entre diferentes muestras la cantidad relativa o relación del microRNA de un gen específico respecto a la cantidad de microRNA de un gen constitutivo (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico, o normalizar respecto a la diferente concentración de RNA total de las muestras, ya que si la cantidad de control endógeno varía es debido a cambios en la cantidad de RNA total empleada en la síntesis de cDNA, no a cambios en su expresión. No existe ningún gen cuya expresión no varíe en ninguna de las condiciones, por lo que se debe de valorar cuál es el mejor control endógeno.

En el caso del *TLDA card*, cada array, utilizando esta técnica se puede cuantificar el nivel de expresión de hasta 768 microRNAs y controles. Esto conlleva cargar el producto, el cDNA (en nuestro caso preamplificado) en el array para la amplificación y análisis por PCR a tiempo real.

B. Método

Preparación de los productos necesarios para ejecutar la qPCR

1. Descongelar el producto PreAmp diluido en hielo. Mezclar invirtiéndolo varias veces y centrifugar brevemente.
2. Mezclar el *TaqMan® Universal PCR Master Mix* agitando la botella.
3. Combinar lo siguiente en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Tabla 5.6. Componentes para realizar la PCR cuantitativa a tiempo real.

Componentes	Volumen para un array (μ l)
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG,2X	250
<i>Diluted PreAmp product</i>	9
<i>Nuclease-free water</i>	441

4. Invertir los tubos varias veces para mezclar bien el contenido y centrifugarlos brevemente.

Cargar y ejecutar el microRNA Array

1. Dispensar 100 μ l de la mezcla de reacción PCR en cada pocillo del TaqMan® microRNA Array.
2. Centrifugar y sellar el Array.
3. Importar el archivo de instalación SDS (SDS.txt) situado en el CD de Información.
4. Cargar y ejecutar el Array usando como condiciones para el termociclador las que vienen por defecto, *384 well TaqMan® Low Density Array*.

C. Reactivos, equipamiento y soluciones utilizada

- 7900HT Fast Real time PCR System (Applied Biosystem®)
- TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems®)
- TaqMan® MicroRNA Arrays (Applied Biosystems®):
Set de 2 tarjetas (*cards*) de 384 pocillos microfluidos (*Array A y B*) que contienen en su interior los *primers* y ensayos TaqMan® deshidratados.

5.4. qRT-PCR ensayos TaqMan® específicos

Una vez obtenidos los resultados del *TLDA card* se quiso validar el perfil de expresión de aquellos microRNAs que se encuentran alterados en la ELO y el COCE.

La metodología fue exactamente idéntica a la utilizada para los *TLDA cards*, ya que estos utilizan la misma tecnología de sondas de hibridación de los ensayos TaqMan® como hemos explicado anteriormente.

5.4.1. Método

A. RT-PCR

Con las muestras extraídas, cuantificadas y normalizadas se procede a la realización de la reacción de retrotranscripción (RT) para pasar el RNA a cDNA y así poder realizar la qRT-PCR.

Para ello se han realizado las siguientes tareas:

1. Deshidratar los RT *primers*.
2. Descongelar las muestras y dar un pequeño pulso.
3. Añadir 11 μ l de cada muestra a cada pocillo con los RT *primers* deshidratados. Mezclarlo rápidamente con el vortex, centrifugarlo brevemente e incubar 5 minutos.
4. Hacer el mix de conversión siguiendo las condiciones especificadas en la siguiente tabla.

Tabla 5.7. Mix de conversión para la RT-PCR.

Reactivos	1X (μ l)
dNTPs	0,15
Enzima RT	1,2
<i>Buffer</i>	1,5
Inhibidor RNase	0,19
Mg	0,2
H ₂ O	0,76

5. Añadir 4 μ l del mix de conversión a cada muestra.
6. Incubar a las siguientes condiciones (Tabla 5.8). Una vez pasado el tiempo de incubación obtendremos el cDNA.

Tabla 5.8. Condiciones de la incubación.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
16	30
42	30
85	5
4	∞

7. Añadir 85 μ l de H₂O al cDNA convertido para diluirlo.

Reactivos, equipamiento y soluciones utilizadas para la reacción de RT-PCR

- TaqMan® MicroRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems®).
- Placa de 96 pocillos (Bio-Rad NC: 2239441)
- Microseal®B Seal MSB1001 (Bio-Rad)
- Termociclador iCycler (Bio-Rad)
- Centrifuge 5430 (Eppendorf)
- Agitador vortex (VWR international)

B. Análisis de la expresión de microRNAs mediante qRT-PCR

En cada pocillo de la placa de 96 hemos añadido previamente 3 μ l de cDNA por triplicado. El siguiente paso es añadir con la pipeta multicanal a cada pocillo 12 μ l de *mastermix* con los volúmenes indicados en la tabla 5.9, sellar la placa con un film óptico y dar un breve pulso en la centrifuga de placas para que no queden burbujas y no haya un error de lectura. Por último, meter la placa en el termociclador con las siguientes condiciones (Tabla 5.10)

Tabla 5.9. Mastermix para ensayos TaqMan®.

Reactivos	1X (μ l)
H ₂ O	3,75
Mix	7,5
<i>primers</i>	0,75
cDNA	3

Tabla 5.10. Condiciones del termociclador para el análisis de la expresión de microRNAs mediante qRT-PCR.

Paso	Opcional	Activación	PCR	
	AmpErase	enzimática	40 ciclos	
	1 ciclo	1 ciclo		
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min

Reactivos, equipamiento y soluciones utilizadas para la reacción de RT-PCR

- TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems®)
- Placa de 96 pocillos (Bio-Rad NC: 2239441)
- Microseal®B Seal MSB1001 (Bio-Rad)
- Termociclador iCycler (Bio-Rad)
- Centrifuge 5430 (Eppendorf)

Reactivos, equipamiento y soluciones utilizadas en la PCR a tiempo real

- TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems®)
- TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems®)
- Placa de 96 pocillos (Bio-Rad NC: 2239441)
- Microseal®B Seal MSB1001 (Bio-Rad)
- Termociclador iCycler (Bio-Rad)
- Centrifuge 5430 (Eppendorf)

5.5. Análisis estadístico

5.5.1. Análisis estadístico de los *TLDA cards*, validación biológica y Ontología de genes

El análisis previo se realizó utilizando dos paquetes de software distintos, *Sequence Detection System* (SDS) y *Expression Suit* (Life Technologies®, USA), como ha sido descrito anteriormente por Bediaga *et al.* (2013). Los datos válidos fueron importados

al paquete HTqPCR (Dvinge & Bertone, 2009) para la evaluar la calidad, la normalidad y la significación estadística de los valores Ct obtenidos entre los diferentes grupos analizados. Los datos se normalizaron utilizando la media geométrica de la expresión de todo el conjunto de microRNA. Los perfiles de expresión de los distintos microRNAs fueron validados empíricamente mediante Bayes/moderated t-tests y todos los valores p-fueron ajustados por el procedimiento Benjamin-Hochberg.

Se seleccionaron aquellos microRNAs con ≥ 2 veces la diferencia (*Fold Change* (FC) > 2) entre las muestras de COCE y normal, y entre las muestras de ELO y normal con unos valores p ajustados <0,05. Los análisis estadísticos para los datos del set de validación se realizaron con el paquete estadístico para Windows SPSS® 20,0 (SPSS®, Chicago, IL, EE.UU.). Para confirmar la distribución normal de nuestras muestras se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra. Para evaluar las diferencias en el nivel de expresión entre los grupos se utilizó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. Los valores de p obtenidos de dos colas se consideraron estadísticamente significativos si $p < 0,05$.

Para predecir los RNA mensajero diana de cada microRNA se utilizo la base de datos mirWalk (<http://mirwalk.uni-hd.de/>) mediante dos algoritmos-mirWalk (Dweep et al., 2011), TargetScan (Friedman *et al.*, 2009) –y con una longitud mínima de la secuencia semilla de 7 nt y una $p = 0,05$.

El análisis del Gene Ontology se realizó con el paquete BioconductortopGO, utilizando el test de Fisher en conjunto con el algoritmo "clásico", como ha sido descrito previamente (Alexa & Rahnenfuhrer, 2010).

5.6. Búsqueda bibliográfica

Se han realizado distintas búsquedas bibliográficas sobre el tema objeto de este estudio en la base bibliográfica PubMed y en las bases de revistas electrónicas www.aacrjournals.org y www.freemedicaljournals.com utilizando las palabras claves: Enfermedad liquenoide oral, Trastorno oral potencialmente maligno, precáncer oral, lesiones premalignas orales, carcinoma oral de células escamosas, carcinoma de

células escamosas de cabeza y cuello, epigenética, microRNA, *TLDA card*, *Gene ontology*.

Fruto de esta búsqueda se obtuvieron más de 450 citas bibliográficas que fueron examinadas, escogiéndose para su análisis pormenorizado las que fueron consideradas más acordes con nuestro proyecto.

6. Resultados

6.1. Características clinicopatológicas de las muestras

En este estudio se han analizado 123 muestras orales, de las cuales 52 (42,3%) correspondían a pacientes diagnosticados de enfermedad liquenoide oral (grupo ELO), 36 (29,3%) a pacientes diagnosticados de un carcinoma oral de células escamosas (grupo COCE) y las 35 (28,4%) restantes a pacientes diagnosticados de hiperplasia fibrosa irritativa sin inflamación y sin displasia (grupo Control).

Las características generales de los diferentes grupos aparecen recogidas en las Tablas 6.1, 6.2 y 6.3.

En el grupo ELO se observa un mayor predominio del género femenino frente al masculino con un ratio de 1,6:1. Este grupo presenta una edad media de 56,2 años, con un rango que va desde los 34 hasta los 82 años de edad. En el caso del grupo COCE también existe un mayor predominio del género femenino, con un ratio de 1,7:1, una edad media en el momento del diagnóstico de 61,3 años y un rango que va desde los 29 hasta los 89 años de edad. Por último, en el grupo Control se observa una relación hombre: mujer de 1,3:1, con una edad media de 53,2 años y un rango que va desde los 24 hasta los 79 años de edad.

Tabla 6.1. Datos generales de los pacientes del grupo ELO, grupo COCE y grupo Control.

		Total muestras analizadas (n =123)		
		ELO (n=52)	COCE (n=36)	Control (n=35)
Género n (%)	Mujer	32 (61)	23 (63,8)	15 (42,8)
	Hombre	20 (39)	13 (36,2)	20 (57,2)
Edad (años)	Media	56,2	61,3	53,2
	(min-max)	(34-82)	(29-89)	(24-79)

Tabla 6.2. Características generales de los pacientes incluidos en la fase de exploración (*Screening*).

		Fase de exploración (<i>Screening</i>) (n=32)		
		ELO (n=16)	COCE (n=8)	Control (n=8)
Género n (%)	Mujer	9 (56,25)	5 (62,5)	4 (50)
	Hombre	7 (43,75)	3 (37,5)	4 (50)
Edad (años)	Media	55,25	59,1	51,75
	(min-max)	(36-75)	(40-76)	(35-75)

Tabla 6.3. Características generales de los pacientes incluidos en la fase de validación.

		Fase de validación (n = 91)		
		ELO (n=36)	COCE (n=28)	Control (n=27)
Género n (%)	Mujer	23 (63,9)	18 (64,3)	11 (40,7)
	Hombre	13 (36,1)	10 (35,7)	16 (59,3)
Edad (años)	Media	57,1	63,5	54,6
	(min-max)	(34-82)	(29-89)	(24-79)

En relación a los hábitos carcinogénicos en el grupo ELO, tanto en los casos analizados en la fase de *screening* como en los de la fase de validación se reconoce una mayor proporción de no fumadores y de no consumidores de alcohol (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Hábitos carcinogénicos de los pacientes del grupo ELO.

Hábito		Screening (n=16)	Validación (n=36)
Consumo tabaco n (%)	Si	5 (31,3)	10 (27,8)
	No	11 (68,7)	26 (72,2)
Consumo alcohol n (%)	Si	5 (31,3)	1(2,8)
	No	11 (68,7)	35 (97,2)

En relación a la enfermedad liquenoide oral (Tabla 6.5) el tipo de lesión mayoritaria en el momento de la toma bióptica fue la atrófica tanto en los pacientes de la fase de *screening* con un 43,8% (7) como en los de la fase de validación 41,7% (15).

La lesión en placa también tiene una presencia notoria en estos pacientes, presentándose en el momento de la toma en el 25% (4) de los pacientes de los de la fase de *screening* y en el 38,9 % (14) en los de fase de validación.

La gingivitis descamativa crónica está presente en el 25% (4) de los pacientes de la fase de *screening* y en el 30,6% (11) de los casos de la fase de validación.

Por último, la presencia de lesiones de tipo erosivo-ulcerativo en los pacientes de la fase *screening* era del 12,8% (2) y en los de la fase de validación del 27,8% (10).

En cuanto al subgrupo clínico en la fase de *screening* el 87,5% (14) de las muestras correspondían a pacientes diagnosticados de LPO y el 12,5% (2) de LLO, mientras que en la fase de validación el 63,9% (23) correspondían a pacientes diagnosticados de LPO y 36,1 (13) restantes diagnosticados de LLO.

En el caso de los subgrupos histopatológicos, en la fase de *screening* había un 50% (8) de pacientes diagnosticados tanto de ELO típico como de ELO compatible, mientras que en la fase de validación había un 52,8% (19) de pacientes diagnosticados de ELO compatible y un 47,2% (17) diagnosticados de ELO típico.

Durante el seguimiento realizado a los pacientes del grupo ELO, 1 caso sufrió transformación maligna. Se trataba de una mujer de 55 años diagnosticada de clínicamente como LPO e histológicamente como ELO compatible, que presentaba en el momento de la toma de la muestra lesiones de tipo reticular y en placa, no era consumidora de alcohol pero si de tabaco.

Tabla 6.5. Aspectos clínicos de los pacientes con ELO en el momento de la biopsia.

Aspecto clínico		Screening (n=16)	Validación (n=36)
Atrófica n (%)	Si	7 (43,8)	15 (41,7)
	No	9 (56,2)	21 (58,3)
Erosivo/Ulcerativa n (%)	Si	2 (12,5)	10 (27,8)
	No	14 (87,5)	26 (72,2)
Placa n (%)	Si	4 (25)	14 (38,9)
	No	12 (75)	22 (61,1)
Gingivitis Descamativa Crónica n (%)	Si	4 (25)	11 (30,6)
	No	12 (75)	24 (66,7)
Subgrupo clínico n (%)	LPO	14 (87,5)	23 (63,9)
	LLO	2 (12,5)	13 (36,1)
Subgrupo histopatológicas n (%)	ELO típico	8 (50)	17 (47,2)
	ELO compatible	8 (50)	19 (52,8)

6.2. Identificación de los perfiles de expresión de los microRNAs

6.2.1. Verificación de la calidad y análisis de las muestras

Los datos en bruto para el análisis se extrajeron mediante el Sistema de Detección de Secuencia (SDS) v2.3 *Software* (Applied Biosystems®).

Cada curva de amplificación fue verificada y los umbrales óptimos para cada ensayo de microRNA se definieron utilizando el RQ Manager *Software* (Applied Biosystems®).

Los valores Ct > 35 se consideraron indeterminados, mientras que los Ct < 10 fueron definidos como poco fiables.

Los datos válidos se importaron al paquete HTqPCR para su visualización, evaluación de la calidad, normalización y pruebas de significación estadística de los valores Ct.

6.2.2. Identificación de los perfiles de expresión aberrantes en los grupos ELO y COCE

En la fase de *screening* evaluamos el perfil de expresión de 768 microRNAs maduros a nivel de todo el genoma en un total de 32 muestras. De ellos, 473 microRNAs fueron clasificados como alterados en el grupo ELO y 444 en el grupo COCE. Los análisis de aproximación visual basados en agrupaciones no supervisadas de estos microRNAs

dieron como resultado un perfil de expresión diferente entre los 3 grupos de pacientes (ELO, COCE y Control) (Figura 6.1).

Con un nivel de significación de $p < 0,05$ (ajustada para test múltiples) y un $FC \leq 0,5$ o ≥ 2 de corte, encontramos 20 microRNAs desregulados en el grupo ELO, 13 sobreexpresados y 7 subexpresados, mientras que se encontraron 106 microRNAs desregulados en el grupo COCE, 41 sobreexpresados y 65 subexpresados (Figura 6.2 y 6.3). Además, observamos que 14 de los microRNAs desregulados en el grupo ELO son compartidos con el grupo COCE, mientras que los 6/20 restantes eran exclusivos de este trastorno (Figura 6.4).

Se realizó la validación biológica de los 6 microRNAs exclusivos del grupo ELO y además, de los 14 microRNAs desregulados en ambos grupos (ELO y COCE), se seleccionaron 8 microRNAs cuya diferencia en los niveles de expresión en relación con el grupo Control era alta ($|FC| > 2$).

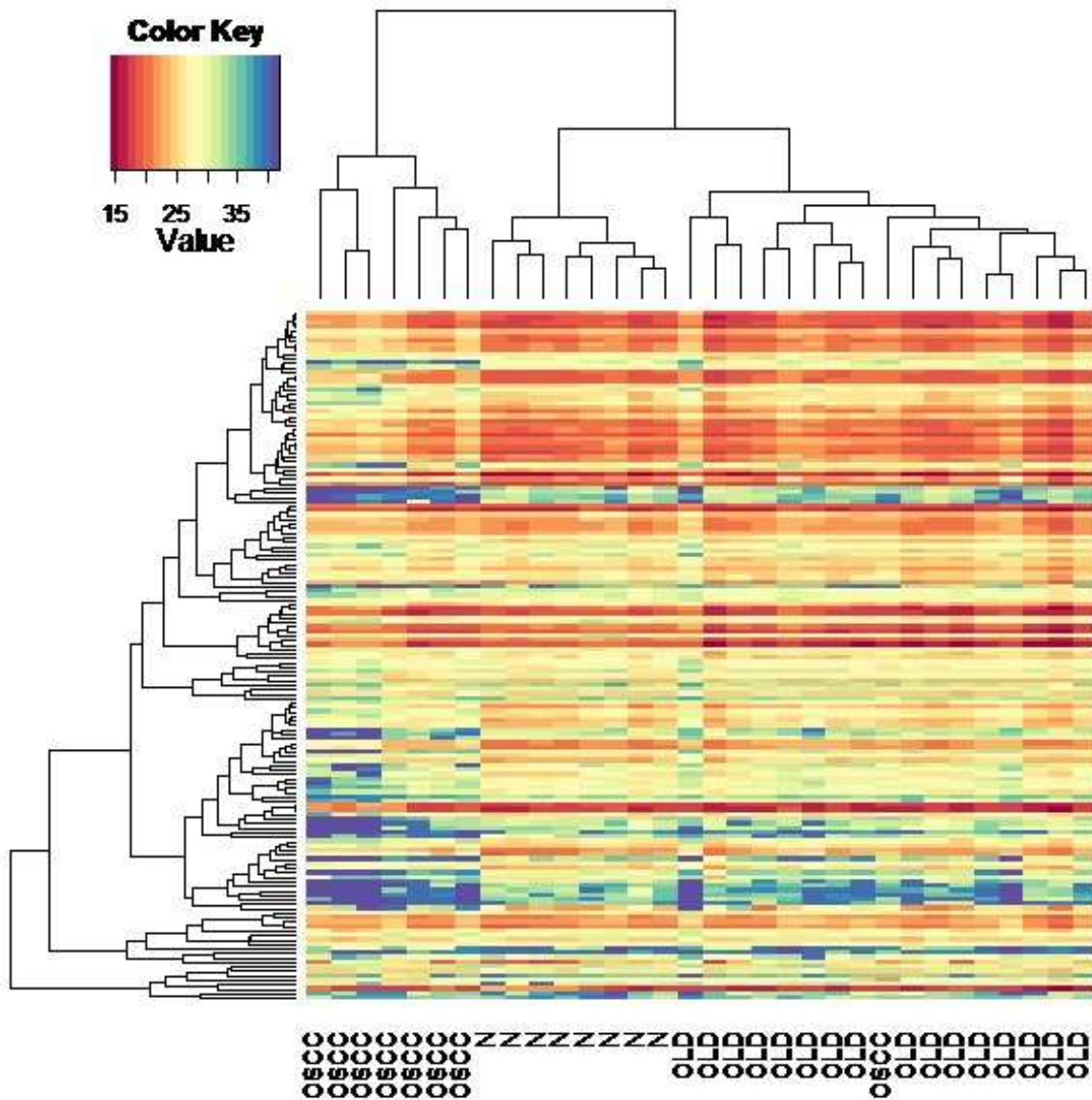


Figura 6.1. Análisis de agrupación jerárquica no supervisado en el que se han utilizado los microRNAs diferencialmente expresados y en el que se separan los tres grupos, ELO, COCE y Control.

El *heatmap* (distancia euclidiana) representa los valores de Delta Ct. Los colores representados en el heatmap corresponden al grado de expresión de cada microRNA como bien se indica en la leyenda: rojo (subexpresado) y azul (sobrexpresado).

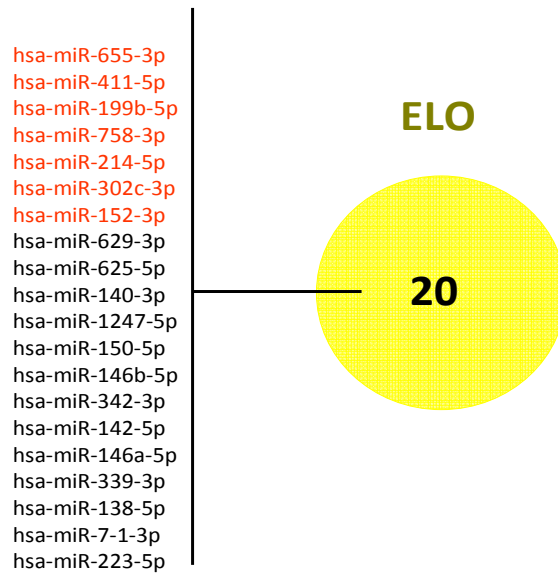


Figura 6.2. Diagrama que muestra los 20 microRNAs desregulados en el grupo ELO en relación con el grupo Control. . En rojo los microRNAs subexpresados y en negro los sobreexpresados.

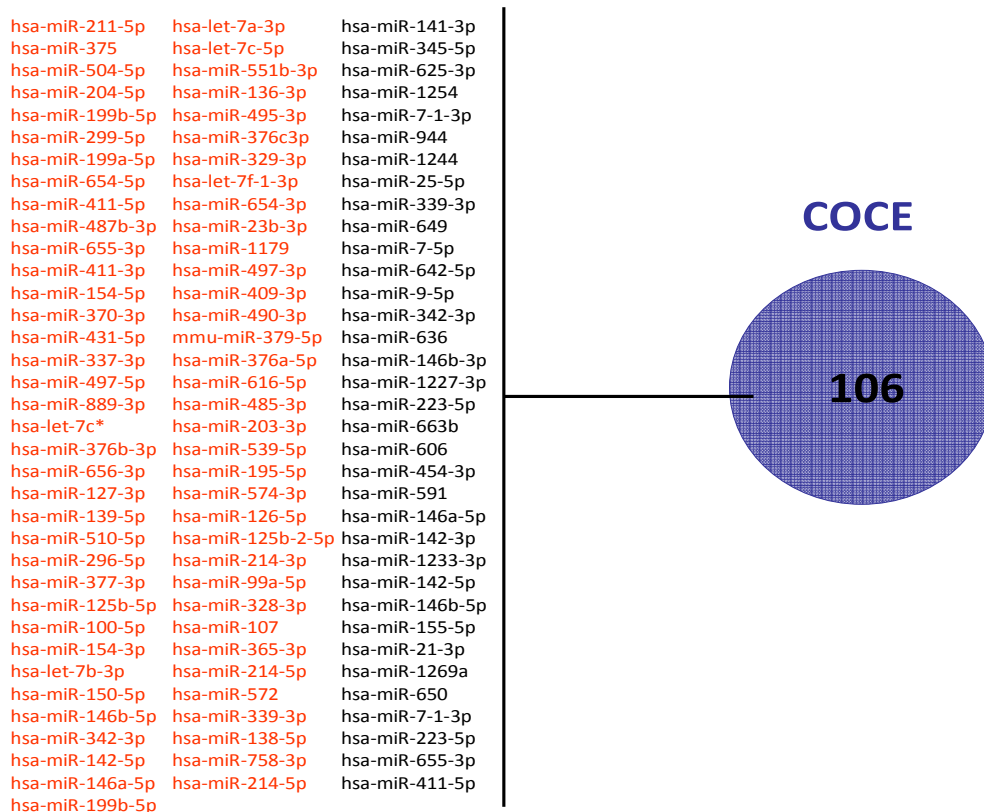


Figura 6.3. Diagrama que muestra los 106 microRNAs desregulados en el grupo COCE en relación al grupo Control. En rojo los microRNAs subexpresados y en negro los sobreexpresados.

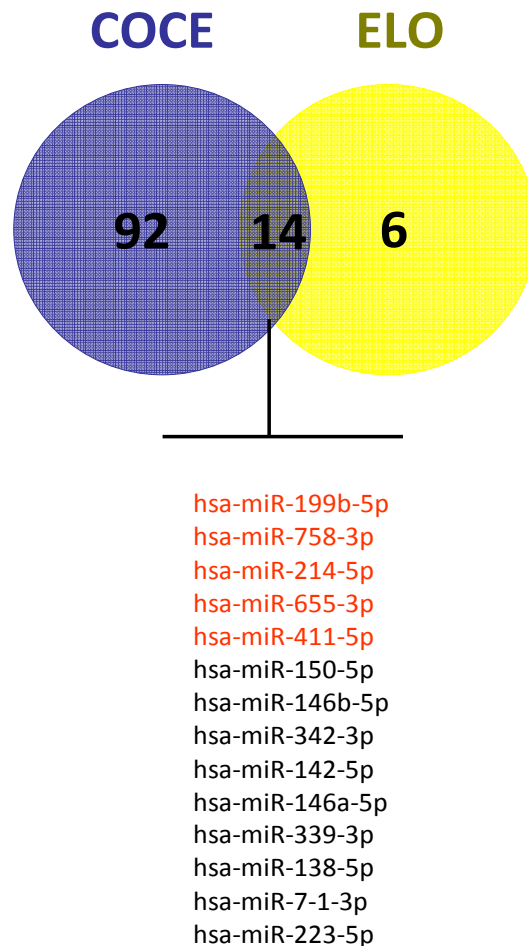


Figura 6.4. Diagrama de Venn que muestra aquellos microRNAs cuya expresión se encuentra desregulada tanto en el grupo COCE como en el grupo ELO en relación al grupo Control. . En rojo los microRNAs subexpresados y en negro los sobreexpresados.

6.2.3. Validación biológica de los perfiles de expresión de los microRNAs

La validación de los 14 microRNAs identificados en la fase de *screening* fue realizada mediante el uso de ensayos TaqMan® y qRT-PCR en un set independiente de muestras constituido por 36 muestras de ELO, 28 muestras de COCE y 27 de control (Tabla 6.6). Aparecieron problemas técnicos con el ensayo TaqMan® del microRNA hsa-miR-302c-3p, lo que motivo que fuera retirado de los posteriores análisis realizados.

Cuando se compara el conjunto de los 13 microRNAs finalmente validados con el tejido control, podemos ver que todos ellos muestran una expresión aberrante en el grupo ELO ($p < 0,05$) (Tabla 6.6).

En relación con el grupo COCE, 7 de los 13 microRNAs analizados, (hsa-miR-150-5p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-152-3p, hsa-miR-625-5p) presentan diferencias en la expresión, que son estadísticamente significativas con respecto al grupo Control ($p < 0,05$).

Al comparar la expresión de estos microRNAs entre los grupos ELO y COCE hemos observado que la expresión de 7 de ellos, presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabla 6.6. Validación biológica de los microRNAs seleccionados.

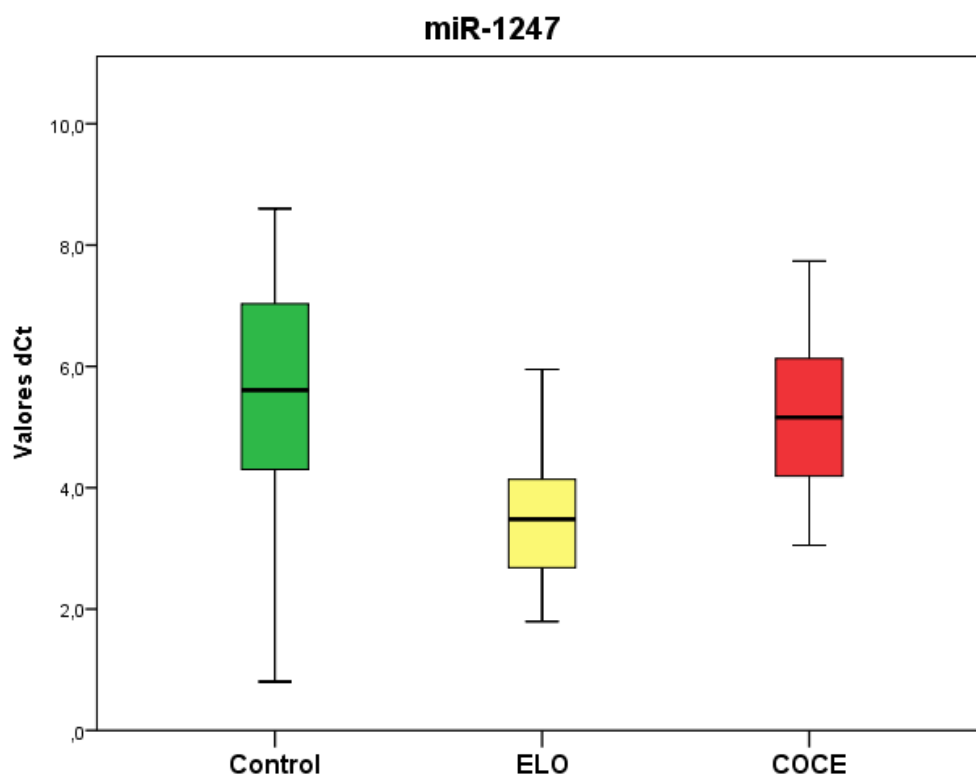
	ELO vs Control		COCE vs Control		ELO vs COCE	
	FC	valor p	FC	p-value	FC	valor p
hsa-miR-150-5p	8.993	<0.001	2.555	<0.001	3.520	<0.001
hsa-miR-142-5p	5.282	<0.001	3.682	<0.001	1.435	0.048
hsa-miR-146a-5p	4.460	<0.001	2.396	<0.001	1.861	<0.001
hsa-miR-223-5p	2.904	<0.001	3.599	<0.001	0.807	0.130
hsa-miR-7-1-3p	2.675	<0.001	1.551	0.164	1.725	<0.001
hsa-miR-339-3p	1.617	<0.001	1.153	0.213	1.402	0.002
hsa-miR-342-3p	1.907	0.026	1.602	0.169	1.191	0.116
hsa-miR-146b-5p	1.675	0.030	1.943	0.018	0.862	0.871
hsa-miR-140-3p	2.178	<0.001	0.801	0.343	2.719	<0.001
hsa-miR-1247-5p	3.971	<0.001	1.109	0.481	3.580	<0.001
hsa-miR-152-3p	0.272	<0.001	0.381	<0.001	0.714	0.078
hsa-miR-625-5p	0.702	0.029	1.738	0.027	0.404	0.524
hsa-miR-629-3p	1.493	0.013	1.128	0.481	1.323	0.075

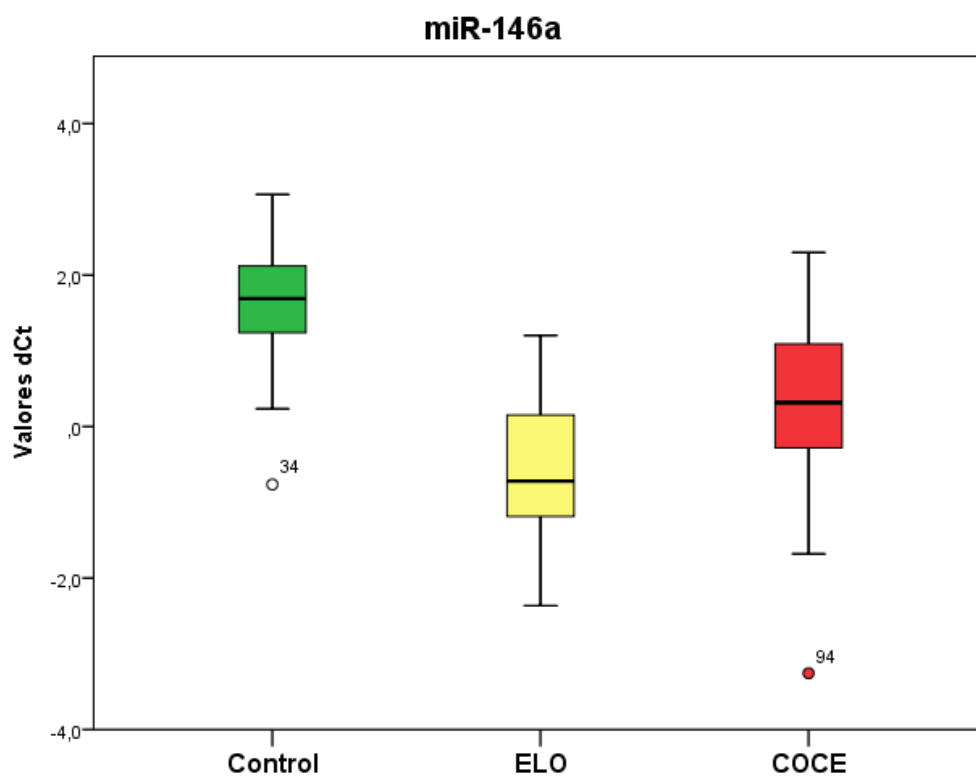
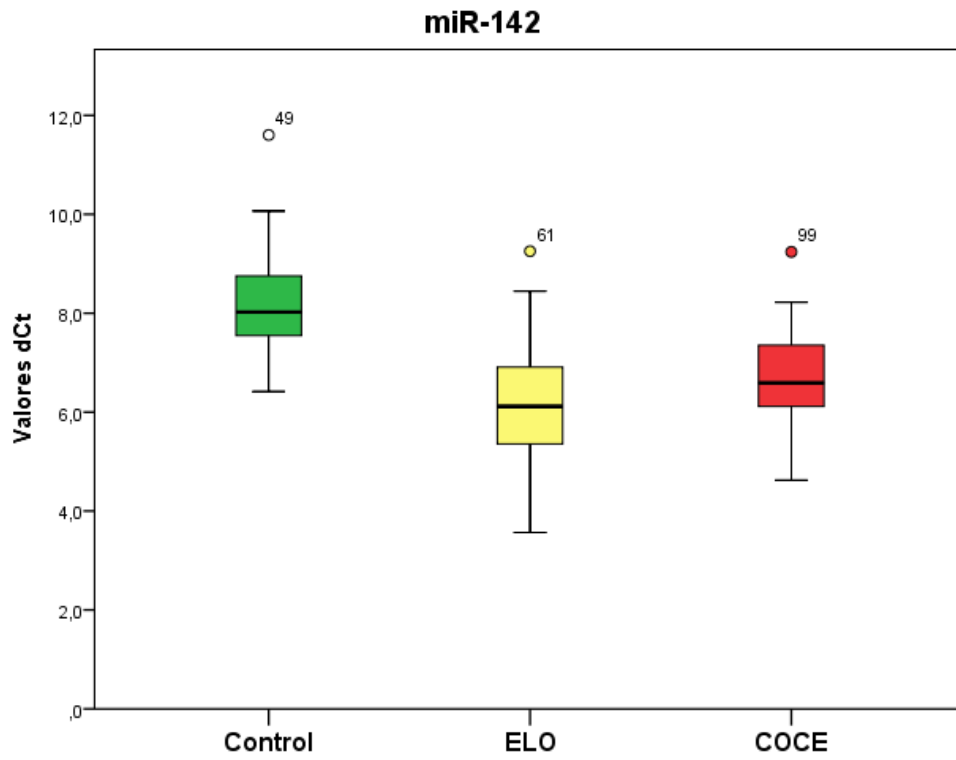
6.2.4. Expresión de cada microRNA entre el grupo ELO y el grupo COCE

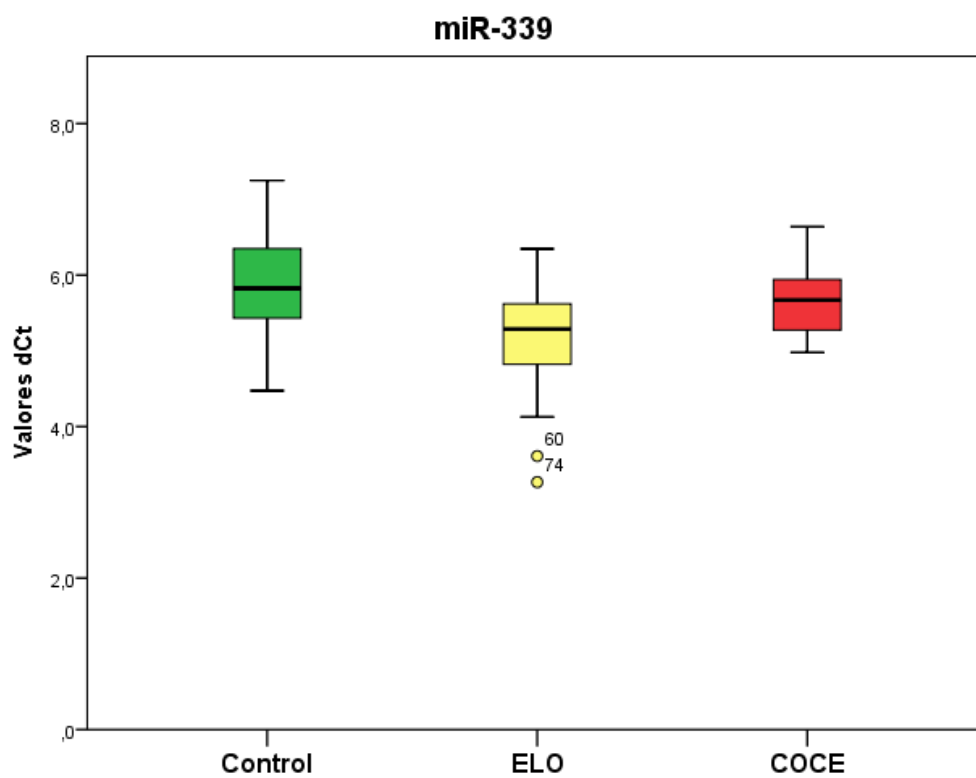
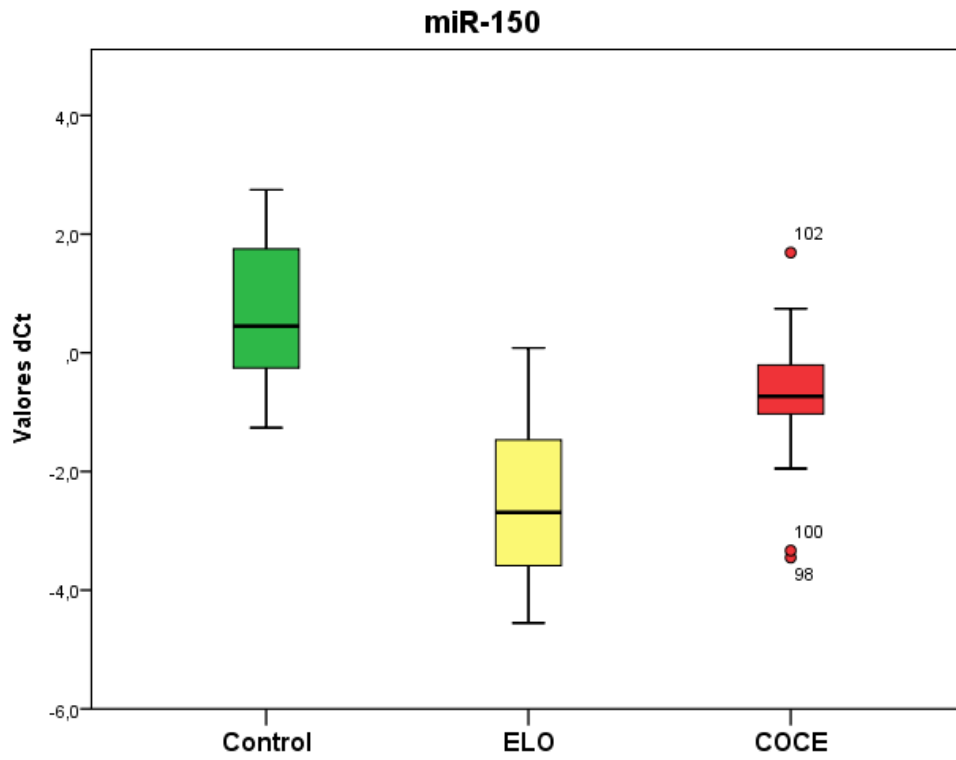
La Figura 6.5 representa los niveles de expresión de los 7 microRNAs que están diferentemente expresados entre el grupo ELO y el grupo COCE (hsa-miR-150-5p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-7-1-3p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-140-3p y hsa-miR-1247-5p). En las distintas gráficas se puede observar como los niveles de

expresión de estos 7 microRNAs disminuyen en el grupo ELO frente al grupo Control ($p < 0,05$), niveles que vuelven al estado basal a medida que pasa al grupo COCE (Figura 6.5).

En la figura 6.6 se representan los niveles de expresión de los 6 microRNAs que no están diferentemente expresados ($p \geq 0,5$) entre el grupo ELO y el grupo COCE (hsa-miR-223-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-152-3p, hsa-miR-625-5p, hsa-miR-629-3p). En este caso, al contrario que en la Figura 7.5 no encontramos tampoco una tendencia en la expresión de estos 6 microRNAs.







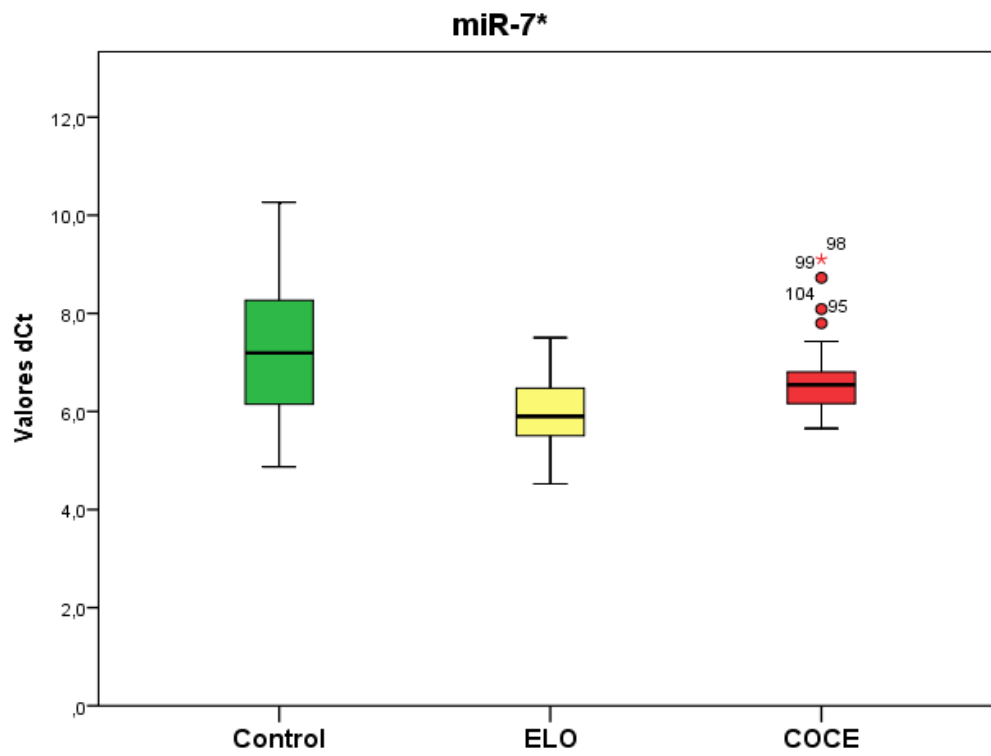
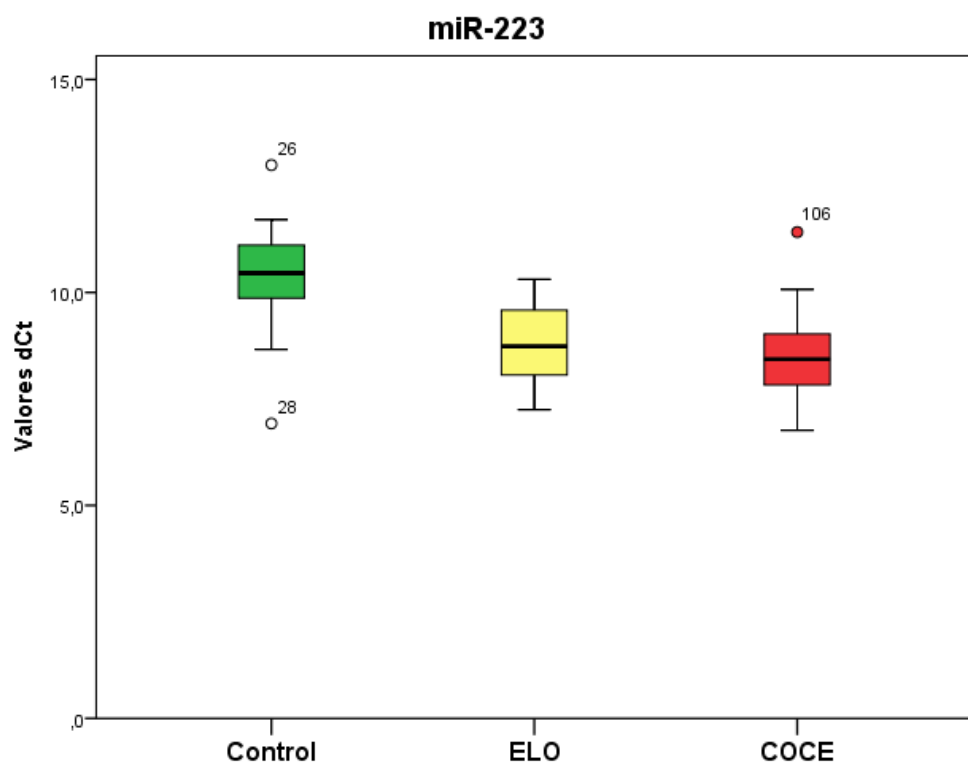
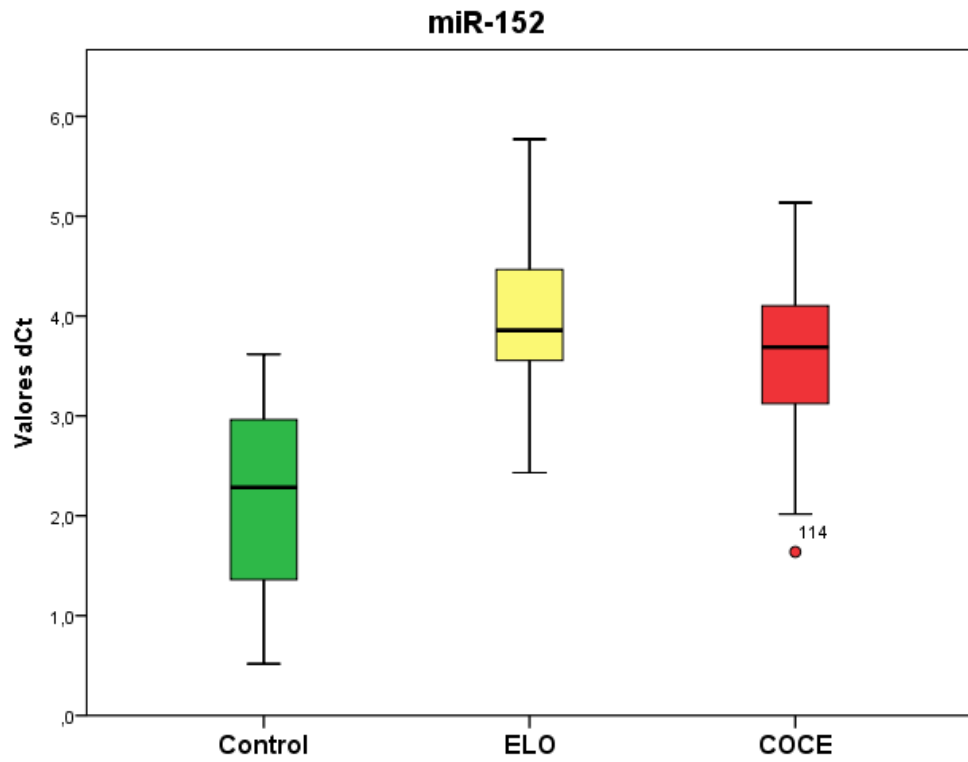
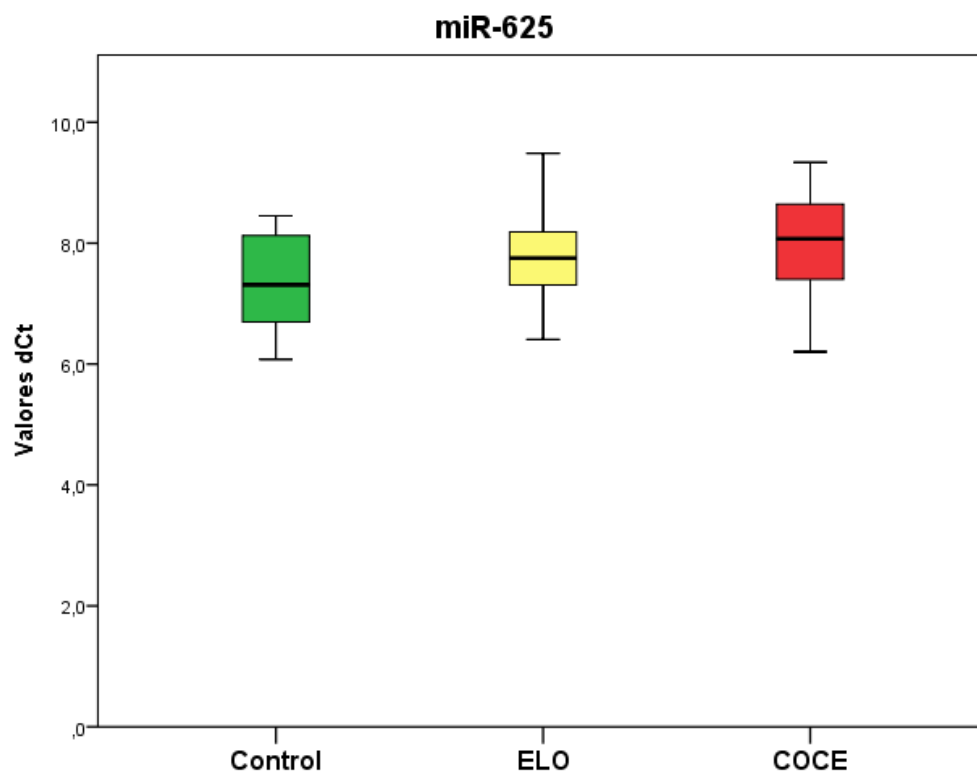
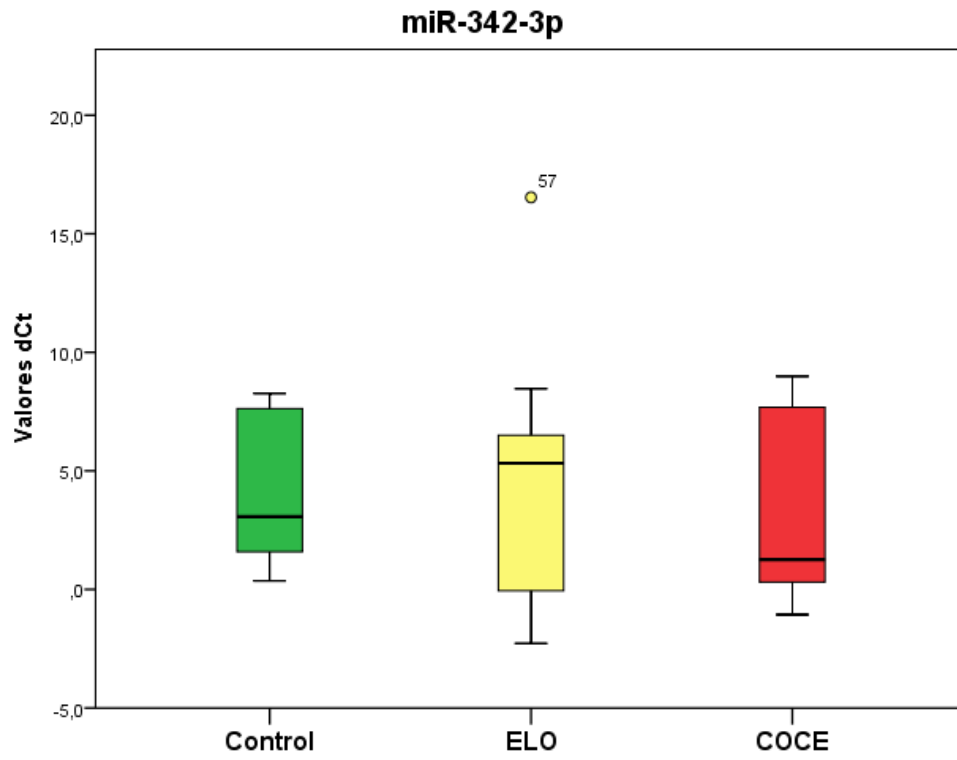


Figura 6.5. Representación gráfica en el que se compara el perfil de expresión de los microRNAs que presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ELO y COCE.





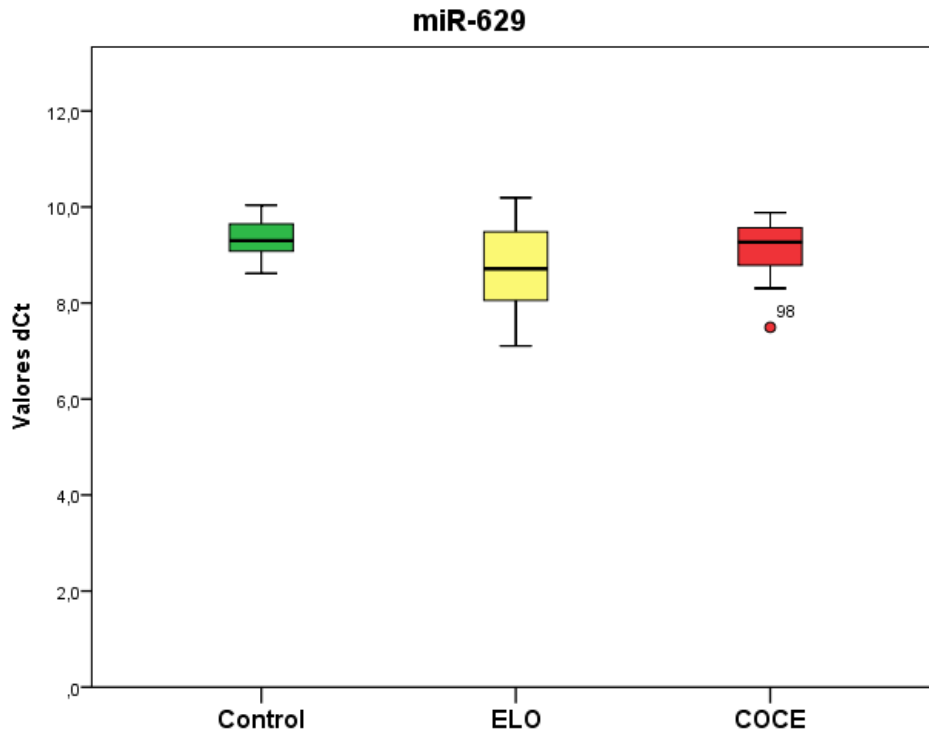


Figura 6.6. Representación gráfica en el que se compara el perfil de expresión de los microRNAs que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ELO y COCE.

6.2.5. Expresión de los microRNAs en base a la clasificación en subgrupos de la ELO

El análisis de los microRNAs validados en la ELO, no ha demostrado diferencias estadísticamente significativas al dividir a los pacientes en los subgrupos clínicos, LPO y LLO.

Cuando analizamos la expresión de los 13 microRNAs validados en la ELO en la clasificación histopatológica de la enfermedad, en los subgrupos de ELO compatible y ELO típico (Tabla 6.7 y 6.8), observamos que existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos subgrupos en 3 de los microRNAs validados (hsa-miR-150-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-223-5p) ($p < 0,05$).

Tabla 6.7. Niveles de expresión de los microRNAs analizados entre el subgrupo histopatológico ELO compatible y los grupos Control y COCE.

	ELO compatible vs Control		ELO compatible vs COCE	
	FC	valor p	FC	Valor p
hsa-miR-223-5p	1,86	p < 0,001	1,64	0,012
hsa-miR-150-5p	6,29	p < 0,001	2,37	0,007
hsa-miR-146a-5p	3,64	p < 0,001	1,23	0,085

Tabla 6.8. Niveles de expresión de los microRNAs analizados entre el subgrupo histopatológico ELO típico y los grupos Control y COCE.

	ELO típico vs Control		ELO típico vs COCE	
	FC	valor p	FC	valor p
hsa-miR-223-5p	2,95	p < 0,001	0,97	0,925
hsa-miR-150-5p	12,84	p < 0,001	4,84	p < 0,001
hsa-miR-146a-5p	5,3	p < 0,001	1,79	p < 0,001

Hemos reconocido diferencias estadísticamente significativas en los 3 microRNAs en las comparaciones de los subtipos de ELO con respecto al grupo control y al grupo COCE, excepto en el miR-146a-5p en la comparación del ELO compatible vs COCE ($p = 0,085$) y el miR-223-5p en la comparación ELO típico vs COCE ($p = 0,925$).

En la representación gráfica de los 3 microRNAs que están diferentemente expresados entre el subgrupo ELO compatible y el subgrupo ELO típico (Figura 6.7 y 6.8) observamos como los niveles de expresión de 2 de los 3 microRNAs (hsa-miR-150-5p y hsa-miR-146a-5p) siguen un patrón similar, con una mayor sobreexpresión en el subgrupo ELO compatible que en el grupo Control. A su vez, el subgrupo ELO típico presenta una mayor sobreexpresión que el subgrupo ELO compatible. Los dos subgrupos sufren un aumento de su expresión, siendo mayor la del subgrupo ELO típico. También observamos que los niveles de expresión del subgrupo ELO compatible son más próximos a los que se presentan en el grupo COCE (Figura 6.7 y 6.8).

En relación al hsa-miR-223-5p (Figura 6.9), hemos observado que los niveles de expresión de este microRNA son mayores en el subgrupo ELO compatible que en el grupo Control. También los niveles de expresión son mayores en el subgrupo ELO

típico que en el subgrupo ELO compatible. A diferencia de lo que ocurre en los dos anteriores microRNAs, en este caso, no hay diferencias en los niveles de expresión entre el subgrupo ELO típico y el grupo COCE.

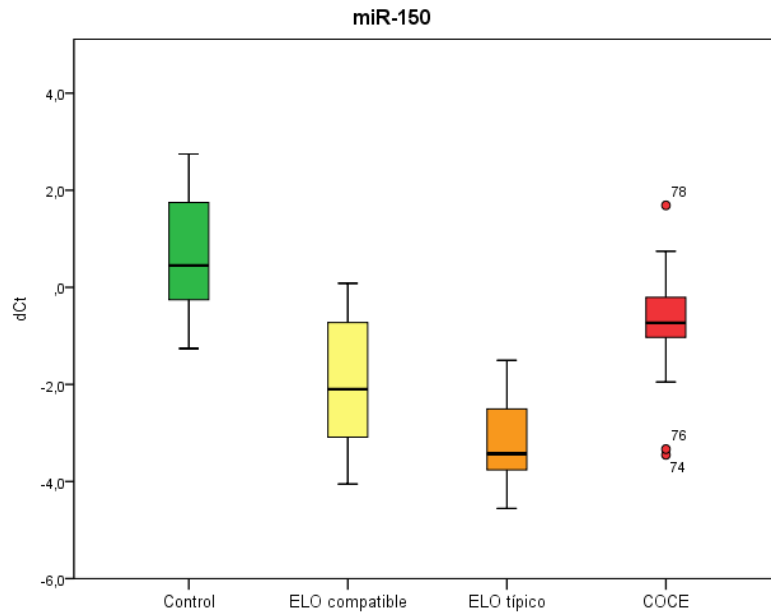


Figura 6.7. Representación gráfica de los niveles de expresión del microRNA hsa-miR-150-5p entre los subgrupos histopatológicos (ELO compatible y ELO típico) y los grupos Control y COCE.

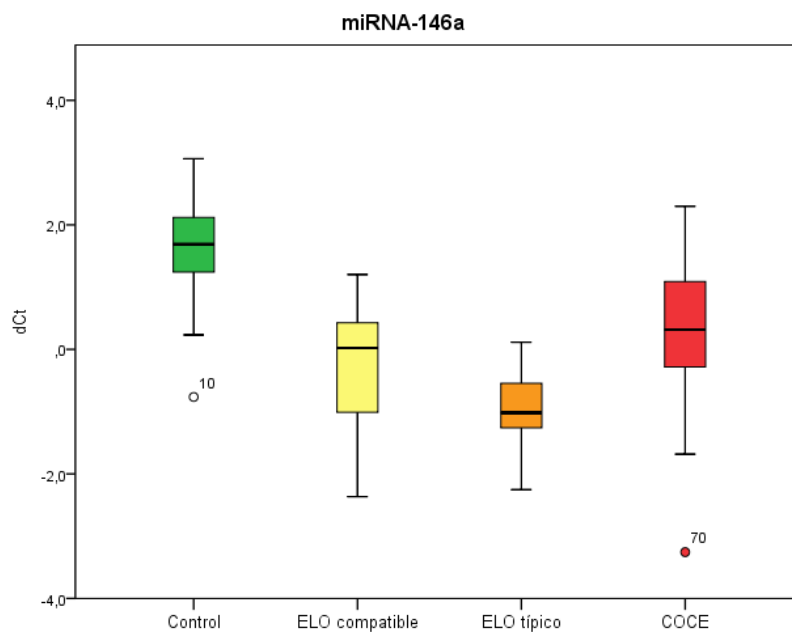


Figura 6.8. Representación gráfica de los niveles de expresión del microRNA hsa-miR-146a-5p entre los subgrupos histopatológicos (ELO compatible y ELO típico) y los grupos Control y COCE.

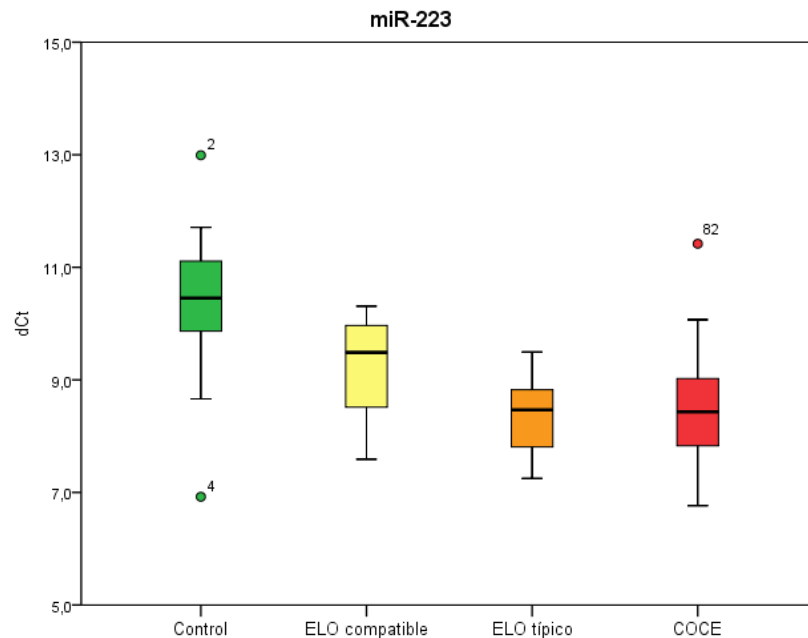


Figura 6.9. Representación gráfica de los niveles de expresión del microRNA hsa-miR-223-5p entre los subgrupos histopatológicos (ELO compatible y ELO típico) y los grupos Control y COCE.

6.3. Análisis *in silico* (Ontología de genes)

El análisis de la ontología de genes (*gene ontology*) (GO) que hemos realizado lo hemos dividido en dos listas diferentes de microRNAs desregulados, basándonos en los resultados obtenidos en la fase de *screening* para el grupo ELO y el grupo COCE.

En primer lugar, hemos realizado un *gene ontology* de genes a partir de los 20 microRNAs cuya expresión se encontraba significativamente desregulada en el grupo ELO. En la Tabla 6.9 se recogen los principales procesos en los que intervienen estos 20 microRNAs. Cuanto más arriba en la lista este un proceso, más genes o microRNAs (de los 20 seleccionados) están involucrados en su regulación (en el CD adjunto se encuentra el listado completo del *gene ontology* Tabla suplementaria 6.1). Entre estos procesos destacan aquellos relacionados con la proliferación celular, la respuesta a sustancias orgánicas, la respuesta inmune, o la regulación positiva del proceso de desarrollo celular (Tabla 6.9).

En segundo lugar, realizamos otro *gene ontology*, que estaba basado en los genes diana validados para los 106 microRNAs cuya expresión encontramos desregulada en el grupo COCE (en el CD adjunto se encuentra el listado completo del *gene ontology* Tabla suplementaria 6.2). En este caso también encontramos un número significativo de procesos biológicos frecuentes tales como la vía de señalización del receptor de transmembrana tirosina-kinasa, la vía de señalización de la neurotrofina, la cicatrización de heridas y la respuesta a las heridas o al movimiento de los componentes celulares, entre otras (Tabla 6.10).

Se puede apreciar en los dos análisis (Tablas 6.9 y 6.10), que tanto los microRNAs desregulados del grupo ELO como del grupo COCE comparten ciertas rutas similares afectadas en el contexto del desarrollo celular de órganos, tejido y epidermis, respuesta a etanol y virus o la respuesta inmune. Sin embargo, los procesos biológicos relacionados con los procesos inmunitarios, con la proliferación celular y la apoptosis o con la respuesta a las sustancias orgánicas, se ven afectadas en mayor medida en la ELO.

Tabla 6.9. *Gene ontology* de los 20 microRNAs desregulados en el grupo ELO. A continuación destacamos los 40 procesos de más relevancia.

GO.ID	Término
GO:0008283	Proliferación celular
GO:0010033	Respuesta a sustancias orgánicas
GO:0006955	Respuesta inmune
GO:0051094	Regulación positiva del proceso de desarrollo celular
GO:2000026	Regulación del desarrollo de organismos pluricelulares
GO:0008284	Regulación positiva de la proliferación celular
GO:0043066	Regulación negativa de la apoptosis
GO:0071345	Respuesta celular a citoquinas
GO:0045944	Regulación positiva de la transcripción
GO:0050776	Regulación respuesta inmune
GO:0048513	Desarrollo órganos
GO:0051240	Regulación positiva de organismos pluricelulares
GO:0007166	Vía de señalización de receptores celulares de superficie

GO:0009615 Respuesta a virus
GO:0030855 Diferenciación epitelial
GO:0048468 Desarrollo celular
GO:0009611 Respuesta a heridas
GO:0009719 Respuesta a estímulos endógenos
GO:0007169 Receptor de transmembrana proteína tirosina kinasa
GO:0010243 Respuesta a compuestos organonitrogenados
GO:0002768 Respuesta inmune-regulador superficie celular
GO:0043065 Regulación positiva del proceso apoptótico
GO:0045471 Respuesta a etanol
GO:0000079 Regulación de ciclina dependiente de proteína
GO:0006928 Movimiento componente celular
GO:0009617 Respuesta a bacterias
GO:0044700 Señalización organismos unicelulares
GO:0007584 Respuesta a nutrientes
GO:0007154 Comunicación celular
GO:0007165 Transducción de señales
GO:0042060 Cicatrización de señales
GO:0006935 Quimiotaxis
GO:0050896 Respuesta a estímulos
GO:0009888 Desarrollo de tejidos
GO:0016477 Migración celular
GO:0048011 Vía de señalización de la TRK
GO:0050731 Regulación positiva de la tirosina
GO:0007596 Coagulación de la sangre
GO:0006413 Iniciación de la traducción
GO:0000082 Transición fase G1/S ciclo celular mitótico

Tabla 6.10. *Gene ontology* de los 106 microRNAs desregulados en el grupo COCE. A continuación destacamos los 40 procesos de más relevancia.

GO.ID	Término
GO:0007169	Vía de señalización del receptor de transmembrana tirosina-kinasa
GO:0038179	Vía de señalización de la neurotrofina
GO:0048011	Vía de señalización de la TRK
GO:0042060	Cicatrización de heridas
GO:0009611	Respuesta a heridas
GO:0006928	Movimiento de los componentes celulares
GO:0048513	Desarrollo de órganos
GO:0044763	Procesos de organismos unicelulares
GO:0009888	Desarrollo de tejidos
GO:0009605	Respuesta a estímulos externos
GO:0050817	Coagulación
GO:0007596	Coagulación de la sangre
GO:0007599	Hemostasia
GO:0044839	Transición fase G2/M ciclo celular
GO:0050878	Regulación de los niveles de fluidos corporales
GO:0000086	Transición fase G2/M ciclo celular mitótico
GO:0009615	Respuesta a virus
GO:0009607	Respuesta a estímulos bióticos
GO:0006955	Respuesta inmune
GO:0044699	Procesos organismos unicelulares
GO:0006935	Quimiotaxis
GO:0000079	Regulación de proteína dependiente de ciclina
GO:0043623	Complejo de montaje celular
GO:0042391	Regulación del potencial de membrana
GO:0044712	Procesos catabólicos de organismos unicelulares
GO:0006892	Transporte mediado por vesículas post-Golgi
GO:0097194	Fase de ejecución de la apoptosis

GO:0006986 Respuesta a proteínas no plegadas
GO:0006508 Proteolisis
GO:0006200 Proceso catabólico dependiente ATP
GO:0001501 Desarrollo sistema esquelético
GO:0071346 Respuesta celular a interferón-gamma
GO:0007162 Regulación negativa de la adhesión celular
GO:0046034 Procesos metabólicos dependientes de ATP
GO:0034341 Respuesta a interferón-gamma
GO:0006631 Procesos metabólico ácidos grasos
GO:0005975 Procesos metabólicos carbohidratos
GO:0045471 respuesta a etanol
GO:0008544 Desarrollo epidermis
GO:0044262 Metabolismo celular carbohidratos

7. Discusión

La búsqueda de datos etiopatogénicos que ayuden a mejorar la caracterización de los trastornos orales potencialmente malignos y posibiliten nuevas estrategias terapéuticas y preventivas constituye, en la actualidad, un tema de máximo interés (Bediaga *et al.*, 2014).

A día de hoy, algunos ensayos de expresión génica son de difícil realización y estandarización en la práctica habitual, como ocurre con los del RNA debido a su inestabilidad. Sin embargo, el estudio de los microRNAs se considera un abordaje útil y es más sencillo, ya que además de ser moléculas muy estables, se requiere poca cantidad de muestra para obtener unos niveles aceptables para su análisis y se pueden usar muestras clínicamente accesibles como las biopsias incluidas en parafina o fluidos biológicos como la sangre y la saliva (Feinberg *et al.*, 2006).

Actualmente, la realización de una biopsia representativa y su posterior análisis histopatológico se considera el *gold standard* en el diagnóstico de las lesiones malignas y premalignas orales. En algunos casos es necesaria la realización de biopsias adicionales, ya que los pacientes presentan lesiones múltiples, extensas, recurrentes y proliferativas (Gasche & Goel, 2012).

Los patrones de expresión de microRNAs alterados se han asociado a una serie de procesos fisiológicos y patológicos en el ser humano, incluyendo el cáncer y algunas enfermedades inflamatorias crónicas (Sonkoly *et al.*, 2008; Cervigne *et al.*, 2009; Rebane & Akdis, 2013).

En la actualidad desconocemos la verdadera etiología de la enfermedad liquenoide oral (ELO) al igual que su potencial para presentar un fenotipo premaligno (Cortes-Ramirez *et al.*, 2009; van der Waal, 2009).

Se ha sugerido que los microRNAs podrían ser utilizados para predecir la transformación maligna de los trastornos orales potencialmente malignos, como la ELO (Clague *et al.*, 2010).

7.1. En relación con las características clinicopatológicas de las muestras

La enfermedad liquenoide oral es un trastorno inflamatorio crónico de la mucosa oral, de base inmunológica y etiología incierta, que precisa para su diagnóstico de la combinación de los datos clínicos e histopatológicos (Ingafou *et al.*, 2006; Aguirre Urizar, 2008; Scully & Carrozzo, 2008).

Clásicamente se señala que la enfermedad liquenoide oral aparece con mayor frecuencia en el género femenino y entre la quinta y sexta décadas de la vida (Scully & Carrozzo, 2008; Cortes-Ramirez *et al.*, 2009; van der Waal, 2009). En este sentido los datos de nuestro estudio están en consonancia con lo descrito en la literatura, ya que observamos una mayor predominancia del género femenino (>50%) y una media de edad situada entre los 50 y 60 años.

En relación con el consumo de productos carcinogénicos como el tabaco y el alcohol, clásicamente se ha señalado que estos hábitos presentan una frecuencia parecida en los pacientes con ELO y en la población general (Eisen, 2002).

En nuestro estudio, hemos observado un mayor predominio de pacientes no consumidores de tabaco (70,45%) en el grupo ELO, lo que coincide con otros trabajos previos (Bermejo-Fenoll *et al.*, 2009; Pakfetrat *et al.*, 2009, Shen *et al.*, 2012). La presencia de este dato apoyaría la hipótesis de que el consumo de tabaco no sería un elemento importante en la génesis de este trastorno oral potencialmente maligno. Respecto al consumo de alcohol, también hemos observado que la mayoría de nuestros pacientes con ELO (82,95%), no eran consumidores habituales de alcohol, hecho que concuerda con otros estudios previos (Bermejo-Fenoll *et al.*, 2009; Pakfetrat *et al.*, 2009, Shen *et al.*, 2012). No obstante, la presencia del consumo de alcohol podría ser un dato adicional que posibilitaría un mayor riesgo de malignización de las lesiones orales en estos pacientes (Gainza-Cirauqui *et al.*, 2013).

En relación con la malignización de la ELO, durante este trabajo uno de los pacientes ha desarrollado un carcinoma oral de células escamosas. Se trataba de una mujer de 55 años fumadora y no consumidora de alcohol diagnosticada de liquen plano oral que presentaba en el momento de la toma de la muestra, lesiones reticulares y en placa. Su perfil de expresión de microRNAs no mostraba valores anormales con respecto a la media del grupo ELO.

Clásicamente, la edad de los pacientes que sufren un COCE se sitúa entre los 50 y los 70 años en la mayor parte de los casos (Scully & Bagan, 2009). En este sentido los datos de nuestro estudio están en consonancia, ya que la media de edad de los pacientes diagnosticados de COCE fue de 61 años. Sin embargo, llama la atención el mayor predominio del género femenino frente al masculino en nuestra muestra, con un ratio de 1,7:1. Aunque los datos epidemiológicos siguen revelando una mayor

incidencia de este cáncer en el género masculino (Ferlay *et al.*, 2013; Sankaranarayanan, 2015), cada vez más se sugiere la presencia de un incremento en la cifra de cáncer oral en las mujeres en los últimos años (Bagán, 2010; Lopez de Munain *et al.*, 2014).

Como muestra control se escogió en nuestro estudio la hiperplasia fibrosa sin inflamación y sin displasia epitelial, ya que es una de las lesiones benignas más comunes en la cavidad oral (Kfir *et al.*, 1980; Esmeli *et al.*, 2005). Esta lesión reactiva está constituida por tejido conectivo de reparación, y ha sido previamente utilizada como tejido control en distintos estudios moleculares (Safadi *et al.*, 2010; Kolokythas *et al.*, 2015; dos Santos Pereira *et al.*, 2016).

7.2. En relación con la metodología de trabajo

Un objetivo importante en las investigaciones actuales sobre los trastornos orales potencialmente malignos y el cáncer oral es la búsqueda de biomarcadores genéticos y epigenéticos que nos permitan realizar una prevención y un diagnóstico precoz de su aparición y de su potencial transformación maligna (Lee *et al.*, 2009; Bediaga *et al.*, 2014; Javaid *et al.*, 2016).

En el presente estudio se han analizado los perfiles de expresión de microRNAs tanto en la enfermedad liquenoide oral como en el cáncer oral mediante la metodología *TaqMan® Low Density Array Card (TLDA card)* que puede analizar simultáneamente el comportamiento de 768 microRNAs en una muestra.

Si bien los arrays permiten analizar el comportamiento de cientos de genes de forma simultánea, el análisis de los datos procedentes de estos estudios presenta importantes retos como: la existencia de muchas variables (cientos de dianas para cada microRNA), el escaso número de observaciones o la gran probabilidad de obtención de falsos positivos si se emplean las técnicas clásicas de análisis bioestadístico (Dvinge & Bertone, 2009; Bediaga *et al.*, 2013). Para solventar estas limitaciones es necesario diseñar estudios con un buen poder estadístico y aplicar métodos bioestadísticos adecuados con los cuales se puedan detectar los cambios que se produzcan (Dvinge & Bertone, 2009; Bediaga *et al.*, 2013). Para ello, en nuestro estudio se procedió a validar los resultados y las correlaciones identificadas mediante *TLDA card* en un grupo independiente de muestras al empleado en la plataforma

anterior. La técnica seleccionada para la validación de los resultados fueron los ensayos TaqMan®, que es la misma tecnología empleada en el *TLDA card*, pero de forma individual, más precisa y más económica.

7.3. En relación con la caracterización del perfil de expresión aberrante de microRNAs en la enfermedad liquenoide oral

Aunque todavía queda mucho por descifrar sobre el papel de los microRNAs en la ELO, algunos estudios (Zhang *et al.*, 2012; Gassling *et al.*, 2013) ya han insinuado la posible existencia de un perfil de expresión de microRNAs alterado diferente del perfil de los controles.

En nuestro estudio, hemos analizado el perfil de microRNAs en el mayor conjunto de muestras de ELO publicado hasta el momento y hemos identificado 20 microRNAs desregulados con unos criterios de inclusión ((FC) > | 2 | y una p ajustada <0,05). De todos ellos, los microRNAs mejor posicionados fueron validados en un conjunto independiente de muestras (microRNA-150, microRNA-142, microRNA-146a, microRNA-223, microRNA-7, microRNA-339, microRNA-342, microRNA-146b, microRNA-140, microRNA-1247, microRNA-152, microRNA-625, microRNA-629).

Entre los 20 microRNAs identificados, el microRNA-146a es el único microRNA cuya clara sobreexpresión ha sido descrita hasta el momento en los tres estudios realizados sobre todo el genoma en esta enfermedad (Zhang *et al.*, 2012; Gassling *et al.*, 2013; y el presente estudio). Estos resultados también están en consonancia con los estudios previos de microRNA-candidato realizados (Arao *et al.*, 2012; Zuo *et al.*, 2015).

Se considera que el microRNA-146a tiene un papel esencial en la regulación de la respuesta inflamatoria y en la oncogénesis (Taganov *et al.*, 2006; Bhaumik *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Nakasa *et al.*, 2008; Perry *et al.*, 2008; Sonkoly *et al.*, 2008; Stanczyk *et al.*, 2008).

En 2006 Taganov *et al.* vieron que la expresión del microRNA-146a se activaba en respuesta al lipopolisacárido (LPS), polímero complejo que forma la parte mayoritaria de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. La activación se produciría por la acción del complejo proteico NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de los linfocitos B activados), el cual controla la producción de citoquinas y la supervivencia celular. También observaron que el microRNA-146a era capaz de

silenciar la expresión de dos dianas, la IRAK 1 (quinasa asociada al receptor de la interleucina 1) y el TRAF 6 (factor asociado al receptor TNF), los cuales se han relacionado con la producción del TNF- α (factor de necrosis tumoral alpha) involucrado en los procesos inflamatorios y en la apoptosis. Por todo ello concluyen que el microRNA-146a podría desempeñar un papel fundamental en la respuesta inmunológica innata (Taganov *et al.*, 2006).

En este sentido se conoce que el microRNA-146a se encuentra sobreexpresado en algunas enfermedades inflamatorias como la psoriasis (Sonkoly *et al.*, 2007), la artritis reumatoide (Nakasa *et al.*, 2008; Pauley *et al.*, 2008), la osteoartritis (Yamasaki *et al.*, 2009) y también en la enfermedad liquenoide oral (Arao *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Gassling *et al.*, 2013).

Todos estos resultados sugieren que el microRNA-146a podría desempeñar un importante papel regulador en la fisiopatología de estas enfermedades inflamatorias de base inmunológica (Williams *et al.*, 2008). Sin embargo, todavía queda mucho por esclarecer sobre su verdadera función y sobre los mecanismos por los que actúa.

En nuestro estudio también hemos observado sobreexpresión del microRNA-146b en los pacientes con ELO, lo que coincide con lo observado por Gassling *et al.* (2013). El microRNA-146b pertenece a la misma familia que el microRNA-146a, compartiendo la misma región semilla y sus secuencias maduras, que se encuentran estrechamente relacionadas (20/22 nt de identidad) (Taganov *et al.*, 2006). En general, toda la familia del microRNA-146 está involucrada principalmente en la regulación de la inflamación y en los mecanismos reguladores del sistema inmunológico innato, habiéndose asociado también con diversas neoplasias en el ser humano, incluyendo el cáncer oral (Taganov *et al.*, 2006).

Con respecto al microRNA-342-3p, que también aparecía desregulado en el estudio de Gassling *et al.* (2013), está situado en uno de los intrones del gen EVL, y cada vez son mayores las evidencias que sugieren que podría desempeñar un papel importante en los procesos de carcinogénesis (Ronchetti *et al.*, 2008; Gassling *et al.*, 2013).

Se ha observado que el microRNA-342 se encuentra desregulado en el mieloma múltiple (Ronchetti *et al.*, 2008), y epigenéticamente silenciado en el carcinoma colorrectal (Grady *et al.*, 2008). La reconstitución de este microRNA en las células provoca un aumento de la actividad apoptótica, lo que sugiere que podría estar

regulando factores celulares antiapoptóticos (Grady *et al.*, 2008). Por ello, el silenciamiento de su expresión podría promover la carcinogénesis mediante la inducción de algunas vías antiapoptóticas (Grady *et al.*, 2008).

Además, hemos observado en nuestro estudio que tanto el microRNA-342 como el microRNA-150 se encuentran desregulados en la ELO. Entre las posibles dianas de estos microRNAs se encuentran el oncogen JUN, la proteína quinasa PRKCE o la proteína kinasa AKT que están asociadas a procesos inflamatorios mediados por citoquinas (Anderson & Wong, 2010; Fourie *et al.*, 2014). Esta desregulación también se ha observado en el colón irritable (Anderson & Wong, 2010; Fourie *et al.*, 2014), que es un trastorno gastrointestinal frecuente, caracterizado por una desregulación inmunológica-inflamatoria.

Por analogía con nuestros resultados, podemos inferir que estos dos microRNAs (microRNA-342, microRNA-150) podrían participar en la génesis y desarrollo del proceso inflamatorio presente en la ELO.

Tanto en nuestro estudio como en el de Zhang *et al.* (2012) se ha reconocido la sobreexpresión de los microRNAs 629 y 152.

En 2012 Yang *et al.*, demostraron *in vitro* que el microRNA-629 era capaz de disminuir la expresión del gen NBS1, el cual está relacionado con un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón (Lu *et al.*, 2009). También se ha detectado sobreexpresión de este microRNA en pacientes pediátricos diagnosticados de lupus eritematoso sistémico, enfermedad reumatológica de base inmunológica (Zhu *et al.*, 2014).

En cuanto al microRNA-152, no hay mucha información todavía, excepto que se ha encontrado sobreexpresado en pacientes con cáncer de cuello de útero que es un carcinoma de células escamosas derivado de la mucosa cervical (Lui *et al.*, 2007), por lo que podría tener interés en su analogía con el cáncer oral.

Aunque se conoce muy poco acerca de las funciones de estos microRNAs, el hecho de que haya sido detectada su desregulación en la ELO en dos estudios totalmente independientes como son el de Zhang *et al.*, (2012) y el nuestro, en diferentes poblaciones y en diferentes laboratorios con protocolos diferentes, refuerza la idea de que pueden tener un papel destacado en la etiopatogenia de la ELO.

Nuestro estudio ha identificado nuevos microRNAs alterados en la ELO, que nunca habían sido anteriormente vinculados a esta enfermedad, como el microRNA-150, el

microRNA-142, el microRNA-223, el microRNA-7, el microRNA-339, el microRNA-140, el microRNA-625 y el microRNA-1247.

En 2012 Yang *et al.*, si observaron niveles reducidos de expresión del microRNA-150 en pacientes diagnosticados de leucoplasia proliferativa en comparación con los diagnosticados de leucoplasia no proliferativa.

En nuestro estudio, hemos observado un aumento significativo de la expresión del microRNA-150 en el grupo ELO respecto del control, mientras que la expresión en el COCE se redujo a niveles equivalentes a los del grupo control. En dos estudios independientes (Xiao *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007) se ha demostrado la intervención del microRNA-150 en el desarrollo de los linfocitos B. Estos resultados, junto a los del análisis de la ontología de genes (*Gene Ontology*), nos indicarían que en algunos trastornos orales potencialmente malignos como la ELO, el componente inflamatorio tendría un papel principal y mayor que en otros trastornos como la leucoplasia o incluso el cáncer, donde otros procesos biológicos adquirirían una mayor relevancia y/o la respuesta inflamatoria no sería un elemento etiopatogénico.

Otra hipótesis que nos sugieren estos datos es que en los pacientes con ELO el sistema inmune estaría alterado también por la sobreexpresión de este microRNA. La posible subexpresión del microRNA-150 en la ELO provocaría una disminución de la respuesta inflamatoria de inmunovigilancia tumoral, lo que podría ayudar a la posible malignización de este trastorno.

En relación con el microRNA-142-3p, que está sobreexpresado en la ELO, se sabe que el gen que codifica para este microRNA se encuentra localizado en una zona de translocación asociada a procesos oncológicos linfoides como las leucemias agresivas de células B (Sonkoly *et al.*, 2008). Además es, junto al microRNA-142-5p, dos de los siete microRNAs más abundantes en los linfocitos T (Wu *et al.*, 2013). Por todo ello, se puede considerar como muy probable que este microRNA ejerza un papel fundamental en la inmunidad adaptativa asociada a estas células linfoides.

Al igual que el microRNA-142, el microRNA-223 es un microRNA intergénico regulado por su propio promotor (Pulikkan *et al.*, 2010), que también se expresa en los tejidos hematopoyéticos, principalmente en las células mieloides, aunque también se ha visto que regula la diferenciación de los linfocitos T (Chen *et al.*, 2004). Este microRNA es capaz de controlar su propia expresión y regular la diferenciación de los distintos tipos

de granulocitos (eosinófilos, neutrófilos y basófilos) (Fazi *et al.*, 2005), lo que sugiere que desempeña diversas funciones en diferentes tipos celulares (Chen *et al.*, 2004). La desregulación de este microRNA se ha descrito tanto en neoplasias malignas de células linfoides T inmaduras (Mavrakis *et al.*, 2011), como en procesos gastrointestinales inflamatorios como el colón irritable (Schaefer *et al.*, 2011). También se conoce que tiene como potencial diana al factor de transcripción oncogénico E2F1 (Pulikkan *et al.*, 2010), el cual está involucrado en el control del ciclo celular y en la actividad de algunas proteínas supresoras tumorales.

Ambos microRNAs (el microRNA-142 y el microRNA-223) podrían ser mediadores de la respuesta inflamatoria a través de los linfocitos T, células cruciales para la aparición, mantenimiento y limitación del daño en la enfermedad liquenoide oral.

En los mamíferos, el microRNA-7 está codificado por tres loci genómicos, lo que origina 3 isoformas distintas, el microRNA-7a-1, el microRNA-7a-2, y el microRNA-7b (Kredo-Russo *et al.*, 2012).

En 2010 Jiang *et al.*, en un estudio con pacientes diagnosticados de COCE, demostraron que el microRNA-7 es capaz de provocar la subexpresión del receptor del factor de crecimiento de la insulina (IGF1R) y por lo tanto atenuar la fosforilación o activación de la proteína quinasa, lo que conllevaría a una disminución de la proliferación celular, un aumento de la apoptosis y un parón del ciclo celular (Jiang *et al.*, 2010). Además, en 2013, Xu *et al.* vieron que la subexpresión del microRNA-7 provocaba un aumento en la señalización de la molécula del sistema inmunitario innato TLR9 (receptor de tipo Toll 9) y como consecuencia de ello una mayor progresión en el cáncer de pulmón. Esta molécula alteraría la transducción de la vía de la proteína quinasa AKT, proteína que regula el complejo NF-KB, que controla la producción de citocinas y la supervivencia celular (Xu *et al.*, 2013). Todos estos datos nos sugieren que el microRNA-7 además de regular la oncogénesis, también tiene un papel importante en la regulación de procesos inflamatorios, por lo que la alteración de su expresión en la ELO nos podría estar indicando su implicación en el desarrollo de algunas vías relacionadas con el proceso inflamatorio presente en esta patología, las cuales podrían tener repercusiones carcinogénicas.

El microRNA-339 es uno de los microRNAs capaces de regular a la endonucleasa de restricción Dicer. Esta enzima sería fundamental en el desarrollo de algunas células del

sistema inmunológico, más concretamente en el desarrollo de las células linfoides T (Cobb *et al.*, 2006), así como en la respuesta inmunológica de tipo 2, que está mediada por linfocitos T (Kemp & Ronchese, 2001; Muljo *et al.*, 2005). El hecho de que en nuestro estudio el microRNA-339 este sobreexpresado en la ELO, refuerza el hecho de que los linfocitos T tengan un papel muy importante en la génesis y el mantenimiento de esta patología.

El microRNA-140-3p también tiene entre sus funciones la de regular el sistema inmunológico (Takata *et al.*, 2011). Se conoce que este microRNA regula de forma negativa una de las vías principales del sistema inmunológico innato, la vía NF- κ B, al tener como dianas a distintos coactivadores de esta vía como son NCOA1 (receptor nuclear) y NRIP1 (proteína de interacción con receptores nucleares) (Takata *et al.*, 2011). Otros mediadores inflamatorios que pueden estar regulados por este microRNA son la metaloproteinasa de matriz MMP-13 (Takata *et al.*, 2011), que se encuentra involucrada en la vía NF- κ B y el factor de crecimiento similar a la insulina IGFBP-5, que se sabe que modula la actividad de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico), que es uno de los activadores de la transducción de señal AKT y es un estimulador del crecimiento y de la proliferación celular (Jones *et al.*, 1993). Aunque no ha sido descrito hasta este momento en otros estudios sobre la ELO, podríamos suponer que su desregulación estaría directamente relacionada con la naturaleza inflamatoria crónica de este trastorno oral.

En relación con el microRNA-625 y el microRNA-1247, no existe mucha información sobre sus funciones aunque se sabe que se encuentran desregulados en el cáncer (Wang *et al.*, 2012; Lou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). Más concretamente, el microRNA-625 se ha observado que esta desregulado en los pacientes con cáncer colorrectal, cáncer de esófago y cáncer gástrico (Wang *et al.*, 2012; Lou *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). A su vez, también se ha descrito el silenciamiento del microRNA-1247 en el cáncer gástrico (Kim *et al.*, 2014). A día de hoy no existe información sobre la desregulación de estos microRNAs en la ELO ni de sus posibles funciones en la regulación de los procesos inflamatorios y/o inmunológicos crónicos.

7.4. En relación con la caracterización del perfil de expresión aberrante de microRNAs en los subtipos de ELO

Dentro de la ELO se incluyen diferentes procesos inflamatorios crónicos de la mucosa oral como el liquen plano oral (LPO) y la lesión liquenoide oral (LLO) en los que se reconocen lesiones papulares (Aguirre, 2008).

En 2003, van der Meij y van der Waal propusieron unos criterios diagnósticos, tanto clínicos como histológicos, para diferenciar los casos “típicos” y los que sólo eran “compatibles”. Estos autores (van der Meij & van der Waal, 2003) demostraron que cuando se aplicaban estos criterios, sólo los casos diagnosticados como compatibles (LLO) mostraban un riesgo evidente de transformación maligna (van der Meij & van der Waal, 2003; van der Meij *et al.*, 2007).

Nuestro estudio, no ha podido demostrar diferencias estadísticamente significativas en el perfil de microRNAs validado en la ELO en relación con los subgrupos clínicos de LPO y de LLO.

Al hacer el análisis de los subgrupos histopatológicos, así mismo en típico y compatible, si aparecen en nuestro estudio algunos microRNAs diferentemente expresados (microRNA-146a, microRNA-150, microRNA-223). Estos 3 microRNAs siguen una tendencia similar en los dos subgrupos histopatológicos, presentando un aumento de su expresión al compararlos con el grupo control, siendo mayor en el subgrupo típico. A su vez, también observamos que los niveles de expresión del microRNA-146a en el subgrupo compatible son similares a los que aparecen en el COCE, y que descienden los del grupo control. La sobreexpresión de este microRNA ha sido demostrada en la ELO y en otros procesos relacionados con la desregulación del sistema inmunológico (Taganov *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Schaefer *et al.*, 2011). Por ello, en base a nuestros resultados, y a los obtenidos en la ontología de genes, podríamos señalar que en los casos “típicos” el proceso inflamatorio tendría un papel principal, mayor que en aquellos casos histológicamente “compatibles”. Esto apoyaría el hecho de que los casos “compatibles”, denominados como LLOs por van der Meij & van der Waal (2003), tendrían otras vías además de la inflamatoria para posibilitar su mayor potencial de transformación maligna.

7.5. En relación con la expresión aberrante de los microRNAs comunes en la ELO y el COCE

En nuestro estudio, hemos identificado 14 microRNAs que se encontraban desregulados tanto en la ELO como en el COCE. Tras aplicar los criterios de inclusión ($FC > |2|$ y una p ajustada $<0,05$), se seleccionaron 8 microRNAs, de los cuales 5 resultaron finalmente validados en un conjunto independiente de muestras (microRNA-150, microRNA-142, microRNA-146a, microRNA-7, microRNA-339).

Entre los 5 microRNAs identificados, el microRNA-146a y el microRNA-7 son los únicos cuya alteración ha sido descrita previamente en estudios realizados en COCE (Taganov *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2010; Hung *et al.*, 2012; Hung *et al.*, 2013).

Hung *et al.* (2013) al igual que nosotros, confirmaron que existe una clara sobreexpresión del microRNA-146a en el COCE. En concreto, varios receptores del sistema inmunológico como son los receptores tipo toll (TLR), los receptores de necrosis tumoral (TNFR) y receptores de la interleucina 1b (IL1R) activarían al complejo NF-kB el cual provocaría la sobreexpresión del microRNA-146a (Hung *et al.*, 2013).

En base a ello, nuestros resultados nos sugieren que el microRNA-146a podría tener un importante papel en el potencial proceso de carcinogénesis oral al mediar en la regulación de vías proinflamatorias con potencial carcinogénico (Bernitsas *et al.*, 2007; Szczepanski *et al.*, 2009; Hung *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, también hemos observado la alteración en ambos procesos del microRNA-7. El microRNA-7 se ha visto desregulado en varios cánceres entre los que se incluye el COCE (Kefas *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2009; Jiang *et al.* 2010). El estudio llevado a cabo por Jiang *et al.* (2010), demostró que el microRNA-7 es capaz de provocar subexpresión del receptor del factor de crecimiento IGF1R y por lo tanto atenuar la fosforilación o activación de la proteína quinasa AKT, lo que conlleva una disminución de la proliferación celular y un aumento de la apoptosis (Jiang *et al.*, 2010). Nuestros resultados no concuerdan con lo descrito por Jiang *et al.*, (2010). Esta discrepancia puede deberse a que el tipo de muestra empleada es diferente, ya que ellos utilizaron cultivos de líneas celulares de cáncer lingual, y nosotros biopsias y sabemos que los microRNAs son específicos de tejido y tipo celular (Lu *et al.*, 2005; Blenkiron *et al.*, 2007). Nuestros resultados en relación con la sobreexpresión del microRNA-7 en la ELO apoyarían el hecho de que se trata de un trastorno oral con bajo

riesgo de transformación maligna y en el que los mecanismos de supresión tumoral estarían funcionando adecuadamente.

Nuestro estudio ha identificado nuevos microRNAs relacionados con el COCE, que nunca habían sido anteriormente vinculados a esta neoplasia maligna, como el microRNA-339, el microRNA-142, y el microRNA-150. Aunque no existe mucha información sobre ellos y sus posibles funciones, si se sabe que se encuentran desregulados en el cáncer (Dezhong *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015). Más concretamente, el microRNA-339, aparece desregulado en el cáncer gástrico (Shen *et al.*, 2015) ya que se ha comprobado que se encuentra subexpresado en este cáncer debido al silenciamiento epigenético (Shen *et al.*, 2015).

En relación con el microRNA-150 se ha observado que está desregulado en el cáncer de prostata y en el osteosarcoma (Dezhong *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). A su vez, también se ha descrito la subexpresión del microRNA-142 en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello HPV positivo (Wald *et al.*, 2011).

Estos resultados previos, nos sugieren que estos microRNAs (microRNA-339, microRNA-142 y microRNA-150), pueden también tener papel importante en la carcinogénesis oral aunque los mecanismos en los que están involucrados aún están por descubrir.

7.6. En relación con el análisis *in silico* (Ontología de genes)

Los avances bioinformáticos han permitido la adquisición de datos a gran escala permitiendo la comparación de secuencias nucleotídicas y protéicas y demostrando que puede encontrarse una fracción considerable de genes ortólogos incluso entre organismos muy diferentes (Batzoglou, 2005).

Las tareas de investigación más comunes en biología molecular requieren comparar los datos experimentales con resultados ya publicados y con resultados de otros laboratorios, utilizando diversas herramientas de análisis. Desde hace poco tiempo, una de las técnicas que mas relevancia está adquiriendo en la investigación biomédica es la denominada “Ontología de genes” (OG) (Bodenreider, 2008). Esta ontología es el fruto de una colaboración entre las bases de datos de organismos modelos para generar vocabularios estructurados con fines de anotación (Bodenreider, 2008). La OG desarrolla vocabularios biológicos, aplicables a todas las especies, con el propósito de

anotar los productos génicos de forma consistente en las diferentes bases de datos (Bodenreider, 2008).

La OG de nuestro estudio se realizó en base a las potenciales dianas de los 20 microRNAs desregulados en la ELO y de los 106 microRNAs desregulados en el COCE.

Estos análisis revelaron que en el caso de la ELO un gran número de microRNAs se encontraban asociados a procesos biológicos relacionados principalmente con: a) el proceso inmunológico e inflamatorio como: la respuesta y regulación inmune, la respuesta celular frente a estímulos de citoquinas y la regulación positiva del proceso efector inmunológico; b) la proliferación celular y la apoptosis como: la proliferación celular y su regulación positiva, la regulación negativa del proceso de apoptosis, la fase de ejecución de la apoptosis; y c) la respuesta frente a sustancias orgánicas y al etanol. En el caso del COCE también hemos encontrado un número elevado de procesos y vías afectadas tales como: las vías de señalización de receptores transmembrana, la vía de señalización de la neurotrofina, el proceso de cicatrización y la respuesta frente a las heridas, el proceso de movimiento de los componentes celulares, etc.

La comparación de las vías afectadas por la desregulación de microRNAs en la ELO y el COCE reveló coincidencias en el contexto de la adhesión celular, el desarrollo de órganos y tejidos, la respuesta frente al etanol y a algunos virus y la respuesta inmunológica. Sin embargo, los aspectos relacionados con los procesos inmunitarios, con la proliferación celular y la apoptosis y la respuesta frente a sustancias orgánicas están más enriquecidos en la ELO que en el COCE.

El papel de los microRNAs en relación con la regulación del sistema inmunológico ha sido ampliamente estudiado desde su descubrimiento en las células de los mamíferos (Taganov *et al.*, 2006). A día de hoy se sabe que son numerosos los microRNAs capaces de desregular las vías inflamatorias y particularmente suprimir la señalización del complejo proteico NF- κ B (Taganov *et al.*, 2006; Takata *et al.*, 2011). Biológicamente, se trata de un sistema excelente y precisamente coordinado para mantener los procesos inflamatorios bajo control (Rebane & Akdis, 2013). El hecho de que los microRNAs estén involucrados en la regulación de la respuesta inmunológica sugiere que la alteración de su expresión puede estar implicada en enfermedades caracterizadas por una respuesta inmunológica anormal como la que se produce en ciertas enfermedades inflamatorias o autoinmunes (Sonkoly *et al.*, 2008). En este sentido nuestros resultados

refuerzan la hipótesis de que la ELO es un trastorno de la mucosa oral de naturaleza eminentemente inflamatoria crónica y base inmunológica. Además, que los procesos de proliferación celular y de apoptosis esten desregulados en la ELO también refuerza el hecho de que esta patología está provocada por un componente inflamatorio crónico producido por una mayor expresión de los linfocitos T y por la muerte de los queratinocitos basales al sufrir un daño continuado.

Por último, el hecho de que los procesos de respuesta a sustancias orgánicas también esten más enriquecidos en la ELO, nos podría dar una idea de que tanto el uso de fármacos, como el consumo de alcohol podrían tener un papel importante y hasta el momento poco estudiado en esta patología.

8. Conclusiones

1. Se reconoce un perfil de expresión aberrante de 20 microRNAs asociado a la enfermedad liquenoide oral.
2. Hemos reconocido un perfil de expresión aberrante asociado al carcinoma oral de células escamosas constituido por 106 microRNAs.
3. Hemos identificado 14 microRNAs cuya expresión aberrante es compartida por la enfermedad liquenoide oral y el carcinoma oral de células escamosas, de los cuales 7 han sido validados (microRNA-150, microRNA-142, microRNA-146a, microRNA-7-1, microRNA-339, microRNA-140, microRNA-1247).
4. En la enfermedad liquenoide oral se identifican microRNAs alterados que están relacionados con la respuesta inmunológica, la respuesta frente a sustancias orgánicas, la proliferación celular y la apoptosis.
5. En el carcinoma oral de células escamosas se identifican microRNAs alterados que están relacionados con la señalización de los receptores transmembrana, la cicatrización y la respuesta frente a las heridas y el movimiento de los orgánulos celulares.
6. La enfermedad liquenoide oral y el carcinoma oral de células escamosas comparten microRNAs alterados que intervienen en la respuesta inmunológica, la respuesta frente al etanol y los virus, el desarrollo celular y la adhesión celular.

9. Bibliografía

A

Accurso, BT; Warner, BM; Knobloch, TJ; Weghorst, CM; Shumway, BS; Allen, CM; Kalmar, JR. (2011). Allelic imbalance in oral lichen planus and assessment of its classification as a premalignant condition. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112 (3): 359-66.

Acha-Sagredo, A; Jimenez, Y; Bagan, JV; Echebarria-Goicouria, MA; Aguirre-Urizar, JM. (2011). Cytometric analysis of oral scrapings of patients with oral lichen planus. *Cytopathology* 22 (2): 106-110.

Aguirre Urizar, JM (2002). Oral candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 19 (1): 17-21.

Aguirre, JM; Bagán, JV; Rodriguez, C; Jimenez, Y; Martínez-Conde, R; Díaz de Rojas, F; Ponte, A. (2004). Efficacy of mometasone furoate microemulsion in the treatment of erosive-ulcerative oral lichen planus: pilotstudy. *J Oral Pathol Med* 33 (7): 381-5.

Aguirre Urizar, JM. (2008). Letter to the editor: oral lichenoid disease. A new classification proposal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13 (4): E224.

Akhtar, N; Rasheed, Z; Ramamurthy, S; Anbazhagan, AN; Voss, FR; Haqqi, TM. (2010). microRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum* 62 (5): 1361-1371.

Alexa, A; Rahnenfuhrer, J. (2010). topGO: Enrichment analysis for Gene Ontology. R package version 2.22.0.

Al-Hashimi, I; Schifter, M; Lockhart, PB; Wray, D; Brennan, M; Migliorati, CA; Axéll, T; Bruce, AJ; Carpenter; Eisenberg, E; Epstein, JB; Holmstrup, P; Jontell, M; Lozada-Nur, F; Nair, R; Silverman, B; Thongprasom, K; Thornhill, M; Warnakulasuriya, S; van der Waal, I. (2007). Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103 Suppl: S25.e1-12.

Anderson, EC; Wong, MH. (2010). Caught in the Akt: regulation of Wnt signaling in the intestine. *Gastroenterology* 139 (3): 718-722.

Arão, TC; Guimaraes, AL; de Paula, AM; Gomes, CC; Gomez, RS. (2012). Increased miRNA-146a and miRNA-155 expressions in oral lichen planus. *Arch Dermatol Res* 304 (5): 371-375.

Avissar, M; Christensen, BC; Kelsey, KT; Marsit, CJ. (2009). microRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15 (8): 2850-2855.

B

Bader, AG. (2012). miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet* 2(3): 120.

Bagan Sebastian, JV; Ceballos, A; Bermejo, A; Aguirre-Urizar, JM; Peñarrocha, MA. (1995). Lesiones y estados precancerosos de la mucosa oral.

Bagan Sebastian, JV. (2010). *Medicina Bucal*, 2ª Edition.

Barbarotto, E; Schmittgen, TD; Calin, GA. (2008). microRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer* 122 (5): 969-977.

Barnes, L; Eveson, JW; Reichart, P; Sidransky, D. (2005). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.

Bartel, DP. (2004). microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2): 281-297.

Bartel, DP. (2009). microRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136 (2): 215-233.

Bascones-Ilundain, C; Gonzalez-Moles, MA; Esparza-Gómez, G; Gil-Montoya, JA; Bascones-Martínez, A. (2006). Importance of apoptotic mechanisms in inflammatory infiltrate of oral lichen planus lesions. *Anticancer Res* 26 (1): 357-62.

Batzoglou, S. (2005). The many faces of sequence alignment. *Brief Bioinform* 6 (1): 6-22.

Bediaga, NG; Davies, MP; Acha-Sagredo, A; Hyde, R; Raji, OY; Page, R; Walshaw, M; Gosney, J; Alfirevic, A; Field, JK; & Liloglou, T. (2013). A microRNA-based prediction algorithm for diagnosis of non-small lung cell carcinoma in minimal biopsy material. *Br J Cancer* 109 (9): 2404-2411.

Bediaga, NG; Marichalar-Mendia, X; Aguirre-Urizar, JM; Calvo, B; Echebarria-Goicouria, MA; de Pancorbo, MM; Acha-Sagredo A. (2014). Global DNA methylation: uncommon event in oral lichenoid disease. *Oral Dis* 20 (8): 821-6.

Bergmann, C; Bachmann, HS; Bankfalvi, A; Lotfi, R; Pütter, C; Wild, CA; Schuler, PJ; Greve, J; Hoffmann, TK; Lang, S; Scherag, A; Lehnerdt, GF. (2011). Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cellcarcinomas. *J Transl Med* 9: 139.

Bermejo-Fenoll, A; Sanchez-Siles, M; Lopez-Jornet, P; Camacho-Alonso, F; Salazar-Sanchez, N. (2009). Premalignant nature of oral lichen planus. A retrospective study of 550 oral lichen planus patients from south-eastern Spain. *Oral Oncol* 45 (8): e54-e56.

Bhaumik, D; Scott, GK; Schokrpur, S; Patil, CK; Campisi, J; Benz, CC. (2008). Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* 27 (42): 5643-5647.

Blenkiron, C; Goldstein, LD; Thorne, NP; Spiteri, I; Chin, SF; Dunning, MJ; Barbosa-Morais, NL; Teschendorff, AE; Green, AR; Ellis, IO; Tavare, S; Caldas, C; Miska, EA. (2007). microRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 8 (10): R214.

Bodenreider, O. (2008). Biomedical ontologies in action: role in knowledge management, data integration and decision support. *Yearb Med Inform*: 67-79.

Bonci, D; Coppola, V; Musumeci, M; Addario, A; Giuffrida, R; Memeo, L; D'Urso, L; Pagliuca, A; Biffoni, M; Labbaye, C; Bartucci, M; Muto, G; Peschle, C; de Maria, R. (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 14 (11): 1271-1277.

Brandwein-Gensler, M; Teixeira, MS; Lewis, CM; Lee, B; Rolnitzky, L; Hille, JJ; Genden, E; Urken, ML; Wang, BY. (2005). Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 29(2): 167-78.

Brase, JC; Wuttig, D; Kuner, R; Sultmann, H. (2010). Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 9: 306.

Bray, F; Ren, JS; Masuyer, E; Ferlay, J. (2013). Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 132 (5): 1133-45.

Budhu, A; Ji, J; & Wang, XW. (2010). The clinical potential of microRNAs. *J Hematol Oncol* 3: 37.

Bushati, N; Cohen, SM. (2007). microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:175-205.

C

Califano, J; van der Riet, P; Westra, W; Nawroz, H; Clayman, G; Piantadosi, S; Corio, R; Lee, D; Greenberg, B; Koch, W; Sidransky, D. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56 (11): 2488-92.

Calin, GA; Dumitru, CD; Shimizu, M; Bichi, R; Zupo, S; Noch, E; Aldler, H; Rattan, S; Keating, M; Rai, K; Rassenti, L; Kipps, T; Negrini, M; Bullrich, F; Croce, CM. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (24): 15524-15529.

Calin, GA; Sevignani, C; Dumitru, CD; Hyslop, T; Noch, E; Yendamuri, S; Shimizu, M; Rattan, S; Bullrich, F; Negrini, M; Croce, CM. (2004). Human microRNA genes are

frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (9): 2999-3004.

Calin, GA; Ferracin, M; Cimmino, A; Di Leva, G; Shimizu, M; Wojcik, SE; Iorio, MV; Visone, R; Sever, NI; Fabbri, M; Iuliano, R; Palumbo, T; Pichiorri, F; Roldo, C; Garzon, R; Sevignani, C; Rassenti, L; Alder, H; Volinia, S; Liu, CG; Kipps, TJ; Negrini, M; Croce, CM. (2005). A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353 (17): 1793-1801.

Calin, GA; Croce, CM. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6 (11): 857-66.

Carbone, M; Arduino, PG; Carrozzo, M; Caiazzo, G; Broccoletti, R; Conrotto, D; Bezzo, C; Gandolfo, S. (2009). Topical clobetasol in the treatment of atrophic-erosive oral lichen planus: a randomized controlled trial to compare two preparations with different concentrations. *J Oral Pathol Med* 38 (2): 227-33.

Carrozzo, M; & Gandolfo, S. (2003). Oral diseases possibly associated with hepatitis C virus. *Crit Rev Oral Biol Med* 14 (2): 115-127.

Carrozzo, M; Uboldi de Capei, M; Dametto, E; Fasano, ME; Arduino, P; Broccoletti, R; Veza, D; Rendine, S; Curtioni, ES; Gandolfo, S. (2004). Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 122 (1): 87-94.

Carrozzo, M; Brancatello, F; Dametto, E; Arduino, P; Pentenero, M; Rendine, S; Porter, SR; Lodi, G; Scully, C; Gandolfo, S. (2005). Hepatitis C virus-associated oral lichen planus: is the geographical heterogeneity related to HLA-DR6? *J Oral Pathol Med* 34 (4): 204-8.

Carthew, RW; Sontheimer, EJ. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136 (4): 642-55.

Cascio, S; D'Andrea, A; Ferla, R; Surmacz, E; Gulotta, E; Amodio, V; Bazan, V; Gebbia, N; Russo, A. (2010). miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Physiol* 224 (1): 242-9.

Cervigne, NK; Reis, PP; Machado, J; Sadikovic, B; Bradley, G; Galloni, NN; Pintilie, M; Jurisica, I; Perez-Ordóñez, B; Gilbert, R; Gullane, P; Irish, J; Kamel-Reid, S. (2009). Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet* 18 (24): 4818-4829.

Chainani-Wu, N; Silverman, S Jr; Lozada-Nur, F; Mayer, P; Watson, JJ. (2001). Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 132 (7): 901-9.

Chang, CC; Yang, YJ; Li, YJ; Chen, ST; Lin, BR; Wu, TS; Lin, SK; Kuo, MY; Tan, CT. (2013). microRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49 (9): 923-931.

Chang, SS; Jiang, WW; Smith, I; Poeta, LM; Begum, S; Glazer, C; Shan, S; Westra, W; Sidransky, D; Califano, JA. (2008). microRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 123 (12): 2791-2797.

Chaiyarit, P; Ma, N; Hiraku, Y; Pinlaor, S; Yongvanit, P; Jintakanon, D; Murata, M; Oikawa, S; Kawanishi, S. (2005). Nitrate and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis. *Cancer Sci* 96 (9): 553-9.

Chen, CZ; Li, L; Lodish, HF; & Bartel, DP. (2004). microRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303 (5654): 83-86.

Chen, LH; Tsai, KL; Chen, YW; Yu, CC; Chang, KW; Chiou, SH; Ku, HH; Chu, PY; Tseng, LM; Huang, PI; & Lo, WL. (2010). microRNA as a Novel Modulator in Head and Neck Squamous Carcinoma. *J Oncol* 2010: 135632.

Childs, G; Fazzari, M; Kung, G; Kawachi, N; Brandwein-Gensler, M; McLemore, M; Chen, Q; Burk, RD; Smith, RV; Prystowsky, MB; Belbin, TJ; Schlecht, NF. (2009). Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 174 (3): 736-745.

Chiyomaru, T; Enokida, H; Tatarano, S; Kawahara, K; Uchida, Y; Nishiyama, K; Fujimura, L; Kikkawa, N; Seki, N; Nakagawa, M. (2010). miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. *Br J Cancer* 102 (5): 883-891.

Chuang, HC; Huang, CC; Chien, CY; Chuang, JH. (2012). Toll-like receptor 3-mediated tumor invasion in head and neck cancer. *Oral Oncol* 48 (3): 226-32.

Cimmino, A; Calin, GA; Fabbri, M; Iorio, MV; Ferracin, M; Shimizu, M; Wojcik, SE; Aqeilan, RI; Zupo, S; Dono, M; Rassenti, L; Alder, H; Volinia, S; Liu, CG; Kipps, TJ; Negrini, M; Croce, CM. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (39): 13944-9.

Clague, J; Lippman, SM; Yang, H; Hildebrandt, MA; Ye, Y; Lee, JJ; Wu, X. (2010). Genetic variation in microRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Mol Carcinog* 49 (2): 183-189.

Cobb, BS; Hertweck, A; Smith, J; O'Connor, E; Graf, D; Cook, T; Smale, ST; Sakaguchi, S; Livesey, FJ; Fisher, AG; Merckenschlager, M. (2006). A role for Dicer in immune regulation. *J Exp Med* 203 (11): 2519-2527.

Cobos-Fuentes, MJ; Martinez-Sahuquillo-Marquez, A; Gallardo-Castillo, I; Armas-Padron, JR; Moreno-Fernandez, A; Bullon-Fernandez, P. (2009). Oral lichenoid lesions

related to contact with dental materials: a literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14 (10): e514-e520.

Cortes-Ramirez, DA; Gainza-Cirauqui, ML; Echebarria-Goikouria, MA; Aguirre-Urizar, JM. (2009). Oral lichenoid disease as a premalignant condition: the controversies and the unknown. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14 (3): E118-E122.

Cortes-Ramirez, DA; Rodriguez-Tojo, MJ; Coca-Meneses, JC; Marichalar-Mendia, X; Aguirre-Urizar, JM. (2014). Epidermal growth factor receptor expression in different subtypes of oral lichenoid disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 19 (5): e451-e458.

Croce, CM. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10 (10): 704-714.

D

Dang, J; Bian, YQ; Sun, JY; Chen, F; Dong, GY; Liu, Q; Wang, XW; Kjems, J; Gao, S; Wang, QT. (2013). microRNA-137 promoter methylation in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 42 (4): 315-321.

Danielsson, K; Wahlin, YB; Gu, X; Boldrup, L; Nylander, K. (2012). Altered expression of miR-21, miR-125b, and miR-203 indicates a role for these microRNAs in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 41 (1): 90-95.

De Sarkar, N; Roy, R; Mitra, JK; Ghose, S; Chakraborty, A; Paul, RR; Mukhopadhyay, I; Roy, B. (2014). A quest for miRNA bio-marker: a track back approach from gingivo buccal cancer to two different types of precancers. *PLoS One* 9 (8): e104839.

Dezhong, L; Xiaoyi, Z; Xianlian, L; Hongyan, Z; Guohua, Z; Bo, S; Shenglei, Z; Lian, Z. (2015). miR-150 is a factor of survival in prostate cancer patients. *J BUON* 20 (1): 173-9.

dos Santos Pereira, J; Fontes, FL; de Medeiros, SR; de Almeida Freitas, R; de Souza, LB; da Costa Miguel, MC. (2016). Association of the XPD and XRCC3 gene polymorphisms with oral squamous cell carcinoma in a Northeastern Brazilian population: A pilot study. *Arch Oral Biol* 64: 19-23.

Du, T; Zamore, PD. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132 (21): 4645-52.

Dvinge, H; Bertone, P. (2009). HTqPCR: high-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. *Bioinformatics* 25 (24): 3325-3326.

Dweep, H; Sticht, C; Pandey, P; Gretz, N. (2011). miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 44 (5): 839-847

E

Ebrahimi, M; Boldrup, L; Wahlin, YB; Coates, PJ; Nylander, K. (2008). Decreased expression of the p63 related proteins beta-catenin, E-cadherin and EGFR in oral lichen planus. *Oral Oncol* 44 (7): 634-638.

Ebrahimi, M; Nylander, K; van der Waal, I. (2011). Oral lichen planus and the p53 family: what do we know? *J Oral Pathol Med* 40 (4): 281-5.

Eisen, D. (2002). The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol* 46 (2): 207-214.

Eisen, D; Carrozzo, M; Bagan Sebastian, JV; Thongprasom, K. (2005). Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis* 11(6): 338-49.

Esmaili, T; Lozada-Nur, F; Epstein, J. (2005). Common benign oral soft tissue masses. *Dent Clin North Am* 49 (1): 223-40.

Evans, AV; Fletcher, CL; Owen, WJ; Hay, RJ. (2000). Oesophageal lichen planus. *Clin Exp Dermatol* 25 (1): 36-7.

F

Farhi, D; Dupin, N. (2010). Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol* 28 (1): 100-8.

Favaro, E; Ramachandran, A; McCormick, R; Gee, H; Blancher, C; Crosby, M; Devlin, C; Blick, C; Buffa, F; Li, JL; Vojnovic, B; Pires das Neves, R; Glazer, P; Iborra, F; Ivan, M; Ragoussis, J; Harris, AL. (2010). MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells bytargeting iron sulfur cluster protein ISCU. *PLoS One* 5 (4): e10345.

Fazi, F; Rosa, A; Fatica, A; Gelmetti, V; De Marchis, ML; Nervi, C; Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 123 (5): 819-831.

Fearon, ER; Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5): 759-767.

Feinberg, AP; Ohlsson, R; Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7 (1): 21-33.

Femiano, F; Scully, C. (2005). DNA cytometry of oral leukoplakia and oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 10 Suppl 1: E9-14.

Ferlay, J; Soerjomataram, I; Ervik, M; Dikshit, R; Eser, S. (2013). Globocan 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancerbase No. 11.

Filipowicz, W; Bhattacharyya, SN; Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9 (2): 102-114.

Fourie, NH; Peace, RM; Abey, SK; Sherwin, LB; Rahim-Williams, B; Smyser, PA; Wiley, JW; Henderson, WA. (2014). Elevated circulating miR-150 and miR-342-3p in patients with irritable bowel syndrome. *Exp Mol Pathol* 96 (3): 422-425.

Friedman, RC; Farh, KK; Burge, CB; Bartel, DP. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19 (1): 92-105.

Fu, X; Han, Y; Wu, Y; Zhu, X; Lu, X; Mao, F; Wang, X; He, X; Zhao, Y; Zhao, Y. (2011). Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest* 41 (11): 1245-1253.

G

Gainza-Cirauqui, ML; Nieminen, MT; Novak Frazer, L; Aguirre-Urizar, JM; Moragues, MD; Rautemaa, R. (2013). Production of carcinogenic acetaldehyde by *Candida albicans* from patients with potentially malignant oral mucosal disorders. *J Oral Pathol Med* 42 (3):243-9.

Gandolfo, S; Richiardi, L; Carrozzo, M; Broccoletti, R; Carbone, M; Pagano, M; Vestita, C; Rosso, S; Merletti, F. (2004). Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol* 40 (1): 77-83.

Gasche, JA; Goel, A. (2012). Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol* 8 (11): 1407-1425.

Gasco, M; Crook, T. (2003). The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol* 39 (3): 222-231.

Gassling, V; Hampe, J; Acil, Y; Braesen, JH; Wiltfang, J; Hasler, R. (2013). Disease-associated miRNA-mRNA networks in oral lichen planus. *PLoS One* 8 (5): e63015.

Gomes, CC; Gomez, RS. (2008). microRNA and oral cancer: future perspectives. *Oral Oncol* 44 (10): 910-914.

Gonzalez-Moles, MA; Scully, C; & Gil-Montoya, JA. (2008). Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis* 14 (3): 229-243.

Gonzalez-Moles, MA; Scully, C; Ruiz-Avila, I. (2012). Molecular findings in oral premalignant fields: update on their diagnostic and clinical implications. *Oral Dis* 18 (1): 40-7.

Gorenchtein, M; Poh, CF; Saini, R; Garnis, C. (2012). microRNAs in an oral cancer context - from basic biology to clinical utility. *J Dent Res* 91 (5): 440-446.

Grady, WM; Parkin, RK; Mitchell, PS; Lee, JH; Kim, YH; Tsuchiya, KD; Washington, MK; Paraskeva, C; Willson, JK; Kaz, AM; Kroh, EM; Allen, A; Fritz, BR; Markowitz, SD; Tewari, M. (2008). Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* 27 (27): 3880-3888.

Gramantieri, L; Ferracin, M; Fornari, F; Veronese, A; Sabbioni, S; Liu, CG; Calin, GA; Giovannini, C; Ferrazzi, E; Grazi, GL; Croce, CM; Bolondi, L; Negrini, M. (2007). Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 67 (13): 6092-9.

Gramantieri, L; Fornari, F; Ferracin, M; Veronese, A; Sabbioni, S; Calin, GA; Grazi, GL; Croce, CM; Bolondi, L; Negrini, M. (2009). MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res* 15 (16): 5073-81.

Grandis, JR; Tweardy, DJ. (1993). TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. *J Cell Biochem Suppl* 17F: 188-191.

H

Ha, PK; Califano, JA. (2006). Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 7 (1): 77-82.

Han, L; Witmer, PD; Casey, E; Valle, D; Sukumar, S. (2007). DNA methylation regulates microRNA expression. *Cancer Biol Ther* 6 (8): 1284-1288.

Hasséus, B; Jontell, M; Bergenholtz, G; Eklund, C; Dahlgren, UI. (1999). Langerhans cells from oral epithelium are more effective in stimulating allogeneic t-cells in vitro than Langerhans cells from skin epithelium. *J Dent Res* 78 (3): 751-8.

Hasséus, B; Jontell, M; Bergenholtz, G; Dahlgren, UI. (2004). Langerhans cells from human oral epithelium are more effective at stimulating allogeneic T cells in vitro than Langerhans cells from skin. *Clin Exp Immunol* 136 (3): 483-9.

Hayashita, Y; Osada, H; Tatematsu, Y; Yamada, H; Yanagisawa, K; Tomida, S; Yatabe, Y; Kawahara, K; Sekido, Y; Takahashi, T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 65 (21): 9628-9632.

Hebert, C; Norris, K; Scheper, MA; Nikitakis, N; Sauk, JJ. (2007). High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 6: 5.

Helander, SD; Rogers, RS. (1994). The sensitivity and specificity of direct immunofluorescence testing in disorders of mucous membranes. *J Am Acad Dermatol* 30 (1): 65-75.

Henson, BJ; Bhattacharjee, S; O'Dee, DM; Feingold, E; Gollin, SM. (2009). Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. *Genes Chromosomes Cancer* 48 (7): 569-582.

Hocking, JS; Stein, A; Conway, EL; Regan, D; Grulich, A; Law, M; Brotherton, JM. (2011). Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br J Cancer* 104 (5): 886-91.

Hosni, ES; Yurgel, LS; Silva, VD. (2010). DNA ploidy in oral lichen planus, determined by image cytometry. *J Oral Pathol Med* 39 (3): 206-211.

Hsu, CM; Lin, PM; Wang, YM; Chen, ZJ; Lin, SF; Yang, MY. (2012). Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 33 (6): 1933-1942.

Huang, WC; Chan, SH; Jang, TH; Chang, JW; Ko, YC; Yen, TC; Chiang, SL; Chiang, WF; Shieh, TY; Liao, CT; Juang, JL; Wang, HC; Cheng, AJ; Lu, YC; Wang, LH. (2014). miRNA-491-5p and GIT1 serve as modulators and biomarkers for oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 74 (3): 751-764.

Hui, AB; Lenarduzzi, M; Krushel, T; Waldron, L; Pintilie, M; Shi, W; Perez-Ordóñez, B; Jurisica, I; O'Sullivan, B; Waldron, J; Gullane, P; Cummings, B; Liu, FF. (2010). Comprehensive microRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 16 (4): 1129-1139.

Hung, PS; Chang, KW; Kao, SY; Chu, TH; Liu, CJ; Lin, SC. (2012). Association between the rs2910164 polymorphism in pre-mir-146a and oral carcinoma progression. *Oral Oncol* 48(5): 404-8.

Hung, PS; Liu, CJ; Chou, CS; Kao, SY; Yang, CC; Chang, KW; Chiu, TH; Lin, SC. (2013). miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes. *PLoS One* 8 (11): e79926.

Hunt, S; Jones, AV; Hinsley, EE; Whawell, SA; Lambert, DW. (2011). microRNA-124 suppresses oral squamous cell carcinoma motility by targeting ITGB1. *FEBS Lett* 585 (1): 187-192.

I

Ingafou, M; Leao, JC; Porter, SR; Scully, C. (2006). Oral lichen planus: a retrospective study of 690 British patients. *Oral Dis* 12 (5): 463-468.

Iorio, MV; Visone, R; Di, Leva G; Donati, V; Petrocca, F; Casalini, P; Taccioli, C; Volinia, S; Liu, CG; Alder, H; Calin, GA; Menard, S; Croce, CM. (2007). microRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67 (18): 8699-8707.

Ismail, SB; Kumar, SK; Zain, RB. (2007). Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci* 49 (2): 89-106.

Izarzugaza, MI; Esparza, H; Aguirre, JM. (2001). Epidemiological aspects of oral and pharyngeal cancers in the Basque Country. *J Oral Pathol Med* 30 (9): 521-526.

Izarzugaza, MI; Martínez, R; Audícana, C; Larrañaga, N; Hernández, E; Tobalina, MC; de Miguel, AR; Michelena, MJ; López de Lacalle, J. (2010). El cáncer en el País Vasco. Incidencia, mortalidad, supervivencia y evolución temporal. 2010.

J

Jackson-Bernitsas, DG; Ichikawa, H; Takada, Y; Myers, JN; Lin, XL; Darnay, BG; Chaturvedi, MM; Aggarwal, BB. (2006). Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 26 (10): 1385-97.

Jakymiw, A; Patel, RS; Deming, N; Bhattacharyya, I; Shah, P; Lamont, RJ; Stewart, CM; Cohen, DM; Chan, EK. (2010). Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 microRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 49 (6): 549-559.

Javaid, MA; Ahmed, AS; Durand, R; Tran, SD. (2016). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *J Oral Biol Craniofac Res* 6 (1): 66-75.

Jiang, L; Liu, X; Kolokythas, A; Yu, J; Wang, A; Heidbreder, CE; Shi, F; Zhou, X. (2010). Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 127 (3): 505-512.

Jiang, L; Dai, Y; Liu, X; Wang, C; Wang, A; Chen, Z; Heidbreder, CE; Kolokythas, A; Zhou, X. (2011). Identification and experimental validation of G protein alpha inhibiting activity polypeptide 2 (GNAI2) as a microRNA-138 target in tongue squamous cell carcinoma. *Hum Genet* 129 (2): 189-97.

Jin, Y; Chen, D; Cabay, RJ; Wang, A; Crowe, DL; Zhou, X. (2013). Role of microRNA-138 as a potential tumor suppressor in head and neck squamous cell carcinoma. *Int Rev Cell Mol Biol* 303: 357-385.

Johnson, SM; Grosshans, H; Shingara, J; Byrom, M; Jarvis, R; Cheng, A; Labourier, E; Reinert, KL; Brown, D; Slack, FJ. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120 (5): 635-647.

Jones, JI; Gockerman, A; Busby, WH; Camacho-Hubner, C; Clemmons, DR. (1993). Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J Cell Biol* 121 (3): 679-687.

Jones-Rhoades, MW; Bartel, DP; Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57: 19-53.

Juneja, M; Mahajan, S; Rao, NN; George, T; Boaz, K. (2006). Histochemical analysis of pathological alterations in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *J Oral Sci* 48 (4): 185-93.

K

Kanasty, RL; Whitehead, KA; Vegas, AJ; Anderson, DG. (2012) Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Mol Ther* 20 (3): 513-24.

Karbiener, M; Fischer, C; Nowitsch, S; Opriessnig, P; Papak, C; Ailhaud, G; Dani, C; Amri, EZ; Scheideler, M. (2009). microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 390 (2): 247-251.

Kefas, B; Godlewski, J; Comeau, L; Li, Y; Abounader, R; Hawkinson, M; Lee, J; Fine, H; Chiocca, EA; Lawler, S; Purow, B. (2008). microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res* 68 (10): 3566-3572.

Kemp, RA; Ronchese, F. (2001). Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol* 167 (11): 6497-6502.

Kent, OA; Mendell, JT. (2006). A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 25 (46): 6188-6196.

Kent, OA; Chivukula, RR; Mullendore, M; Wentzel, EA; Feldmann, G; Lee, KH; Liu, S; Leach, SD; Maitra, A; Mendell, JT. (2010). Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. *Genes Dev* 24 (24): 2754-2759.

Kfir, Y; Buchner, A; Hansen, LS. (1980). Reactive lesions of the gingiva. A clinicopathological study of 741 cases. *J Periodontol* 51 (11): 655-61.

Kim, J; Yook, J; Lee, EH; Ryu, MH; Yoon, JH; Hong, JC; Kim, DJ; Kim, HS. (2001). Evaluation of premalignant potential in oral lichen planus using interphase cytogenetics. *J Oral Pathol Med* 30 (2): 65-72.

Kim, JG; Kim, TO; Bae, JH; Shim, JW; Kang, MJ; Yang, K; Ting, AH; Yi, JM. (2014). Epigenetically regulated miR-941 and miR-1247 target gastric cancer cell growth and migration. *Epigenetics* 9 (7): 1018-1030.

Kimkong, I; Hirankarn, N; Nakkuntod, J; Kitkumthorn, N. (2011). Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and susceptibility to oral lichen planus. *Oral Dis* 17 (2): 206-9.

Kimkong, I; Nakkuntod, J; Sodsai, P; Hirankarn, N; Kitkumthorn, N. (2012). Association of interferon-gamma gene polymorphisms with susceptibility to oral lichen planus in the Thai population. *Arch Oral Biol* 57 (5): 491-4.

Kingma, DW; Allen, RA; Moore, W; Caughron, SK; Melby, M; Gillies, EM; Marlar, RA; Dunn, ST. (2010). HPV genotype distribution in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma using seven in vitro amplification assays. *Anticancer Res* 30 (12): 5099-104.

Kinoshita, T; Nohata, N; Yoshino, H; Hanazawa, T; Kikkawa, N; Fujimura, L; Chiyomaru, T; Kawakami, K; Enokida, H; Nakagawa, M; Okamoto, Y; Seki, N. (2012). Tumor suppressive microRNA-375 regulates lactate dehydrogenase B in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 40 (1): 185-193.

Kolokythas, A; Zhou, Y; Schwartz, JL; Adami, GR. (2015). Similar Squamous Cell Carcinoma Epithelium microRNA Expression in Never Smokers and Ever Smokers. *PLoS One* 10 (11): e0141695.

Kozaki, K; Imoto, I; Mogi, S; Omura, K; Inazawa, J. (2008). Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 68 (7): 2094-2105.

Kozomara, A; Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42 (Database issue): D68-D73.

Kredo-Russo, S; Ness, A; Mandelbaum, AD; Walker, MD; Hornstein, E. (2012). Regulation of pancreatic microRNA-7 expression. *Exp Diabetes Res* 2012: 695214.

Krogh, P; Hald, B; Holmstrup, P. (1987). Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. *Carcinogenesis* 8 (10): 1543-1548.

L

Lajer, CB; Nielsen, FC; Friis-Hansen, L; Norrild, B; Borup, R; Garnaes, E; Rossing, M; Specht, L; Therkildsen, MH; Nauntofte, B; Dabelsteen, S; von Buchwald, C. (2011). Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer* 104 (5): 830-840.

Lanford, RE; Hildebrandt-Eriksen, ES; Petri, A; Persson, R; Lindow, M; Munk, ME; Kauppinen, S; Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327(5962): 198-201.

Lanfranchi-Tizeira, HE; Aguas, SC; Sano, SM. (2003). Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. *Med Oral* 8 (1): 2-9.

Langevin, SM; Stone, RA; Bunker, CH; Grandis, JR; Sobol, RW; Taioli, E. (2010). microRNA-137 promoter methylation in oral rinses from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with gender and body mass index. *Carcinogenesis* 31 (5): 864-870.

Layland, MK; Sessions, DG; Lenox, J. (2005). The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope* 115 (4): 629-39.

Lee, Y; Yang, X; Huang, Y; Fan, H; Zhang, Q; Wu, Y; Li, J; Hasina, R; Cheng, C; Lingem, MW; Gerstein, MB; Weichselbaum, RR; Xing, HR; Lussier, YA. (2010). Network modeling identifies molecular functions targeted by miR-204 to suppress head and neck tumormetastasis. *PLoS Comput Biol* 6 (4): e1000730.

Lee, YH; Wong, DT. (2009). Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent* 22 (4): 241-8.

Li, J; Huang, H; Sun, L; Yang, M; Pan, C; Chen, W; Wu, D; Lin, Z; Zeng, C; Yao, Y; Zhang, P; Song, E. (2009). miR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res* 15 (12): 3998-4008.

Li, X; Lin, R; Li, J. (2011). Epigenetic silencing of microRNA-375 regulates PDK1 expression in esophageal cancer. *Dig Dis Sci* 56 (10): 2849-2856.

Li, X; Chen, L; Wang, W; Meng, FB; Zhao, RT; Chen, Y. (2015). MicroRNA-150 Inhibits Cell Invasion and Migration and Is Downregulated in Human Osteosarcoma. *Cytogenet Genome Res* 146 (2): 124-35.

Lim, LP; Lau, NC; Garrett-Engele, P; Grimson, A; Schelter, JM; Castle, J; Bartel, DP; Linsley, PS; Johnson, JM. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433 (7027): 769-73.

Lin, S; Liu, CJ; Lin, JA; Chiang, WF; Hung, PS; Chang, KW. (2010). miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncol* 46 (3): 204-8.

Lin, SL; Chiang, A; Chang, D; Ying, SY. (2008). Loss of miR-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA* 14 (3): 417-424.

Liu, CJ; Kao, SY; Tu, HF; Tsai, MM; Chang, KW; Lin, SC. (2010). Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis* 16 (4): 360-364.

Liu, GX; Xie, Q; Zhou, CJ; Zhang, XY; Ma, BL; Wang, CQ; Wei, FC; Qu, X; Sun, SZ. (2011). The possible roles of OPN-regulated CEACAM1 expression in promoting the survival of

activated T cells and the apoptosis of oral keratinocytes in oral lichen planus patients. *J Clin Immunol* 31 (5): 827-39.

Liu, X; Yu, J; Jiang, L; Wang, A; Shi, F; Ye, H; Zhou, X. (2009). microRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 6 (3): 131-139.

Liu, Z; Li, G; Wei, S; Niu, J; El-Naggar, AK; Sturgis, EM; Wei, Q. (2010). Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 116 (20): 4753-4760.

Lo, WY; Wang, HJ; Chiu, CW; Chen, SF. (2012). miR-27b-regulated TCTP as a novel plasma biomarker for oral cancer: from quantitative proteomics to post-transcriptional study. *J Proteomics* 77: 154-166.

Lodi, G; Scully, C; Carrozzo, M; Griffiths, M; Sugarman, PB; Thongprasom, K. (2005). Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100 (2): 164-178.

Lodi, G; Pellicano, R; Carrozzo, M. (2010). Hepatitis C virus infection and lichen planus: a systematic review with meta-analysis. *Oral Dis* 16 (7): 601-612.

Lopez de Munain, A; Audicana, C; Errezola, M; Tobalina, MC; Bidaurrezaga, J; de la Cruz, M; Hurtado, R; Larrañaga, N; San Sebastian, MC. Incidencia del cáncer en la comunidad autónoma del país vasco. www.osakidetza.euskadi.eus.

Lopez-Jornet, P; Camacho-Alonso, F. (2010). Clinical assessment of oral lichen planus based on different scales. *Int J Dermatol* 49 (3): 272-275.

Lou, X; Qi, X; Zhang, Y; Long, H; Yang, J. (2013). Decreased expression of microRNA-625 is associated with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol* 108 (4): 230-235.

Lu, J; Getz, G; Miska, EA; Alvarez-Saavedra, E; Lamb, J; Peck, D; Sweet-Cordero, A; Ebert, BL; Mak, RH; Ferrando, AA; Downing, JR; Jacks, T; Horvitz, HR; Golub, TR. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435 (7043): 834-8.

Lu, Z; Liu, M; Stribinskis, V; Klinge, CM; Ramos, KS; Colburn, NH; Li, Y. (2008). microRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 27 (31): 4373-4379.

Lui, WO; Pourmand, N; Patterson, BK; Fire, A. (2007). Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res* 67 (13): 6031-6043.

M

MacLellan, SA; Lawson, J; Baik, J; Guillaud, M; Poh, CF; Garnis, C. (2012). Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer Med* 1 (2): 268-274.

Martínez-Conde, R; Aguirre, JM; Burgos, JJ; Rivera, JM. Clinicopathological factors in early squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth, in Biscay (the Basque Country, Spain). (2001). *Med Oral* 6 (2): 87-94.

Mattsson, U; Jontell, M; Holmstrup, P. (2002). Oral lichen planus and malignant transformation: is a recall of patients justified? *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (5): 390-6.

Mavrakis, KJ; van der Meulen, J; Wolfe, AL; Liu, X; Mets, E; Taghon, T; Khan, AA; Setty, M; Rondou, P; Vandenberghe, P; Delabesse, E; Benoit, Y; Socci, NB; Leslie, CS; van Vlierberghe P; Speleman, F; Wendel, HG. (2011). A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nat Genet* 43 (7): 673-678.

McCormick, R; Buffa, FM; Ragoussis, J; Harris, AL. (2010). The role of hypoxia regulated microRNAs in cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 345:47-70.

Meek, DW. (2004). The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9): 1049-1056.

Mignogna, MD; Fedele, S; Lo Russo, L; Lo Muzio, L; Bucci, E. (2004). Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence? *Oral Oncol* 40 (2): 120-30.

Mignogna, MD; Fedele, S; Lo Russo, L. (2006). Dysplasia/neoplasia surveillance in oral lichen planus patients: a description of clinical criteria adopted at a single centre and their impact on prognosis. *Oral Oncol* 42 (8): 819-24.

Mignogna, MD; Fedele, S; Lo, Russo L; Mignogna, C; de Rosa G; Porter, SR. (2007). Field cancerization in oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol* 33 (3): 383-389.

Miska, EA. (2005). How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 15 (5): 563-568.

Mitomo, S; Maesawa, C; Ogasawara, S; Iwaya, T; Shibasaki, M; Yashima-Abo, A; Kotani, K; Oikawa, H; Sakurai, E; Izutsu, N; Kato, K; Komatsu, H; Ikeda, K; Wakabayashi, G; Masuda, T. (2008). Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 99 (2): 280-286.

Molnár, A; Schwach, F; Studholme, DJ; Thuenemann, EC; Baulcombe, DC. (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447 (7148): 1126-9.

Muljo, SA; Ansel, KM; Kanellopoulou, C; Livingston, DM; Rao, A; Rajewsky, K. (2005). Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* 202 (2): 261-269.

Mutallip, M; Nohata, N; Hanazawa, T; Kikkawa, N; Horiguchi, S; Fujimura, L; Kawakami, K; Chiyomaru, T; Enokida, H; Nakagawa, M; Okamoto, Y; Seki, N. (2011). Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) suppresses cell apoptosis and its regulation by miR-133alpha in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Int J Mol Med* 27 (3): 345-352.

N

Nakasa, T; Miyaki, S; Okubo, A; Hashimoto, M; Nishida, K; Ochi, M; Asahara, H. (2008). Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 58 (5): 1284-1292.

Naqvi, AR; Islam, MN; Choudhury, NR; Haq, QM. (2009). The fascinating world of RNA interference. *Int J Biol Sci* 5 (2): 97-117.

Nohata, N; Hanazawa, T; Kikkawa, N; Mutallip, M; Sakurai, D; Fujimura, L; Kawakami, K; Chiyomaru, T; Yoshino, H; Enokida, H; Nakagawa, M; Okamoto, Y; Seki, N. (2011). Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Hum Genet* 56 (8): 595-601.

Numasawa, H; Yamamoto, N; Katakura, A; Shibahara, T. (2005). Loss of heterozygosity and microsatellite instability on chromosome 2q in human oral squamous cell carcinoma. *Bull Tokyo Dent Coll* 46 (1-2): 17-25.

Nylander, E; Ebrahimi, M; Wahlin, Y. B; Boldrup, L; Nylander, K. (2012). Changes in miRNA expression in sera and correlation to duration of disease in patients with multifocal mucosal lichen planus. *J Oral Pathol Med* 41 (1): 86-89.

O

Okamura, K; Hagen, JW; Duan, H; Tyler, DM; Lai, EC. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130 (1): 89-100.

Ortholan, C; Lusinchi, A; Italiano, A; Bensadoun, RJ; Auperin, A; Poissonnet, G; Bozec, A; Arriagada, R; Temam, S; Benezery, K; Thariat, J; Tao, Y; Janot, F; Mamelle, G; Vallicioni, J; Follana, P; Peyrade, F; Sudaka, A; Bourhis, J; Dassonville, O. (2009) Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80years or more. *Radiother Oncol* 93 (3): 516-23.

Ostenfeld, MS; Bramsen, JB; Lamy, P; Villadsen, SB; Fristrup, N; Sorensen, KD; Ulhøi, B; Borre, M; Kjems, J; Dyrskjot, L; Orntoft, TF. (2010). miR-145 induces caspase-

dependent and -independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in Ta bladder tumors. *Oncogene* 29 (7): 1073-1084.

Ota, A; Tagawa, H; Karnan, S; Tsuzuki, S; Karpas, A; Kira, S; Yoshida, Y; Seto, M. (2004). Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 64 (9): 3087-3095.

P

Pakfetrat, A; Javadzadeh-Bolouri, A; Basir-Shabestari, S; Falaki, F. (2009). Oral Lichen Planus: a retrospective study of 420 Iranian patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14 (7): E315-E318.

Papagiannakopoulos, T; Shapiro, A; Kosik, KS. (2008). microRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* 68 (19): 8164-8172.

Park, NJ; Zhou, H; Elashoff, D; Henson, B. S; Kastratovic, D. A; Abemayor, E; Wong, DT. (2009). Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 15 (17): 5473-5477.

Pauley, KM; Satoh, M; Chan, AL; Bubb, MR; Reeves, WH; Chan, EK. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10 (4): R101.

Perez-Sayans, M; Pilar, GD; Barros-Angueira, F; Suarez-Penaranda, JM; Fernandez, AC; Gandara-Rey, JM; Garcia-Garcia, A. (2012). Current trends in miRNAs and their relationship with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 41 (6): 433-443.

Perry, MM; Moschos, SA; Williams, AE; Shepherd, NJ; Larner-Svensson, HM; Lindsay, MA. (2008). Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol* 180 (8): 5689-5698.

Peters, L; Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 26 (5): 611-23.

Poh, CF ; MacAulay, CE ; Laronde, DM ; Williams, PM; Zhang, L; Rosin, MP. (2011). Squamous cell carcinoma and precursor lesions: diagnosis and screening in a technical era. *Periodontology* 2000 57: 73-88.

Pulikkan, JA; Dengler, V; Peramangalam, PS; Peer Zada, AA; Muller-Tidow, C; Bohlander, SK; Tenen, DG; Behre, G. (2010). Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* 115 (9): 1768-1778.

Q

Qian, B; Katsaros, D; Lu, L; Preti, M; Durando, A; Arisio, R; Mu, L; Yu, H. (2009). High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1. *Breast Cancer Res Treat* 117 (1): 131-140.

R

Rana, TM. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (1): 23-36.

Raponi, M; Dossey, L; Jatko, T; Wu, X; Chen, G; Fan, H; Beer, DG. (2009). microRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res* 69 (14): 5776-5783.

Rebane, A; Akdis, CA. (2013). microRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 132 (1): 15-26.

Reddy, SD; Ohshiro, K; Rayala, SK; Kumar, R. (2008). microRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res* 68 (20): 8195-8200.

Rogler, CE; Levoci, L; Ader, T; Massimi, A; Tchaikovskaya, T; Norel, R; Rogler, LE. (2009). microRNA-23b cluster microRNAs regulate transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signaling and liver stem cell differentiation by targeting Smads. *Hepatology* 50 (2): 575-584.

Ronchetti, D; Lionetti, M; Mosca, L; Agnelli, L; Andronache, A; Fabris, S; Deliliers, GL; Neri, A. (2008). An integrative genomic approach reveals coordinated expression of intronic miR-335, miR-342, and miR-561 with deregulated host genes in multiple myeloma. *BMC Med Genomics* 1: 37.

Rosin, MP; Cheng, X; Poh, C; Lam, WL; Huang, Y; Lovas, J; Berean, K; Epstein, JB; Priddy, R; Le, ND; Zhang, L. (2000) Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 6 (2): 357-62.

Roopashree, MR; Gondhalekar, RV; Shashikanth, MC; George, J; Thippeswamy, SH; Shukla, A. (2010). Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *J Oral Pathol Med* 39 (10): 729-734.

Ruby, JG; Jan, CH; Bartel, DP. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448 (7149): 83-6.

Ruesga, MT; Acha-Sagredo, A; Rodríguez, MJ; Aguirregaviria, JI; Videgain, J; Rodríguez, C; de Pancorbo, ML; Aguirre, JM. (2007). p16 (INK4a) promoter hypermethylation in oral scrapings of oral squamous cell carcinoma risk patients. *Cancer Lett* 250 (1): 140-5.

Rutnam, ZJ; Yang, BB. (2012). The involvement of microRNAs in malignant transformation. *Histol Histopathol* 27 (10): 1263-1270.

S

Safadi, RA; Al Jaber, SZ; Hammad, HM; Hamasha, AA. (2010). Oral lichen planus shows higher expressions of tumor suppressor gene products of p53 and p21 compared to oral mucositis. An immunohistochemical study. *Arch Oral Biol* 55 (6): 454-61.

Sankaranarayanan, R; Ramadas, K; Amarasinghe, H; Subramanian, S; Johnson, N. (2015). *Oral Cancer: Prevention, Early Detection, and Treatment*. Third Edition (3).

Santhi, WS; Prathibha, R; Charles, S; Anurup, KG; Reshmi, G; Ramachandran, S; Jissa, VT; Sebastian, P; Radhakrishna, Pillai M. (2013). Oncogenic microRNAs as biomarkers of oral tumorigenesis and minimal residual disease. *Oral Oncol* 49 (6): 567-575.

Sarhadi, VK; Wikman, H; Salmenkivi, K; Kuosma, E; Sioris, T; Salo, J; Karjalainen, A; Knuutila, S; Anttila, S. (2006). Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol* 209 (2): 206-212.

Schaefer, JS; Montufar-Solis, D; Vigneswaran, N; Klein, JR. (2011). Selective upregulation of microRNA expression in peripheral blood leukocytes in IL-10^{-/-} mice precedes expression in the colon. *J Immunol* 187 (11): 5834-5841.

Schetter, AJ; Leung, SY; Sohn, JJ; Zanetti, KA; Bowman, ED; Yanaihara, N; Yuen, ST; Chan, TL; Kwong, DL; Au, GK; Liu, CG; Calin, GA; Croce, CM; Harris, CC. (2008). microRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 299 (4): 425-436.

Schifter, M; Jones, AM; Walker, DM. (1998). Epithelial p53 gene expression & mutational analysis, combined with growth fraction assessment, in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 27 (7): 318-324.

Schlosser, BJ. (2010). Lichen planus and lichenoid reactions of the oral mucosa. *Dermatol Ther* 23 (3): 251-267.

Schottenfeld, D; Beebe-Dimmer, J. (2006). Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 56 (2): 69-83.

Szczepanski, MJ; Czystowska, M; Szajnik, M; Harasymczuk, M; Boyiadzis, M; Kruk-Zagajewska, A; Szyfter, W; Zeromski, J; Whiteside, TL. (2009). Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res* 69 (7): 3105-13.

Scully, C; Eisen, D; Carrozzo, M. (2000). Management of oral lichen planus. *Am J Clin Dermatol* 1 (5): 287-306.

Scully, C; Carrozzo, M. (2008). Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg* 46 (1): 15-21.

Scully, C; Bagan, J. (2009). Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 15 (6): 388-99.

Shao, Y; Qu, Y; Dang, S; Yao, B; Ji, M. (2013). miR-145 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting c-Myc and Cdk6. *Cancer Cell Int* 13 (1): 51.

Sharma, R; Sircar, K; Singh, S; Rastogi, V. (2011). Role of mast cells in pathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Maxillofac Pathol* 15 (3): 267-71.

Shen, B; Zhang, Y; Yu, S; Yuan, Y; Zhong, Y; Lu, J; Feng, J. (2015). MicroRNA-339, an epigenetic modulating target is involved in human gastric carcinogenesis through targeting NOVA1. *FEBS Lett* 589 (20): 3205-11.

Shen, ZY; Liu, W; Zhu, LK; Feng, JQ; Tang, GY; Zhou, ZT. (2012). A retrospective clinicopathological study on oral lichen planus and malignant transformation: analysis of 518 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17 (6): e943-e947.

Shin, KH; Bae, SD; Hong, HS; Kim, RH; Kang, MK; Park, NH. (2011). miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. *Biochem Biophys Res Commun* 404 (4): 896-902.

Song, B; Wang, C; Liu, J; Wang, X; Lv, L; Wei, L; Xie, L; Zheng, Y; Song, X. (2010). MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression. *J Exp Clin Cancer Res* 27(29): 29.

Sonkoly, E; Stahle, M; & Pivarcsi, A. (2008). microRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 18 (2): 131-140.

Sonkoly, E; Wei, T; Janson, PC; Saaf, A; Lundeberg, L; Tengvall-Linder, M; Norstedt, G; Alenius, H; Homey, B; Scheynius, A; Stahle, M; Pivarcsi, A. (2007). microRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One* 2 (7): e610.

Sousa, FA; Paradella, TC; Carvalho, YR; Rosa, LE. (2009). Immunohistochemical expression of PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. *J Oral Sci* 51 (1): 117-21.

Spizzo, R; Nicoloso, MS; Lupini, L; Lu, Y; Fogarty, J; Rossi, S; Zagatti, B; Fabbri, M; Veronese, A; Liu, X; Davuluri, R; Croce, CM; Mills, G; Negrini, M; Calin, GA. (2010). miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells. *Cell Death Differ* 17 (2): 246-254.

Stanczyk, J; Pedrioli, DM; Brentano, F; Sanchez-Pernaute, O; Kolling, C; Gay, RE; Detmar, M; Gay, S; Kyburz, D. (2008). Altered expression of microRNA in synovial

fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58 (4): 1001-1009.

Sugerman, PB; Savage, NW; Walsh, LJ; Zhao, ZZ; Zhou, XJ; Khan, A; Seymour, GJ; Bigby, M. (2002). The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (4): 350-365.

Suh, SO; Chen, Y; Zaman, MS; Hirata, H; Yamamura, S; Shahryari, V; Liu, J; Tabatabai, ZL; Kakar, S; Deng, G; Tanaka, Y; Dahiya, R. (2011). microRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis* 32 (5): 772-778.

Suzuki, H; Emi, M; Komiya, A; Fujiwara, Y; Yatani, R; Nakamura, Y; Shimazaki, J. (1995). Localization of a tumor suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2 Mb region of 8p22-p21.3. *Genes Chromosomes Cancer* 13 (3): 168-174.

T

Takamizawa, J; Konishi, H; Yanagisawa, K; Tomida, S; Osada, H; Endoh, H; Harano, T; Yatabe, Y; Nagino, M; Nimura, Y; Mitsudomi, T; Takahashi, T. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperativesurvival. *Cancer Res* 64 (11): 3753-6.

Taganov, KD; Boldin, MP; Chang, KJ; Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (33): 12481-12486.

Takata, A; Otsuka, M; Kojima, K; Yoshikawa, T; Kishikawa, T; Yoshida, H; Koike, K. (2011). microRNA-22 and microRNA-140 suppress NF-kappaB activity by regulating the expression of NF-kappaB coactivators. *Biochem Biophys Res Commun* 411 (4): 826-831.

Thongprasom, K; Luengvisut, P; Wongwatanakij, A; Boonjatturus, C. (2003). Clinical evaluation in treatment of oral lichen planus with topical fluocinolone acetonide: a 2-year follow-up. *J Oral Pathol Med* 32 (6): 315-22.

Thornhill, MH; Sankar, V; Xu, XJ; Barrett, AW; High, AS; Odell, EW; Speight, PM; Farthing, PM. (2006). The role of histopathological characteristics in distinguishing amalgam-associated oral lichenoid reactions and oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 35 (4): 233-240.

Tong, AW; Nemunaitis, J. (2008). Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther* 15 (6): 341-55.

Towle, R; Truong, D; Hogg, K; Robinson, WP; Poh, CF; & Garnis, C. (2013). Global analysis of DNA methylation changes during progression of oral cancer. *Oral Oncol* 49 (11): 1033-1042.

U

Ueda, R; Kohanbash, G; Sasaki, K; Fujita, M; Zhu, X; Kasthuber, ER; McDonald, HA; Potter, DM; Hamilton, RL; Lotze, MT; Khan, SA; Sobol, RW; Okada, H. (2009). Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (26): 10746-10751.

V

van den Haute, V; Antoine, JL; Lachapelle, JM. (1989). Histopathological discriminant criteria between lichenoid drug eruption and idiopathic lichen planus: retrospective study on selected samples. *Dermatologica* 179 (1): 10-3.

van der Meij, EH; Reibel, J; Slootweg, PJ; van der Wal, JE; de Jong, WF; van der Waal, I. (1999). Interobserver and intraobserver variability in the histologic assessment of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 28 (6): 274-277.

van der Meij, EH; van der Waal, I. (2003). Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med* 32 (9): 507-512.

van der Meij, EH; Mast, H; van der Waal, I. (2007). The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol* 43 (8): 742-748.

van der Waal, I. (2009). Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 45 (4-5): 317-323.

van Oijen, MG; Slootweg, PJ. (2000). Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (3): 249-256.

Varol, N; Konac, E; Gurocak, OS; Sozen, S. (2011). The realm of microRNAs in cancers. *Mol Biol Rep* 38 (2): 1079-1089.

Volinia, S; Calin, GA; Liu, CG; Ambs, S; Cimmino, A; Petrocca, F; Visone, R; Iorio, M; Roldo, C; Ferracin, M; Prueitt, RL; Yanaihara, N; Lanza, G; Scarpa, A; Vecchione, A; Negrini, M; Harris, CC; Croce, CM. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (7): 2257-2261.

W

Wald, AI; Hoskins, EE; Wells, SI; Ferris, RL; Khan, SA. (2011). Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck* 33 (4): 504-12.

Walsh, LJ. (2003). Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 14 (3): 188-198.

Wang, M; Li, C; Nie, H; Lv, X; Qu, Y; Yu, B; Su, L; Li, J; Chen, X; Ju, J; Yu, Y; Yan, M; Gu, Q; Zhu, Z; Liu, B. (2012). Down-regulated miR-625 suppresses invasion and metastasis of gastric cancer by targeting ILK. *FEBS Lett* 586 (16): 2382-2388.

Wang, Z; Qiao, Q; Chen, M; Li, X; Wang, Z; Liu, C; Xie, Z. (2014). miR-625 down-regulation promotes proliferation and invasion in esophageal cancer by targeting Sox2. *FEBS Lett* 588 (6): 915-921.

Warnakulasuriya, S; Johnson, NW; van der Waal, I. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 36 (10): 575-580.

Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 45 (4-5): 309-316.

Webster, RJ; Giles, KM; Price, KJ; Zhang, PM; Mattick, JS; Leedman, PJ. (2009). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem* 284 (9): 5731-5741.

Wiklund, ED; Gao, S; Hulf, T; Sibbritt, T; Nair, S; Costea, DE; Villadsen, SB; Bakholdt, V; Bramsen, JB; Sorensen, JA; Krogdahl, A; Clark, SJ; Kjems, J. (2011). microRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 6 (11): e27840.

Williams, AE; Perry, MM; Moschos, SA; Lerner-Svensson, HM; Lindsay, MA. (2008). Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem Soc Trans* 36 (Pt 6): 1211-1215.

Wong, TS; Liu, XB; Wong, BY; Ng, RW; Yuen, AP; Wei, WI. (2008). Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res* 14 (9): 2588-92.

Wu, X; Ajani, JA; Gu, J; Chang, DW; Tan, W; Hildebrandt, MA; Huang, M; Wang, KK; Hawk, E. (2013). microRNA expression signatures during malignant progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)* 6 (3): 196-205.

www.seom.org/seom 2014.

Xiao, C; Calado, DP; Galler, G; Thai, TH; Patterson, HC; Wang, J; Rajewsky, N; Bender, TP; Rajewsky, K. (2007). miR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 131 (1): 146-159.

Xiao, W; Bao, ZX; Zhang, CY; Zhang, XY; Shi, LJ; Zhou, ZT; Jiang, WW. (2012). Upregulation of miR-31* is negatively associated with recurrent/newly formed oral leukoplakia. *PLoS One* 7 (6): e38648.

Xu, L; Wen, Z; Zhou, Y; Liu, Z; Li, Q; Fei, G; Luo, J; Ren, T. (2013). microRNA-7-regulated TLR9 signaling-enhanced growth and metastatic potential of human lung cancer cells by altering the phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3/Akt pathway. *Mol Biol Cell* 24 (1): 42-55.

Y

Yamasaki, K; Nakasa, T; Miyaki, S; Ishikawa, M; Deie, M; Adachi, N; Yasunaga, Y; Asahara, H; Ochi, M. (2009). Expression of microRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 60 (4): 1035-1041.

Yanaihara, N; Caplen, N; Bowman, E; Seike, M; Kumamoto, K; Yi, M; Stephens, R. M; Okamoto, A; Yokota, J; Tanaka, T; Calin, GA; Liu, CG; Croce, CM; Harris, CC. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9 (3): 189-198.

Yang, CC; Hung, PS; Wang, PW; Liu, CJ; Chu, TH; Cheng, HW; Lin, SC. (2011). miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 40 (5): 397-404.

Yang, L; Li, Y; Cheng, M; Huang, D; Zheng, J; Liu, B; Ling, X; Li, Q; Zhang, X; Ji, W; Zhou, Y; Lu, J. (2012). A functional polymorphism at microRNA-629-binding site in the 3'-untranslated region of NBS1 gene confers an increased risk of lung cancer in Southern and Eastern Chinese population. *Carcinogenesis* 33 (2): 338-347.

Yang, Y; Li, Y. X; Yang, X; Jiang, L; Zhou, ZJ; Zhu, YQ. (2013). Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. *BMC Cancer* 13: 129.

Yu, SL; Chen, HY; Chang, GC; Chen, CY; Chen, HW; Singh, S; Cheng, CL; Yu, CJ; Lee, YC; Chen, HS; Su, TJ; Chiang, CC; Li, HN; Hong, QS; Su, HY; Chen, CC; Chen, WJ; Liu, CC; Chan, WK; Chen, WJ; Li, KC; Chen, JJ; Yang, PC. (2008). MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 13 (1): 48-57.

Z

Zhang, WY; Liu, W; Zhou, YM; Shen, XM; Wang, YF; Tang, GY. (2012). Altered microRNA expression profile with miR-27b down-regulation correlated with disease activity of oral lichen planus. *Oral Dis* 18 (3): 265-270.

Zhang, Y; Guo, J; Li, D; Xiao, B; Miao, Y; Jiang, Z; Zhuo, H. (2010). Down-regulation of miR-31 expression in gastric cancer tissues and its clinical significance. *Med Oncol* 27 (3): 685-689.

Zhao, T; Li, G; Mi, S; Li, S; Hannon, GJ; Wang, XJ; Qi, Y. (2007). A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* 21 (10): 1190-203.

Zhou, B; Wang, S; Mayr, C; Bartel, DP; Lodish, HF. (2007). miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (17): 7080-7085.

Zhu, J; Huang, X; Su, G; Wang, L; Wu, F; Zhang, T; Song, G. (2014). High expression levels of microRNA-629, microRNA-525-5p and microRNA-516a-3p in paediatric systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 33 (6): 807-815.

Zhu, S; Si, ML; Wu, H; Mo, YY. (2007). microRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 282 (19): 14328-14336.

Zhu, S; Wu, H; Wu, F; Nie, D; Sheng, S; Mo, YY. (2008). microRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 18 (3): 350-359.

Zidar, N; Bostjancic, E; Gale, N; Kojc, N; Poljak, M; Glavac, D; Cardesa, A. (2011). Down-regulation of microRNAs of the miR-200 family and miR-205, and an altered expression of classic and desmosomal cadherins in spindle cell carcinoma of the head and neck--hallmark of epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 42 (4): 482-488.

Zuo, YL; Gong, DP; Li, BZ; Zhao, J; Zhou, L. Y; Shao, FY; Jin, Z; He, Y. (2015). The TF-miRNA Coregulation Network in Oral Lichen Planus. *Biomed Res Int* 2015: 731264.

10. Anexo: CD

