VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament d'Estomatologia

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN LA LEUCOPLASIA VERRUGOSA PROLIFERATIVA

TESIS DOCTORAL

Programa de doctorado en Odontología (código 3143, RD 99/2011)

Presentada por: ALEXANDER PROAÑO HARO

Directores: PROF. JOSÉ VICENTE BAGÁN SEBASTIÁN

PROFª. LETICIA BAGÁN DEBÓN

DR. JUAN SANDOVAL DEL AMOR

VALENCIA, Julio 2023

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA Facultat de Medicina i Odontologia

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: **JOSÉ VICENTE BAGÁN SEBASTIÁN** N.I.F. 18896743N, Departamento/Instituto: Catedrático de Medicina Bucal del Departamento de Estomatología. Centro: Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València.

2.- Apellidos y nombre: **LETICIA BAGÁN DEBÓN** N.I.F. 29205156D, Departamento/Instituto: Profesora Ayudante de Doctor de Medicina Bucal del Departamento de Estomatología. Centro: Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València.

3.- Apellidos y nombre: **JUAN SANDOVAL DEL AMO**R N.I.F. 79142120V, Departamento/Instituto: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Centro: Director de la plataforma de Epigenética e Investigador establecido de la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión.

Tutor o tutora

Apellidos y nombre. **JOSÉ VICENTE BAGÁN SEBASTIÁN**. N.I.F. 18896743N, Departamento/Instituto: Catedrático de Medicina Bucal del Departamento de Estomatología. Centro: Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València.

Directores/as y tutor, respectivamente, de la tesis doctoral: "ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN LA LEUCOPLASIA VERRUGOSA PROLIFERATIVA"

de D/Dña. **ALEXANDER PROAÑO HARO**,

estudiante del Programa de Doctorado **3143 en Odontología** (RD 99/2011) de la Universitat de València, emiten informe FAVORABLE para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 26 de JULIO de 2023.

Fdo.: José Vicente Bagán Sebastián	Fdo.: Leticia Bagán Debón	Fdo.: Juan Sandoval del Amor
JOSE VICENTE|BAGAN|SEBASTIAN Digitally signed by JOSE VICENTE|BAGAN|SEBASTIAN Date: 2023.07.26 20:33:37 +02'00'	29205156-D	JUAN|SANDOVAL|DEL AMOR Firmado digitalmente por JUAN|SANDOVAL|DEL AMOR Fecha: 2023.07.31 11:01:00 +02'00'
Director y Tutor	Directora	Director

ESCOLA DE DOCTORAT
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departament d'Estomatologia
C/ Gascó Oliag, 1 46010 VALÈNCIA Tel. 963864144
http://www.uv.es/estomatologia
dep.estomatologia@uv.es

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años son muchas las personas que aportaron su granito de arena en la elaboración de esta Tesis Doctoral; a todos y cada uno de ellos, gracias.

En primer lugar, me gustaría agradecer, uno a uno, a todos mis directores por su contribución en cada una de las fases de la tesis, por su paciencia y su tiempo.

Al Prof. Bagán, que ha sido el mentor que siempre soñé tener. Una persona con gran capacidad de transmitir toda su experiencia y conocimiento, un excelente docente, investigador y sobre todo un apoyo moral muy importante a lo largo del desarrollo de la tesis en todas y cada una de las vivencias que he tenido. Gracias por su confianza depositada en mí, su disposición, su implicación y su apoyo tanto a nivel académico como personal. Siempre será mi referente y ejemplo a seguir. Es un orgullo estar a su lado.

A la Dr. Leticia Bagán por ser tan cercana y ayudarme en todo momento durante estos años. Eres todo un ejemplo de dedicación y constancia. Gracias por todos los consejos que me has dado, por motivarme a investigar en medicina oral y por tu amistad. Este es el principio de muchos proyectos y colaboraciones juntos. Para mí es un placer.

Al Dr. Juan Sandoval por acogerme en tu laboratorio e iniciarme en el mundo de la investigación molecular. Agradecer tu paciencia con todas las dudas que te planteaba y, sobre todo, tu ayuda en la discusión de los resultados aportando tu experiencia analítica. Gracias Diana por tu colaboración y enseñanzas en el meticuloso trabajo de laboratorio.

Quiero agradecer a todos los profesores y profesoras que han contribuido en mi formación académica. En especial a la Dra. Yolanda Jiménez por sembrar ya desde el segundo año del grado mi interés por la medicina oral. Al Dr. Montiel por iniciarme en el mundo de la estadística, y sobre todo mi interés en los meta-análisis. Al Prof. Francisco Vera por acogerme en su departamento e iniciarme en el mundo de la investigación. Agradecer a todos los profesionales del equipo del Servicio de Estomatología y Cirugía Maxilofacial del HGUV, y por supuesto a todos los pacientes y a sus familiares que de forma desinteresada contribuyen a la realización de estas investigaciones.

A mis compañeras y compañeros de trabajo y de la universidad que siempre han sido un apoyo y me han animado a seguir adelante. Así como a mis compis del grado y

del máster de Medicina Oral, especialmente a Sari y Vicky, con las que compartí un año inolvidable. A todas mis compañeras y profesores de la Unidad de Medicina Oral UV que siempre se han interesado por mi trabajo y a las cuales tengo gran admiración. A todo el personal administrativo, en especial a Elisa y Rafa por su amabilidad y disposición.

A mis amigos y amigas de toda la vida, en especial a Dani, Sergio, Jose y Jean Paul por tenerme paciencia y soportarme los días con más estrés. Gracias por ser un apoyo y compañía esencial. Gracias por todos los momentos que hemos disfrutado juntos.

A mi familia, distribuida en España, Ecuador y Venezuela, que siempre me ha apoyado. En especial a mis tías Jeaneth, María y Michita por preocuparse por mí y animarme a conseguir cada uno de los objetivos que me he propuesto. A mi primo Francisco, con el que he compartido muchos momentos de mi vida y al cual agradezco su interés por cada logro que he conseguido. A Esperanza, la suegra que todo el mundo querría tener, por su paciencia y ayuda en nuestro día a día para que todo sea más fácil. A mi padre, Patricio, por preocuparse y transmitirme desde pequeño la búsqueda de la excelencia. A Javi, mi segundo padre, por enseñarme que la perfección y constancia son pilares fundamentales en la vida. A todos, gracias por vuestro cariño y afecto.

A mi madre, Marisol, porque gracias a su esfuerzo y sacrificio he conseguido todo lo que tengo. Gracias por todos los valores que me ha transmitido en cuanto a la perseverancia, la humildad, la paciencia, la gratitud. Gracias por todo el amor y cariño que me ha dado. Gracias por todos sus consejos y enseñanzas de la vida. Gracias por la confianza que siempre me ha tenido. Definitivamente es la persona a la que más debo en esta vida y de la cual estoy más orgulloso por todo lo que ha hecho.

A mi hermana, Mari Fer, mi pequeñaja, mi hermana del alma. Gracias por preguntarme cómo llevaba la tesis. Gracias por todos esos días en los que sabías escuchar todo lo que te contaba, aunque no supieras de lo que te hablaba, e incluso me dieses tu opinión y nuevas ideas. Sé que siempre vamos a estar juntos y espero que el día de mañana sepas aprovechar todo el esfuerzo que hacen nuestros padres. Te quiero mucho peque.

A Yoselin, el amor de mi vida. Muchas gracias por tu paciencia, comprensión, compañía, cariño, motivación, empatía y amor a lo largo de estos años. Sin tu constante apoyo esto no habría sido igual. Gracias por animarme a seguir mis sueños y superar los obstáculos que se presentaban. Nos espera un futuro maravilloso. Te amo mi vida.

A mi madre, Marisol

ÍNDICE

1) **INTRODUCCIÓN.**

I. Concepto de trastornos orales potencialmente malignos. 3

II. Leucoplasia oral. 4

i. Cuadro clínico. 4

III. Leucoplasia verrugosa proliferativa. 6

i. Concepto y evolución histórica. 6

ii. Epidemiología. 7

iii. Etiología. 8

iv. Cuadro clínico. 10

v. Características histopatológicas. 13

vi. Criterios diagnósticos. 15

vii. Tratamientos. 17

viii. Transformación maligna. 21

IV. Carcinoma oral de células escamosas. 26

i. Epidemiología. 26

ii. Cuadro clínico. 26

iii. Estadiaje clínico. 27

iv. Pronóstico. 28

V. Biología molecular del cáncer. 30

VI. Alteraciones moleculares en la carcinogénesis oral. 31

VII. Alteraciones epigenéticas. 40

VIII. Metilación de ADN. 41

i. Métodos de detección de metilación. 42

ii. Metilación en cáncer oral y leucoplasias. 46

iii. Revisión sistemática. 46

2) JUSTIFICACIÓN. 63

3) OBJETIVOS. 69

4) **MATERIAL Y MÉTODOS.**

I. Diseño del estudio. 75

II. Población diana del estudio. 75

i. Período. 75

ii. Recogida de las muestras. 75

iii. Selección de pacientes. 76

III. Metodología realizada. 78

i. Estudio clínico – patológico y evolutivo. 78

1. Variables sociodemográficas. 79

2. Variables clínicas. 79

3. Variables histopatológicas. 80

4. Variables de control evolutivo. 81

5. Intervalos temporales. 82

6. Recogida de los datos. 83

7. Cumplimiento de normas éticas y legales. 83

ii. Estudio epigenómico. 84

1. Extracción de ADN. 84

2. Control de la calidad de ADN. 84

3. Control de la integridad de ADN. 85

4. Array de metilación de ADN. 87

IV. Análisis estadístico y bioinformático. 93

i. Análisis estadístico clínico – patológico y evolutivo. 93

ii. Análisis bioinformático. 93

iii. Perfil de metilación global. 95

iv. Análisis de integración. 95

5) RESULTADOS.

I. Análisis descriptivo de las variables clínico - patológicas y evolutivas. 99

i. Variables sociodemográficas. 101

ii. Variables clínicas. 102

iii. Variables histopatológicas. 108

iv. Variables evolutivas. 112

v. Intervalos temporales. 116

II. Análisis epigenómico. 118

i. Comparación del epigenoma entre LVP – COCE y COCE.

1. Perfiles de metilación global. 118

a. Análisis exploratorio no supervisado. 118

b. Mapa de calor no supervisado. 119

2. Análisis diferencial de metilación supervisado. 119

a. Análisis tras ajuste de modelo de regresión basados en rangos. 119

b. Análisis tras ajuste de modelo de regresión logística penalizada. 121

3. Análisis de integración datos de expresión y metilación. 124

6) DISCUSIÓN. 127

I. Estudio clínico – patológico y evolutivo. 131

II. Estudio epigenómico. 140

i. Perfil de metilación global. 141

ii. Análisis de correlación de datos de expresión y metilación. 146

III. Futuras líneas de investigación. 152

7) CONCLUSIONES. 153

8) BIBLIOGRAFÍA. 157

9) ANEXOS. 191

GLOSARIO ABREVIATURAS:

- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- TOMP: trastornos orales potencialmente malignos.
- LO: leucoplasia oral.
- LVP: leucoplasia verrugosa proliferativa.
- IC: intervalo de confianza.
- COCE: carcinoma oral de células escamosas.
- HPV: virus del papiloma humano.
- EBV: virus de Epstein-Barr.
- LPO: liquen plano oral.
- LLO: lesiones liquenoides orales.
- TM: transformación maligna.
- NE: no especificado.
- F: femenino.
- OR: Odds ratio.
- STP: segundos tumores primarios.
- AJCC: American Joint Committe on Cancer.
- DOI: profundidad de invasión.
- ENE: extensión extranodal o extracapsular.
- NGS: secuenciación de nueva generación.
- CDK: quinasas dependientes de ciclina.
- CD1: ciclina D1.
- hTERT: transcriptasa inversa de la telomerasa humana.
- EMT: transición epitelial-mesenquimatosa.
- MMPs: metaloproteinasas.
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.
- HIF: factores inducibles de hipoxia.

- PD-L1: ligando de muerte celular programada 1.
- TLR: receptores tipo Toll.
- LOH: pérdida de heterocigosidad.
- NF-κB: factor nuclear potenciador de cadenas ligeras κ de células B activadas.
- DNMT: ADN metiltransferasas.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
- MSP: metilación específica de PCR.
- COBRA: análisis combinado de restricción con bisulfito.
- MeDIP: ensayo de inmunoprecipitación de ADN metilado.
- 5mC: metilcitosina.
- MeDIP-Chip: inmunoprecipitación de ADN metilado seguido de un análisis basado en matrices.
- MeDIP-Seq: inmunoprecipitación de ADN metilado seguido de un análisis basado en secuenciación.
- WGBS: secuenciación de bisulfito del genoma completo.
- qMSP: metilación específica cuantitativa de PCR.
- LVP – COCE: carcinomas orales de células escamosas en pacientes con LVP.
- IPN: invasión perineural.
- ILV: invasión linfovascular.
- BCD: ADN convertido con bisulfito.
- SD: desviación estándar.
- PCA: análisis de componentes principales.
- FIS: Fondos de Investigación Sanitaria.
- Mx: maxilar.
- Mb: mandibular.
- EGD: expresión génica diferencial.
- SG: supervivencia global.
- SLE: supervivencia libre de enfermedad.

LISTADO DE TABLAS:

- **Tabla 1:** Criterios diagnósticos mayores y menores propuestos por Cerero – Lapiedra y *cols*.

- **Tabla 2.** Pacientes tratados mediante escisión quirúrgica, láser o combinaciones.

- **Tabla 3.** Ensayos clínicos en curso para el tratamiento de la LVP.

- **Tabla 4.** Tasas de transformación maligna reportadas en cohortes de pacientes con LVP.

- **Tabla 5.** Correlación clínica según el tamaño e invasividad tumoral conforme a los criterios de la 8ª edición de la AJCC.

- **Tabla 6.** Correlación clínica según el estado de los ganglios linfáticos regionales conforme a los criterios de la 8ª edición de la AJCC.

- **Tabla 7.** Correlación según la presencia o no de metástasis a distancia conforme a los criterios de la 8ª edición de la AJCC.

- **Tabla 8.** Estadiaje tumoral según las características TNM propuesta por AJCC.

- **Tabla 9.** Características de los estudios incluidos.

- **Tabla 10.** Metilación aberrante de ciertos promotores de genes correlacionados de forma estadísticamente significativa según características clínicas, demográficas, patológicas y evolutivas con el riesgo de COCE.

- **Tabla 11.** Esquema de los tipos de variables estudiadas.

- **Tabla 12.** Número de pacientes incluidos en cada uno de los grupos. LVP: leucoplasia verrugosa proliferativa. COCE: carcinoma oral de células escamosas.

- **Tabla 13.** Edad expresada en años en cada grupo.

- **Tabla 14.** Distribución de sexo según los distintos grupos del estudio.

- **Tabla 15.** Distribución de hábitos tóxicos referidos por los pacientes.

- **Tabla 16.** Frecuencia y porcentaje de las localizaciones de las muestras.

- **Tabla 17.** Tipo de presentación clínica de las lesiones tumorales incluidas en el estudio según el grupo al que pertenezcan.

- **Tabla 18.** Tipo de presentación clínica de las lesiones no tumorales del grupo LVP y leucoplasias homogéneas.

- **Tabla 19.** Tamaño medio del mayor diámetro de las lesiones tumorales expresado en centímetros.

- **Tabla 20.** Área media total de las lesiones tumorales expresado en cm^2.

- **Tabla 21.** Porcentaje de afectación de la mucosa oral y tipo de lesiones presentes en cada paciente perteneciente al grupo LVP – COCE.

- **Tabla 22.** Tipo de lesión y localización de las lesiones de los pacientes pertenecientes al grupo LVP - COCE.

- **Tabla 23.** Localización y porcentaje de afectación de la totalidad de la mucosa oral de lesiones de los pacientes pertenecientes al grupo LVP.

- **Tabla 24.** Características histopatológicas de las lesiones tumorales de ambos grupos.

- **Tabla 25.** Estadiaje TNM clínico y patológico de los pacientes oncológicos.

- **Tabla 26.** Distribución del grado de displasia epitelial inicial en los grupos de lesiones no malignas.

- **Tabla 27.** Manejo terapéutico empleado en los pacientes oncológicos.

- **Tabla 28.** Manejo terapéutico a lo largo del seguimiento de cada paciente con LVP y ausencia de antecedentes de carcinoma oral.

- **Tabla 29.** Número de biopsias realizadas en cada subgrupo de pacientes con LVP a lo largo de su seguimiento.

- **Tabla 30.** Número de pacientes y frecuencia de presencia de recidiva, segundos tumores primarios, metástasis a distancia o exitus en cada grupo de pacientes con patología tumoral.

- **Tabla 31.** Número y localización de segundos tumores primarios en los pacientes oncológicos.

- **Tabla 32.** Pacientes del grupo LVP – no cáncer que sufrieron transformación maligna a COCE.

- **Tabla 33.** Tiempo de seguimiento de cada grupo de pacientes expresado en años.

- **Tabla 34.** Tiempo de supervivencia de cada grupo expresado en años.

- **Tabla 35.** CpGs y sus correspondientes genes resultados del análisis de metilación diferencial mediante el ajuste de modelos de regresión basados en rangos. De cada CpG se ha incluido su ubicación con respecto a la isla CpG y la región génica.

- **Tabla 36.** Resultados del modelo de regresión logística penalizada.

- **Tabla 37.** Características de los genes que coincidieron en los resultados de los dos análisis realizados.

- **Tabla 38.** CpGs y sus genes asociados resultados del análisis de regresión logística penalizada para investigar las 472 CpGs localizadas en los promotores de los 133 EGD que son capaces de discriminar entre ambos grupos según el estado de metilación.

LISTADO DE FIGURAS:

- **Figura 1.** Diagrama de bosque o "forest plot" y diagrama de embudo o "funnel plot" que representan gráficamente el meta-análisis.

- **Figura 2.** Ilustración de los sellos distintivos del cáncer dividido según las diez capacidades biológicas adquiridas y las cuatro características habilitadoras. De forma esquemática se evidencia algunos de los mecanismos moleculares alterados implicados en la carcinogénesis oral o en la progresión tumoral del carcinoma oral de células escamosas según los distintos "hallmarks" del cáncer.

- **Figura 3.** Diagrama de flujo de los procesos de búsqueda y resultados (PRISMA).

- **Figura 4.** Forest plot de la asociación entre hipermetilación del promotor p16 y el riesgo de COCE.

- **Figura 5.** Forest plot de la asociación entre hipermetilación del promotor MGMT y el riesgo de COCE.

- **Figura 6.** Forest plot de la asociación entre hipermetilación del promotor DAPK1 y el riesgo de COCE.

- **Figura 7.** Forest plot de la asociación entre hipermetilación de promotor DAPK y SFRP2 y el riesgo de COCE.

- **Figura 8.** Qubit ® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) empleado para la cuantificación de ADN.

- **Figura 9.** Determinación del control de la integridad de ADN. **A-** Cubeta y fuente de alimentación de electroforesis. B- Fotodocumentador de gel BIO-RAD.

- **Figura 10.** Electroforesis de las muestras.

- **Figura 11.** Electroforesis de las muestras adicionales.

- **Figura 12.** Esquema por días del protocolo de Illumina para el array de metilación de ADN.

- **Figura 13.** Conversión de las citosinas no metiladas en uracilos tras la conversión de bisulfito.

- **Figura 14.** Horno Illumina Hybridization empleado para la incubación de ADN.

- **Figura 15.** Hybex Microsample Incubator empleado para la fragmentación de ADN.

- **Figura 16.** Disposición en cada sección de BeadChip del ADN de cada muestra.

- **Figura 17.** Cubetas de cristal con PB1 empleadas para realizar el lavado.

- **Figura 18.** Dispositivo de baño en seco Tecan (Te-Flow flow-through chamber).

- **Figura 19.** Lavado y secado de los BeadChips en bomba de vacío.

- **Figura 20.** Escáner fluorescente Illumina iScan SQ empleado para realizar la lectura de BeadChips.

- **Figura 21.** Múltiples lesiones de leucoplasia verrugosa proliferativa no cáncer de un mismo paciente afectando a diferentes localizaciones como encía vestibular y palatina maxilar derecha, así como encías y fondo de vestíbulo de dientes mandibulares.

- **Figura 22.** Leucoplasia homogénea en borde lateral derecho de lengua.

- **Figura 23.** Transformación maligna a carcinoma oral de células escamosas en encía edéntula en zona de premolares en paciente en seguimiento de LVP.

- **Figura 24.** Carcinoma oral de células escamosas localizado en encía mandibular en zona del primer molar inferior izquierda.

- **Figura 25.** Gráfico de barras correspondiente a la localización anatómica de cada muestra distribuidas según cada grupo.

- **Figura 26.** Carcinoma oral de células escamosas localizado en borde lateral izquierdo de lengua en forma de ulceración. Paciente perteneciente al grupo COCE convencional.

- **Figura 27**. Leucoplasias homogéneas localizadas en paladar y en encía vestibular en dos pacientes diferentes.

- **Figura 28.** Porcentaje del tipo de lesiones presentes en los ocho pacientes del grupo LVP – COCE.

- **Figura 29.** Porcentaje de cada grado tumoral de los pacientes con LVP – COCE y los pacientes con COCE convencional.

- **Figura 30.** Presencia de infiltración perineural en cada grupo de pacientes con lesiones tumorales analizadas.

- **Figura 31.** Presencia de infiltración linfovascular en cada grupo de pacientes.

- **Figura 32.** Frecuencias del estadiaje TNM clínico de cada grupo de pacientes oncológicos.

- **Figura 33.** Frecuencias del estadiaje TNM patológico de cada grupo de pacientes.

- **Figura 34.** Frecuencias del resultado del estudio histopatológico de las LVP – no cáncer y de las leucoplasias homogéneas.

- **Figura 35.** Tiempo medio de seguimiento expresado en años de cada uno de los grupos de pacientes incluidos en el estudio.

- **Figura 36.** Análisis de componentes principales diferenciando por color y forma los dos grupos de pacientes estudiados.

- **Figura 37.** Mapa de calor (Heatmap) y agrupación jerárquica de las 5.000 CpGs aleatorias evaluadas en los 18 pacientes incluidos.

- **Figura 38.** Mapa de calor y agrupación jerárquica con los valores de metilación de las CpGs diferencialmente metiladas según el análisis de regresión basa en rangos. Los resultados de la metilación diferencial muestran una clara discriminación entre ambos grupos al usar las 14 CpGs. Las CpG con mayor ganancia de metilación están representadas de color verde.

- **Figura 39.** Agrupación jerárquica con mapa de calor según la lista de CpGs capaces de discriminar entre ambos grupos tras ajustar el modelo de regresión logística penalizada mediante *Elastic Net*.

- **Figura 40.** Mapa de calor representativo de las posiciones de las 37 CpG que corresponden a los 26 genes situadas en las zonas promotoras con diferencias de metilación estadísticamente significativas ordenadas según la agrupación jerárquica. El nivel de metilación se representa en una gradación o escala de colores, representando el verde la ganancia de metilación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTO DE TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE MALIGNOS.

En una reciente actualización coordinada por el Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el Cáncer Oral celebrada en 2020 en Reino Unido, un grupo de expertos internacionales revisaron la terminología, definiciones y clasificación de los trastornos orales potencialmente malignos (TOPM). Definieron a este grupo de enfermedades como "cualquier anomalía de la mucosa oral que esté asociada con un riego estadísticamente mayor de desarrollar cáncer oral"[(1)].

Se consideran trastornos orales potencialmente malignos la leucoplasia oral (LO), leucoplasia verrugosa proliferativa (LVP), eritroplasia oral, fibrosis oral submucosa, liquen plano oral, queilitis actínica, lesiones palatinas asociadas a tabaquismo invertido, lupus eritematoso oral, disqueratosis congénita, lesiones orales liquenoides y enfermedad oral de injerto contra huésped[(1)].

Todos los pacientes con trastornos orales potencialmente malignos se caracterizan por presentar una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer oral. Sin embargo, existen diferencias tanto en la prevalencia como en las tasas de transformación maligna entre las distintas enfermedades que conforman este grupo[(1)(2)(3)]. La prevalencia global mundial de estos TOPM según el meta-análisis de Mello y *cols*.[(2)] publicado en 2018 es de 4,47% (95% intervalo de confianza (IC) = 2,43 – 7,08). Esta prevalencia varía dependiendo de las diferentes patologías que conforman el grupo, teniendo mayor prevalencia la fibrosis oral submucosa (4,96%; 95%IC = 2,28 – 8,62) seguida de la leucoplasia oral (4,11%; 95%IC = 1,98 – 6,97), sin embargo, estos datos dependen del área geográfica de donde procedan los estudios. Así, existen diferencias según la ubicación geográfica, siendo mayor la prevalencia en la población asiática (10,54%; 95%IC = 4,6 – 18,55) seguida de América del Sur y el Caribe (3,93%; 95%IC = 2,43 – 5,77) y siendo la prevalencia en la población europea del 3,07% (95%IC = 1,64 – 4,93)[(2)]. Finalmente destacar que existe mayor prevalencia en hombres 59,99% (95%IC = 41,27 – 77,30)[(2)].

La importancia de poder clasificar las lesiones orales con una terminología clara, sencilla y uniforme radica en la facilidad de posteriormente poder difundir y comparar estudios, así como una mayor facilidad para los clínicos e investigadores en la búsqueda de la evidencia científica disponible más reciente y actualizada[(1)(4)].

1.2. LEUCOPLASIA ORAL.

La leucoplasia oral es, en nuestra área, el trastorno oral potencialmente maligno más prevalente y estudiado a lo largo de los años[2][4]. Es por ello que su definición y terminología han sido continuamente debatidos, considerándose un término clínico[5].

La palabra "leucoplasia" fue introducida en la literatura científica por primera vez por el dermatólogo húngaro Schwimmer en 1877. Posteriormente varias definiciones con ciertas puntualizaciones se han llevado a cabo por diversos autores y sociedades científicas[5]. En la actualidad, la definición aceptada internacionalmente es la publicada en 2007 por un grupo de expertos de la OMS en el que se define la leucoplasia oral como "una placa blanca de riesgo cuestionable habiendo excluido otras enfermedades conocidas o alteraciones que no suponen un aumento del riesgo de cáncer"[6].

Esta definición es puramente clínica, es por ello que, inicialmente se realiza un diagnóstico clínico provisional para descartar otras enfermedades orales blanquecinas de la mucosa oral y tras esperar 2 – 4 semanas después de haber sido identificados y eliminados los posibles factores etiológicos, si las lesiones persisten, se debe realizar una biopsia para confirmar o modificar el diagnóstico clínico provisional inicial[1][6]. El resultado de este estudio histopatológico podrá variar desde hiperplasia epitelial con hiperqueratosis a leucoplasia con diferentes grados de displasia[1][6].

1.2.1. CUADRO CLÍNICO

Las leucoplasias generalmente son asintomáticas, por lo que muchas veces son diagnosticadas como hallazgos casuales durante las exploraciones clínicas rutinarias[7].

Se pueden clasificar las leucoplasias desde un punto de vista etiológico y desde un punto de vista clínico[1][5][7][8]. En cuanto al primer aspecto, se pueden distinguir las leucoplasias asociadas al tabaco (tanto fumado como masticado) y las leucoplasias idiopáticas o de etiología desconocida[8]. Cabe destacar que las leucoplasias en pacientes que nunca han fumado tienden a presentar una historia clínica natural más agresiva[1].

Clínicamente se ha clasificado la leucoplasia oral basándose en su color y características morfológicas (textura, espesor, relieve) en dos tipos: formas homogéneas y formas no homogéneas. Esta clasificación clínica no es estática, pues leucoplasias homogéneas pueden evolucionar hacia formas no homogéneas y viceversa[5][7][9].

Las leucoplasias homogéneas se caracterizan por ser lesiones blancas uniformemente planas, finas en su superficie, bien delimitadas, no induradas y que pueden presentar fisuras poco profundas en su parte exterior. Es la forma clínica más frecuente cuyo riesgo de transformación maligna es relativamente bajo[1][5][7][9].

Las leucoplasias no homogéneas se caracterizan por presentar lesiones no uniformes en color (blancas y rojas) y/o superficie. Tienen peor delimitación y mayor riesgo de transformación maligna. Presentan características clínicas variables por lo que se subdividen en[1][3][5][9]:

- Leucoplasias moteadas: denominadas también como eritroleucoplasias, presentan lesiones mixtas de color blanco y rojo, aunque predominando claramente el aspecto blanquecino.

- Leucoplasias nodulares: presentan pequeñas proyecciones polipoides o excrecencias redondeadas rojas o blancas.

- Leucoplasias verrugosas: presentan superficies exofíticas rugosas u onduladas de color blanquecino.

La leucoplasia verrugosa proliferativa ha sido considerada durante años como una forma no homogénea de leucoplasia oral. Sin embargo, presenta características clínicas, histopatológicas, evolutivas, epidemiológicas e incluso genéticas que han sido tomadas en cuenta en la última revisión de trastornos orales potencialmente malignos que ha permitido considerarla como una entidad diferente del resto de las leucoplasias antes descritas, con un aspecto multifocal[1]. Todos estos detalles serán presentados a continuación.

1.3. LEUCOPLASIA VERRUGOSA PROLIFERATIVA.

1.3.1. CONCEPTO Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA.

La leucoplasia verrugosa proliferativa fue descrita por primera vez en 1985 por Hansen y *cols*.[10] como una enfermedad de origen desconocido con gran tendencia a desarrollar áreas de carcinomas. Definieron a esta entidad como una forma particular de leucoplasia oral agresiva de larga evolución, que se inicia como una simple placa blanca de hiperqueratosis que con el tiempo va extendiéndose y haciéndose multifocal, confluente, exofítica y proliferativa. Estos pacientes se caracterizaban por presentar lesiones de crecimiento lento, persistentes, irreversibles y resistentes a todo tipo de tratamientos.

Inicialmente esta entidad fue descrita como una enfermedad de espectro continuo clínico-patológico, en la que las lesiones de los pacientes podían clasificarse en diez grados histológicos, con la frecuente posibilidad de evolucionar hacia estadios más severos, es decir, hacia carcinomas orales invasivos[10].

Desde entonces, se han publicado numerosas definiciones e incluso subtipos de esta entidad, sin embargo, todas ellas variando muy poco la descripción inicial[1][11][12][13][14].

En el año 2000, Fettig y *cols.* describieron un subtipo al que denominaron "leucoplasia verrugosa proliferativa de la encía" caracterizada por presentar lesiones blanquecinas únicamente localizadas en encía libre o adherida, tanto por vestibular como por lingual o interdental, igualmente con carácter progresivo, persistente y recurrente. Pese a presentar características clínicas e histológicas similares al resto de las LVP, los autores lo consideraron como un subgrupo distinto pues estos pacientes no presentaban lesiones en otras localizaciones que no fueran las encías[11].

En 2007, Cabay *y cols.* definieron la LVP como una forma clínica de leucoplasia oral caracterizada por un curso progresivo y persistente con aspectos clínicos e histopatológicos cambiantes y con alta progresión hacia carcinoma oral[12].

Posteriormente, Profesor Aguirre-Urizar en 2011, propuso cambiar el término "verrugoso" por "multifocal" para referirse a estos pacientes con el término "leucoplasia multifocal proliferativa" con el objetivo de reducir su infradiagnóstico y mejorar el

diagnóstico precoz, ya que, argumentaba que en muchos casos las lesiones iniciales no son verrugosas y que cuando adquieren ese aspecto, histológicamente pueden ya corresponder a un carcinoma verrugoso[13].

Recientemente, Villa *y cols.* en 2018 propusieron emplear el término "leucoplasia proliferativa" para estos pacientes, ya que no todos presentaban lesiones verrugosas. Así mismo describieron un subtipo clínico al que denominaron "eritroleucoplasia proliferativa" caracterizada por presentar lesiones eritematosas prominentes en más de un 25% total de la mucosa afectada y tener la mayor tasa de transformación maligna[14].

Finalmente, en la reciente actualización celebrada en Glasgow en 2020, coordinada por el Centro Colaborador de la OMS para el Cáncer Oral, expertos internacionales en medicina y patología oral propusieron continuar empleando el término "leucoplasia verrugosa proliferativa", ya que, está ampliamente aceptado en la literatura científica desde su descripción original y el cambio de terminología propuesta por los autores anteriormente nombrados no tiene un fundamento suficientemente demostrado con evidencia científica para anular la terminología con la que se definió inicialmente. Por lo tanto, definieron a este grupo de pacientes como una forma distinta de leucoplasia oral multifocal caracterizada por tener un curso clínico progresivo, persistente e irreversible con presencia de múltiples leucoplasias orales que frecuentemente se vuelven verrugosas[1].

1.3.2. EPIDEMIOLOGÍA

La mayoría de estudios publicados corresponden a estudios observacionales retrospectivos con una muestra estudiada que varía desde estudios de casos a series de 81 pacientes. Las cohortes que incluyen un mayor número de pacientes corresponden a las descritas en España por el grupo del Profesor Bagán *y cols*.[15] con 81 pacientes seguida de la cohorte de Reino Unido descrita por Thomson *y cols*.[16] con 80 pacientes.

En relación al sexo, existe una mayor incidencia en mujeres siendo la relación hombres/mujeres cercanas al 1/1,5, es decir, hay una clara predilección por el sexo femenino, ya que, de los pacientes diagnosticados de LVP cerca del 65% son mujeres[10][11][14][15][16].

En cuanto la edad de aparición o diagnóstico de la enfermedad, se observa que

afecta mayoritariamente en la sexta década de vida, siendo la edad media de 63,6 años[10][11][15][16].

Podemos observar que se han realizado más estudios sobre esta enfermedad a nivel europeo, sobre todo en países como España, Italia y Reino Unido[12][15]. También se han realizado varias investigaciones en América, sobre todo en Estados Unidos seguido de Brasil[10][11][14]. Por último, en el continente asiático esta entidad ha sido menos estudiada[16].

1.3.3. ETIOLOGÍA.

Es una enfermedad de etiología desconocida que no se ha relacionado con factores de riesgo conocidos para el cáncer oral como el tabaco, el betel quid o el alcohol[11]. Se cree que es una entidad de origen multifactorial.

- TABACO.

El tabaco es un claro ejemplo de agente carcinogénico que actúa directamente sobre la mucosa oral produciendo una serie de cambios anatomofisiológicos e inflamación crónica por el efecto irritativo local de ciertos componentes del humo como los fenoles, aldehídos, monóxido de carbono, nicotina y, sobre todo, hidrocarburos aromáticos presentes en el alquitrán. Las personas con diferentes hábitos tabáquicos, tanto fumado como masticado, tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedades orales como leucoplasias, fibrosis oral submucosa o carcinoma oral de células escamosas (COCE) y se asocia de forma directa con una mayor frecuencia y duración del consumo[17]. A pesar de la estrecha relación entre el tabaquismo y otros trastornos orales potencialmente malignos o incluso el carcinoma oral, en la mayoría de series descritas de LVP no se ha encontrado una relación significativa, en el total de estudios analizados observamos que 276 de 756 pacientes eran fumadores, por lo que la prevalencia de fumadores es cercana al 37%. Cabe destacar que existen diferencias entre las proporciones de pacientes fumadores entre las distintas cohortes, por ejemplo, de la cohorte de Favia *y cols.*[18] con 48 pacientes, sólo 11 eran fumadores (23%) así como en la de Campisi *y cols.*[19] con 58 pacientes de los cuales 17 eran fumadores o exfumadores (29%). Por otra parte, Borgna *y cols*.[20] reportaron que de los 48 pacientes, 33 eran fumadores (69%); porcentaje similar al de Hansen *y cols.*[10] que en su descripción inicial reportaron que el 60% de sus 30 pacientes eran fumadores.

- ALCOHOL.

El consumo de alcohol también es considerado uno de los principales carcinógenos para el cáncer de la cavidad oral, sin embargo, la prevalencia en pacientes con LVP es muy baja, cercana al 11% de todos los pacientes. Las series de casos con mayor tasa de pacientes consumidores de alcohol son las descritas por la cohorte de Reino Unido de Borgna *y cols.*[20] de los cuales 27 de los 48 pacientes consumían alcohol (57%), seguido de las de Campisi *y cols.*[19] y Gandolfo *y cols.*[21] con un 17% y 25%, respectivamente, ambas cohortes pertenecientes a Italia.

- VIRUS PAPILOMA HUMANO.

Desde el inicio de su descripción, varios estudios han investigado la posible asociación de esta entidad con una etiología vírica, y más exactamente con los oncovirus. Es por ello, que el virus del papiloma humano (HPV) ha sido ampliamente estudiado. En 1995, Palefsky *y cols.*[22] detectaron HPV-16 en siete de las nueve muestras estudiadas de siete pacientes y sólo en un paciente el HPV-18. Dos años más tarde, Gopalakrishnan *y cols.*[23] identificaron HPV-16 y HVP-18 en dos de los diez pacientes que estudiaron. Años más tarde, tres estudios[11][24][25] no encontraron asociación entre LVP y la infección por papilomavirus. Campisi y cols.[19] estudiaron en 58 pacientes con LVP la presencia de HPV-DNA y lo compararon con una cohorte de 90 leucoplasias orales, sin embargo, tampoco encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Más recientemente, dos estudios realizados en Reino Unido[20] y Estados Unidos[26] tampoco encontraron asociación entre LVP y HPV. Como se puede observar, existe controversia sobre el papel del HPV en la LVP, ya que, los resultados parecen contradictorios, pero sopesando la balanza hacia una falta de asociación con el HPV.

- VIRUS EPSTEIN-BARR.

Dos estudios del grupo de Bagán *y cols*.[27][28] no han encontrado una relación significativa entre la infección por virus de Epstein-Barr (EBV) y su papel en la etiología de LVP. En el estudio preliminar de 2008[27], encontraron mayor prevalencia del virus en pacientes con LVP (cuatro de los cuales posteriormente desarrollaron COCE), pero no pudieron relacionarlo directamente como un agente causal, ya que también se encontró en pacientes con COCE. Los mismos autores recalcan que podría ser una infección asociada a un epitelio con múltiples alteraciones severas durante un largo período de

tiempo y que el tamaño muestral es pequeño. Años más tarde, en 2016, realizaron un estudio salival[28] para evaluar la prevalencia de EBV-ADN e igualmente no encontraron diferencias significativas entre los subgrupos analizados de LVP, COCE y controles sanos.

- VIRUS DE LA HEPATITIS C.

La infección por virus de la hepatitis C se ha relacionado fuertemente con estos pacientes únicamente en el estudio de Favia *y cols.*[18], ya que, en su cohorte de 48 pacientes el 75% presentaba dicha infección. Además, de los 33 pacientes que desarrollaron segundos tumores primarios, el 88% era VHC positivo. Sin embargo, hay que interpretar con cautela dichos resultados debido al diseño del estudio, tamaño muestral, la falta de evidencia científica corroborada por otros estudios independientes y al posible sesgo de selección porque es conocida la propagación endémica del virus en el sur de Italia[18].

- INFECCIÓN FÚNGICA: CANDIDA.

Al igual que los virus anteriormente nombrados, este agente infeccioso fue estudiado al principio para evaluar su posible asociación en la etiología o progresión de la enfermedad. Existen pocos estudios que intenten identificar la presencia de *Cándida albicans* en estos pacientes, así en la primera descripción de Hansen *y cols.*[10] observaron que el 63% de los 19 pacientes estudiados eran positivos para este patógeno mediante tinción PAS. Posteriormente, el mismo grupo de la Universidad de San Francisco en 1997[29], identificaron que el 50% de los 38 pacientes estudiados presentaban dicha infección, sin embargo, no encontraron una correlación con su etiología o progresión hacia la transformación maligna, por lo que podría ser una infección secundaria sobre unas lesiones ya existentes.

1.3.4. CUADRO CLÍNICO.

Como ya hemos comentado anteriormente, los pacientes con leucoplasia verrugosa proliferativa se caracterizan por presentar lesiones blanquecinas multifocales que pueden localizarse en cualquier parte de la mucosa oral. Estas lesiones presentan un crecimiento lento que con el tiempo se van extendiendo ocupando otras superficies de la mucosa oral y van confluyendo[10]. Esta presentación clínica y su comportamiento son importantes

para poder realizar un diagnóstico correcto.

Inicialmente, se ha descrito que se manifiestan como simples placas blancas homogéneas, planas y asintomáticas con características histopatológicas de hiperqueratosis sin displasia, que se van extendiendo a lo largo del tiempo, volviéndose proliferativas[10].

De forma general, el diagnóstico de estos pacientes se hace de manera retrospectiva y en estadios avanzados cuando el curso de la enfermedad ha progresado hacia la multifocalidad. Varios estudios con un tamaño muestral considerable han corroborado la afectación de múltiples localizaciones en estos pacientes y que se encuentran mayormente afectadas las encías, mucosa alveolar, paladar y mucosa yugal[1][10][14][15][20][21]. Basándose en que las encías están frecuentemente involucradas, Fettig y *cols.*[11] describieron una serie de casos de LVP que presentaban de forma inicial lesiones blanquecinas planas, bien delimitadas en encía libre que con el tiempo se iban extendiendo a lo largo del margen gingival adquiriendo una superficie papilar-verrugosa, nodular o moteada[11]. Posteriormente, algunos autores han denominado a estas leucoplasias circunscritas en encía marginal de forma circunferencial como un "anillo alrededor del cuello". Así mismo, estos autores señalaron que podría tratarse de un signo clínico inicial de LVP, especialmente si hay afectación multifocal y/o un marcado engrosamiento de la lesión o presencia recurrencias tras su escisión[30].

Continuando en el camino hacia un diagnóstico precoz de la enfermedad, McParland y Warnakulasuriya[31] en 2021, describieron de forma retrospectiva una cohorte de 51 pacientes con diagnóstico clínico final de LVP pero que inicialmente fueron diagnosticados 4 de ellos de queratosis friccional, 17 de leucoplasia oral unifocal y 30 pacientes de liquen plano oral (LPO) reticular. A los pacientes se les realizó un seguimiento durante 16 años y observaron que la progresión gradual hacia LVP se producía en una media de 3,4 años hasta el diagnóstico definitivo. Estos autores recalcaron que hay que prestar especial atención cuando clínicamente se observen lesiones que inicialmente simulen áreas liquenoides y que vayan adquiriendo una apariencia de placas blancas homogéneas o incluso verrugosas, pues estaríamos ante cambios propios de una progresión a leucoplasia verrugosa proliferativa[31].

En este sentido, varios autores ya habían descrito que la presencia de ciertas

características clínicas o histopatológicas liquenoides y la LVP pueden formar parte de una misma enfermedad[16][32][33][34]. Mete *y cols*.[32] en 2010, fueron los primeros en reportar un caso clínico de una mujer con lesiones en forma de placas verrugosas linguales que inicialmente exhibieron características histopatológicas liquenoides que simulaban una enfermedad liquenoide como el liquen plano oral. Del mismo modo, Lópes *y cols*.[33] describieron cinco años más tarde otro caso con características clínicas y evolutivas similares. Coincidiendo con esta hipótesis, años más tarde Susan Müller[34], también concluyó que las lesiones tempranas de LVP pueden presentar características liquenoides por lo que es necesario una cuidadosa correlación clínico patológica para un correcto diagnóstico. A pesar de todo lo descrito anteriormente, el grado de evidencia científica es limitado, pues son descripciones de casos aislados sin formar parte de cohortes amplias.

Varias series de casos también han descrito la evolución del liquen plano oral a LVP [16][35]. Por ejemplo, en el estudio preliminar de Garcia-Pola y cols·[35] describieron un grupo de 14 pacientes con LPO que posteriormente desarrollaron lesiones en forma de placas blancas, verrugosas y multifocales en un período medio de 4 años. Estos pacientes correspondían a un 2,7% de su cohorte de 515 pacientes con LPO. Thomson y cols·[16] también caracterizaron de su cohorte inicial de 590 pacientes con TOPM tratados con láser CO_2, dos subcohortes correspondientes a 118 pacientes con lesiones liquenoides orales (LLO) y 80 con LVP. Los autores informaron que en diez pacientes se identificaron características tanto de LLO como LVP, hipotetizando que ambas entidades podrían ser parte de un mismo continuo de enfermedad. Sin embargo, en ninguno de los dos estudios se especifican los criterios diagnósticos reconocidos empleados en el diagnóstico de LVP.

Con el paso del tiempo, los pacientes pueden ir desarrollando lesiones con un amplio espectro de características clínicas. Estas lesiones heterogéneas varían desde múltiples placas blancas lisas o fisuradas (leucoplasias homogéneas) que se van volviendo exofíticas y verrugosas (leucoplasias no homogéneas)[1][10][36][37], hasta áreas eritematosas, papulares o eritroleucoplasias que pueden ir confluyendo y diseminándose por toda la mucosa oral[10][14][20][36]. Pese a que no todos los pacientes exhiben lesiones con apariencia verrugosa, es cierto que a lo largo de su seguimiento la mayoría presenta un patrón verrugoso[1][10][36][37].

En estadios más avanzados, se puede observar su evolución a la transformación maligna en carcinoma verrugoso o carcinomas orales de células escamosas[1][10][38]. Las

características clínicas y pronósticas de los carcinomas derivados de estos pacientes serán abordados en un apartado posterior de la presente tesis.

1.3.5. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS.

En un primer momento, Hansen *y cols.*[10] describieron en esta enfermedad una evolución clínico-patológica continua a lo largo de su seguimiento y clasificaron histológicamente las lesiones de estos pacientes en diez grados según la severidad de los hallazgos microscópicos. Este espectro clínicopatológico constaba de cinco estadios diferenciados denominados "leucoplasia clínica", "leucoplasia verrugosa", "carcinoma verrugoso", "carcinoma papilar de células escamosas" y "carcinoma de células escamosas poco diferenciado" que a su vez podían presentar estadios intermedios.

Posteriormente, Batsakis *y cols.*[39] propusieron cambios en ese estadiaje histológico, pues argumentaban que el carcinoma papilar de células escamosas es una entidad clinicopatológica aparte y que en grados iniciales habría que diferenciar entre leucoplasias clínicas sin presencia de displasia y leucoplasias con displasia, por lo que propusieron una nueva clasificación con 4 etapas histológicas con estadios intermedios.

La diversidad de características histopatológicas dentro del espectro de LVP, ha dificultado desarrollar unos criterios uniformes y reproducibles. Por ello existe una notable variabilidad inter-observadores en el diagnóstico de leucoplasia verrugosa proliferativa lo que supone una gran dificultad para reproducir la metodología entre los diversos autores[40].

Se ha descrito que formas iniciales de LVP pueden exhibir características liquenoides en biopsias caracterizadas por la presencia de infiltrados linfocitarios en forma de banda adyacente a células basales y células disqueratosicas, pese a clínicamente presentarse como leucoplasias[31][34]. Sin embargo, una marcada ortoqueratosis con una superficie corrugada no es un hallazgo histológico típico de LPO por lo que permitiría evitar diagnósticos erróneos. También se han descrito como hallazgos histológicos tempranos en LVP, la presencia de lesiones corrugadas hiper o paraqueratósicas con arquitectura verrugopapilar en ausencia o mínima atipia citológica que no suele estar presente en otras lesiones orales[34][41].

Un concepto importante a destacar es la displasia epitelial. Esta se define

microscópicamente como un conjunto de cambios arquitecturales y citológicos que se gradúan en base a su profundidad y severidad. Supone un elemento morfológico clave para conocer el riesgo de posible malignidad. Está ampliamente aceptada la clasificación de la displasia en función del grado de afectación epitelial en leve, moderada y severa si hay afectación <1/3, entre 1/3 y 2/3 y >2/3 del espesor epitelial, respectivamente, así como la presencia de otras alteraciones atípicas celulares además de esa extensión en el epitelio[34][41]. La mayoría de pacientes con LVP se someten a múltiples biopsias durante su seguimiento, pese a no presentar de forma general displasia epitelial al principio, posteriormente pueden presentan distintos grados de displasia y finalmente pueden evolucionar a carcinomas invasivos[10][14][20][26][29][41]. Se ha observado que la LVP y las leucoplasias orales unifocales clásicas comparten características histopatológicas de displasia epitelial similares, tanto arquitecturales, organizativas como citológicas[42]. En una reciente revisión sistemática y meta-análisis, se observó que en las biopsias iniciales realizadas a 50 (31%) de los 162 pacientes con LVP incluidos presentaban algún grado de displasia epitelial[43].

En un reciente consenso de expertos patólogos internacionales apoyados por la Academia Estadounidense de Patología Oral y Maxilofacial y la Sociedad Norteamericana de Patólogos de Cabeza y Cuello[44], se ha intentado proporcionar criterios microscópicos uniformes para la descripción de la LVP, en la que se describen tres categorías histopatológicas: (1) lesión no reactiva hiperqueratósica corrugada orto (o para) queratinizada, (2) proliferación epitelial no reactiva voluminosa hiperqueratósica y (3) lesión sospechosa de carcinoma oral de células escamosas (categoría que también engloba al carcinoma verrugoso y carcinoma de células escamosas con arquitectura papilar). Los autores justificaron emplear el término “no reactiva” con el fin de detallar que la lesión biopsiada no supone una reacción friccional ante un trauma, infección o patología ampollar. Así mismo, recalcaron que, si hay presencia de displasia epitelial, se emplearía ese diagnóstico en lugar de las dos primeras categorías previamente descritas. Finalmente, los autores enfatizaron la importancia de una estrecha correlación clínica-patológica[44].

1.3.6. DIAGNÓSTICO / CRITERIOS DIAGNÓSTICOS.

Los criterios diagnósticos de una enfermedad son pilares fundamentales tanto para su reconocimiento como para excluir posibles diagnósticos diferenciales[45]. Hasta la fecha, cuatro grupos de investigación han propuesto diferentes criterios diagnósticos en base a los datos clínicos, histopatológicos y evolutivos antes descritos[10][14][46][47].

Como ya hemos comentado, Hansen y cols.[10] fueron los primeros es describir esta entidad como una forma específica de leucoplasia oral que comienza como una simple hiperqueratosis que con el tiempo se extiende y se vuelve multifocal. Las lesiones presentan un crecimiento lento, son persistentes, irreversibles y frecuentemente desarrollan componentes eritematosos. Con el paso del tiempo, algunas áreas se vuelven exofíticas, parecidas a verrugas y evolucionan a lesiones clínica e histopatológicamente idénticas al carcinoma verrugoso y al carcinoma oral de células escamosas. Además, estas lesiones son resistentes a todo tipo de terapias.

Posteriormente, en 2010, Cerero – Lapiedra *y cols.*[46] propusieron para el diagnóstico adecuado y objetivo de esta entidad cinco criterios diagnósticos mayores y cuatro menores (tabla 1). Para establecer el diagnóstico se debía cumplir una de las dos combinaciones siguientes: tres criterios mayores o dos criterios mayores más dos criterios menores (siendo siempre necesario cumplir el criterio histopatológico).

Criterios mayores:	Criterios menores:
Lesión de leucoplasia en más de dos localizaciones orales diferentes, con predominio en encías, procesos alveolares o paladar.	Lesión de leucoplasia oral que ocupe en total al menos 3 cm al sumar todas las áreas afectadas.
Existencia de alguna zona verrugosa.	Que la paciente sea mujer.
Que las lesiones se hayan extendido o engrosado durante su evolución.	Que no fume.
Que se haya producido una recidiva en un lugar ya tratado.	Tiempo de evolución superior a 5 años.
Histológicamente puede existir desde una simple hiperqueratosis del epitelio, hasta zonas de hiperplasia verrugosa, carcinoma verrugoso o bien COCE, in situ o infiltrante.	

Tabla 1: Criterios diagnósticos mayores y menores propuestos por Cerero – Lapiedra y *cols.*[46].

Tres años más tarde, Carrard *y cols.*[47] sugirieron simplificar los criterios diagnósticos omitiendo la distinción entre criterios mayores y menores, y propusieron que debían cumplir los siguientes cuatro aspectos: (A) presencia de leucoplasias con áreas verrugosas o similares a verrugas, que afecten a más de dos localizaciones orales (dorso de la lengua, unilateral o bilateral, borde de la lengua, mucosa yugal, mucosa alveolar o encía del maxilar superior, mucosa alveolar o encía del maxilar inferior, paladar duro y blando, suelo de boca, labio superior o inferior), (B) tamaño mínimo de 3 cm del conjunto de lesiones, (C) período de seguimiento de cinco años que documente la evolución de la enfermedad hacia la progresión y crecimiento del área lesional implicada, con recidivas en las áreas tratadas previamente y (D) disponibilidad de al menos un estudio histopatológico para descartar la transformación maligna en carcinoma verrugoso o carcinoma oral de células escamosas.

Un lustro más tarde, Villa *y cols.*[14] propusieron cuatro criterios que debían cumplirse: (A) presencia de lesiones blanquecinas/queratósicas lisas, fisuradas, verrugosas o eritematosas con o sin ulceraciones, (B) lesiones multifocales no contiguas o una lesión grande única superior a 4 cm que afecte a una localización o una lesión superior a 3 cm que afecte a localizaciones contiguas, (C) lesiones que con el tiempo progresen y se expandan en tamaño y/o desarrollen multifocalidad y (D) histopatología que, si no muestra abiertamente displasia o carcinoma, muestre hiperqueratosis, paraqueratosis, atrofia o acantosis con mínima o ninguna atipia citológica, con o sin banda linfocítica o hiperplasia verrugosa; características que no deben respaldar un diagnóstico de queratosis por fricción o reactiva. Estos autores descartaron la presencia de áreas verrugosas como requisito para el diagnóstico pues encontraron que la mayoría de los pacientes mostraban lesiones blanquecinas lisas o fisuradas (71,4%) y sólo 10 pacientes (23,8%) presentaban características verrugosas prominentes, definidas como afectación con lesiones verrugosas en el 27% de la mucosa oral. Sin embargo, en sus resultados, destacaron que sólo 3 pacientes (7,1%) no presentaban características verrugosas; por lo que podemos suponer que el resto (92,9%) sí presentaban lesiones verrugosas. Del mismo modo, el seguimiento de esta cohorte de pacientes fue corta, pues la media de seguimiento a los pacientes que desarrollaron carcinomas orales fue de 5,8 años, pero el seguimiento a los que no transformaron en cáncer oral fue sólo de 1,5 años; por lo que, si el periodo de seguimiento es corto, evidentemente los pacientes no van a desarrollar aún lesiones verrugosas.

Como se puede observar, la mayoría de propuestas difieren poco de la descripción y definición inicial[10][48]. De ahí, que continúe siendo difícil poder realizar un diagnóstico precoz de esta enfermedad. Además, como ya hemos comentado antes, en estadios iniciales de su historia natural, existe la posible superposición de características clínicas y patológicas con leucoplasias orales unifocales o lesiones liquenoides orales que pueden dificultar el diagnóstico temprano[16][31][35][49]. Es por ello, que algunos autores[49] sugieren incluir como criterios diagnósticos de LVP no sólo a lesiones blanquecinas en forma de placas, sino también en forma de lesiones liquenoides, liquen plano oral o eritroleucoplasias cuyo curso sea progresivo con diseminación local multifocal (inicialmente o a lo largo del seguimiento), con presencia de características verrugosas en algunas lesiones y frecuente recurrencia tras su manejo. Sin embargo, es necesaria mayor evidencia científica que corrobore estas hipótesis con estudios multicéntricos y mayores cohortes para considerar este tipo de lesiones como precursoras de LVP.

Por el momento, no existen unos criterios diagnósticos que abarquen todo el espectro clínico-patológico de esta enfermedad y que permitan su diagnóstico precoz[48]. Cabe recalcar que el diagnóstico tiene que basarse en una correlación clínico – patológica – evolutiva y no únicamente en unos criterios u otros de forma aislada. Esto nos puede ayudar a diferenciar la LVP de leucoplasias unifocales e incluso lesiones liquenoides, ya que, pese a compartir características clínicas e histológicas, la progresión y comportamiento evolutivo difiere significativamente entre estas entidades[49].

Para concluir, por el momento, el diagnóstico se basa en la asociación de características clínicas e histopatológicas así como en observar la evolución progresiva de las lesiones hacia la presentación multifocal de aspecto verrugoso. Es imperativo realizar una buena descripción clínica y documentación fotográfica de toda la mucosa oral de los pacientes tanto para el diagnóstico como para su seguimiento.

1.3.7. TRATAMIENTOS.

El manejo de estos pacientes tiene como objetivo prevenir el desarrollo de cáncer oral, reducir su mortalidad y morbilidad, así como mejorar su supervivencia y calidad de vida[50]. Sin embargo, el manejo de estos pacientes es complejo y supone un desafío porque no hay ningún tratamiento que sea realmente efectivo demostrado con suficiente evidencia científica[50][51].

Está ampliamente demostrado en la literatura científica que estos pacientes presentan lesiones persistentes, progresivas e irreversibles[1][10][16][20][38]. Con el fin de describir las distintas modalidades terapéuticas empleadas y cuantificar las recurrencias tras los mismo, en 2021 publicamos una revisión sistemática y meta-análisis de la incidencia de las recurrencias en el manejo de pacientes con LVP[51]. De la búsqueda electrónica en las bases de datos junto con la búsqueda manual de referencias primarias, obtuvimos un total de 922 estudios. Tras eliminar las referencias duplicadas y los estudios que no cumplían los criterios de inclusión, realizamos el análisis cualitativo y cuantitativo de 12 estudios. Un total de 397 pacientes diagnosticados de LVP fueron incluidos, cuya edad media era de 62 años, siendo 248 mujeres (62,5%), y con un periodo de seguimiento medio de 79 meses. Encontramos distintas modalidades de tratamientos para su manejo, desde una estrecha vigilancia con biopsias múltiples hasta la escisión quirúrgica de las lesiones con bisturí frío o láser, tratamiento médico sistémico o tópico (incluyendo antiinflamatorios, retinoides, antivíricos), terapias fotodinámicas, radioterapia, quimioterapia y combinaciones de los mismos (tabla 2).

		Número de pacientes
Escisión quirúrgica sola		112
Escisión quirúrgica en combinación a	Ablación láser	11
	Terapia fotodinámica	2
	Retinoides tópicos	5
	Corticoides tópicos	5
	Retinoides + corticoides tópicos	1
	Metisoprinol	25
	Radioterapia	24
	Quimioterapia	3
	Radioterapia + Quimioterapia	3
Láser CO_2		129
Láser ND:YAG		7
Láser er: YAG		2
Láser en combinación a	Corticosteroides tópicos	6
	Corticosteroides tópicos y sistémicos	1
	Terapia fotodinámica	2
	Retinoides	1
TOTAL		339

Tabla 2. Pacientes tratados mediante escisión quirúrgica, láser o diferentes combinaciones.

(Tomada de Proaño-Haro A, Bagan L, Bagan JV. Recurrences following treatment of proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review and meta-analysis. J Oral Pathol Med. 2021; 50: 820 – 8).

Como se puede observar, el tratamiento más empleado fue la escisión quirúrgica con bisturí frío o láser en 339 pacientes (85% de la población estudiada). Un total de 191 pacientes fueron tratados mediante escisión quirúrgica sola o en combinación a otros tratamientos y 148 fueron tratados con distintos tipos de láser o combinaciones. Nueve pacientes recibieron tratamientos médicos exclusivos (sistémicos y/o tópicos), sólo cinco pacientes no recibieron ningún tipo de tratamiento y 44 pacientes de la cohorte de Borgna *y cols*.[20] fueron tratados de forma conservadora mediante revisiones periódicas y biopsias seriadas durante su seguimiento.

Como resultados de los tratamientos, obtuvimos que 60 pacientes se encontraron libres de enfermedad con una respuesta completa al tratamiento láser CO_2, otros tras la escisión quirúrgica y otro en combinación de cirugía y radioterapia. Y como resultado del meta-análisis del efecto global de la combinación de proporciones obtuvimos una recurrencia del 67,2% (IC 95%: 48,3 - 81,8) en pacientes con LVP tratados mediante distintas modalidades y ausencia de sesgo de publicación (figura 1). A partir de estos resultados, pudimos confirmar y cuantificar la alta tasa de recurrencia que presentan estos pacientes, sin embargo, no pudimos establecer posibles asociaciones con variables clínico patológicas ni sociodemográficas por la falta de información en los estudios incluidos[51].

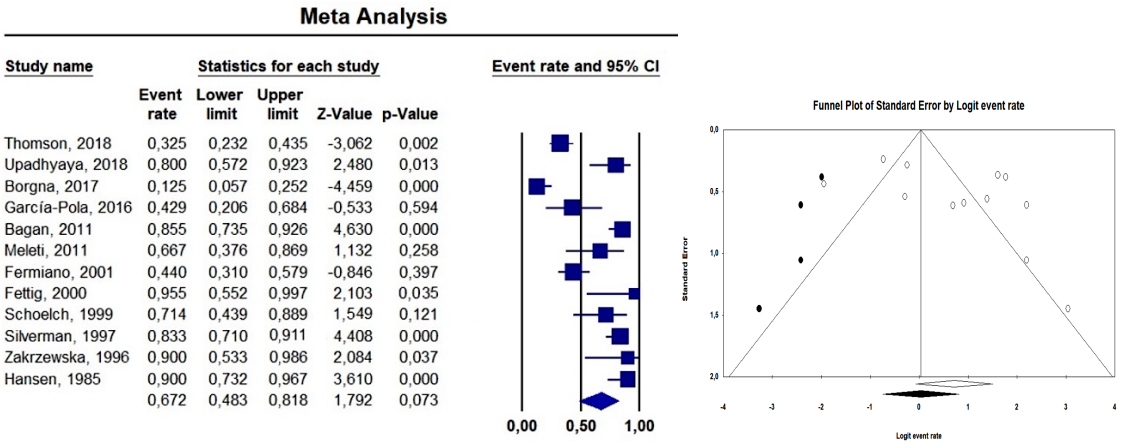


Figura 1. Diagrama de bosque o "forest plot" y diagrama de embudo o "funnel plot" que representan gráficamente el meta-análisis. *(Tomada de Proaño-Haro A, Bagan L, Bagan JV. Recurrences following treatment of proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review and meta-analysis. J Oral Pathol Med. 2021; 50: 820 – 8).*

La inmunoterapia como tratamiento neoadyuvante se ha demostrado eficaz para el tratamiento del carcinoma oral de células escamosas. Por lo que, el alto riesgo a desarrollar cáncer de los pacientes con LVP (particularmente aquellos con alta expresión de PD-L1) ha permitido considerarlos como candidatos para tratamientos biológicos, de echo actualmente, hay un ensayo clínico de fase II en curso con nivolumab y otro con pembrolizumab (tabla 3)[50].

Referencia del ensayo clínico	Título	País	Estado
NCT03692325	Safety and efficacy of Nivolumab in treating oral proliferative verrucous leukoplakia	USA	Reclutamiento
NCT03603223	A phase II open label, single arm study of Pembrolizumab in treating participants with leukoplakia.	USA	Reclutamiento

Tabla 3. Ensayos clínicos en curso para el tratamiento de la LVP. *(Modificada de Kerr AR, Lodi G. Management of oral potentially malignant disorders. Oral Dis. 2021; 27: 2008 – 25)*.

A modo de resumen, concluimos con que no existen protocolos aceptados universalmente para su manejo y no existe evidencia científica que indique que algún tratamiento médico, quirúrgico o combinado reduzca la recurrencia de las lesiones o el riesgo de transformación maligna.

El manejo de estos pacientes se debe basar en un buen seguimiento con registros fotográficos de toda la mucosa oral para poder detectar posibles cambios clínicos en revisiones cada 3 – 6 meses, realizar biopsias ante cualquier cambio de las mucosas, si existe presencia de displasia severa deberá realizarse la extirpación quirúrgica, también hay que educar a los pacientes para eliminar posibles factores de riesgo cancerígenos como el tabaco y alcohol. Si los pacientes sufren transformación maligna durante su seguimiento, serán remitidos al médico cirujano u oncólogo para su correcto manejo[10][14][38][51].

1.3.8. TRANSFORMACIÓN MALIGNA.

Todos los pacientes con trastornos orales potencialmente malignos se caracterizan por presentar una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer oral. Sin embargo, esta posible evolución es variable e impredecible[1][3]. Así pues, las tasas de transformación malignas (TM) informadas en recientes revisiones sistemáticas son de 9,8% (IC 95%: 7,9 – 11,7) para la leucoplasia oral[52], 2,28% (IC 95%: 1,49 – 3,2) para el liquen plano oral[53], 2,11% (IC 95%: 0,01 – 6,33) para las lesiones liquenoides orales[53] y 4,2% (IC 95%: 2,7 – 5,6) para la fibrosis oral submucosa[54].

El aspecto evolutivo más relevante de la LVP es su alta tendencia a transformación maligna en cáncer oral. Desde la primera descripción de Hansen *y cols.*[10] ya quedó patente el alto riesgo de desarrollo de carcinomas que tenían estos pacientes, ya que 26 (87%) de los 30 pacientes progresaron hacia carcinoma verrugoso o COCE. Coincidiendo con estos resultados, años más tarde Silverman y Gorsky.[29] también describieron que un alto porcentaje (70'4%) de su cohorte de 54 pacientes había evolucionado a cáncer oral en un periodo de seguimiento medio de 7,7 años al igual que Villa *y cols.*[14] que reportaron un porcentaje similar de afectación (71,4%) en un tiempo medio de 3 años o Favia y cols.[18] cuya tasa de transformación maligna de la cohorte de 75 pacientes fue del 64%. En otras cohortes también con un tamaño muestral considerable, las tasas de transformación maligna son cercanas al 45% del total de pacientes incluidos[15][19][20][21]. Por ejemplo, en la cohorte de pacientes más grande de LVP que incluye a 81 pacientes publicada por Prof. Bagán y cols.[15] un total de 33 pacientes (40,7%) desarrollaron cáncer oral. Similares tasas comunicaron Gandolfo *y cols.*[21] en su cohorte de 47 pacientes y Campisi *y cols.*[19] en su cohorte de 58 pacientes, siendo los porcentajes de transformación maligna de 40,4% y 43,1%, respectivamente. Borgna y *cols.*[20] informaron un porcentaje un poco mayor, siendo de 47,9% de los 48 pacientes incluidos. En la tabla 4 se resume las tasas de transformación maligna reportadas en diferentes estudios. Todas las cohortes de los autores anteriormente nombrados[10][14][15][18][19][21][29] coincidían en que las mujeres presentaban mayor tendencia a desarrollar carcinomas orales (tabla 4).

Autor y año	Número de pacientes	Número de pacientes con transformación maligna (%)	Tiempo medio TM (años)	Sexo de pacientes con TM
Favia y cols., 2020[18]	75	48 (64%)	NE	25/48 F (52,1%)
Bagan y cols., 2019[15]	81	33 (40'7%)	6	25/33 F (75'8%)
Upadhyaya y cols., 2018[30]	20	9 (45%)	7,6	8/9 F (88'9%)
Villa y cols., 2018[14]	42	30 (71'4)	3,08	NE
Borgna y cols., 2017[20]	48	23 (47'9%)	2	11/23 F (48%)
Gandolfo y cols., 2009[21]	47	19 (40'4%)	2	14/19 F (73'7%)
Campisi y cols., 2004[19]	58	25 (43'1%)	NE	NE
Silverman y cols., 1997[29]	54	38 (70'4%)	7,7	32/38 F (84'2%)
Hansen y cols., 1985[10]	30	26 (86'7%)	NE	21/26 F (81%)

Tabla 4. Tasas de transformación maligna reportadas en cohortes de pacientes con LVP. NE: no especificado. F: femenino.

Una reciente revisión sistemática y meta-análisis realizada por Ramos – García y *cols.*[55] en 2021, informaron una proporción de transformación maligna global del 43,87% (IC 95%: 31,93 – 56,13). Estos autores, analizaron un total de 17 cohortes publicadas, incluyendo a 474 pacientes. Tras diferentes intervalos de tiempo, 211 pacientes evolucionaron a cáncer oral, siendo el carcinoma oral de células escamosas el tipo histológico más común. Las localizaciones más frecuentemente afectadas fueron la encía (40%), seguido de la mucosa yugal (24%), lengua (18%) y paladar (11%). Como ya hemos comentado anteriormente, estos autores también concluyeron que las mujeres estuvieron mayormente afectadas tanto si habían evolucionado a cáncer oral como no, siendo su proporción de transformación maligna del 40,26% (IC 95%: 30,57 – 50,26). Así mismo, en el análisis por subgrupos, encontraron mayor homogeneidad y mayores

tasas de transformación maligna en los estudios realizados en América (57,77%. IC 95%: 40,58 – 74,19), Europa (40,2%. IC 95%: 21,7 – 60,4), según los criterios diagnósticos establecidos por Hansen *y cols*.[10] (56,46%. IC 95%: 35,07 – 76,76) o Villa *y cols*.[14] (51,38%. IC 95%: 42,45 – 60,27) y en estudios de calidad metodológica alta (44,15%. IC 95%: 23,94 – 65,37) o moderada (53,4%. IC 95%: 33,2 – 73,12). Sin embargo, no se encontraron asociaciones entre sexo, edad o hábitos tóxicos y el riesgo de transformación maligna.

Ese mismo año, otro meta-análisis sobre el riesgo de TM[43] informó una proporción global del 65,8% (IC 95%: 55,3 – 76,2). Este estudio incluyó a 16 cohortes. Un total de 314 pacientes de los 504 analizados, desarrollaron por lo menos un carcinoma oral. Del mismo modo, la mayoría de pacientes fueron mujeres (67,4%). En el análisis de subgrupos, coincidieron con los anteriores autores en cuanto a que las localizaciones más frecuentemente afectadas eran las encías/reborde alveolar (38%), lengua (23%) y mucosa yugal (14%), y que el diagnóstico histopatológico más frecuente fue de carcinoma oral de células escamosas (64,8%) seguido del carcinoma verrugoso (33,8%). Los autores también concluyeron que los estudios con mayor período de seguimiento (más de 6 años) presentaban mayor tasa de transformación maligna (67,5%. IC 95%: 41,4 – 81,6). Sin embargo, no encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el riesgo de transformación maligna y las características clínico-patológicas[43]. A diferencia de otro estudio[56] que concluyó que de forma estadísticamente significativa las mujeres son 1,7 veces más propensas a la transformación maligna que los hombres (*Odds ratio* (OR) 0,57. IC 95%: 0,35 – 0,93); que estos pacientes presentan un riesgo 3,8 veces mayor de progresión hacia carcinoma oral de células escamosas en comparación a carcinoma verrugoso (OR 3,75. IC 95%: 1,75 – 8,06); y una probabilidad de desarrollar COCE tres veces mayor en mujeres que en hombres (OR 0,33. IC 95%: 0,18 – 0,59).

Los carcinomas desarrollados en estos pacientes pueden localizarse en cualquier zona de la cavidad oral. Sin embargo, las localizaciones más frecuentes de las tumoraciones malignas son la mucosa gingival y alveolar, seguido de la mucosa bucal, dorso de la lengua y paladar[43][55][57]. Clínicamente el tipo de lesiones malignas que podemos encontrar en estos pacientes son ulcerativas, exofíticas, eritroleucoplasia y lesiones mixtas[14][18][37]. El grupo de investigación de Bagán *y cols*., asociaron de forma significativa la presencia de áreas verrugosas extensas[36], lesiones erosivas/eritematosas y ulcerativas[36][37] en la encía con la transformación maligna. Del mismo modo, Villa y

cols.[14] reportaron que las lesiones eritroleucoplásicas se asociaban con un alto riesgo de malignidad. Favia *y cols*.[18] reportaron que los tumores de los 48 pacientes tenían un tamaño variable de 0,5 a 3 cm y clínicamente se manifestaban como lesiones exofíticas en el 73% de los casos y eritroleucoplasias en el 27% restante.

Otra característica también muy destacable de estos pacientes es la gran predisposición a desarrollar segundos tumores primarios (STP) en diferentes localizaciones de la cavidad oral. Silverman y Gorsky[29] fueron los primeros en describir el desarrollo de STP en 12 (31,5%) de los 38 pacientes que transformaron a cáncer. Posteriormente otros autores confirmaron que cerca al 40% de los pacientes que progresaron a carcinomas orales, posteriormente desarrollaron STP[21][38]. Este aspecto, el grupo del profesor Bagán *y cols*.[15] lo estudiaron en mayor profundidad al comparar de forma retrospectiva un grupo de 33 pacientes con LVP que habían desarrollado dos o más carcinomas orales de células escamosas con otro grupo de 48 pacientes con LVP que no habían transformado a cáncer oral. Concluyeron que el intervalo de tiempo entre el diagnóstico de cada carcinoma y el siguiente era cada vez más corto, siendo la localización más afectada la encía en forma de eritroleucoplasia. Así mismo, destacaron como factores de riesgo a desarrollar STP un mayor periodo de seguimiento y mayor número de localizaciones orales con lesiones. Favia y cols.[18] describieron que el 44% de su cohorte de 75 pacientes desarrollaron segundos tumores primarios en un tiempo medio de 18 meses, siendo igualmente la encía la localización más afectada. Destacaron que 9 pacientes desarrollaron más de tres carcinomas, uno de los cuales desarrolló 12 carcinomas y que 6 pacientes desarrollaron múltiples carcinomas de forma sincrónica.

Se ha descrito en la literatura una tasa de mortalidad global meta-analizada del 21,29% (IC 95%: 8,77 – 36,36) para los carcinomas orales derivados de pacientes con LVP, es decir, presentan un pronóstico favorable[58]. Así mismo, el análisis de metarregresión reveló una tasa de mortalidad significativamente inferior en los pacientes que desarrollaron carcinomas verrugosos[58]. También se ha descrito una recurrencia cercana al 22% tras los tratamientos oncológicos pertinentes y el inusual desarrollo de metástasis[59].

Sólo tres estudios han comparado y evaluado las posibles diferencias clínicas, epidemiológicas y microscópicas entre el COCE convencional y COCE derivado de LVP. Bagán *y cols*.[57] encontraron diferencias entre ambos grupos y concluyeron que los

carcinomas de LVP son más comunes en mujeres no fumadoras y afectan preferentemente a la encía. Akrish *y cols*.[60] plantearon la hipótesis de que son entidades distintas, ya que, los carcinomas de pacientes con LVP presentaban un mejor pronóstico porque su diagnóstico se realizaba en estadios tempranos caracterizados por un menor tamaño y espesor tumoral, ausencia de metástasis linfáticas y, pese a desarrollar más segundos tumores primarios, presentaban una alta tasa de supervivencia a los 4 años. Dos años más tarde, los mismos autores[61] confirmaron mediante un estudio inmunohistoquímico comparativo que presentaban un mejor pronóstico, ya que la expresión de fibroblastos asociados a cáncer fue poco frecuente, lo que puede contribuir a que su crecimiento sea lento y menos invasivo.

Todas estas características de esta enfermedad junto a la posibilidad de desarrollar carcinomas en cualquier localización de la mucosa oral, esté o no afectada por lesiones, se han relacionado ya desde hace varios años con el proceso de cancerización de campo oral[62]. Este concepto fue propuesto por Slaughter *y cols*.[63] en 1953 para intentar esclarecer la aparición de tumores multifocales independientes en la cavidad oral así como la alta propensión a desarrollar recurrencias locales tras los tratamientos. Esta teoría defiende la existencia de células genéticamente mutadas incluso más allá de las áreas con alteraciones clínicas o histopatológicas evidentes. Las principales alteraciones moleculares serían mutaciones en oncogenes o genes supresores tumorales, inestabilidad genómica o pérdida de heterocigosidad. Como consecuencia se desarrolla un campo potencialmente maligno y expansivo que comparte las mismas alteraciones genéticas y desplazan a la mucosa normal hacia la carcinogénesis epitelial[63][64]. En el tracto aerodigestivo superior, estas alteraciones se han correlacionado con exposiciones al tabaco o alcohol. Sin embargo, estos carcinógenos no se han relacionado con la leucoplasia verrugosa proliferativa, lo que sugiere que existen otros mecanismos implicados aún no identificados[65].

1.4. CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

1.4.1. EPIDEMIOLOGÍA.

A nivel mundial en 2020 se registraron 18,1 millones de nuevos casos de cáncer y 9,9 millones de muertes por cáncer. El carcinoma de la cavidad oral y labios fue el decimoctavo cáncer más común, cuya incidencia fue del 2% (377.713) de la totalidad de tumores malignos diagnosticados con una mortalidad que ascendía al 1,8% (177.757)[66]. Existe una gran variabilidad en su incidencia según las distintas regiones del mundo, siendo más frecuente en países del sur Asia central (India, Sri Lanka, Pakistán) así como en regiones del Pacífico (Papúa Nueva Guinea y Melanesia)[66].

El carcinoma oral de células escamosas es la forma más común de cáncer oral y representa el 90% de todas las neoplasias malignas orales. Afecta mayoritariamente a varones, con una proporción de 2:1 frente a mujeres[67][68]. La incidencia aumenta con la edad, y en la mayoría de los casos afecta a personas mayores de 60 años. Sin embargo, recientemente se ha observado un aumento en la incidencia en personas jóvenes menores de 40 años[68].

Su etiología es multifactorial. El alcohol y tabaco son los factores de riesgo más importantes relacionados en su etiopatogenia, así como el betel quid o nuez de areca con o sin tabaco o la exposición solar a radiación ultravioleta. En los últimos años, el virus del papiloma humano y la acumulación de mutaciones genéticas se han considerado factores etiológicos y pronóstico en cáncer de orofaringe[67]. También se han relacionado algunas enfermedades genéticas hereditarias como la anemia de Fanconi, el xeroderma pigmentoso, Síndrome de Cowden o disqueratosis congénica con mayor susceptibilidad a desarrollar COCE[1][67].

1.4.2. CUADRO CLÍNICO.

Las localizaciones más comúnmente afectadas son los bordes laterales y zona ventral de la lengua, suelo de boca, trígono retromolar y pilares amigdalinos[69].

Clínicamente, en estadios iniciales podemos observar lesiones en forma de eritroplasias o eritroleucoplasias con cierta induración a la palpación y los pacientes pueden referir molestias inespecíficas. En estadios avanzados podemos observar lesiones ulceradas, exofíticas o mixtas, mal delimitadas e induradas, por lo que los pacientes

refieren dolor intenso o severo. Dependiendo de la localización del tumor pueden aparecer otros síntomas o signos como parestesias, hemorragias, movilidad dental, dolor de oído, disfagia, disnea, entre otros[69].

Para el diagnóstico definitivo continúa siendo el *gold standard* la toma de una o varias biopsias de la tumoración y el consiguiente estudio histopatológico[67][69].

1.4.3. ESTADIAJE CLÍNICO.

La estadificación tumoral clínica se realiza siguiendo las directrices de la octava edición de clasificación TNM propuesta por la American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2017)[70] que consta de tres parámetros: T (tamaño e invasividad del tumor primario en los tejidos circundantes) (tabla 5), N (afectación metastásica de ganglios linfáticos locorregionales) (tabla 6) y M (presencia de metástasis a distancias) (tabla 7).

Valor T	Correlación clínica de la categoría T
Tx	Datos insuficientes para valorar el tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor ≤ 2cm con profundidad de invasión (DOI) ≤ 5mm.
T2	Tumor ≤ 2cm, con DOI > 5mm o tumor de 2-4cm con DOI ≤ 10mm.
T3	Tumor de 2-4cm con DOI > 10mm o tumor > 4cm con DOI ≤ 10mm.
T4	T4a: Enfermedad local moderadamente avanzada. Tumor > 4cm con DOI > 10mm o que afecta al hueso mandibular/maxilar, seno maxilar o piel.
	T4b: Enfermedad local muy avanzada. Tumor que invade espacio masticador, apófisis pterigoides, base del cráneo o que engloba la arteria carótida interna.

Tabla 5. Correlación clínica según el tamaño e invasividad tumoral conforme a los criterios de la 8ª edición de la AJCC[70].

Valor N	Correlación clínica de la categoría N
Nx	Datos insuficientes para valorar los ganglios linfáticos cervicales.
N0	No existe afectación ganglionar linfática cervical.
N1	Metástasis en un único ganglio ipsilateral al tumor con un tamaño menor o igual a 3cm y sin extensión extranodal o extracapsular (ENE).
N2	N2a: metástasis en un único ganglio ipsilateral al tumor con un tamaño entre 3 y 6cm y sin ENE.
	N2b: metástasis múltiples ganglios ipsilaterales al tumor, ninguna mayor de 6cm y sin ENE.

	N2c: metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales al tumor, ninguna mayor de 6cm y sin ENE.
N3	N3a: metástasis ganglionar mayor de 6 cm y sin ENE.
	N3b: metástasis ganglionar con sospecha clínica de ENE+ (Afectación cutánea, invasión tejidos blandos o afectación nervios).

Tabla 6. Correlación clínica según el estado de los ganglios linfáticos regionales conforme a los criterios de la 8ª edición de la AJCC[70].

Valor M	Metástasis a distancia
M0	No metástasis a distancia.
M1	Presencia de metástasis a distancia.

Tabla 7. Correlación según la presencia o no de metástasis a distancia conforme a los criterios de la 8ª edición de la AJCC[70].

El estadiaje final se realiza agrupando estas tres categorías y proporciona una guía para definir la extensión y pronóstico de la tumoración, así como para determinar la estrategia terapéutica a emplear (tabla 8). El estadio I representa la etapa inicial, caracterizada por un tumor pequeño sin evidencia de diseminación. El estadio IV es el más avanzado, en la que hay evidencia de metástasis o el tumor ha invadido hueso cortical, músculos profundos de la lengua, piel o seno maxilar.

Estadio tumoral	Correlación clínico – patológica del estadio tumoral
Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio I	T1 N0 M0
Estadio II	T2 N0 M0
Estadio III	T3 N0 M0 o T1-T3 N1 M0
Estadio IV	**IVa:** T4a N0-N1 M0 o T1-T4a N2 M0
	IVb: T4b, cualquier N, M0 o Cualquier T, N3, M0
	IVc: cualquier T, cualquier N, M1

Tabla 8. Estadiaje tumoral según las características TNM propuesta por la American Joint Committee on Cancer[70].

1.4.4. PRONÓSTICO.

A pesar de los avances en el diagnóstico precoz y manejo de estos pacientes, su tasa de supervivencia a cinco años es de aproximadamente el 60%[69][71]. En un reciente

meta-análisis realizado para analizar las posibles variaciones en la supervivencia a cinco años en pacientes con COCE, se incluyeron a 23.382 pacientes, de los cuales el 88% tenían COCE lingual. No se encontraron diferencias en la supervivencia a los cinco años entre los jóvenes (menores de 40 años, cuya supervivencia global fue del 61%) con los pacientes adultos (supervivencia del 59%)[71].

El estadio de la enfermedad es uno de los principales factores pronósticos, en pacientes con estadios tempranos se han descrito tasas de supervivencia del 84% mientras que para estadios avanzados se reduce al 40%. Por lo que, la presentan afectación cervical reduce hasta un 50% la supervivencia global[72]. De igual manera, tumores resecados con márgenes quirúrgicos afectados requieren tratamiento coadyuvante y se han relacionado como predictores de peor pronóstico, al igual que la presencia de metástasis en ganglios linfáticos, invasión linfovascular y perineural[73][74].

Se han descrito tasas de recurrencias tras el tratamiento de entre el 24 al 31% de los pacientes con carcinomas orales de células escamosas. Y se ha descrito como factor pronóstico independiente que cuanto antes se produzca la recurrencia, peor será el pronóstico[75][76]. También se ha informado del desarrollo de segundos tumores primarios en el 18% de los pacientes con COCE convencional, siendo más frecuente en área retromolar, labio inferior y suelo de boca[77].

Las metástasis regionales a ganglios linfáticos cervicales se producen en un 40% de los pacientes, y las metástasis a distancia en un 10%, afectando sobre todo a pulmón (80%), hueso y cerebro[78]. Se ha relacionado la presencia de infiltración tumoral ganglionar como predictivo de diseminación metastásica así como el estadio ganglionar patológico según la octava edición de la AJCC como el predictor pronóstico individual más consistente[74][78].

Por lo que, de forma general, el COCE tiene un mal pronóstico y se caracteriza por una invasión local agresiva y metástasis tempranas[77][78].

1.5. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER.

El cáncer es una de las enfermedades humanas más complejas y heterogéneas con múltiples niveles de regulación[79][80]. El proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas se denomina carcinogénesis. El cáncer se desarrolla a partir de la acumulación de sucesivas alteraciones genéticas y epigenéticas en los genes que actúan en las vías de señalización asociadas al cáncer y que permiten a las células poder sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de proliferación, apoptosis y del ciclo celular[67][79].

En la última actualización publicada en el año 2022 por el Prof. Douglas Hanahan sobre los "hallmarks" o sellos distintivos del cáncer se propone un conjunto de diez capacidades biológicas distintivas adquiridas por las células humanas involucradas en la carcinogénesis. Estos sellos o características comunes de las células tumorales representan un principio de organización para racionalizar de una forma más clara la diversidad y complejidad de las patologías neoplásicas[79].

Estas características incluyen la resistencia a la muerte celular, proliferación continua y sostenida, inactivación de los supresores de crecimiento, activación de la inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis, activación de la invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo energético celular, evasión de la destrucción inmune, desbloqueo de la plasticidad fenotípica y la presencia de células senescentes de diversos orígenes relacionadas con el "microambiente tumoral". También se han descrito cuatro características habilitadoras que facilitan los procesos anteriores como la inestabilidad genética, la inflamación promotora de tumores, la reprogramación epigenética no mutacional y la presencia de microbiomas polimórficos[79]. Estas características pueden ser adquiridas en cualquier tipo celular por diversos mecanismos durante el proceso carcinogénico.

La integración de los distintos mecanismos distintivos del cáncer junto con ciertas capacidades facilitadoras y el desarrollo de nuevas tecnologías pueden ayudar a conocer y entender las complejidades de la patogénesis del cáncer. Por lo que, identificar los mecanismos moleculares subyacentes a la carcinogénesis puede permitir posteriormente describir biomarcadores diagnósticos y pronósticos, así como el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas[80][81][82].

1.6. ALTERACIONES MOLECULARES EN LA CARCINOGÉNESIS ORAL.

La carcinogénesis supone un conjunto de procesos que acaban produciendo que las células normales se conviertan en cancerígenas mediante una serie de mecanismos de inicio, promoción y progresión[79]. En estado fisiológico, el ciclo celular está controlado por varias proteínas y genes con funciones activadoras o supresoras que conducen a las células a través del ciclo celular, permitiendo su división cuando sea necesaria. Sin embargo, si se produce una desregulación de estos eventos moleculares, se predispone al desarrollo, crecimiento y progresión tumoral en el cáncer oral[83].

En la literatura científica está ampliamente aceptado que la transición o evolución de un epitelio normal hacia trastornos orales potencialmente malignos o a un carcinoma oral de células escamosas invasivo es el resultado de una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en el tiempo[80][81][82]. Entre los mecanismos moleculares subyacentes se encuentran la inestabilidad genómica, la amplificación, la deleción, la metilación de ADN y la mutación[82]. Estos procesos están impulsados por una compleja red de vías de señalización molecular[81].

El desarrollo del carcinoma oral de células escamosas es progresivo y puede iniciarse tanto en una mucosa sana como estar precedido de lesiones potencialmente malignas clínicamente diferenciadas como son las eritroplasias, leucoplasias, LVP, liquen plano y otros trastornos orales potencialmente malignos[84]. Además, la exposición a carcinógenos bien conocidos como el alcohol, tabaco, nuez de betel o la infección por el virus del papiloma humano pueden promover la carcinogénesis oral[67][85]. Y una vez las células tumorales se han desarrollado, pueden invadir estructuras locales, ganglios linfáticos e incluso diseminarse produciendo metástasis a distancia[84][85].

De forma general, en la fisiopatología molecular del COCE ocurren una serie de alteraciones moleculares y alteraciones en las vías de señalización en los diferentes escalones de los sellos distintivos del cáncer. A continuación, vamos a exponer de forma resumida, según la evidencia científica existente, algunos de los mecanismos moleculares alterados en los carcinomas orales de células escamosas y las leucoplasias orales clasificados según los distintos tipos de sellos distintivos del cáncer anteriormente nombrados (figura 2).

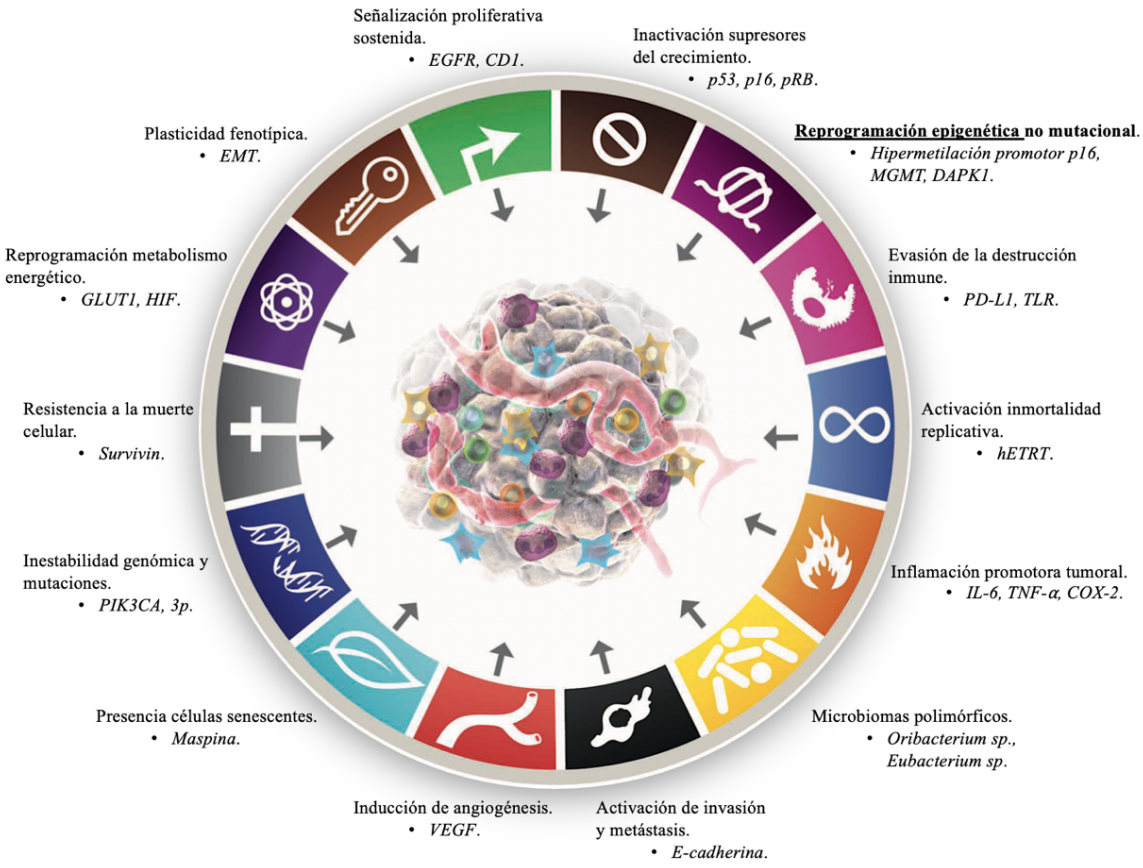


Figura 2. Ilustración de los sellos distintivos del cáncer dividido según las diez capacidades biológicas adquiridas y las cuatro características habilitadoras. De forma esquemática se evidencia algunos de los mecanismos moleculares alterados implicados en la carcinogénesis oral o en la progresión tumoral del carcinoma oral de células escamosas según los distintos "hallmarks" del cáncer. *(Modificada de Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions. Cancer Discov. 2022; 12: 31 – 46).*

Inactivación de supresores del crecimiento. El gen más estudiado es el oncogen supresor tumoral TP53 ubicado en el cromosoma 17 (17p13.1) que codifica la proteína p53. Este gen TP53 es conocido como el "guardián del genoma" gracias a sus funciones implicadas en la regulación de la apoptosis, el control del ciclo celular y la reparación del daño en el ADN. Por lo que, su inactivación da como resultado una proliferación celular sostenida e inhibición de la apoptosis. La desregulación de p53, por mutación o deleción, se ha observado en más del 50% de los pacientes con COCE[(67)(81)(84)]. La mutación de este gen se ha descrito como un evento inicial en la carcinogénesis oral con un porcentaje de afectación del 36 al 81% de los pacientes con COCE. Así mismo, se ha demostrado la capacidad predictiva de la sobreexpresión de la proteína p53 como biomarcador de riesgo de transformación maligna de leucoplasias orales en COCE con un riesgo relativo de 2,22 (IC95%: 1,35 – 3,64. p = 0,002)[(86)]. Sin embargo, en LVP esta evidencia es limitada[(86)].

Las proteínas p16INK4A (p16) y p14ARF (p14) son inhibidoras del ciclo celular del gen supresor CDKN2A ubicado en el cromosoma 9p21. La expresión reducida de p16INK4A se ha correlacionado con estadios avanzados de carcinomas orales, sin embargo, se necesitan más estudios para determinar su potencial como biomarcador de predicción de progresión maligna[81][87]. Estudios mediante secuenciación de nueva generación (NGS) han corroborado las frecuentes mutaciones y deleciones de los genes TP53 y CDKN2A en el cáncer de cabeza y cuello[88].

Otros reguladores del ciclo son las quinasas dependientes de ciclina (CDK) o sus inhibidores, como p21 y p27. La sobreexpresión de ambos se ha correlacionado con peores resultados clínico-patológicos en cáncer oral[87]. Del mismo modo, se ha descrito la desregulación de la proteína del Retinoblastoma, producto del gen supresor tumoral RB1, de forma temprana en la displasia epitelial oral y se ha asociado con mayor riesgo de transformación en cáncer[80][81].

Señalización proliferativa sostenida. Las células cancerosas se caracterizan por tener un crecimiento autónomo y caótico debido a la desregulación de las señales de crecimiento. La división celular de células sanas está controlada por factores de crecimiento o proteínas liberadas. Las mutaciones en el ADN de células cancerígenas pueden estimular la proliferación de estas células sin necesidad de factores de crecimiento. En este sentido, se ha identificado aberraciones en oncoproteinas como EGFR, K-ras, c-myc, FGF3 y ciclina D1 (CD1). EGFR es un receptor de superficie celular específico para el factor de crecimiento epidérmico y los péptidos asociados que estimula la división de los queratinocitos orales; su sobreexpresión se ha observado en el 80-90% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, con un aumento del 42 – 58% en cáncer oral[84][87]. También se ha observado su sobreexpresión en la transformación maligna de leucoplasias[80][87], sobre todo cuando se asocia con un mayor número de copias del gen EGFR[80]. Así mismo, su sobreexpresión se considera un marcador pronóstico independiente que se correlaciona con una peor supervivencia, un estadio tumoral avanzado y una mala respuesta al tratamiento[84][87]. La ciclina D1 está codificada por el gen CCND1 ubicado en el cromosoma 11q13 y es un protooncogen clave en la transición de la fase G1 a la S en el ciclo celular. Esta ciclina D1 se sobreexpresa en el 25 – 75% de los COCE y se ha relacionado con estadios tempranos en la carcinogénesis oral[81][87], así como peor supervivencia, mayor agresividad y peor diferenciación histológica[89]. La amplificación del gen CCND1 es el principal mecanismo oncogénico

subyacente a la sobreexpresión de CD1 y se ha relacionado directamente con el hábito tabáquico[89].

Estudios genómicos han confirmado que las alteraciones en la expresión génica generalmente son el resultado de variaciones en el número de copias genómicas previas a la progresión[90]. Las alteraciones del número de copias más frecuentes en COCE son las ganancias en los cromosomas 3q, 5p, 7p, 8q, 11q y 20q y las pérdidas en 3p, 8p y 18q. La ganancia en 8q es la más frecuente (47%) seguida de la ganancia en 11q13 (45%). Esta última región alberga genes con un papel importante en la progresión, invasión y metástasis tumoral en COCE[90]. También se ha identificado como hallazgo frecuente la amplificación de 7p11.2 que posteriormente daría lugar a la sobreexpresión de EGFR[90].

Resistencia a la muerte celular. Una célula sana tiene proteínas de señalización que la conducen a la muerte celular apoptótica cuando perciben que su material genético está dañado. Las células cancerígenas son capaces de evadir este mecanismo provocando la proliferación celular y permitiendo acumular más mutaciones en el tiempo. Survivin es un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis y se cree que facilita el paso de las células tumorales a través de la mitosis evadiendo los puntos de control del ciclo celular. Su sobreexpresión se ha relacionado con la progresión de lesiones precancerosas[80], peor pronóstico del COCE e inducción a la quimiorresistencia[80][87].

Activación de la inmortalidad replicativa. La mayoría de las células de nuestro organismo tienen un número limitado de divisiones celulares. Cuando las células alcanzan ese punto, pueden entrar en dos estados no proliferativos: senescencia o apoptosis. Las células tumorales son capaces de sobrepasar el límite preestablecido de divisiones, en un proceso denominado inmortalización. La inmortalización celular es un mecanismo mediado por los telómeros, estructuras de ADN especializadas, que estabilizan y protegen a los extremos de los cromosomas de la degradación. Las células con puntos de control comprometidos pueden escapar de la apoptosis y reactivar la expresión de la telomerasa para impulsar el mantenimiento de los telómeros y la inmortalidad replicativa. Se ha demostrado la sobreexpresión de transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) como un evento temprano en la carcinogénesis oral, en displasias de alto grado y COCE invasivo[87][91]. La desregulación de las vías Notch y Wnt también se han relacionado con la inmortalidad replicativa[81].

Activación de la invasión y metástasis. Este sello distintivo es el causante de que las células cancerígenas invadan tejidos vecinos, migren a través del torrente sanguíneo y se diseminen a otros órganos a distancia. Las cadherinas son una superfamilia de proteínas transmembrana dependientes de calcio con función de adhesión celular. El proceso conocido como transición epitelial-mesenquimatosa (EMT) favorece la progresión tumoral gracias a que las células epiteliales adquieren rasgos mesenquimales como una mayor producción de componentes de la matriz extracelular, angiogénesis o linfogénesis debido a la pérdida de polaridad y adhesión intercelular[(85)(87)]. Se ha postulado que la regulación a la baja de E-cadherina impulsa esta transición epitelial mesenquimatosa, ya que las células tumorales podrían perder el anclaje epitelial[(80)]. Recientemente se ha descrito que la sobreexpresión de los genes HNRNPC, ITGA5, HMGA2 y SRSF3; así como la expresión a la baja de ALDH3A1 y ARID2 promueven el proceso de EMT, por lo que empeoran el pronóstico de los carcinomas orales[(85)]. Otro de los mecanismos implicados en la diseminación es la degradación de la matriz extracelular. En estudios de expresión génica en COCEs invasivos y metastásicos se han encontrado cambios de expresión estadísticamente significativos para metaloproteinasas (MMPs), lamininas, colágeno y quimiocinas, todos ellos componentes de la matriz extracelular[(92)].

Inducción de angiogénesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes facilita el suministro de nutrientes y oxígeno a las células tumorales para favorecer el crecimiento tumoral y la metástasis. El estado del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se ha estudiado como uno de los principales reguladores de la angiogénesis. Sin embargo, su relación con las lesiones orales displásicas o cancerosas no está aún del todo clara, esto puede ser debido a los distintos métodos de cuantificación empleados, así como a la dificultad para determinar si la nueva angiogénesis es resultado de la tumoración o de la proliferación endotelial normal[(80)(87)(93)]. Se ha relacionado la sobreexpresión de VEGF-C como un factor pronóstico independiente con peor supervivencia en COCE[(93)]. También se han descrito algunos factores proangiogénicos como homebox1, forkhead box C2 que inducen la linfangiogénesis al activar la expresión de VEGF-C[(67)]. Otro de los parámetros estudiados es la densidad de microvasos evaluada mediante inmunohistoquimia de CD105, que es capaz de identificar nuevos vasos sanguíneos con mayor especificidad. Se ha observado que su determinación podría ser útil para diferenciar COCE invasivo de lesiones precancerosas y mucosa sana, ya que el

primero tiene mayor actividad angiogénica[94].

Reprogramación del metabolismo energético. Las células tumorales también son capaces de desarrollar vías de energía responsables del crecimiento y división celular descontrolados incluso en situaciones desfavorables. Las células cancerígenas pueden reprogramar su propio metabolismo de la glucosa y por lo tanto su producción final de energía. Esta glicólisis aeróbica es un sello metabólico observado en el cáncer[95][96]. La sobreexpresión de transportadores de glucosa como GLUT1 se ha relacionado con peor supervivencia y estadios avanzados en COCE[96]. Esta dependencia de glucólisis puede acentuarse en condiciones de hipoxia. De hecho, se ha informado que factores inducibles de hipoxia (HIF) se sobreexpresan en COCE y se relaciona con un mayor riesgo de mortalidad[97][98]. La relevancia de HIF y GLUT1 respalda la importancia del suministro energético para las células tumorales[96][97][98].

Evasión de la destrucción inmune. Nuestro sistema inmunitario mediante diversos mecanismos es capaz de identificar las células malignas y destruirlas. Las células tumorales son capaces de evadir estos mecanismos y aumentar la expresión de inhibidores de respuesta inmunitaria. Una de esas proteínas es el ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1) que se puede unir a los linfocitos e inhibir la respuesta inmunitaria[81][99]. En un reciente metaanálisis publicado en 2020, se concluyó que los pacientes con sobreexpresión de PD-L1 en la membrana celular presentaban un pronóstico negativo y encontraron correlación con COCEs avanzados, mujeres no fumadoras ni bebedoras y niveles elevados de PD-1, CD4 y CD8 tumorales[99]. Actualmente esto ha permitido el desarrollo de inmunoterapias dirigidas a los receptores de puntos de control inhibitorios. Una de las dianas terapéuticas más prometedoras es la inhibición de PD-1 y PD-L1 para el tratamiento de carcinomas de cabeza y cuello recurrentes o metastásicos que no hayan respondido al tratamiento con cisplatino, cuyos nombres comerciales son pembrolizumab y nivolumab[100]. Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores de superficie celular transmembrana con propiedades de escape inmunitario tumoral y resistencia a la apoptosis. La sobreexpresión de TLR3, TLR5 y TLR9 desempeñan un papel fundamental en la carcinogénesis oral, invasión y proliferación[101]. Recientemente, nuestro grupo de trabajo describió el perfil transcriptómico de pacientes con LVP y reveló la expresión diferencial de genes relacionados con la modulación de la vigilancia inmunitaria como uno de los primeros pasos en la carcinogénesis oral[102].

Inestabilidad genómica y mutaciones. La adquisición de las múltiples características nombradas anteriormente depende en gran parte de una sucesión de alteraciones en el mantenimiento y reparación del genoma. La presencia y acumulación de mutaciones responsables de la progresión tumoral está favorecida por un estado de inestabilidad genómica de las células tumorales. Esta inestabilidad se puede adquirir por defectos en la segregación de cromosomas, alteraciones en el número de copias, pérdida de heterocigosidad (LOH), inestabilidad de los telómeros, aberraciones genómicas (deleciones o amplificaciones) y mutaciones en los puntos de control o reparación del ciclo celular[(67)(103)]. Ejemplo de ello, es la deleción de ciertas regiones del cromosoma 3p que se observan en un 60 – 80% de las displasias epiteliales y en más del 90% de los COCE[(67)]. La pérdida de la heterocigosidad en los loci cromosómicos 13q, 17p, 9p21 se ha relacionado con lesiones premalignas y carcinomas tempranos[(80)]. La amplificación en los brazos cromosómicos 8q22-q23 (EIF3E) y 8q24.21 (MYC) en displasias leves[(67)]. La pérdida de heterocigosidad de 9q33 en el 32% de COCE[(103)]. Así mismo, en un reciente análisis de la aberración del número de copias de ADN y LOH del genoma completo se identificó que las regiones en 4q, 8p, 9p y 11q desempeñaban un papel importante en la biología del cáncer oral y en su supervivencia global[(104)]. Otras aberraciones cromosómicas como la pérdida alélica en 5q21-22, 22q13, 4q, 11q, 18q y 21q se han asociado con estadios tumorales avanzados[(67)]. También se ha informado la frecuente mutación de los genes supresores tumorales TP53 y CDKN2A seguida de otros genes como FAT1, HRAS, PIK3CA y BRAF, así como el aumento en el número de copias en EGFR, PIK3CA, AKT1, RPS6KB1 y MYC en COCE[(105)]. Se ha relacionado la mutación del oncogen PIK3CA con estadios tardíos y una peor supervivencia del cáncer oral[(81)(105)]. Esta inestabilidad cromosómica, en LVP se ha estudiado y se ha sugerido que la aneuploidía es un marcador de mayor riesgo de progresión maligna[(106)].

Inflamación promotora tumoral. La inflamación puede predisponer a la transformación maligna y promover la progresión tumoral mediante la alteración del microambiente tumoral o matriz extracelular. Este estado de inflamación crónica mediado por macrófagos, mastocitos y citoquinas promotoras de tumores infiltran el tumor y favorecen su crecimiento e invasión. Existen diferentes mediadores inflamatorios que tienen un papel en la carcinogénesis oral como las citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF), inmunosupresoras (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12), quimiotácticas (CCL, CXCL1, CXCL2) o factores de transcripción (AP-1, NF-κB)[(107)]. En este sentido,

recientemente un estudio de inmunoensayo en saliva de nuestro grupo de investigación reveló que los niveles de IL-6, IL-8, TNF-α, HCC-1 y PF-4 difirieron de forma estadísticamente significativa entre COCE, leucoplasias orales, LVP y controles sanos. Así mismo, encontramos una correlación entre niveles elevados de IL-6 y TNF-α y la progresión y gravedad de COCE[108]. Del mismo modo, también se ha observado mayores niveles de IL-6 salival y plasmática en pacientes con LVP y una correlación significativa con áreas verrugosas más extensas[36]. Otra de las enzimas más estudiadas es la enzima proinflamatoria ciclooxigenasa-2 cuya sobreexpresión se ha relacionado con la invasión y metástasis en COCE[109]. De igual forma, la compleja vía de señalización NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), que puede ser activada por la inestabilidad genética o hipoxia, regula el aumento de expresión de citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión, factores angiogénicos y óxido nítrico. En carcinomas orales avanzados se ha observado una mayor inmunoexpresión de NF-κB[110].

Plasticidad fenotípica. Esta capacidad de los organismos para alterar su fenotipo de acuerdo a las condiciones ambientales contribuye a la heterogeneidad celular en el COCE y la resistencia a ciertos fármacos[111]. Una de las principales características de la plasticidad en la malignización es la transición epitelial–mesenquimatosa, caracterizada por la pérdida de la diferenciación epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso que favorece la invasión y metástasis durante la progresión del COCE[85][111]. Se ha demostrado *in vitro* que esta plasticidad subyace a una mayor resistencia terapéutica de las células madre cancerosas en COCE[112].

Presencia de células senescentes. La senescencia celular es un mecanismo de detención de forma irreversible de la proliferación celular como respuesta al estrés y daño celular. En la carcinogénesis, las células tumorales evaden este fenómeno senescente. La senescencia inducida por oncogenes está regulada por las vías ARF/p53/p21 (también envuelta en la apoptosis), p16/Rb/E2F y a través de los receptores del ácido retinoico[113][114]. Se ha descrito una mayor expresión de ciclina D1, Rb y maspina, que activan los programas de senescencia de la vía p16-pRb, en lesiones de leucoplasia en comparación con tejido sano y una disminución en carcinomas; lo que confirma la función antitumoral de la senescencia en etapas tempranas de la carcinogénesis oral. Asimismo, los autores destacan el valor pronóstico de la proteína maspina, codificada por

el gen supresor tumoral SERPINB5, en el precáncer oral por su papel protector frente a la carcinogénesis oral[114].

Microbiomas polimórficos. La influencia del microbioma oral en la patogenia del COCE no está del todo clara. Los posibles mecanismos implicados en la carcinogénesis oral de algunas especies bacterianas o sus subproductos están relacionados con la inducción de una respuesta inflamatoria crónica, alteración de la homeostasis o alteración de la fisiología del huésped[115]. Se ha descrito el papel de numerosas comunidades microbianas[116][117], así como de virus, arqueas y hongos[117] en el cáncer oral. Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente a la carcinogénesis o progresión aún se desconoce completamente[117]. Son escasos los estudios de microbiota en los trastornos orales potencialmente malignos y además presentan una heterogeneidad metodológica y clínica que dificulta su comparación[118]. En este sentido, nuestro grupo desarrolló un estudio de secuenciación de la región V3-V4 de genes ARN ribosomal 16S (16S rRNA) en diez pacientes con LVP, como resultados se obtuvo una pérdida de la diversidad y composición microbiana oral en estos pacientes en comparación con controles sanos, así como un enriquecimiento en patógenos protumorigénicos como son el *Oribacterium sp., Campylobacter jejuni, Eubacterium sp., Tannerella o Porphyromonas* posiblemente relacionados con el desarrollo de esta enfermedad[119].

Reprogramación epigenética no mutacional. Existe una evidencia creciente del papel de las alteraciones epigenéticas en la adquisición de capacidades distintivas del cáncer[79]. Actualmente la epigenética ha adquirido un papel importante en la carcinogénesis de numerosos tumores sobre todo gracias al desarrollo de tecnologías de alto rendimiento que han permitido un enfoque global del estudio del epigenoma[120][121]. Los estados de hipermetilación e hipometilación del ADN se han propuesto como anomalías de la metilación del ADN en el cáncer[122]. La hipermetilación o ganancia de metilación del ADN en las regiones promotoras de los genes se ha correlacionado con el silenciamiento de la expresión de genes supresores tumorales y, por otra parte, la hipometilación o disminución de metilación con un aumento de la expresión génica de oncogenes que incrementan la inestabilidad cromosómica y pueden tener un papel en el desarrollo de los carcinomas[81].

1.7. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS.

La transcripción y la traducción de genes (genética) permiten la expresión de proteínas que regulan el comportamiento de las células. La epigenética está implicada en la regulación de la transcripción y traducción genética. Las modificaciones epigenéticas del genoma proporcionan uno de los principales mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica[122]. Por lo que, las modificaciones epigenéticas realizadas en el ADN y las histonas regulan la estructura de la cromatina y la expresión génica.

La epigenética se define como una serie de mecanismos que inician y mantienen patrones hereditarios sin afectar la secuencia del genoma[120][123]. Estos mecanismos nos ayudan a entender cómo dos genotipos idénticos pueden dar lugar a diferentes fenotipos en función de estímulos ambientales[120]. Fisiológicamente, los mecanismos epigenéticos están implicados en la diferenciación celular, desarrollo embrionario y adaptación a factores ambientales[123]. Gracias a ello, las células de nuestro organismo, pese a presentar el mismo ADN, realizan funciones diferentes[121]. Sin embargo, las alteraciones de los patrones de expresión génica tienen un papel importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, cánceres, enfermedades congénitas, endocrinas e incluso trastornos neurológicos[123]. Por lo que, estas alteraciones epigenéticas también pueden contribuir a la adquisición de capacidades distintivas durante el desarrollo y progresión tumoral[79][121][123].

Los cambios epigenéticos son heredables y reversibles, y pueden afectar la conformación espacial y transcripción del ADN; dando lugar a cambios en la estructura de la cromatina. Por lo que, se producen cambios fenotípicos al no modificarse la secuencia de las bases del ADN[124]. Estos cambios pueden persistir durante el periodo de tiempo que estemos expuestos a sustancias nocivas en el medio ambiente o pueden persistir durante toda la vida celular y transmitirse de forma generacional[121].

Se han descrito varios mecanismos epigenéticos como la metilación de ADN, variaciones en la conformación de la cromatina, modificación postraduccional de las histonas y regulación postranscripcional de ARN no codificantes (no traducido)[120][124]. En la presente tesis, nos vamos enfocar exclusivamente en la metilación de ADN que es el factor epigenético más estudiado y relacionado con el cáncer.

1.8. METILACIÓN DE ADN.

Las alteraciones en la metilación del ADN pueden ser de tres tipos: hipermetilación, hipometilación o pérdida de la impronta.

La hipometilación de ADN se caracteriza por pérdidas de metilación en regiones de todo el genoma, sobre todo en áreas pobres en genes, retrotransposones e intrones. Esta hipometilación global del ADN puede producir inestabilidad cromosómica y activación de oncogenes[121].

La pérdida de impronta se caracteriza por la pérdida de la expresión monoalélica de genes específicos de un alelo parental debido a perfiles de hipometilación aberrantes que puede llevar a la activación de la copia normalmente silenciada de un gen promotor del crecimiento o al silenciamiento de la copia normalmente activa de un gen inhibidor del crecimiento[125].

La hipermetilación del ADN es un proceso biológico caracterizado por la adición de un grupo metilo (-CH3), mediante la unión covalente metil-citosina, en el carbono 5 de las bases nitrogenadas citosinas ubicadas en 5' de las guaninas. Por lo tanto, supone la adición de un grupo metilo en sitios específicos que no están metilados en condiciones normales[121]. Las principales dianas de este proceso son las islas CpG o regiones de ADN ricas en dinucleótidos Citosinas seguidas de Guaninas[122].

Estas islas CpG se encuentran principalmente en regiones promotoras de ciertos genes suponiendo cerca del 70% de los mismos. Estas islas se definen como regiones de más de 200 a 2000 pares de bases de longitud y con una densidad (%) de GC superior al 55%[122][126]. La metilación de islas CpG en regiones promotoras que regulan la expresión génica es un área en auge de investigación en neoplasias malignas humanas, pues estos tramos de ADN se han conservado durante la evolución libres de metilación, por lo que, metilaciones aberrantes *de novo* en estas islas se han relacionado con cánceres humanos[122]. La hipermetilación de estas islas CpG en la región promotora conlleva la silenciación génica, por tanto, si ocurre en genes supresores tumorales, la metilación desempeña un papel importante en la carcinogénesis[81]. La presencia de grupos metilo en el promotor de un gen modifica la unión de las ARN polimerasas, factores transcripcionales, enzimas y otras moléculas al genoma; por lo que las consecuencias biológicas están determinadas por su presencia en el genoma y por su ubicación[122][123].

Los procesos de metilación ayudan al control del funcionamiento celular normal y son esenciales para mantener el desarrollo y la homeostasis del organismo. Por ejemplo, la metilación está implicada en procesos biológicos como el establecimiento y mantenimiento de la identidad celular, la inactivación de uno de los dos cromosomas X en las mujeres, la impronta genética dando lugar a expresión monoalélica, el control local de la expresión génica, así como en el desarrollo embrionario. Sin embargo, una desregulación de estos procesos puede llevar a estados patológicos[126][127]. Ejemplo de ello, son las alteraciones en la metilación de ADN relacionadas con trastornos neurológicos, como el Alzheimer o esquizofrenia, la artritis reumatoide, la diabetes, la obesidad, la ateroesclerosis u la osteroporosis[127][128].

La metilación de ADN se produce gracias a una reacción enzimática catalizada por ADN metiltransferasas (DNMT, por sus siglas en inglés) que media la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina a la citosina. Se han identificado cinco subtipos en mamíferos, siendo tres las principales: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. La DNMT1 es responsable de mantener el patrón de metilación en las células hijas durante la mitosis o meiosis, es decir, son metiltransferasas de mantenimiento. DNMT3A y DNMT3B están involucradas en el proceso de metilación de *novo* durante la impronta genómica[121]. Se ha relacionado ampliamente en la literatura la sobreexpresión de DNMT con neoplasias de mama, hepatocelular, gástrica, pulmonar, pancreática y de cabeza y cuello[121].

1.8.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA METILACIÓN DE ADN.

Una comprensión completa del papel de la metilación del ADN en la salud y enfermedad requiere el desarrollo de herramientas que puedan medirlas. Los métodos empleados para su análisis generalmente se dividen en dos grupos: métodos que analizan regiones de genes específicas y métodos que analizan el genoma[126][127][129][130]. La elección del método de estudio se realizará según el problema biológico que se investigue y la resolución, tecnología y presupuesto del que se disponga[129].

Los métodos que analizan regiones de genes específicas que están diferencialmente metiladas se dividen en tres grupos: métodos basados en conversión de bisulfito, métodos basados en enzimas de restricción y ensayos basados en enriquecimiento por afinidad[129].

Los métodos basados en la conversión de bisulfito implican la desaminación de citosinas no metiladas en uracilo tras el tratamiento con bisulfito de sodio, mientras que

las citosinas metiladas permanecen sin cambios en los dinucleótidos CpG. Su principal limitación es la incapacidad para distinguir entre modificaciones de 5mC y 5hmC. Posteriormente, para la evaluación de la metilación de ADN se emplean métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), entre los que se encuentran: metilación específica de PCR (MSP), MSP cuantitativo, secuenciación con bisulfito y pirosecuenciación. El método MSP es simple y de los más utilizados, ya que, es lo suficientemente sensible para detectar la metilación, sin embargo, no es capaz de cuantificarla. Es por ello que se han desarrollado adaptaciones de PCR en tiempo real que permiten realizar un análisis cuantitativo de los niveles de metilación del ADN. La secuenciación con bisulfito se emplea para el mapeo de la metilación alelo específica en las regiones CpG de los productos de la PCR, y permite la discriminación de las citosinas no metiladas que se desaminan a uracilo y se secuencian como timinas y las citosinas metiladas que permanecen sin convertir y se secuencian como citosinas; sin embargo, requiere alta capacitación y mucho tiempo de trabajo. La pirosecuenciación con bisulfito es un procedimiento simple, altamente reproducible, con buena relación calidad/precio que permite la cuantificación precisa de múltiples sitios CpG en una sola reacción, sin embargo, sólo pueden ser secuenciados en cada reacción un número bajo de pares de bases, lo que limita la cantidad de sitios CpG que pueden ser evaluados[129][130].

Los métodos basados en enzimas de restricción se caracterizan por la digestión selectiva del ADN por determinadas endonucleasas de restricción específicas de metilación. El análisis combinado de restricción con bisulfito (COBRA) es una técnica cuantitativa que combina la conversión de bisulfito y la digestión con enzimas de restricción para determinar el nivel de metilación en pequeñas cantidades de ADN genómico, sin embargo, su uso es limitado debido a la disponibilidad reducida de sitios de restricción y los falsos positivos después de una digestión incompleta[129].

Los métodos basados en enriquecimiento por afinidad se caracterizan por la captación de la fracción metilada de ADN mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra las citosinas metiladas o bien proteínas que se unen al ADN metilado. En el ensayo de inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP) se emplea un anticuerpo que reconoce e inmunoprecipita específicamente el ADN que contiene citosinas metiladas. Los enfoques de purificación por afinidad a proteínas del dominio de unión a metil-CpG separan selectivamente el ADN 5-metilcitosina del resto del ADN genómico. Ambos enfoques son fáciles, específicos y sensibles, sin embargo, el enriquecimiento de

secuencias con un alto número de CpG es más frecuente que los fragmentos pobres en CpG por lo que pueden interpretarse como no metiladas[129][130].

Los métodos de análisis de metilación del genoma completo se pueden clasificar igualmente en tres categorías similares al grupo anterior según el tipo de técnica empleada[126][131].

Entre las técnicas basadas en enzimas de restricción, se encuentra el escaneo genómico de puntos de referencia de restricción que permite reconocer información regional y posicional de la metilación de ADN con electroforesis bidimensional, sin embargo, requiere una calidad de ADN alta con una mínima degradación. La amplificación CGI metilada y micromatrices es una técnica de matriz de dos colores muy sensible y específica, útil para identificar nuevos marcadores de metilación, sin embargo, tiene baja resolución. La hibridación de metilación diferencial se basa en el enriquecimiento de solo la fracción de ADN hipermetilado. En investigaciones de diferencias entre un tumor y los controles en la micromatriz requiere de un análisis bioinformático para comparar múltiples grupos[131].

De las técnicas basadas en enriquecimiento por afinidad, la inmunoprecipitación de ADN metilado es un método de inmunocaptura que se basa en el enriquecimiento con anticuerpos específicos para la metilcitosina (5mC), seguido de un análisis basado en matrices (MeDIP-Chip) o un análisis basado en secuenciación (MeDIP-Seq). Estos métodos requieren la desnaturalización del ADN, por lo que, son menos sensibles en regiones con baja densidad de CpG y no se puede estimar el nivel absoluto de metilación. Otra técnica es la secuenciación de captura de proteínas del dominio de unión a metil-CpG que captura regiones metiladas de ADN bicatenario con proteínas MBD. Es un método más económico que el anterior, sin embargo, no es capaz de diferenciar entre 5mC y 5hmC[126][131].

Los métodos basados en la conversión de bisulfito se caracterizan por tratar previamente el ADN genómico con bisulfito de sodio para desaminar químicamente la citosina a uracilo sin afectar a la 5-metilcitosina. Una de estas técnicas es la de micromatriz de oligonucleótidos específica de metilación (microarrays de MSO) cuyos productos de amplificación por PCR de este ADN convertido luego se hibridan con micromatrices. Una de las principales ventajas que presenta es la capacidad para analizar

diferentes genes en la misma matriz, sin embargo, presenta limitaciones para analizar los CpG poco espaciados en los genes que están metilados de forma heterogénea[126][131]. El desarrollo de técnicas de secuenciación de alto rendimiento permite el análisis de la metilación de ADN en todo el genoma con una resolución de un solo par de bases utilizando la técnica llamada secuenciación de bisulfito del genoma completo (WGBS). La principal ventaja es su capacidad para determinar el estado de metilación de secuencias de ADN con baja densidad de CpG así como para identificar los niveles totales de metilación de ADN. Sin embargo, tiene un costo elevado. Un enfoque de secuenciación de todo el genoma más específico con una resolución de base única es la secuenciación de bisulfito de representación reducida, estudia las islas CpG mediante pretratamiento del ADN con endonucleasas de restricción seguida de la secuenciación del ADN de próxima generación.

El ensayo de metilación Infinium de Illumina es una técnica basada en la conversión de ADN con bisulfito de sodio para perfilar la metilación del ADN en el genoma. El desarrollo de los microarrays de Illumina ha pasado por cuatro generaciones. Esta tecnología se introdujo por primera vez en 2006 con el ensayo de metilación GoldenGate DNA Methylation BeadArray que analizaba 1.536 sitios CpGs. En 2008 desarrollaron la plataforma de segunda generación llamada HumanMethylation27K BeadChip que presentaba 27.578 sondas dirigidas a sitios CpGs y permitía realizar estudios de evaluación de todo el epigenoma. Tres años más tarde, comercializaron la plataforma de tercera generación conocida como Infinium HumanMethylation450 BeadChip que presentaba 485.577 sondas dirigidas a sitios CpG, sin embargo, aún suponía una cobertura relativamente baja. Más tarde, en 2016 Illumina lanzó EPICMethylation BeadChip para el estudio de 863.904 sondas CpG[131][132]. Esta tecnología basa su funcionamiento que en presencia de bisulfito sódico ($NaHSO_3$) las citosinas no metiladas se convierten en uracilo en el ADN desnaturalizado. Posteriormente, el uracilo se convierte en timina durante la amplificación por PCR y los productos enriquecidos se fragmentan mediante enzimas de restricción seguido de la hibridación con el chip. En el ensayo, se aplican dos tipos de sondas de consulta para detectar la intensidad del estado metilado (citosina) y no metilado (timina). El estado de metilación se evalúa analizando las intensidades de señal obtenidas de una reacción de extensión de polimerasa de base única. Las matrices BeadChip de metilación pueden convertir los valores de intensidad de hibridación de la sonda en una abundancia relativa

de citosinas (metiladas y no metiladas) en los sitios CpG de interés[126][131]. Entre las ventajas de este método se encuentra su facilidad de uso, eficiencia en cuanto al tiempo, costo y mayor proporción de sondas que capturan la metilación en los promotores[132].

1.8.2. METILACIÓN DE ADN EN CÁNCER ORAL Y LEUCOPLASIAS.

La metilación aberrante del ADN se ha relacionado con eventos iniciales de la carcinogénesis oral y se ha descrito que incluso puede ocurrir con más frecuencia que la inactivación estructural de genes por mutaciones o deleciones[81][121][133]. La pérdida de metilación del ADN en regiones de todo el genoma, denominada "hipometilación global del ADN" también se ha asociado con la inestabilidad genómica y la progresión del cáncer oral[81][124][127].

El desarrollo de herramientas para la detección temprana de eventos relacionados con el inicio de la carcinogénesis oral puede permitir identificar precozmente a pacientes de riesgo, así como comprender las alteraciones moleculares subyacentes de estos pacientes para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y reducir su alta mortalidad y morbilidad. Por lo tanto, estudios sobre la metilación aberrante del ADN nos permitirán desarrollar biomarcadores epigenéticos como herramientas diagnósticas y evolutivas de leucoplasias, LVP y carcinomas orales.

A continuación, se presenta una revisión sistemática y meta-análisis de los biomarcadores epigenéticos de metilación de ADN publicados hasta la fecha sobre leucoplasias orales, LVP y COCE en muestras de tejidos congelados.

1) Diseño de la revisión.

La revisión sistemática cumple las directrices de la guía PRISMA (Preferred Reporting Items for Sistematic Reviews and Meta-Analysis) y su protocolo se registró en el Registro Internacional Prospectivo de Revisiones Sistemáticas (PROSPERO – CRD42022349496).

2) Estrategia de búsqueda.

Se realizó una revisión sistemática de la literatura en las bases de datos Medline (Pubmed), Web of Science y Embase desde 2011 hasta diciembre 2022. Se combinaron los descriptores booleanos AND/OR con las siguientes palabras clave: "Leukoplakia",

"Leukoplakia, Oral", “Proliferative verrucous leukoplakia”, "Mouth Neoplasms", “Oral cancer”, “Oral squamous cell carcinoma”, "Tissues", “Oral tissue”, "Biopsy", “Oral biopsy”, "Methylation", "DNA Methylation", “Hypomethylation”, “Hypermethylation”. No se aplicaron límites de idioma. Adicionalmente se realizó una búsqueda bibliográfica manual de las referencias de los estudios incluidos. Se empleó la plataforma RefWorks Proquest para gestionar las referencias y eliminar las referencias duplicadas.

3) Criterio de elegibilidad.

Los criterios de inclusión se realizaron en base al formato PECOS: (1) Población: pacientes diagnosticados clínicamente y confirmado mediante estudio histopatológico de carcinoma oral de células escamosas (grupo caso). (2) Comparación: muestras tisulares de mucosa sana adyacente a la tumoración, controles sanos, leucoplasias orales o LVP (grupo control). (3) Exposición: estudios con biomarcadores de metilación aberrante de ADN con valor pronóstico en muestras de tejido de congelación. (4) Resultado: datos de los niveles de expresión diferencial de metilación de ADN de genes específicos o metilación del epigenoma. (5) Estudios observacionales retrospectivos, prospectivos o longitudinales realizados en esta última década.

4) Criterios de exclusión.

Estudios realizados sobre otros tipos muestras como enjuagues, saliva, hisopos orales, sangre, líneas celulares o en animales. Estudios con falta de datos para caracterizar los grupos. También se excluyeron estudios retractados, revisiones, reportes de casos, cartas al editor, resúmenes de reuniones científicas, opiniones personales y libros.

5) Cribado y selección de estudios.

Tras la eliminación de duplicados, la selección se realizó de forma independiente por dos revisores (APH y JB) según título y resumen; para finalmente evaluar a texto completo los artículos seleccionados, excluyendo los que no cumplían los criterios de elegibilidad. Las discrepancias fueron resueltas por consenso.

6) Extracción de datos.

La información de los artículos seleccionados fue extraída en una tabla Excel (v.16/2018, Microsoft, Redmond, USA) por uno de los autores (APH) y revisada por el

resto (LBD y JB). Se recopilaron el apellido del primer autor y año de publicación, país, diseño del estudio, criterios diagnósticos empleados, descripción clínica y patológica, tamaño muestral, sexo, edad y seguimiento, factores de riesgo, islas CpG evaluadas, biomarcadores (promotores de genes metilados) evaluados, técnica de análisis de metilación y porcentaje de metilación aberrante en cada grupo.

7) Evaluación metodológica.

Se realizó mediante la herramienta Quality in Prognostic Studies[134] que evalúa seis secciones potenciales de sesgo: participación en el estudio, abandono, medición del factor pronóstico, medición del resultado, factores de confusión y análisis estadísticos empleados. El riesgo de sesgo se calificó como alto, moderado o bajo para cada ámbito[134].

8) Síntesis cuantitativa.

Los resultados de cada estudio se presentaron mediante comparaciones entre frecuencias de expresión y el análisis descriptivo respectivo. Así como las Odds-ratio con los respectivos intervalos de confianza al 95%. Los estudios que no informaron las medidas de forma explícita, se calcularon a partir del texto y tablas disponibles.

El meta-análisis se realizó en genes investigados en al menos dos estudios independientes. La heterogeneidad fue evaluada mediante la prueba Q de Cochran y el indicador I^2. La heterogeneidad fue considerada estadísticamente significativa cuando p < 0'05 e $I^2 > 50\%$[135][136]. Las OR agrupadas se calcularon mediante un meta-análisis de efectos aleatorios cuando la heterogeneidad era significativa ($p<0,05$); en caso contrario, se empleó el modelo de efectos fijos. También se estimó el correspondientes estadístico Z, valor – p y sus IC al 95%. Los análisis se plasmaron mediante gráficos de bosque o "forest-plots"[135].

Se realizaron análisis de sensibilidad para determinar la influencia de cada uno de los estudios en la estimación global del efecto, por lo que, se repitió el meta-análisis tantas veces como estudios seleccionados, de modo que cada vez se omitía un estudio[137].

El sesgo de publicación fue evaluado mediante el gráfico de embudo o "funnel plot" y el test "Duval and Tweedie's trim and fill", que evalúa la existencia de diferencias de la estimación obtenida entre los estudios observados y los estudios imputados en el

meta-análisis. Para todo el análisis estadístico se empleó el software R de acceso libre con el paquete estadístico Metabin (v.3.4.4; https://www.r-project.org).

Resultados de la revisión sistemática y meta-análisis:

1. Selección de estudios.

En el proceso de búsqueda electrónica se obtuvieron 533 artículos. A los cuales se añadieron 2 artículos tras la búsqueda manual. Después de eliminar los duplicados, se identificaron 479 artículos. Tras la lectura de título y resumen, se excluyeron 354 estudios por no cumplir los criterios de inclusión. De los 85 artículos seleccionados para evaluación a texto completo, se excluyeron dieciséis por falta de datos, veintiuno por análisis de otros TOPM u otras localizaciones anatómicas y veinticinco por análisis de muestras de saliva, suero, hisopos o tejido fijado y embebido en parafina. Por lo que, finalmente fueron seleccionados 23 artículos en el presente estudio (figura 3).

2. Características de los estudios incluidos.

Las características de los 23 estudios incluidos se encuentran en la tabla 9. La mayoría de estudios se realizaron en poblaciones asiáticas (dieciséis estudios), de los cuales nueve en China[140][143][150][151][152][153][157][158][160] y cinco en la India[146][147][148][154][155]. Casi la totalidad de los estudios (95%) siguieron un diseño de casos y controles. En doce estudios se comparó la metilación entre tejido tumoral y tejido sano emparejado subyacente. Sólo cinco estudios incluyeron muestras de leucoplasias o LVP[138][149][154][155][160]. Doce estudios incluyeron correlación con características clínico – patológicas[139][140][141][142][143][144][148][150][152][153][159][160]. El número total de pacientes incluidos fue de 1.141 COCEs, 144 leucoplasias, 10 LVP, 494 muestras de tejido emparejado sano en pacientes con COCE y 197 controles sanos. En el grupo COCE existía una clara predilección por el sexo masculino, con un rango del 45 al 100% de pacientes incluidos. En los grupos LVP y leucoplasias existía más disparidad en el sexo de los pacientes. La mayoría de los estudios presentaban una distribución similar en cuanto al sexo y edad entre los casos y controles. Sólo se informó de los criterios diagnósticos empleados para cada grupo de pacientes en nueve estudios[138][140][141][142][145][147][149][153][160], de los cuales cuatro emplearon criterios de la OMS y tres de la American Joint Committe on Cancer. En 13 estudios informaron sobre factores de riesgo asociados. El 60% de los pacientes con COCE eran fumadores y

consumidores de alcohol y el 32% HPV+. En las leucoplasias orales el 61% eran fumadores y el 45% consumidores de alcohol (tabla 9).

Para medir la metilación, 12 estudios emplearon la metilación específica de PCR (MSP), 4 metilación específica cuantitativa de PCR (qMSP), 4 microarray de metilación de Illumina, 1 inmunoprecipitación de ADN metilado seguido de secuenciación (MeDIP-seq) y otro seguido de análisis de matrices (MeDIP-Chip) y 1 utilizó secuenciación por bisulfito. La metilación del epigenoma fue evaluada en 6 estudios[138][146][150][156][158][159], en 3 de los cuales incluyeron la validación de sus resultados mediante pirosecuenciación[156], metilación específica de PCR[158] o mediante metilación específica cuantitativa de PCR[146]. En otro estudio, también evaluaron la metilación del epigenoma previamente a su validación, sin embargo, no facilitaron los datos de los pacientes incluidos, por lo que sólo fueron incluidos en este estudio el grupo validación[147]. Por último, un estudio de qMSP también realizó la validación por pirosecuenciación[152].

Marcadores de metilación de ADN tisular en estudios de epigenoma.

En cinco de los seis estudios que evaluaron la metilación del epigenoma, incluyeron la cantidad de regiones metiladas diferencialmente encontradas. En el análisis de pacientes con COCE y el margen quirúrgico sano respectivo, Basu y cols. 2017[146] reportaron 21.810 *differentially methylated probes*, de las cuales correspondían a 2.325 islas CpG hipermetiladas y 968 hipometiladas; Towle y cols. 2013[156] también reportaron 3.939, de los cuales 1.933 estaban hipermetiladas y 2.006 hipometiladas; Zang y cols. 2013[158] obtuvieron 2.654 regiones diferencialmente metiladas, correspondientes a 1.269 hipermetiladas y 1.385 hipometiladas; Jithesh y cols. 2013[159] reportaron 48 *differentially methylated* probes, de las cuales estaban 32 hipermetiladas y 16 hipometiladas. Por otra parte, en pacientes con LVP en comparación con controles sanos, Herreros-Pomares y cols. 2021[138] reportaron 4.647 *differentially methylated regions*, de las cuales estaban 4.630 CpG hipermetiladas y 17 hipometiladas.

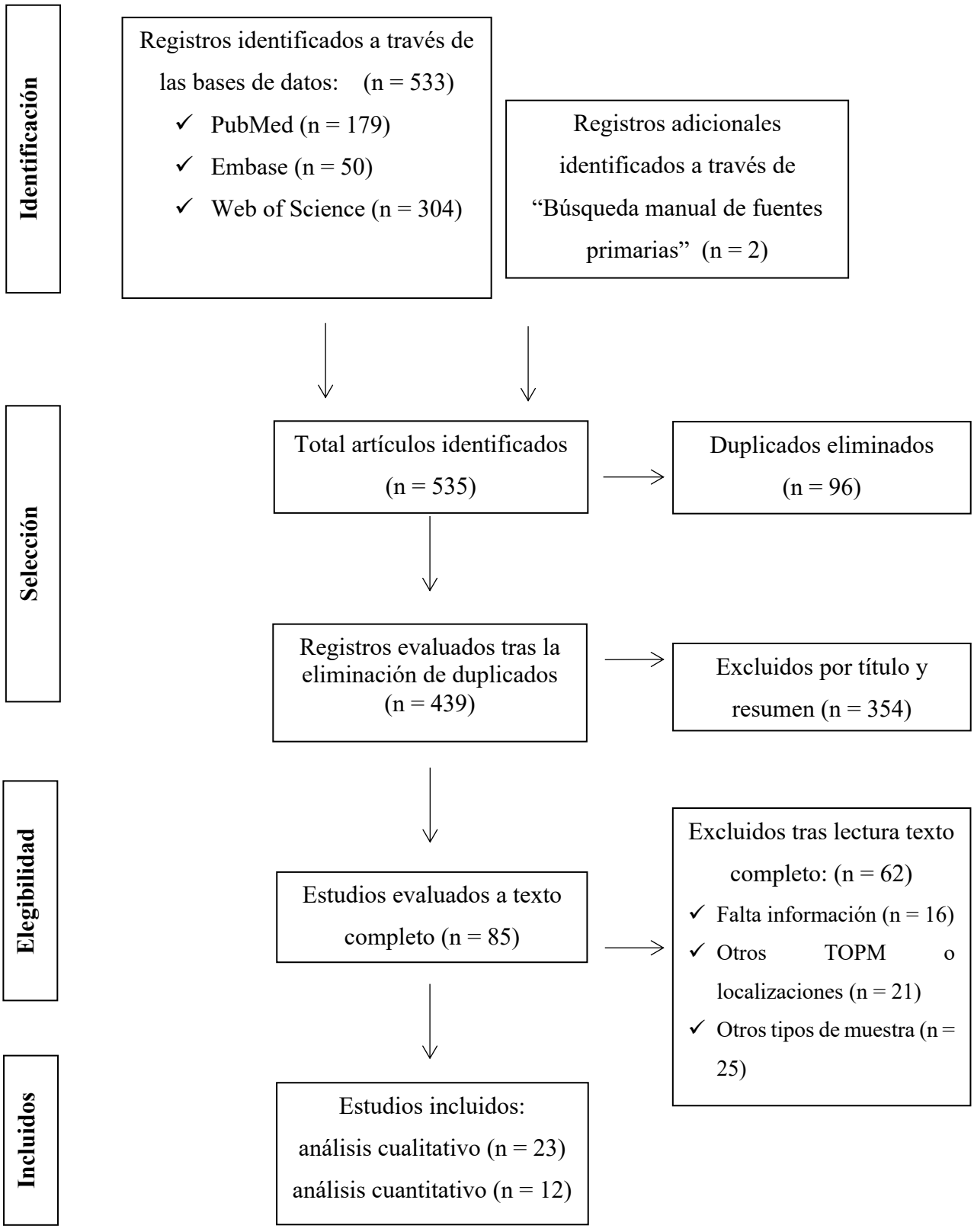


Figura 3. Diagrama de flujo de los procesos de búsqueda y resultados (PRISMA).

AUTOR Y AÑO	PAIS	DISEÑO DEL ESTUDIO	CRITERIOS DX	CASOS				CONTROLES			FACTORES DE RIESGO	BIOMARCADOR (LOCI EXAMINADO)		TECNICA	% METILACIÓN	
				NUMERO	SEXO	EDAD	HISTOPATOLOGIA	NUMERO	SEXO	EDAD		HIPERMETILADO	HIPOMETILADO		CASOS	CONTROLES
Herreros-Pomares y cols., 2021 (138)	España	caso - control	LVP: Cerero-Lapiedra	10 LVP	6 (60%) F	70,5	2 no displasia, 2 D. leve, 4 D. moderada, 2 D. severa	5 SANOS	2 (40%) F	66'4	3 (30%) fumadores	PCLB1, CD8A, SPOCK2, MYO7A, ARTN, OSR2, GATA3, HOXD10	ANKRD6, DLG2, GPX3, PITX2, ZNF736	MeDIP-seq	-	-
Supic y cols., 2022 (139)	Serbia	cohortes	NE	148 COCE	38 (25,7%) F	58	126 bien o mod dif, 22 poco dif				113 (76,4%) fumadores, 148 (100%) alcohol	miR-34b/c		Metilación específica de PCR	41,22	
Sun y cols., 2021 (140)	China	tejido emparejado cáncer - normal	International classification of diseases	67 COCE	23 (34,3%) F	59,1	24 bien dif, 40 mod dif, 3 poco dif	67 sano emparejado	23 (34%) F	59,1	38 (56,7%) fumadores, 35 (52,2%) alcohol, 3 (4,5%) areca nut	PAX1, ZNF582	-	Metilación específica cuantitativa de PCR	*PAX1: 120,07 (2,77-382,08). *ZNF582:20,79 (2,13-225,61)	*PAX1: 0,03 (0-12,28). *ZNF582: 0,66 (0,11-4,19)
Strzelczyk y cols., 2018 (141)	Polonia	tejido emparejado cáncer - margen sano	American Joint Committe on Cancer	75 COCE	25 (33%) F	56	11 bien dif, 57 mod dif, 7 poco dif	75 margen quirúrgico sano	25 (33%) F	56	58 (77,3%) fumadores. 57 (76%) alcohol, 30 (40%) antecedente familiar cáncer	p16, APC, MGMT, TIMP3, CDH1	-	Metilación específica de PCR	p16: 58,67. APC: 49,33. MGMT: 58,67. TIMP3: 50,67. CDH1: 57,33.	p16: 50,67. APC: 41,33. MGMT: 37,33. TIMP3: 42,67. CDH1: 25,33.
Strzelczyk y cols., 2019 (142)												SFRP1, SFRP2, RASSF1A, RARβ, DAPK1			SFRP1: 41,3. SFRP2: 26,6. RASSF1A: 21,3. RARβ: 63,9. DAPK1: 65,3.	SFRP1: 32. SFRP2: 11,9. RASSF1A: 21,3. RARβ: 77,2. DAPK1: 41,3.
Zhou y cols., 2019 (143)	China	tejido emparejado cáncer - normal	NE	45 COCE lingual	15 (33%) F	NE	COCE lingual	45 tejido adyacente sano	15 (33%) F	NE	NE	DR4, DR5, DcR1, DcR2	-	Metilación específica de PCR	DcR1: 40. DcR2: 47. DR4: 78. DR5: 36	DcR1: 2. DcR2: 4. DR4: 2. DR5: 4

Allameh y cols., 2019 (144)	Irán	casos - controles	"standard protocols" NE	67 COCE	28 (42%) F	59,8	39 bien dif, 19 mod dif, 9 poco dif	59 SANOS	24 (40,7%) F	44,1	COCE: 53,7% fumadores. 14,9% HPV+. SANOS: 52,5% fumadores, 6,7% HPV+.	p16	-	Metilación específica de PCR	p16: 59,7	p16: 38,9
Eljabo y cols., 2018 (145)	Serbia	tejido emparejado. Prospectivo	OMS	40 COCE	15 (38%) F	65,3	40 COCE	40 margen quirúrgico sano	15 (38%) F	65,3	22 (55%) fumadores. 18 (45%) alcohol	p14, p16	-	Metilación específica cuantitativa de PCR	p14: 90. p16: 78	p14: 80. p16: 70
Basu y cols., 2017 (146)	India	tejido emparejado cáncer - normal	NE	11 COCE. 53 COCE	4 (36%) F. 14 (26%) F	51,37. 53,5	64 bien dif	11 margen sano. 53 margen sano	4 (36%) F. 14 (26%) F	51,37. 53,5	6 (55%) HPV+. 3 (27%) tabaco 29 (55%) HPV+. 23 (43%) tabaco	ZNF577, HLA-DPB1, LHX1, MYH14, ZSCAN31, LDLRAD4, LXN	PTPN22, PIWIL1, MFAP2, SPNS3, AIM2, SLAMF1, SPATA13	Illumina Infinium 450K BeadChip array+ Metilación específica cuantitativa de PCR	-	-
Bhat y cols., 2017 (147)	India	casos - controles	OMS	20 COCE lengua	7 (35%) F	58	8 bien dif, 12 mod dif	20 sanos	NE	NE	11 HPV+	DAPK1, LRPPRC, RAB6C, ZNF471	-	Secuenciación de genoma por bisulfito (BGS)	DAPK1: 95. LRPPRC: 80. RAB6C: 100. ZNF471: 100.	DAPK1: 25. LRPPRC: 15. RAB6C: 20. ZNF471: 30.
Sushma y cols., 2016 (148)	India	Tejido emparejado cáncer - margen sano (misma biopsia)	NE	50 COCE	17 (34%) F	NE	50 COCE	50 margen biopsia sana	17 (34%) F	NE	32% fumadores 16% alcohol 52% betel quid	PTEN, p16	-	Metilación específica de PCR	PTEN: 24 p16: 38	PTEN: 0 p16: 0
Abe y cols, 2016 (149)	Japón	caso - control	OMS	26 COCE	9 (34,6%) F	64,6	12 bien dif, 14 NE	24 leuco (5 disp leve, 6 disp mod, 2 disp sev. 11 no disp) 16 sanos	leuco: 14 (58%) F sanos: NE	leuco: 64 sanos: NE	-	CMTM3, RBP4, NKX2-3, TSPYL5, CLDN11, EGFLAM, TRPC4, MAP6	-	Metilación específica de PCR	CMTM3: 38 RBP4: 35 NKX2-3: 31 TSPYL5: 31 CLDN11: 27 EGFLAM: 19 TRPC4: 42 MAP6: 31	CMTM3: 13 RBP4: 4 NKX2-3: 13 TSPYL5: 25 CLDN11: 4 TRPC4: 17 MAP6: 13
Li y cols., 2015 (150)	China	caso – control (emparejado sano y sano)	NE	40 COCE	NE	52,6	NE	10 emparejado sano 5 sanos	NE	47,2 (media ambos grupos)	NE			Análisis microarray (Illumina GoldenGate Methylatio)		

Xiao y cols., 2014 (151)	China	tejido emparejado cáncer - margen sano	NE	49 COCE	NE	NE	49 COCE	49 margen quirúrgico sano	NE	NE	NE	SFRP2	-	Metilación específica de PCR	SFRP2: 75,5	SFRP2: 6,1
Lai y cols., 2014 (152)	China	caso - control	NE	86 COCE 49 COCE	100% H	NE	86 COCE 49 COCE	24 SANO 11 SANO	100% H	NE	NE	TFPI-2	-	Metilación específica cuantitativa de PCR + Pirosecuenciación	qMSP: TFPI-2 P1: 16,23 ± 12,97 TFPI-2 P2: 12,96 ± 12,46. TFPI-2 P3: 17,19 ± 13,62 TFPI-2 P4: 16,67 ± 13,60. Pirosecuen: TFPI-2 P1: 20,35 ± 12,19 TFPI-2 P2: 16,21 ± 9,48. TFPI-2 P3: 21,63 ± 16,08 TFPI-2 P4: 34,63 ± 18,06	qMSP: TFPI-2 normal: 4,45 ± 7,51. Pirosecuen: TFPI-2 normal: 4,43 ± 1,91
Zhang y cols., 2014 (153)	China	caso - control	International Union Against Cancer, 2002	50 COCE lingual	21 (42%) F	NE	3 bien/mod dif, 17 poco dif	13 SANO	NE	NE	NE	LARGE		Metilación específica de PCR	64	23
Bhatia y cols., 2014 (154)	India	caso - control	NE	76 COCE	7 (9%) F	53 ± 12,97	76 COCE	16 SANO 22 LEUCO 11 LEUCO sin DISPLASIA	Sano: 4 (25%) F Leuco: 3 (14%) F Leuco sin D: 1 (9%) F	29 ± 8,28. 39 ± 13,59. 34 ± 11	COCE: 78% fumador, 25% alcohol. Sano: 56% fumador, 31% alcohol. Leuco: 91% fumador, 27% alcohol Leuco sin D: 91% fumador, 27% alcohol	MGMT, p16		Metilación específica de PCR	MGMT: 76. p16: 82.	MGMT Sano: 13. MGMT Leuco: 73. MGMT Leuco sin D: 73. p16 Sano: 13. p16 Leuco: 68. p16 Leuco sin D: 36.
Asokan y cols., 2014 (155)	India	caso - control	NE	10 COCE	NE	NE	10 COCE	5 SANOS 10 LEUCO	NE	NE	NE	p16, p15, hMLH, MGMT, E-caderina		Metilación específica de PCR	p16: 60. p15: 20. hMLH: 10. MGMT: 40. E-caderina: 60.	todos sanos: 0. p16: 60. p15: 0. hMLH: 0. MGMT: 30. E-caderina: 60.

Towle y cols., 2013 (156)	Canada	tejido emparejado cáncer - displasia - normal	NE	10 COCE/CIS. 11 COCE	5 (50%) F. 6 (55%) F	52. 59	6 COCE. 4 CIS. 11 COCE	10 SANO + 10 DISPLASIA emparejada mismos pacientes. 11 SANOS emparejados	5 (50%) F. 6 (55%) F	52. 59	1ºCOCE: 30% fumadores. 2ºCOCE: 18% fumadores.	DAPK1, RUNX3, SFRP4, CDKN2A, MGMT, KCNAB3, EYA4, HOXA9, TRHDE, ZNF454, ZNF671	KCNK18, C1QB, CASP8, CFHR2, TRPM2, HNF4A, C12orf36	Infinium HumanMethylation27 BeadChip (2º generación) + Pirosecuenciación.	HIPERMETILACIÓN: DAPK1, RUNX3, SFRP4, EYA4, HOXA9, ZNF454, ZNF671: 100. CDKN2A: 70. MGMT: 50. KCNAB3, TRHDE: 90. HIPOMETILACIÓN: C1QB, TRPM2, C12orf36: 100. KCNK18, CASP8: 90. CFHR2: 80.	HIPERMETILACIÓN: KCNAB3, EYA4, HOXA9, TRHDE, ZNF454, ZNF671: 80. DAPK1: 70. RUNX3, SFRP4, MGMT: 60. CDKN2A: 50. HIPOMETILACIÓN: KCNK18: 70. C1QB, CASP8, CFHR2, TRPM2, HNF4A, C12orf36: 60.
Li y cols., 2013 (157)	China	caso - control	NE	53 COCE	20 (38%) F	55	53 COCE	23 SANOS	NE	NE	NE	Apaf-1, DAPK		Metilación específica de PCR	Apaf-1: 86,8. DAPK: 71,7.	Apaf-1: 0. DAPK: 0.
Zhang y cols., 2013 (158)	China	tejido emparejado cáncer - normal	NE	9 COCE 2O COCE	NE	NE	9 COCE 2O COCE	9 sano emparejado 2O sano emparejado	NE	NE	NE	FBLN1, ITIH5	RUNX3	MeDIP-Chip + MSP	FBLN1: 55. ITIH5: 70. RUNX3: 15.	FBLN1: 20. ITIH5: 25. RUNX3: 55.
Jithesh y cols., 2013 (159)	UK	tejido emparejado cáncer - normal	NE	44 COCE	15 (34%) F	60	11 bien dif, 27 mod dif, 3 poco dif, 3 NE	44 sano emparejado	15 (34%) F	60	6 (13%) HPV+	HOXA9, HS3ST2, NPY, HTR1B, SOX17, MME, EPHA5, CALCA, EYA4, HOXA11, TAL1, WT1	EMR3, PI3, SPP1, AIM2, PTHLH, IFNG, CEACAM1	Análisis microarray (Illumina GoldenGate high-throughput array) + Bioinformática	-	-
Liu y cols., 2012 (160)	China	caso - control	OMS	32 COCE	13 (40,6%) F	55	32 COCE	77 leuco (33 disp leve, 24 disp mod, 7 disp sev. 13 no disp)	35 (45,5%) F	56,1	COCE: 47% fumadores, 44% alcohol. Leuco: 48,6% fumadores, 52% alcohol	DAPK		Metilación específica cuantitativa de PCR	46,9	19,5

Tabla 9. Características de los estudios incluidos. NE: No especificado.

En tres de esos estudios[146][156][158], posteriormente realizaron la validación de sus resultados en una selección específica de un panel de promotores metilados diferencialmente. En cuatro estudios[138][146][156][158], también realizaron el análisis de expresión génica. Li y cols. 2015[150], evaluaron diferentes combinaciones de paneles de genes diferencialmente metilados y describieron la hipermetilación de 7 genes para la detección de COCE (ASCL1, FGF3, FLT4, GAS7, KDR, TERT y TFPI2) y la hipermetilación de 8 genes para su diagnóstico precoz (ADCYAP1, EPHA7, FLT4, GSTM2, KDR, MT1A, NPY y TFPI2).

Marcadores de metilación de ADN tisular de genes específicos evaluados para detectar diferentes estadios de COCE y sus precursores.

Los estudios que aplicaron un enfoque de estado de metilación de genes específicos, evaluaron un total de 54 genes en asociación a diferentes estadios de COCE o leucoplasias (tabla 11). De forma general, se encontraron mayores niveles de hipermetilación estadísticamente significativa en COCE en los promotores de genes PAX1, ZNF582, MAGMT, CDH1, SFRP2, DAPK1, miR-34b/c, DR4, DR5, DcR1, DcR2, p16, p14, LXN, ZNF154, CTDSP1, ZNF577, HLA-DPB1, LRPPRC, RAB6C, ZNF471, PTEN, TSPYL5, FLT4, KDR, TFPI2, LARGE, E-cadherina, Apaf-1, DAPK, FBLN1 y ITIH5. La metilación aberrante de 6 genes se evaluó en dos o más estudios. La metilación de p16 fue evaluada con mayor frecuencia[141][144][145][148][154][155], seguida de MGMT[141][154][155][156] y DAPK1[142][147][156].

Correlación de metilación aberrante y características clínico-patológicas y evolutivas.

Cinco estudios encontraron de forma estadísticamente significativa mayor hipermetilación en ciertos promotores de genes en muestras tumorales de pacientes con antecedentes familiares de cáncer[141][142], mayor tamaño tumoral[142][143][153], fumadores[141], mayores de 44 años[143] y localización lingual[148] (tabla 10). Un estudio en pacientes con leucoplasias orales encontró correlación entre fumadores de más de 20 años y la hipermetilación de DAPK[160].

También se ha encontrado correlación con características patológicas como invasión de ganglios linfáticos[139][141][142][153], rotura ganglionar extracapsular[159], estadio patológico avanzado[152] y diferenciación tumoral moderada o pobre[144]. Un estudio

relacionó la hipermetilación de FLT4, KDR y TFPI2 con la detección de estadios I y II de COCE[150]. En cuanto al pronóstico, un estudio relacionó la metilación aberrante de 17 genes con las recurrencias[159] y otro la hipermetilación con la reducción de la supervivencia global[139] (tabla 10). Un estudio no reportó ninguna correlación de forma significativa[140].

AUTOR	GENE (LOCI)	Características clínicas, demográficas y evolutivas		Características patológicas	
			OR (95% CI)		OR (95% CI)
Strzelczyk y cols., 2018 (141)	APC	fumadores	3.6 (0.97 - 13.39)*		
	MGMT	Antecedentes familiares	3.04 (1.08 - 8.55)		
	TIMP3			N+	1.79 (0.96 - 3.35)*
	CDH1	mujeres	2.61 (0.88 - 7.73)*		
		fumadores	3.13 (0.91 - 10.8)*		
Strzelczyk y cols., 2019 (142)	SFRP1	T3/T4	0.59 (0.35 - 0.98)		
	RARβ			N+	1.79 (0.96 - 3.35)*
	DAPK1	Antecedentes familiares	3.20 (1.09 – 9.4)	N+	3.34 (1.29 - 8.61)
Zhou y vcols., 2019 (143)	DcR1, DR4, DR5	edad (>44y)	NE		
	DcR1, DR4	TNM 3/4	NE		
Allameh y cols., 2019 (144)	p16			MD/PD	5.95 (1.8 - 18.9)**
Sushma y cols., 2016 (148)	p16	lingual	5.72 (1.6 - 20.4)**		
Lai y cols., 2014 (152)	TFPI-2			P4	NE
Zhang y cols., 2014 (153)	LARGE	TNM 3/4	4.01 (1.18 - 13.62)**	N+	6.22 (1.22 - 31.67)**
Jithesh y cols., 2013 (159)	15-gene signature (DCC, CALCA, WT1)			Rotura extracapsular (ECS)	NE
	17-gene signature (MLLT6, MSH2, NOTCH4, PCGF4, TFPI2)	recurrencia	NE		

Tabla 10. Metilación aberrante de ciertos promotores de genes correlacionados de forma estadísticamente significativa según características clínicas, demográficas, patológicas y evolutivas con el riesgo de carcinoma oral de células escamosas. NE: no especificado. * p<0,1. ** calculado a partir del texto y tablas de los correspondientes estudios.

Evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos.

De forma general se observó una calidad metodológica aceptable. Existían variaciones de calidad entre los diferentes dominios evaluados. Se observó de forma

predominante un riesgo de sesgo bajo en los apartados “medición de resultados” y “abandono del estudio”, un riesgo de sesgo moderado en los dominios “medición del factor pronóstico”, “evaluación factores de confusión” y “análisis estadístico”, sin embargo, en el dominio “participación en el estudio” se registró un riesgo de sesgo moderado/alto debido a la falta de información sobre los criterios de inclusión y exclusión, criterios diagnósticos, características de los pacientes o el período de estudio.

Meta-análisis.

Un total de 318 casos y 288 controles de seis estudios fueron incluidos para evaluar la asociación entre la hipermetilación del promotor p16 y el riesgo de COCE. El meta-análisis de efectos aleatorios estimó una OR estadísticamente significativa mayor de hipermetilación en las muestras de COCE en comparación con los controles (OR = 2,64. 95% IC = 1,41 – 4,95). Observamos una heterogeneidad significativa moderada entre los estudios (I^2 = 63%, p = 0,02) (figura 4). Ningún estudio fue añadido con el método Trim and Fill para corregir la asimetría del funnel plot y la Odds Ratio estimada no difería de la inicial, por lo que todo ello indica la ausencia de sesgo publicación.

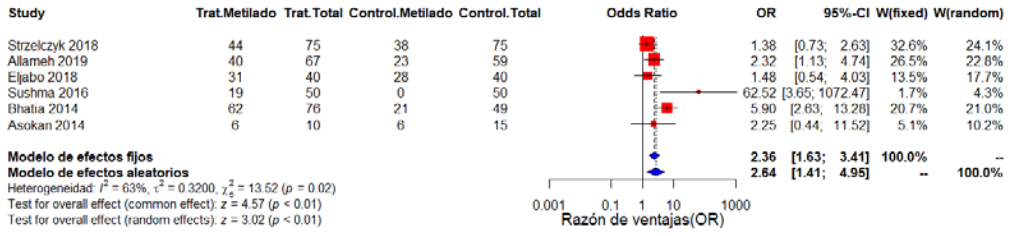


Figura 4. Forest plot de la asociación entre hipermetilación del promotor p16 y el riesgo de COCE.

Un total de 171 casos y 149 controles de cuatro estudios fueron incluidos para evaluar la asociación entre la hipermetilación del promotor MGMT y el riesgo de COCE. El meta-análisis de efectos fijos estimó una OR estadísticamente significativa mayor de hipermetilación en las muestras de COCE en comparación con los controles (OR = 2,35. 95% IC = 1,48 – 3,73). Observamos ausencia de heterogeneidad entre los estudios (I^2 = 0%, p = 0,53) (figura 5). En el funnel plot obtuvimos una imagen simétrica al igual que al realizar el método Trim and Fill cuya Odds Ratio estimada no difería de la inicial, todo ello sugiere la ausencia de sesgo publicación.

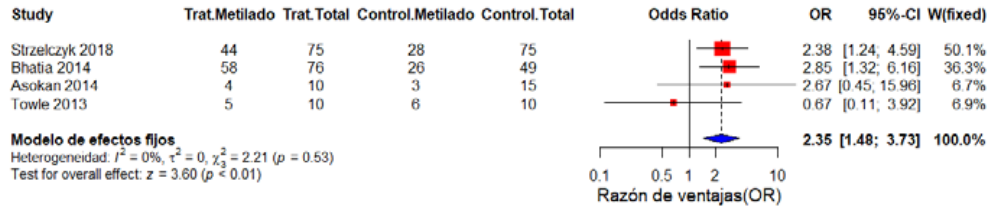


Figura 5. Forest plot de la asociación entre hipermetilación del promotor MGMT y el riesgo de COCE.

En tres estudios se evaluó la asociación entre la hipermetilación del promotor DAPK1 y el riesgo de COCE. En el meta-análisis de efectos aleatorio obtuvimos una OR estadísticamente significativa mayor de hipermetilación en las muestras de COCE (OR = 9,04. 95% IC = 1,25 – 65,17). Observamos una heterogeneidad estadísticamente significativa y moderada entre los estudios (I^2 = 71%, p = 0,03) (figura 6). Un estudio fue añadido con el método Trim and Fill para corregir la asimetría del funnel plot y la Odds Ratio estimada difería poco de la inicial, lo que indica la ausencia de sesgo publicación.

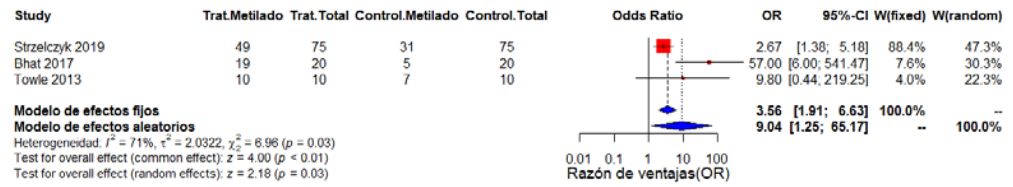
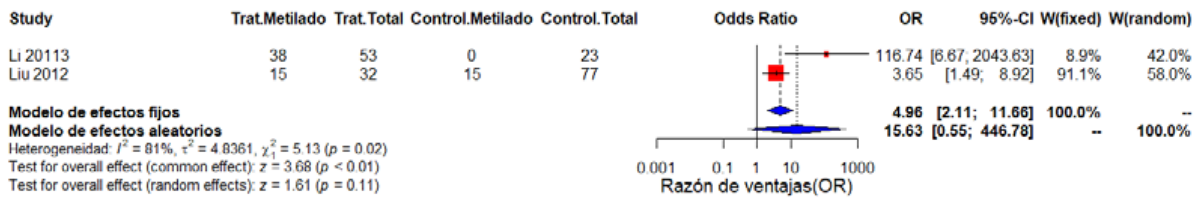


Figura 6. Forest plot de la asociación entre hipermetilación del promotor DAPK1 y el riesgo de COCE.

En la figura 7 observamos los forest plot obtenidos de la asociación entre la hipermetilación de los promotores de genes DAPK y SFRP2 y el riesgo de COCE. En ambos análisis observamos una alta heterogeneidad estadísticamente significativa y en los resultados de los meta-análisis de efectos aleatorios no se asoció de forma estadísticamente significativa con el riesgo de COCE. Además, en ambos análisis obtuvimos una imagen asimétrica del funnel plot lo que indicaba la presencia de sesgo de publicación.



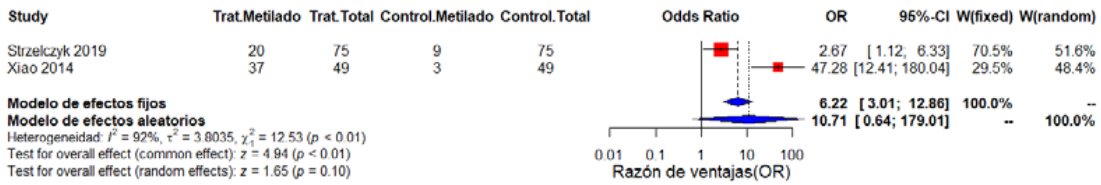


Figura 7. Forest plot de la asociación entre hipermetilación de promotor DAPK y SFRP2 y el riesgo de COCE.

En los resultados de los análisis de sensibilidad de los meta-análisis realizados sobre más de dos estudios (p16, MGMT y DAPK1) no se observaron variaciones tras la repetición secuencial omitiendo cada vez un estudio. Lo que confirma la solidez y robustez de nuestros resultados obtenidos.

Como se ha podido observar, la metilación de ADN es un mecanismo importante en la regulación de la expresión génica cuya alteración se ha descrito en el cáncer oral[146][148][156]. En la presente revisión sólo en seis estudios se evaluó la metilación del epigenoma y se obtuvo como resultados perfiles de metilación diferenciados entre COCE y tejido sano adyacente, lo que evidencia la adquisición de modificaciones epigenéticas en la tumorgénesis oral[146][150][156][158][159]. Por otro lado, la metilación diferencial de ciertos promotores de genes específicos también ha permitido diferenciar las muestras de tejido tumoral del tejido emparejado sano. Algunos de estos genes que presentan la metilación aberrante de su promotor participan en procesos celulares importantes como el control del ciclo celular[141][144][145], la apoptosis[142][143][148][157], la regulación de la vía de señalización Wnt[151][156], la adhesión celular[140][141][155], la regulación transcripcional[142] y la reparación del ADN[141][154][155][156].

Varios estudios respaldan la hipótesis de que la acumulación de metilación aberrante conduce a la transformación maligna de las leucoplasias orales[149][154][155][160]. Del mismo modo, se ha observado que las leucoplasias con displasia presentan mayor cantidad de genes metilados[149][154]. En este sentido, la silenciación mediante la hipermetilación del gen TSPYL5 es frecuente en leucoplasias, lo que ha permitido hipotetizar que se trate de un gen supresor tumoral[149]. También se ha descrito la metilación aberrante de MGMT y el promotor p16 como predictores del riesgo de progresión maligna[154][155] y la hipermetilación de DAPK como mecanismo de carcinogénesis en pacientes fumadores[160]. En el estudio de Asokan y cols.[155], el 60% de las leucoplasias presentaban hipermetilación del promotor de los genes supresores

tumorales p16 y E-cadherina. Sin embargo, este estudio presentaba un tamaño muestral bajo y la ausencia de un estudio estadístico que pudiera arrojar alguna conclusión satisfactoria.

Por lo tanto, la presente revisión sistemática sintetiza la evidencia actual de la implicación de las alteraciones en la metilación del ADN tisular en la carcinogénesis oral. La presencia de diferencias significativas en los niveles de metilación de ciertos promotores de genes podría ser útil para el desarrollo de biomarcadores epigenéticos pronósticos en los carcinomas orales de células escamosas y leucoplasias orales. A pesar de las limitaciones, los resultados del meta-análisis son robustos y permiten demostrar una asociación estadísticamente significativa entre la hipermetilación de ciertos promotores de genes y el riesgo de COCE. Sin embargo, son necesarios más estudios en pacientes con leucoplasias y LPV, así como estudios con un enfoque del análisis de la metilación del epigenoma para poder desarrollar biomarcadores de metilación para identificar y monitorizar a estos pacientes de alto riesgo de transformación maligna.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

La leucoplasia verrugosa proliferativa es el trastorno oral potencialmente maligno con la tasa de transformación en cáncer oral más alta de este grupo de enfermedades[1][43][55]. Recientemente, en una actualización coordinada por el Centro colaborador de la Organización Mundial de la Salud para el Cáncer oral, se ha reconocido por primera vez y de forma oficial a esta enfermedad de origen desconocido como una forma distinta de leucoplasia oral multifocal caracterizada por tener un curso clínico progresivo, persistente e irreversible con presencia de múltiples leucoplasias orales que frecuentemente se vuelven verrugosas[1].

Varios autores ya habían considerado a la leucoplasia verrugosa proliferativa como una entidad diferenciada de las leucoplasias orales no homogéneas[14][15][38][41]. Seguramente debido a que se habían descrito diferencias epidemiológicas, clínicas e incluso genómicas entre ambas enfermedades. Por ejemplo, los pacientes con LVP son mayoritariamente mujeres de edad más avanzada, sin hábitos tabáquicos ni enólicos relacionados[1][14][29][38][21], cuyas lesiones se pueden presentar en cualquier localización de la cavidad oral y de forma multifocal, siendo las zonas más frecuentemente afectadas las encías, mucosa alveolar, paladar y mucosa yugal[1][10][14][15][20][21][29]. Sin embargo, tanto las leucoplasias clásicas homogéneas como las no homogéneas afectan con mayor predilección a hombres fumadores y en superficies laterales y zona ventral de la lengua y el suelo de boca[9][41][44][52].

El diagnóstico de la LVP se realiza de forma retrospectiva en base a hallazgos clínicos, histológicos y evolutivos que se van desarrollando a lo largo de los años. Como hemos descrito anteriormente, existen varios criterios diagnósticos publicados por diferentes grupos de investigación[10][14][46][47]. Sin embargo, aún no existen unos criterios que abarquen todo el espectro clínico-patológico de esta enfermedad y que permitan su diagnóstico precoz[26][48]. En estadios iniciales, no hay características clínico-patológicas patognomónicas que permitan diferenciarlas de queratosis friccionales, leucoplasias homogéneas clásicas, liquen plano oral o lesiones liquenoides orales[31][49]. No obstante, resulta fundamental poder diferenciarlas de forma precoz de estas enfermedades, ya que el control y manejo, así como el pronóstico y seguimiento es muy diferente, pues los pacientes con LVP presentan mayor riesgo de transformación en cáncer oral[38][49]. Así mismo, la LVP es refractaria a todo tipo de tratamiento presentando una recurrencia del 67’2% (IC 95%: 48,3 - 81,8)[51], a diferencia de las leucoplasias unifocales clásicas que presentan unas tasas de recurrencia más bajas, cercanas al 20%[161][162].

En estadios avanzados, clínicamente las lesiones de estos pacientes progresan hacia la multifocalidad con un amplio espectro de tipo de lesiones que abarcan desde placas blancas lisas o fisuradas hasta lesiones exofíticas, verrugosas, eritematosas y eritroleucoplásicas[1][10][14][20][37]. Finalmente, en el curso de su evolución, se observa que entre el 43,87% (IC 95%: 31,93 – 56,13)[55] y el 65,8% (IC 95%: 55,3 – 76,2)[43] de los pacientes desarrollan por lo menos una transformación maligna en cáncer oral, si bien algunos autores todavía indican cifras superiores de malignización[10][14][29][49]. Esta es otra de las notables diferencias que encontramos con las leucoplasias orales clásicas que presentan una tasa de transformación maligna del 9,8% (IC 95%: 7,9 – 11,7)[52].

Otra de las particularidades de la LVP es la ausencia de asociación con aspectos etiopatológicos conocidos como pudieran ser el tabaco, el alcohol y la masticación de nuez de areca u hoja de betel. Tampoco se ha establecido evidencia directa con patógenos virales como el HPV o EBV[1][14][20][38][43].

Estos factores clínico-patológicos y epidemiológicos distintivos junto con la ausencia de factores de riesgo asociados al carcinoma oral de células escamosas convencional han llevado a algunos autores a considerar que los carcinomas orales de células escamosas en pacientes con LVP (COCE – LVP) podrían tener una diferente forma de presentación clínica, siendo por lo tanto cánceres con comportamientos diferentes a los clásicos carcinomas orales de células escamosas[39][57][59][60]. Por ejemplo, existe una diferente predilección de afectación entre ambas entidades, siendo la lengua y el suelo de boca las localizaciones mayormente afectadas en COCE convencional mientras que son las encías, mucosa alveolar, paladar y mucosa yugal las más comunes en COCE – LVP[43][44][55][57][163].

Además, dada la multifocalidad característica de esta entidad, los pacientes pueden presentar varios carcinomas en múltiples sitios a la vez o desarrollar segundos tumores a lo largo de su seguimiento de ahí que se haya relacionado esta enfermedad con un claro proceso de cancerización de campo oral[18][62][63]. En un estudio realizado por nuestro equipo[15], observamos que una vez el paciente ha evolucionado hacia la malignización, la evolución de la enfermedad se vuelve aún más agresiva, ya que cerca del 40% de los pacientes desarrollaban varios segundos tumores primarios y en un intervalo de tiempo cada vez más corto[15]. Pese a todo ello, estos pacientes presentan un pronóstico más favorable cuando se comparan con carcinomas orales convencionales, ya que presentan

tasas de mortalidad y recurrencias más bajas (cercanas al 20%), siendo muy raras las metástasis[58][59] y presentan mejores tasas de supervivencia[18][44][163].

La agresividad de esta enfermedad caracterizada por la multifocalidad, las altas tasas de recidivas, así como de transformación maligna y tendencia a desarrollar segundos tumores sugiere la existencia de alteraciones moleculares aún no caracterizadas en pacientes con LVP[50][51]. Pese a que se han descrito algunas alteraciones genéticas, no se ha definido ni su etiología ni patogénesis[59][106]. Por lo que, determinar las bases moleculares de esta enfermedad, podría permitir predecir el comportamiento clínico y desarrollar en el futuro nuevas estrategias terapéuticas. Además, diferenciar los carcinomas desarrollados en pacientes con LVP de los carcinomas convencionales puede conllevar prometedoras implicaciones prácticas a la hora de elegir estrategias de tratamiento y seguimiento para cada condición.

El primer paso para el correcto manejo de estos pacientes es siempre el diagnóstico precoz. El desarrollo de biomarcadores predictivos que nos permitiesen conocer la probabilidad de progresión, así como un diagnóstico precoz podrían facilitarnos la comprensión de los mecanismos y alteraciones moleculares involucradas en esta enfermedad para sentar las bases de su etiopatogenia[50]. Recientemente en el año 2021, nuestro grupo de investigación publicó una serie de tres estudios "ómicos"[102][119][138] sobre un grupo de diez pacientes con LVP sin lesiones ni antecedentes de carcinoma oral y cinco controles sanos para investigar la biología molecular de la transformación maligna de sus lesiones orales. Se realizó un análisis integrador de los 140 genes expresados diferencialmente con la metilación de ADN. Se encontraron ocho genes hipermetilados diferencialmente (PCLB1, CD8A, SPOCK2, MYO7A, ARTN, OSR2 y GATA3) y cinco genes hipometilados (GPX3, PITX2, ANKRD6, DLG2 y ZNF736) en PVL. Por lo que, mediante estos estudios de inmunoprecipitación del ADN metilado y la secuenciación de alto rendimiento se describieron biomarcadores de progresión hacia la transformación maligna[102][138]. También se describió que la disbiosis microbiana es común en la LVP y está caracterizada por una pérdida de la diversidad microbiana oral[119]. Estos tres estudios fueron punteros en la descripción de alteraciones moleculares, y nuestro objetivo es ampliar las muestras y subgrupos de pacientes al incluir más tipos de lesiones orales.

En la última actualización de 2022 sobre los sellos distintivos del cáncer[79] se ha reconocido de forma oficial la implicación de la reprogramación epigenética en el cáncer,

pese a existir evidencias claras de su papel desde hace años[120][123][131][133]. Según hemos podido corroborar, no existen estudios epigenómicos que hayan analizado las diferencias en la metilación de ADN en pacientes con carcinomas orales y LVP comparándolos con COCE convencional. Los recientes avances en tecnologías de metilación del ADN basadas en micromatrices[131][132] y en análisis bioinformáticos han mostrado un gran potencial para identificar las vías moleculares y la etiopatogénesis de una enfermedad desconocidas a priori. Actualmente, según nuestro conocimiento, las características epigenómicas no han sido abordados en la literatura científica como método de diagnóstico precoz ni sus implicaciones como factores pronósticos de los carcinomas orales derivados de LVP. La desregulación del metiloma es un sello distintivo del desarrollo y la progresión tumoral, por lo que las aberraciones en los patrones de metilación del ADN podrían emplearse como biomarcadores pronóstico de pacientes con LVP. Por todo ello, creemos oportuno y justificado realizar un estudio clínico-molecular en estos pacientes con las tasas de transformación maligna y de recurrencias más altas de todos los trastornos orales potencialmente malignos. La caracterización de estos eventos moleculares junto con las características clínico-patológicas pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre su etiopatogénesis y pronóstico.

Basándonos en lo explicado anteriormente nos planteamos la siguiente hipótesis nula (H_0):

Las alteraciones epigenómicas en los pacientes con leucoplasia verrugosa proliferativa que han desarrollado cáncer oral podrían confirmar que no presentan patrones epigenómicos diferentes a los carcinomas orales de células escamosas convencionales.

Consideramos como hipótesis alternativa (H_1) lo siguiente:

Las alteraciones epigenómicas en los pacientes con leucoplasia verrugosa proliferativa que han desarrollado cáncer oral podrían confirmar que sí presentan patrones epigenómicos diferentes a los carcinomas orales de células escamosas convencionales.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

El objetivo principal del presente estudio es evaluar en una cohorte de pacientes con carcinomas orales de células escamosas asociadas a leucoplasia verrugosa proliferativa las características moleculares que permitan diferenciarlos de pacientes con carcinomas orales de células escamosas convencionales a partir de un estudio epigenómico y bioinformático sobre muestras de tejido de congelación. Con el fin de demostrar a nivel molecular que la LVP es una entidad diferenciada e independiente.

3.2. Objetivos específicos.

3.2.1. Describir y comparar las características clínico – patológicas y evolutivas de los diferentes grupos de pacientes incluidos en el estudio (leucoplasias orales clásicas, leucoplasias verrugosas proliferativas, carcinomas orales asociados a LVP y cánceres no asociados a LVP).

3.2.2. Caracterizar las alteraciones en el perfil de metilación global de pacientes con carcinomas orales de células escamosas precedidas o no de leucoplasia verrugosa proliferativa. Comparar y definir los perfiles de metilación diferencial entre ambas enfermedades.

3.2.3. Comparar los perfiles de metilación diferencial a partir de un análisis integrativo de datos de expresión génica y de metilación diferencial entre pacientes con carcinomas orales de células escamosas precedidas o no de leucoplasia verrugosa proliferativa.

3.2.4. Identificar biomarcadores pronósticos de metilación de ADN candidatos para diferenciar a los pacientes con carcinomas orales y LVP.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

El presente estudio se puede definir como observacional, longitudinal, ambispectivo y analítico. Se considera observacional pues no se ha realizado un control directo sobre ninguna intervención y el criterio de formación de los grupos se ha basado en la presencia de las enfermedades. Del mismo modo, nos hemos limitado a medir y analizar determinadas variables. Longitudinal porque existe un tiempo entre las distintas variables que permite establecer una secuencia temporal entre estas, y de dirección ambispectiva pues de forma prospectiva se ha seleccionado y estudiado la evolución de los pacientes, y de forma retrospectiva se han recogido datos de los archivos de sus historias clínicas. Por lo tanto, se puede clasificar como un estudio de casos y controles anidados en el seguimiento de varias cohortes de pacientes.

4.2. POBLACIÓN DIANA DEL ESTUDIO.

Se ha tomado como población diana para la realización de este estudio a pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de leucoplasia verrugosa proliferativa, leucoplasia oral homogénea y carcinoma oral de células escamosas en la Comunidad Valenciana. El estudio se ha realizado en el Servicio de Estomatología y Cirugía Maxilofacial del Hospital General Universitario de Valencia, que desde 2006 en este servicio se encuentra la Unidad de Referencia de Estomatología de la Comunidad Valenciana (publicada en el DOGV – Núm. 5.249 del 2 de mayo de 2006).

4.2.1. PERÍODO.

La recopilación de pacientes y muestras se realizó de forma prospectiva y consecutiva desde octubre 2018 hasta mayo 2021. El seguimiento evolutivo de todos los pacientes se realizó hasta febrero 2022.

4.2.2. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS.

En el Servicio de Estomatología y Cirugía Maxilofacial del Hospital General Universitario de Valencia a todos los pacientes candidatos de dichas cohortes, se les realizó de forma protocolaria una historia clínica detallada, exploración clínica y registro fotográfico de todas las lesiones que presentaban. Posteriormente, se realizaron dos biopsias a cada paciente de áreas lesionales representativas incluyendo el epitelio y el tejido conectivo. Biopsias que formaban parte del seguimiento habitual de cada paciente

para confirmar el diagnóstico clínico de sospecha establecido en la primera visita o como seguimiento evolutivo de los mismos.

Las biopsias incisionales se realizaron en la consulta de cirugía ambulatoria del servicio tras cubrir con un paño quirúrgico estéril a cada paciente, colocarles un gorro desechable y gafas de protección. Previamente los pacientes se habían enjuagado con clorhexidina al 0,12%. Con la ayuda de una jeringa de autoaspiración desechable se anestesió Articaína al 4% con epinefrina. Para las tomas de las muestras, las incisiones se realizaron con hojas de bisturí número 11 o 15 en un mango de bisturí número 3 o con punch. Posteriormente se suturaron las heridas quirúrgicas con portaagujas e hilo de sutura reabsorbible. Una de las muestras obtenidas se almacenaba en un recipiente con formol al 10% perfectamente identificado con los datos del paciente para el estudio histopatológico de rutina en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Valencia. La otra muestra se almacenó inmediatamente en tubos Eppendorf y se congeló a -80ºC hasta su posterior utilización.

Tras los 32 meses de recopilación de pacientes, finalmente se obtuvieron un total de 105 muestras que se mantuvieron en congelación (tras aplicar unos criterios de inclusión que posteriormente serán comentados): 38 de pacientes diagnosticados de leucoplasia verrugosa proliferativa, 42 pacientes con carcinoma oral de células escamosas y 25 pacientes con leucoplasias orales.

También se obtuvieron 10 muestras de controles sanos sin antecedentes de trastornos orales potencialmente malignos ni cáncer oral que acudieron al Servicio de Estomatología y Cirugía Maxilofacial del HGUV para extracciones dentales. A estos pacientes se les extraía una pequeña muestra tisular, sin patología alguna, adyacente a la zona de la incisión quirúrgica habitual para llevar a cabo las extracciones. Los controles se seleccionaron emparejados por edad y sexo según los casos estudiados.

4.2.3. SELECCIÓN DE PACIENTES.

Del total de muestras recogidas, se definieron 4 grupos claramente diferenciados:

- **Grupo 1:** pacientes con leucoplasias orales homogéneas.
- **Grupo 2:** pacientes con leucoplasia verrugosa proliferativa no cáncer (LVP – no cáncer).

- **Grupo 3:** pacientes con leucoplasia verrugosa proliferativa que han transformado en carcinoma oral de células escamosas (LVP – COCE).

- **Grupo 4:** pacientes con carcinoma oral de células escamosas sin antecedentes de trastornos orales potencialmente malignos (COCE convencional).

La población de estudio se definió en función de los siguientes criterios:

GRUPO 1: Leucoplasias orales homogéneas:

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico clínico y confirmación histopatológica de leucoplasia oral según criterios diagnósticos de Warnakulasuriya y cols.[1][6].

- Forma clínica de leucoplasia oral homogénea.

- Ausencia de signos clínicos e histopatológicos de malignidad en el momento de la biopsia.

- No antecedentes de cáncer oral.

GRUPO 2: Leucoplasia verrugosa proliferativa no cáncer:

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico clínico y confirmación histopatológica de leucoplasia verrugosa proliferativa según los criterios diagnósticos de Villa y cols. (2019)[14].

- Ausencia de signos clínicos e histopatológicos de malignidad en el momento de la biopsia.

- No antecedentes de cáncer oral ni carcinoma in situ.

- Mayores de edad inmunocompetentes sin antecedentes médicos oncológicos en cualquier otra localización tratados quirúrgicamente, con radioterapia o quimioterapia.

GRUPO 3: Leucoplasia verrugosa proliferativa que han transformado en carcinomas orales de células escamosas:

Criterios de inclusión:

- Pacientes en seguimiento por leucoplasia verrugosa proliferativa según los criterios diagnósticos de Villa y cols. (2019)[14].
- Biopsia de lesión tumoral confirmada mediante estudio histopatológico con resultado de carcinoma oral de células escamosas.
- Mayores de edad sin antecedentes médicos oncológicos en cualquier otra localización tratados quirúrgicamente, con radioterapia o quimioterapia.

GRUPO 4: Carcinomas orales de células escamosas convencionales:

Criterios de inclusión:

- Pacientes diagnosticados clínicamente y confirmado mediante estudio anatomopatológico de carcinoma oral de células escamosas.
- Mayores de edad sin antecedentes oncológicos en ninguna otra localización ni antecedentes de quimioterapia o radioterapia.
- No antecedentes de trastornos orales potencialmente malignos en la cavidad oral (LVP, leucoplasia, eritroplasia, liquen plano, fibrosis oral submucosa).

4.3. METOLOGÍA REALIZADA:

En la presente investigación se han realizado dos tipos de estudios:

4.3.1. ESTUDIO CLÍNICO – PATOLÓGICO Y EVOLUTIVO.

En las primeras visitas o revisiones de seguimiento se realizó un estudio detallado y completo de la cavidad oral y se recogió de forma estructurada y protocolaria en sus historias clínicas todos los datos de filiación, información sociodemográfica, datos clínicos y antecedentes médicos y tóxicos. Así mismo se realizó un registro fotográfico de todas las lesiones que presentaban y una radiografía panorámica (ortopantomografía) a todos los pacientes.

A los pacientes que presentaban tumoraciones sospechosas de carcinomas orales también se les realizó una resonancia magnética o una tomografía computarizada según las características clínicas y las zonas que se quisieran valorar, sobre todo para comprobar si había afectación ósea y la afectación o no de estructuras vecinas.

A continuación, se detallan y definen cada una de las variables estudiadas:

a) Variables sociodemográficas:

- Edad: variable cuantitativa expresada en años en el momento de la toma de las muestras biópsicas.
- Sexo: variable cualitativa dicotómica (varón o mujer).
- Hábitos tóxicos: cualitativa dicotómica en hábito tabáquico y alcohólico (sí o no).

b) Variables clínicas:

- Localización de la muestra: variable cualitativa politómica (encía maxilar o mandibular zona vestibular o palatina, paladar duro, paladar blando, mucosa yugal, lengua zona ventral, dorsal o lateral, suelo de boca, pilar amigdalino, labio superior o inferior; y zona derecha o izquierda).
- Forma clínica: variable cualitativa politómica.
    - Lesiones no tumorales / no malignas:
        - Leucoplasia homogénea.
        - Leucoplasia verrugosa.
    - Lesiones tumorales / malignas:
        - Eritroleucoplasia.
        - Exofítica.
        - Ulcerada.
        - Mixta (presencia de componentes exofíticos y ulcerativos).

- Tamaño clínico de las lesiones tumorales: variable cuantitativa expresada en centímetros. Se recoge el mayor diámetro en centímetros y el área en centímetros cuadrados.

- En el grupo de pacientes con LVP (tanto cáncer como no cáncer) también se recogió el número de localizaciones orales afectadas, tipo de lesiones y porcentaje de la totalidad de la mucosa oral afectada por lesiones de LVP. Para ello se dividió la cavidad oral y labios en 26 localizaciones y se registró la presencia o no de lesiones en cada localización, posteriormente se dividió el número de localizaciones afectadas entre el número total de localizaciones para conocer el porcentaje de afectación. El tipo de lesiones se dividió en leucoplasias homogéneas, leucoplasias verrugosas, eritroleucoplasias, lesiones erosivas ulcerativas y mixtas (combinaciones de las mismas).

c) Variables histopatológicas:

- Lesiones no tumorales / no malignas. Resultado histopatológico: variable cualitativa politómica (ausencia de displasia epitelial, displasia leve, displasia moderada, displasia severa). Para valorar la displasia epitelial oral se siguieron los criterios de la OMS de 2022[164].

- Lesiones tumorales / malignas:

    - Grado de diferenciación tumoral: variable cualitativa politómica (G0-indeterminado; G1-bien diferenciado; G2-moderadamente diferenciado; G3-pobremente indiferenciado). La diferenciación histopatológica fue definida según los criterios de la OMS[164][165].

    - Nivel de infiltración: variable cualitativa politómica (ausencia, afectación muscular, afectación ósea).

    - Profundidad de invasión: variable cuantitativa expresada en milímetros.

    - Invasión perineural (IPN) e invasión linfovascular (ILV): variables cualitativas dicotómicas (sí o no).

    - Estado de los márgenes quirúrgicos: variable cualitativa dicotómica (libres

o afectados). Se revisaron los informes histopatológicos referentes a la escisión quirúrgica, así como las biopsias intraoperatorias.

- Metástasis ganglionar: variable cualitativa dicotómica (sí o no). En el primer caso, también se registraba el número de ganglios analizados y afectados y si existía extensión extranodal.

- Metástasis a distancia: variable cualitativa dicotómica (sí o no). En el primer caso también se registraba la localización.

- Estadio cTNM y pTNM según la 8ª edición del Manual de estadificación del cáncer de la AJCC (*American Joint Commission on Cancer*, 2017)[70].

d) Variables de control evolutivo:

- Tratamiento de las lesiones tumorales: variable cualitativa politómica (cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones).

- En el grupo de pacientes con LVP (tanto cáncer como no cáncer) se anotó el número total de biopsias realizadas a lo largo de su seguimiento.

- Recidivas: variable cualitativa dicotómica (sí o no). Registramos como recidiva cuando había evidencia de células tumorales (confirmada histopatológicamente) en un período mayor a tres meses, pero menor a tres años y a menos de 2 centímetros de distancia del tumor primario. Menos de 3 meses, sería persistencia tumoral.

- Segundos tumores primarios: variable cualitativa dicotómica (sí o no). Se registraron como STP aquellos que aparecieron en zonas claramente alejadas del tumor inicial por epitelio normal.

- En el grupo de LVP no cáncer se registró si los pacientes desarrollaron carcinomas orales de células escamosas durante su seguimiento, así como el tiempo hasta la transformación maligna y su tratamiento. En este grupo de pacientes también se investigaron los tratamientos previamente realizados y si hubo o no recidivas con posterioridad.

- Estado final de los pacientes a fecha del último registro realizado en febrero 2022:

variable cualitativa politómica (vivo sin tumor, vivo con tumor, muerto por tumor, muerto por otro motivo).

e) Intervalos temporales: variables cuantitativas expresadas en años.

- Tiempo de seguimiento: tiempo desde la primera visita hasta la última revisión del seguimiento en febrero 2022 o hasta la fecha de exitus de los pacientes.

- Tiempo de transformación maligna: tiempo desde la primera visita hasta la toma de biopsia con resultado de carcinoma oral de células escamosas.

- Tiempo de supervivencia: tiempo desde la toma de la biopsia hasta la última revisión del seguimiento en febrero 2022 o hasta la fecha de exitus de los pacientes.

A continuación, clasificaremos de forma esquemática las distintas variables estudiadas según el tipo de variable al que corresponda (tabla 11).

Tipos de variables:	Variables estudiadas:
Variables cuantitativas:	Edad (años).
	Tamaño clínico (cm y cm^2).
	Número de localizaciones afectadas en LVP.
	Profundidad de invasión tumoral (mm).
	Número de biopsias realizadas en LVP.
	Tiempo de transformación maligna (años).
	Tiempo de supervivencia (años).
	Tiempo de seguimiento (años).
Variables cualitativas dicotómicas:	Sexo.
	Hábito tabáquico y hábito alcohólico.
	Invasión perineural e invasión linfovascular.
	Estado márgenes quirúrgicos.
	Presencia de metástasis ganglionar o a distancia.
	Presencia de recidivas o segundos tumores primarios.
	Desarrollo de COCE en pacientes LVP no cáncer.
Variables cualitativas politómicas:	Localización de las muestras.
	Forma clínica.

	Resultado histopatológico.
	Nivel de infiltración tumoral.
	Estadio cTNM y pTNM.
	Tratamientos empleados.
	Estado final de los pacientes.

Tabla 11. Esquema de los tipos de variables estudiadas.

f) RECOGIDA DE LOS DATOS.

Las fuentes de información empleadas para la recopilación de datos fueron las siguientes: visor de historias clínicas digitales a través del programa INTRANET empleando los números de historias clínicas en el Servicio de Estomatología y Cirugía Maxilofacial, informes de resultados de estudios histopatológicos del Servicio de Anatomía Patológica e informes de resultados de pruebas de imagen del Servicio de Radiodiagnóstico; todos estos servicios pertenecientes al Hospital General Universitario de Valencia.

g) CUMPLIMIENTO NORMAS ÉTICAS Y LEGALES.

Este estudio fue diseñado de acuerdo con los principios de ética de la Declaración de Helsinki (Finlandia, 1964). El protocolo se presentó y aprobó en el Comité Ético de Investigación en Humanos de la Universitat de València con número de procedimiento H1523722754549 (11 mayo 2018) y en el Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (4 junio 2019). Todos los pacientes fueron informados tanto verbalmente como por escrito y firmaron los correspondientes consentimientos informados para participar en el estudio, tanto el consentimiento para estudio fotográfico, estudio histopatológico y estudio biomolecular. La obtención de todos los datos clínico – patológicos así como evolutivos, fue llevado a cabo tras la firma del compromiso de confidencialidad.

4.3.2. ESTUDIO EPIGENÓMICO.

4.3.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN.

Todo el procedimiento de extracción de ADN se realizó en el Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia. La extracción y purificación del ADN total de las muestras de tejido de congelación se realizó siguiendo el protocolo de QIAGEN ® TissueLyser y DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

En primer lugar, se realizó la lisis mecánica de forma manual de cada muestra con la ayuda de un bisturí y placas Petri. Posteriormente se colocaron en tubos Eppendorf que contenían dos bolas de acero inoxidables para homogeneizar la muestra en Tissuelyser LT QUIAGEN a 50Hz durante 5 minutos. Tras centrifugar y asegurar que los restos tisulares se quedaran en el fondo del tubo, se pipeteó en columnas de centrifugación AllPrepDNA Mini Spin Column QIAGEN. Nuevamente se centrifugó para que el DNA se quedase en la parte superior y el ARN en el tubo colector (que se empleó para otros estudios biomoleculares). Posteriormente, al ADN se le realizó de forma protocolaria ciclos de lavado, centrifugado, elusión e incubación. Finalmente se almacenaron las muestras a -80ºC hasta continuar con el estudio.

4.3.2.2. CONTROL DE LA CALIDAD DE ADN.

El control de la calidad e integridad del ADN y el estudio de arrays de metilación se realizaron en la Plataforma de Epigenómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

El control de la calidad y concentración de ADN total se analizó mediante fluorimetría con Qubit® 2.0 Fluorometer (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay, Life Technologies, CA, USA). Para poder realizar el estudio de arrays de metilación se necesitaba una concentración mínima de 500 ng en 45μL de ADN para el método manual realizado en este estudio.

Qubit ® 2.0 es un fluorómetro de sobremesa que se puede emplear para la cuantificación de ADN, ARN y proteínas mediante los ensayos basados en fluorescencia altamente sensibles y precisos, de forma rápida y específica al minimizar los efectos de la contaminación. Funciona mediante el empleo de agentes fluoróforos intercalantes

específicos de ADN que estima exclusivamente el ADN de doble cadena (figura 8). Previamente para este análisis se incubaron las muestras durante dos minutos con el kit Qubit® dsDNA BR Buffer (Thermo Fisher Scientific). Tras la cuantificación, las muestras fueron nuevamente almacenadas a -80ºC hasta la conversión con bisulfito.

Figura 8. Qubit ® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) empleado para la cuantificación de ADN.

4.3.2.3. CONTROL DE LA INTEGRIDAD DE ADN.

La integridad de ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,3%. Una muestra de ADN se consideraba íntegra cuando la imagen de su perfil se correspondía a una banda. El nivel de degradación venía determinado por la pérdida de definición de la banda predominante y el acompañamiento de una estela o smear a lo largo del gel. Para ello, se cargaron 1µM de ADN con 2µL de buffer de carga azul y 2 µL de agua en el gel usando el marcador GeneRuler 1kB (Thermo Fisher Scientific) como escalera. El gel se extendió durante 60 minutos a 120mA en una cubeta y fuente de alimentación de electroforesis (figura 9A). Posteriormente, se obtuvieron las imágenes mediante el Fotodocumentador de geles BIO-RAD (transiluminador UV) (figura 9B).

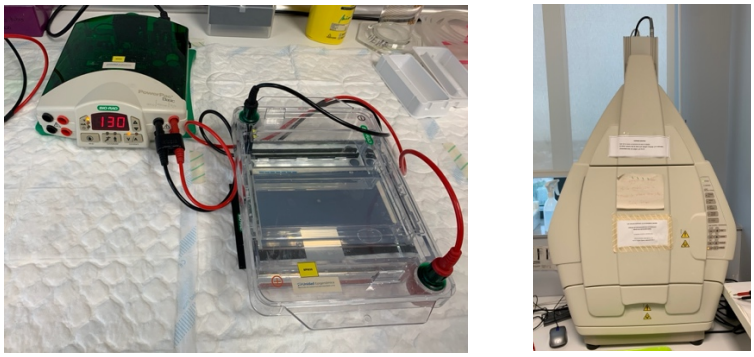


Figura 9. Determinación del control de la integridad de ADN. **A-** Cubeta y fuente de alimentación de electroforesis. **B-** Fotodocumentador de gel BIO-RAD.

Inicialmente el número de muestras incluidas en el estudio fueron 48, pues es la cantidad que puede ser evaluada de forma simultánea en seis Arrays de metilación. En base a los dos apartados anteriores se dio el visto bueno a 44 de las 48 muestras seleccionadas, por lo que fueron excluidas 4 muestras debido a las siguientes razones. La muestra 5 por la ausencia de banda, que confirmaba la presencia de degradación o falta de integridad. Las muestras 11, 35 y 44 por la baja cantidad total de ADN confirmada además por la presencia de una banda muy tenue y poco definida (figura 10).

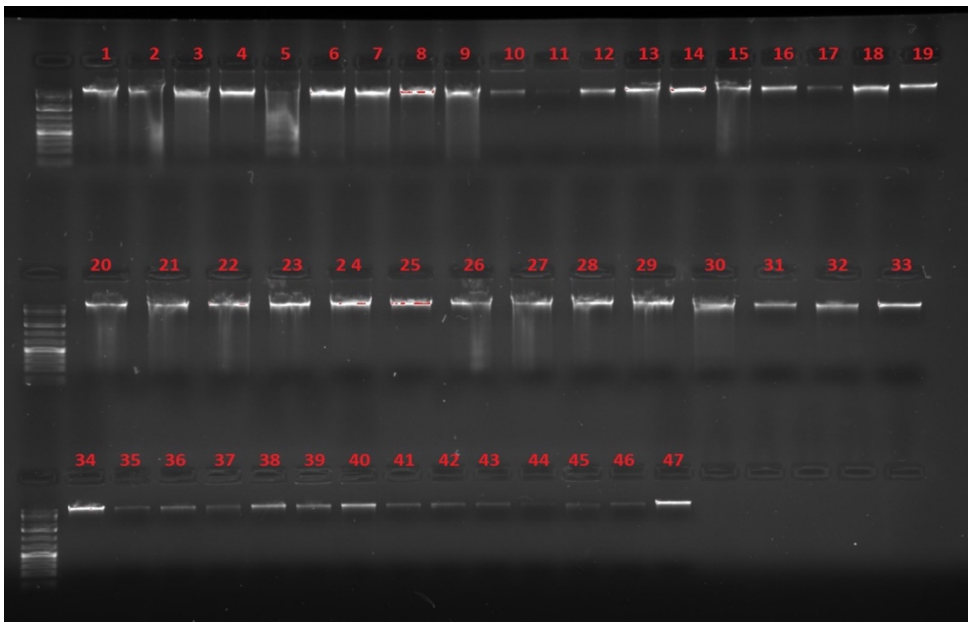


Figura 10. Electroforesis de las muestras.

Otro contratiempo que tuvimos a la hora de realizar el estudio epigenómico ocurrió en el segundo día del protocolo de metilación que correspondía a la incubación de ADN a 37ºC durante toda la noche en el Horno Illumina Hybridization. Accidentalmente y por fuentes ajenas al servicio, esa noche se desconectó dicho termociclador, lo que supuso la pérdida de todas esas muestras ya tratadas mediante los procedimientos anteriormente descritos. Del remanente de ADN que quedaba de las muestras iniciales, en 4 pacientes no se pudo extraer la cantidad mínima deseada de 500 ng en 45µL de ADN. Por lo que tuvimos que seleccionar nuevamente un total de 8 muestras de pacientes para posteriormente realizar la extracción de ADN, el control de calidad y de integridad. Finalmente, todas las nuevas muestras cumplieron satisfactoriamente las condiciones (figura 11). Sin embargo, este percance supuso un retraso en el presente proyecto. Además, es importante destacar que en la presente tesis doctoral se han analizado a nivel epigenético un total de 18 muestras correspondientes a los grupos LVP - COCE y COCE

convencional. Los demás grupos serán evaluados en estudios epigenéticos posteriores que no se han contemplado en esta tesis doctoral.

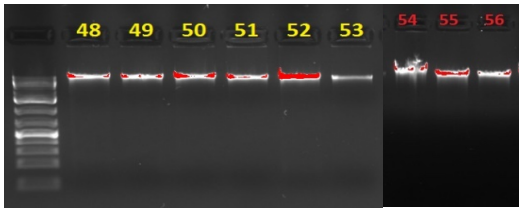


Figura 11. Electroforesis de las muestras adicionales.

4.3.2.4. ARRAY DE METILACIÓN DE ADN.

El estado de metilación del ADN se evaluó mediante la plataforma de microarrays de metilación Infinium 850K EPIC DNA METHYLATION BEADCHIP (Illumina Inc, San Diego, USA) que permite interrogar más de 850.000 sitios CpG (dinucleótidos dianas de la metilación) en todo el genoma y cubre el 99% de los genes conocidos y el 95% de las islas CpG[166]. A continuación, se detalla el flujo de trabajo manual realizado según el protocolo estándar de metilación Infinium HD realizado a lo largo de 4 días (figura 12).

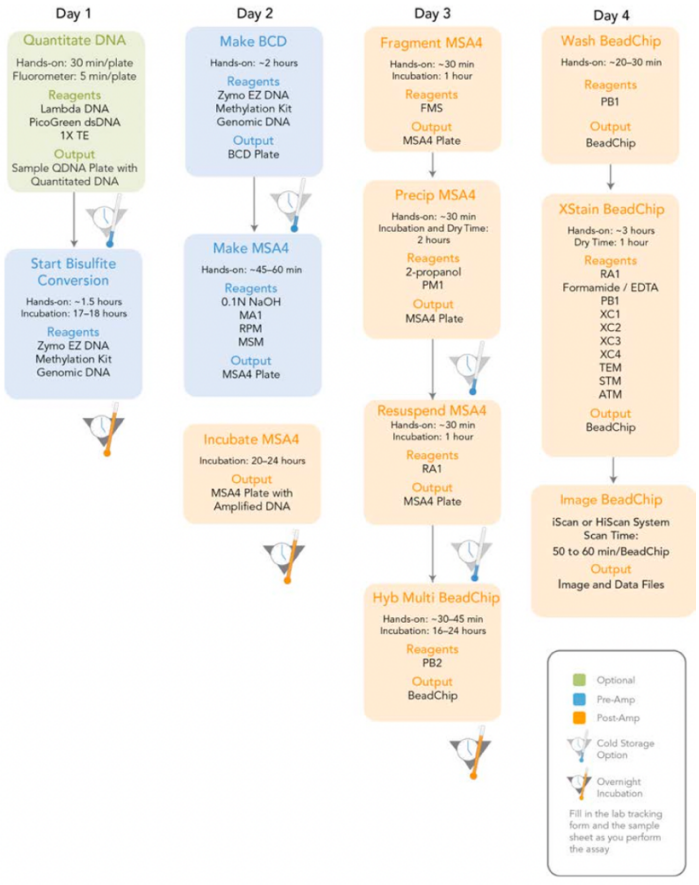


Figura 12. Esquema por días del protocolo de Illumina para el array de metilación de ADN.

- DÍA 1:

Previamente a iniciar el protocolo, se comprobó la correcta integridad, cantidad y calidad del ADN según los parámetros previamente descritos.

Conversión con bisulfito de las citosinas no metiladas (área pre-amplificación):

En primer lugar, se distribuyeron de forma aleatoria los 500ng de ADN de cada muestra en una placa de 96 pocillos. La conversión de bisulfito se realizó según la recomendación del fabricante para Illumina Infinium Assay empleando el kit EZ DNA Methylation (Zymo Research Corp, CA, USA) para que las citosinas no metiladas se conviertan en uracilo y las citosinas metiladas permanezcan sin cambios (figura 13). La detección de metilación en ADN convertido con bisulfito (BCD, por sus siglas en inglés) se basa en la diferente sensibilidad de la citosina y 5-metilcitosina a la desaminación por bisulfito, ya que, en condiciones ácidas, la citosina se convierte en uracilo.

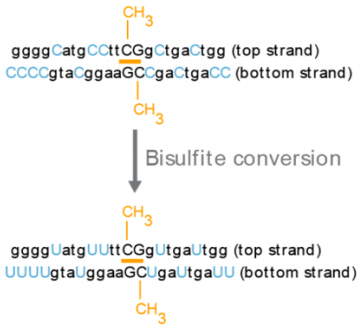


Figura 13. Conversión de las citosinas no metiladas en uracilos tras la conversión de bisulfito.

- DÍA 2:

Amplificación (área pre-amplificación):

Previamente las muestras se desnaturalizaron y neutralizaron para prepararlas para la amplificación. Para ello se empleó 4 µL de cada muestra de ADN convertido en cada pocillo y los reactivos MA1, NaOH 0,1N, RPM y MSM; también se realizó ciclos de centrifugado, vórtex e incubación según las especificaciones.

Incubación del ADN (área post-amplificación):

El ADN desnaturalizado se amplificó isotérmicamente mediante incubación a 37ºC durante 20 horas sin movimientos en un Horno Illumina Hybridization (figura 14). La

amplificación del genoma aumenta uniformemente la cantidad de muestra de ADN en varios miles de veces.

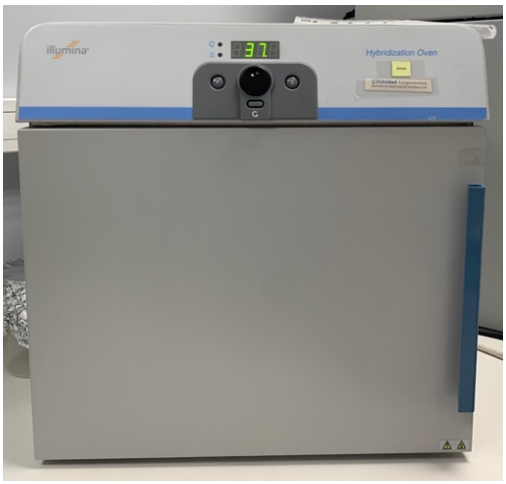


Figura 14. Horno Illumina Hybridization empleado para la incubación de ADN.

- DÍA 3:

Fragmentación del ADN:

Se realizó gracias a un proceso enzimático controlado que fragmenta el producto amplificado. El proceso emplea la fragmentación del punto final para evitar la sobre fragmentación. Para ello se empleó el reactivo FMS, se realizó el vortex, centrifugado e incubación en Hybex Microsample Incubator a 37ºC durante 1 hora (figura 15).

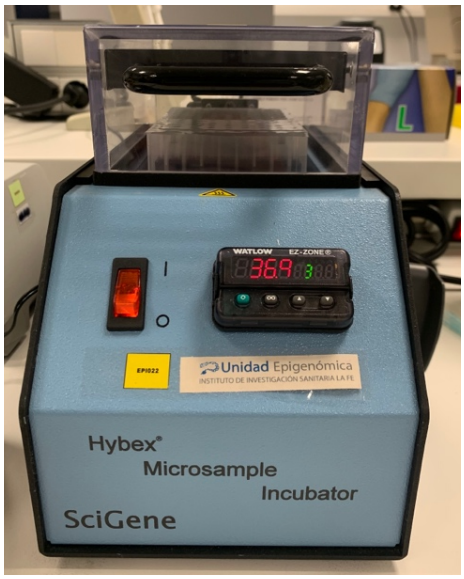


Figura 15. Hybex Microsample Incubator empleado para la fragmentación de ADN.

Precipitación del ADN:

Se realizó la precipitación con isopropanol, varios ciclos de vortex e incubación y finalmente se centrifugó a 3000rcf a 4ºC durante 20 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante de forma manual golpeando la placa sobre un área seca y se dejó la placa durante 1 hora boca abajo sobre papel de filtro hasta que los pocillos estuviesen vacíos de líquido y se haya evaporado todo el sobrenadante.

Resuspensión del ADN:

El ADN precipitado se resuspendió en tampón de hibridación al añadir el reactivo RA1, realizar incubación, vortex y centrifugado.

Hibridación del BeadChip:

En primer lugar, el ADN resuspendido se incubó en Hybex Microsample Incubator a 95ºC durante 20 minutos y posteriormente se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto, se prepararon las cámaras de hibridación. A continuación, se colocó el reactivo PB2 en cada uno de los reservorios tampón de las cámaras de hibridación y los microchips (BeadChips) en cada ranura de la cámara de hibridación, haciendo coincidir el extremo del código de barras con el símbolo del código de barras de la cámara.

Finalmente se añadió 26 µL de cada muestra de ADN en la sección de BeadChip correspondiente y se incubó en horno Illumina Hybridation a 48ºC durante 16 horas para completar el proceso de hibridación de las muestras (figura 16).

Figura 16. Disposición en cada sección de BeadChip del ADN de cada muestra.

- DÍA 4:

Tras retirar la cámara de hibridación del horno y dejar enfriar durante 30 minutos, se realizó el lavado del ADN sin hibridar o con hibridación inespecífica. Para ello se retiró de cada BeadChip el sello de la cubierta con un movimiento rápido para realizar los dos lavados con PB1 con la ayuda de las rejillas de lavado en cubetas de cristal (figura 17).

Figura 17. Cubetas de cristal con PB1 empleadas para realizar el lavado.

Posteriormente, se preparó cada BeadChip con las placas de vidrio y espaciadores transparentes estándar Infinium en el dispositivo de alineación para muestras múltiples Alignment Fixture. Se fijó la cámara de flujo capilar continuo con abrazaderas metálicas.

Extensión y tinción (XStain) BeadChip:

En primer lugar, cada conjunto de cámara de flujo continuo con BeadChips se colocó sobre el dispositivo de baño en seco Tecan (Te-Flow flow-through chamber) para posteriormente añadir los reactivos sobre cada cámara de flujo capilar (figura 18). Durante todo el proceso, la cámara Tecan mantenía una temperatura constante de 44ºC controlado gracias a una sonda de control de temperatura Illumina, hasta que añadíamos el buffer STM y modificábamos la temperatura según las indicaciones del fabricante.

Figura 18. Dispositivo de baño en seco Tecan (Te-Flow flow-through chamber).

Posteriormente se realizó un lavado del ADN no hibridado con el reactivo RA1. También se empleó el reactivo TEM para extender los cebadores hibridados del ADN. Esta reacción incorpora nucleótidos marcados en los cebadores extendidos. Se añadió formamida al 95%/EDTA 1mM para eliminar el ADN hibridado. Tras la neutralización con el reactivo XC3, los cebadores extendidos etiquetados se sometieron a un proceso de tinción multicapa en la gradilla de cámara.

Finalmente se desmontaron las cámaras de flujo continuo y se lavaron los BeadChips con el reactivo PB1, XC4 (figura 19A) y se secaron en bomba de vacío durante 30 minutos (figura 19B).

Figura 19. Lavado y secado de los BeadChips en bomba de vacío.

Lectura:

El análisis de los BeadChips se realizó utilizando un escáner fluorescente Illumina iScan (figura 20) que emplea un láser para excitar el fluoróforo del producto de extensión de base única en los BeadChips y registrar imágenes de alta resolución de la luz emitida. La puntuación de metilación de cada CpG se representó como valor beta.

Figura 20. Escáner fluorescente Illumina iScan SQ empleado para realizar la lectura de BeadChips.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFORMÁTICO.

4.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO CLÍNICO – PATOLÓGICO Y EVOLUTIVO.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa SPSS-18 (Statistical Package for the Social Sciences) con licencia de la Universitat de València. El análisis estadístico constó de una parte descriptiva y otra inferencial.

Para el análisis descriptivo de todos los participantes, los resultados se describieron como media ± desviación estándar (SD). Las variables categóricas se presentaron como frecuencias y porcentajes en cada grupo. Para la representación de los resultados se emplearon gráficos de barras y gráficos de sectores.

Para la estadística inferencial se realizaron diferentes análisis según el tipo de variables estudiadas:

Entre variables cualitativas o categóricas se estudió su relación con el test de "Chi-cuadrado" (χ^2).

Entre variables cuantitativas o continuas con tendencia a la normalidad y variables cualitativas dicotómicas se empleó la t-Student. Entre variables continuas no paramétricas y variables cualitativas dicotómicas [o en los casos en los que el tamaño muestral sea inferior a 30 y no se podía realizar una aproximación paramétrica] se empleó la U de Mann-Whitney.

El nivel de significación empleado en los análisis fue del 5% ($\alpha = 0,05$), por lo que cualquier p-valor inferior a 0,05 indicaba una relación estadísticamente significativa.

4.4.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

Preprocesamiento de los datos.

Una vez procesadas las muestras, los datos brutos resultantes (archivos .IDAT) se sometieron a un proceso de normalización utilizando el paquete minfiR (v. 1.38) y la normalización funcional con la finalidad de hacer comparables los datos procedentes de todas las muestras del estudio. Posteriormente, las intensidades normalizadas fueron transformadas en niveles de metilación (valor β) utilizando el paquete estadístico R.

Los marcadores CpG se clasificaron en función de su localización cromosómica, de la química Infinium utilizada para interrogar el marcador (Infinium I, Infinium II) y de su posición respecto a la región génica según la anotación de la UCSC (TSS1500, TSS200, 5'UTR, 1er Exón, Body, 3'UTR).

Entre los criterios adicionales se incluyeron su ubicación respecto a las islas CpG (isla, playa, orilla y mar abierto; ordenados de mayor a menor densidad de CpGs), las regiones potenciadoras asociadas a Fantom-5, las regiones reguladoras descritas en el proyecto ENCODE y las secuencias de sitios de unión a la transcripción, las regiones de cromatina abierta y los grupos de hipersensibilidad a DNasa.

Filtrado de CpGs. El filtrado de sondas se realizó en tres niveles.

Cada valor beta de la matriz EPIC se acompañó de un p valor de detección que representa la confianza de un valor beta determinado. Se eliminaron las CpGs con un elevado p valor de detección ($p > 0,01$) para excluir las sondas de baja calidad y con mucha variabilidad en las repeticiones de los valores. Análisis anteriores indicaron que un valor umbral de 0,01 permite hacer una distinción clara entre valores beta confiables y no confiables[167].

Se eliminaron las CpGs asociadas a SNPs (polimorfismo de un solo nucleótido, polimorfismo de nucleótido simple, polimorfismo de nucleótido único), dado que los SNP cercanos al sitio CpG pueden alterar los niveles de metilación.

También se eliminaron las sondas de los cromosomas sexuales para evitar posibles sesgos debidos al género.

Por lo tanto, en el filtrado de sondas realizado se identificaron y eliminaron 1.620 CpGs con un elevado p valor de detección ($p > 0,01$) y 2.932 CpGs asociadas a SNPs. También se encontraron 19.681 CpGs asociadas a cromosomas sexuales. Por lo que, tras el filtrado, se consideraron válidas 842.179 CpGs para el estudio.

Disponibilidad de los datos.

Los datos de metilación se han depositado en la base de datos ArrayExpress en EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) con el número de acceso E-MTAB-12202.

Análisis bioinformático.

PERFIL DE METILACIÓN GLOBAL.

El análisis exploratorio no supervisado de los datos se realizó mediante dos análisis. Un análisis de componentes principales (PCA) que mediante un algoritmo matemático reduce la dimensionalidad de los datos al identificar direcciones, llamadas componentes principales, a lo largo de las cuales la variación en los datos es máxima. Por lo que, permite evaluar visualmente si las muestras presentan similitudes o diferencias o si se podrían agrupar[168]. También se empleó el análisis de mapas de calor (heatmaps) de observaciones y variables agrupadas para visualizar las agrupaciones de los datos de metilación en representaciones 2D de la matriz, donde las filas representan genes y las columnas las diferentes condiciones. El color de cada casilla depende del nivel de metilación y sigue una escala donde el color verde representa una mayor ganancia de metilación.

El análisis de metilación diferencial supervisada entre ambos grupos se evaluó mediante dos enfoques diferentes. Primero mediante el ajuste de un modelo de regresión basado en rangos para cada CpG[169]. Los p valor se ajustaron mediante el uso de *False Discovery Rate*[169]. Segundo mediante el ajuste de un modelo de regresión logística penalizado mediante *Elastic Net*[170]. El factor de penalización para la *Elastic Net* se seleccionó tomando la lambda más alta con un error estándar mínimo (regla de un error estándar) de 500 repeticiones de validación cruzada en 10 veces. A continuación, se utilizó la mediana de los 500 valores lambda como factor de penalización final. El parámetro de *Elastic Net* alpha (que regula la mezcla de penalización L1 y L2) se fijó en 0,4. Los CpGs con coeficientes diferentes de cero tras la penalización fueron seleccionados y, por tanto, se consideraron relevantes para discriminar entre ambos grupos[170].

ANÁLISIS DE INTEGRACIÓN DE DATOS TRANSCRIPTÓMICOS Y DE METILACIÓN DE ADN.

Para este análisis de metilación sólo se incluyeron los CpG localizados en regiones promotoras de genes relevantes seleccionados a partir de los resultados del estudio de RNAseq realizados de forma paralela a la presente tesis en estas mismas muestras tisulares. Para ello, se realizó el ajuste de otro modelo de regresión logística penalizado

mediante *Elastic Net*, siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito, para seleccionar los CpGs capaces de discriminar los grupos[170].

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico R (versión 4.2.0) y los paquetes de R glmnet (versión 4.1-4) y DESeq2 (versión 1.30.1).

1.5 FINANCIACIÓN.

La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la subvención de los Fondos de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III a través del proyecto PI19/00790 (Cofinanciado por el Fondo Europeo de desarrollo Regional "A way to make Europe"), cuyo investigador principal y adquisidor de fondos es el Prof. José Bagán.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES CLÍNICO – PATOLÓGICAS Y EVOLUTIVAS.

A continuación, vamos a realizar el análisis descriptivo de las variables de los 48 pacientes incluidos y distribuidos en los siguientes grupos bien diferenciados (tabla 12) (figura 21)(figura 22)(figura 23)(figura 24):

Pacientes	N	Porcentaje
Total	48	100%
Leucoplasias homogéneas	8	16,7%
LVP – no cáncer	12	25%
LVP - COCE	8	16,7%
COCE convencional	10	20,8%
Controles	10	20,8%

Tabla 12. Número de pacientes incluidos en cada uno de los grupos. LVP: leucoplasia verrugosa proliferativa. COCE: carcinoma oral de células escamosas.

Figura 21. Múltiples lesiones de **leucoplasia verrugosa proliferativa** no cáncer de un mismo paciente afectando a diferentes localizaciones como encía vestibular y palatina maxilar derecha, así como encías y fondo de vestíbulo de dientes mandibulares. [Fotos cedidas por Clínica Medicina Bucal (Dres. Bagán)]

Figura 22. Leucoplasia homogénea en borde lateral derecho de lengua. [Foto cedidas por Clínica Medicina Bucal (Dres. Bagán)]

Figura 23. Transformación maligna a **carcinoma oral de células escamosas** en encía edéntula en zona de premolares en paciente en seguimiento de **LVP**. [Foto cedidas por Clínica Medicina Bucal (Dres. Bagán)]

Figura 24. Carcinoma oral de células escamosas localizado en encía mandibular en zona del primer molar inferior izquierda. [Foto cedidas por Clínica Medicina Bucal (Dres. Bagán)]

5.2. VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS.

5.2.1. EDAD.

La edad media de nuestros pacientes era de 70,5 años con una desviación típica de 11,76 años, y un rango de edades comprendido entre 50 y 96 años. La edad media, la desviación típica y los valores mínimos y máximos de la edad de cada grupo de pacientes se resume en la tabla 13. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de pacientes (ANOVA p = 0,062).

Pacientes	N	Media	SD	Mínimo	Máximo
Total	48	70,5	11,76	50	96
Leucoplasias homogéneas	8	65,62	8,38	54	82
LVP – no cáncer	12	66,83	12,16	50	84
LVP - COCE	8	80,25	12,42	61	96
COCE convencional	10	72,8	9,05	59	83
Controles	10	68,7	12,34	54	89

Tabla 13. Edad expresada en años en cada grupo. SD: desviación típica.

5.2.2. SEXO.

La frecuencia y porcentaje de la distribución según sexo y grupo está descrita en la tabla 14. Como se puede observar, existe un alto predominio de mujeres en todos los grupos. No encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos (Chi^2 p > 0,05).

	Mujeres		Varones	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Total	32	66,7%	16	33,3%
Leucoplasias homogéneas	5	62,5%	3	37,5%
LVP – no cáncer	9	75%	3	25%
LVP - COCE	6	75%	2	25%
COCE convencional	6	60%	4	40%
Controles	6	60%	4	40%

Tabla 14. Distribución de sexo según los distintos grupos del estudio.

5.2.3. HÁBITOS TÓXICOS.

Mayoritariamente los pacientes no referían ser fumadores ni consumidores de alcohol en la anamnesis (tabla 15). Al igual que en los apartados anteriores, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos en ninguno de los dos hábitos tóxicos (Chi^2 $p > 0,05$).

	Tabaco		Alcohol	
	Sí (%)	No (%)	Sí (%)	No (%)
Total	16 (33%)	32 (67%)	4 (8,3%)	44 (91,7%)
Leucoplasias homogéneas	4 (50%)	4 (50%)	2 (25%)	6 (75%)
LVP – no cáncer	5 (41,7%)	7 (58,3%)	1 (8,3%)	11 (91,7%)
LVP - COCE	1 (12,5%)	7 (87,5%)	0	8 (100%)
COCE convencional	4 (40%)	6 (60%)	1 (10%)	9 (90%)
Controles	2 (20%)	8 (80%)	0	10 (100%)

Tabla 15. Distribución de hábitos tóxicos referidos por los pacientes de cada grupo.

5.3. VARIABLES CLÍNICAS.

5.3.1. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LAS MUESTRAS.

De forma global, el 41,6% de las muestras estudiadas, correspondientes a 20 pacientes, se localizaban en las encías. Las siguientes localizaciones más frecuentes fueron la lengua, mucosa yugal y paladar (tabla 16) (figura 25).

Localización (%)	Encía maxilar	Encía mandibular	Paladar	Lengua	Suelo de boca	Mucosa yugal	Labios	Trígono retromolar
Total	9 (18,7)	11 (22,9)	6 (12,5)	9 (18,7)	3 (6,3)	8 (16,7)	1 (2,1)	1 (2,1)
Leucoplasias homogéneas	1 (12,5)		1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25)	1 (12,5)		
LVP – no cáncer	2 (16,7)	2 (16,7)	2 (16,7)	1 (8,3)		4 (33,3)		1 (8,3)
LVP – COCE	3 (37,5)	2 (25)	2 (25)			1 (12,5)		
COCE convencional	1 (10)	2 (20)	1 (10)	4 (40)	1 (10)		1 (10)	
Controles	2 (20)	5 (50)		1 (10)		2 (20)		

Tabla 16. Frecuencia y porcentaje de las localizaciones de las muestras por grupos.

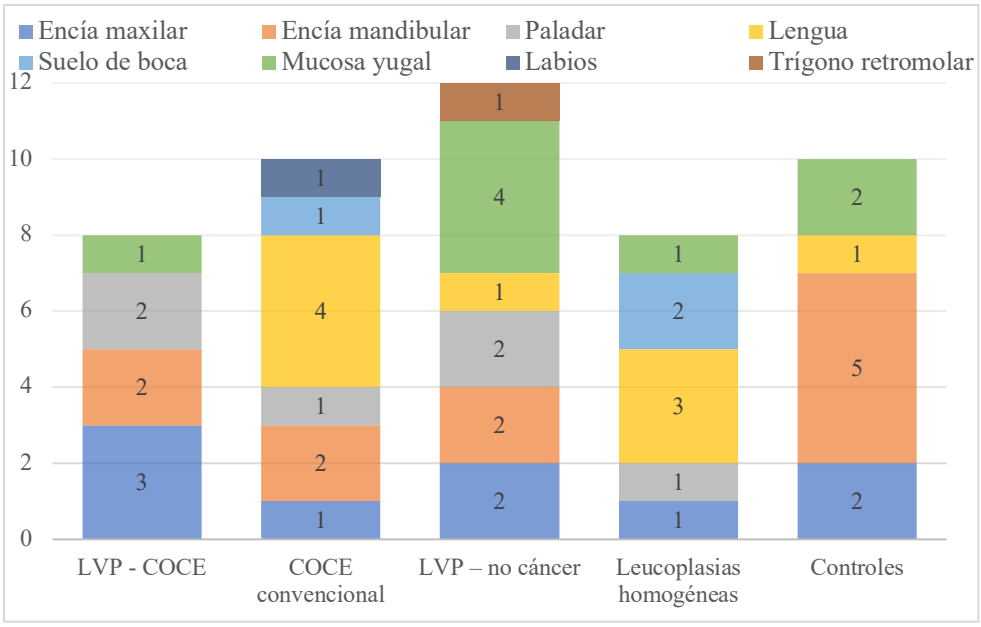


Figura 25. Gráfico de barras correspondiente a la localización anatómica de cada muestra distribuidas según cada grupo.

5.3.2. CUADRO CLÍNICO.

Las características clínicas de las lesiones las vamos a dividir según pertenezcan a lesiones tumorales (malignas) o no tumorales (no malignas) en cada uno de los grupos.

LESIONES TUMORALES:

En este subgrupo se analiza la apariencia clínica de las lesiones de los pacientes con leucoplasia verrugosa proliferativa que desarrollaron carcinomas orales y los pacientes con COCE convencional. En estos últimos existía un claro predominio estadísticamente significativo de la presentación clínica ulcerada (p = 0,022) (figura 26), sin embargo, los pacientes LVP-COCE presentaban una mayor variedad de tipo de presentación clínica de las lesiones tumorales (tabla 17).

Forma clínica	LVP - COCE	COCE convencional
Eritroplasia	2 (25%)	-
Ulcerada	1 (12,5%)	9 (90%)
Exofítica (verrugosa)	3 (37,5%)	-
Mixta	2 (25%)	1 (10%)

Tabla 17. Tipo de presentación clínica de las lesiones tumorales incluidas en el estudio según el grupo al que pertenezcan.

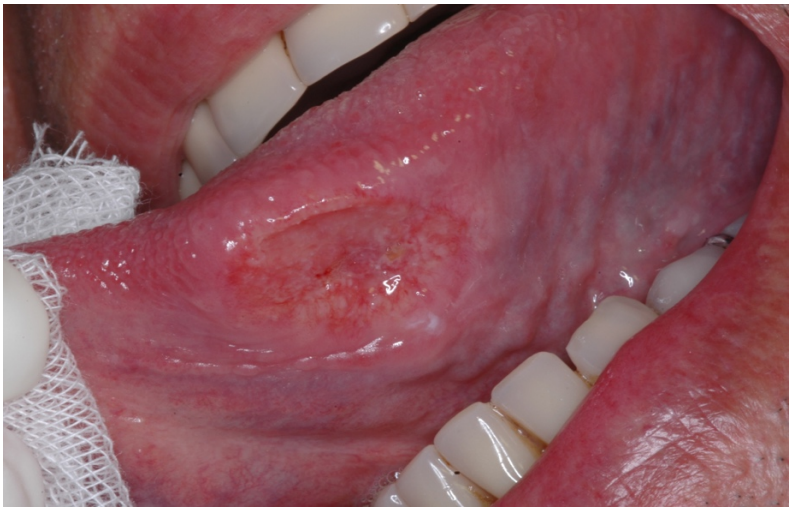


Figura 26. Carcinoma oral de células escamosas localizado en borde lateral izquierdo de lengua en forma de ulceración. Paciente perteneciente al grupo de COCE convencional. [Foto cedidas por Clínica Medicina Bucal (Dres. Bagán)]

LESIONES NO TUMORALES:

En este subgrupo se incluye las lesiones no tumorales de los pacientes con LVP y leucoplasias homogéneas (tabla 18) (figura 27). En el grupo LVP predominaron las lesiones exofíticas y verrugosas.

Forma clínica	LVP no cáncer	Leucoplasia homogénea
Leucoplasia verrugosa	10 (83%)	-
Leucoplasia homogénea	2 (17%)	8 (100%)

Tabla 18. Tipo de presentación clínica de las lesiones no tumorales.

Figura 27. Leucoplasias homogéneas localizadas en paladar y en encía vestibular en dos pacientes diferentes. Foto cedidas por Clínica Medicina Bucal (Dres. Bagán)]

5.3.3. TAMAÑO CLÍNICO.

LESIONES TUMORALES:

La media del mayor diámetro en centímetros para el grupo LVP – COCE era de 2,7 ± 0,32 cm y para el grupo COCE convencional de 2,85 ± 1,08 cm (tabla 19).

Pacientes	n	Media	SD	Mínimo	Máximo
LVP - COCE	8	2,7	0,32	2,3	3
COCE convencional	10	2,85	1,08	1,5	5

Tabla 19. Tamaño medio del mayor diámetro de las lesiones tumorales expresado en centímetros.

La media del área total de las lesiones fue de 5,04 ± 2,19 cm^2 para el grupo LVP – COCE y de 4,99 ± 3,61 cm^2 para el grupo COCE convencional (tabla 20).

Pacientes	n	Media	SD	Mínimo	Máximo
LVP - COCE	8	5,04	2,19	2,99	9
COCE convencional	10	4,99	3,61	1,5	13,5

Tabla 20. Área media total de las lesiones tumorales expresado en centímetros cuadrados.

5.3.4. LOCALIZACIONES AFECTADAS, TIPO DE LESIONES Y PORCENTAJE DE AFECTACIÓN DE LOS PACIENTES CON LVP.

Todos los pacientes con LVP presentaban múltiples lesiones en el momento de inclusión en el presente estudio.

PACIENTES LVP – COCE:

En este grupo, la media de localizaciones afectadas fue de 11,25 ± 4,65 , lo que supone una afectación del 43,25 ± 17,83 % de la mucosa oral con alguna lesión del espectro clínico de LVP. En la tabla 21 se puede observar el número, porcentaje de afectación y tipo de lesiones de cada paciente LVP-COCE.

	Número localizaciones	Tipo de lesiones	% afectación mucosa oral [*1]
LVP-COCE 1	17	Leucoplasia homogénea, leucoplasia verrugosa	65

LVP-COCE 2	8	Leucoplasia verrugosa y mixtas	30
LVP-COCE 3	8	Leucoplasia homogénea, leucoplasia verrugosa y eritroleucoplasias	31
LVP-COCE 4	15	Leucoplasia homogénea, leucoplasia verrugosa	58
LVP-COCE 5	6	Leucoplasia homogénea, leucoplasia verrugosa, eritroleucoplasia	23
LVP-COCE 6	18	Leucoplasia verrugosa	69
LVP-COCE 7	9	Leucoplasia homogénea, leucoplasia verrugosa, eritroleucoplasia	35
LVP-COCE 8	9	Leucoplasia homogénea, leucoplasia verrugosa	35

Tabla 21. Porcentaje de afectación de la mucosa oral y tipo de lesiones presentes en cada paciente perteneciente al grupo LVP – COCE. *[1]El porcentaje de afectación se ha calculado dividiendo el número de localizaciones afectadas entre el número total de localizaciones en las que hemos dividido la boca.

La distribución de las localizaciones más frecuentemente afectadas, así como el tipo de lesiones están descritas en la tabla 22. Las encías (maxilares o mandibulares) mostraban lesiones en todos los pacientes, seguido de la afectación lingual (88% de los pacientes) y de la afectación de la mucosa yugal (75% de los pacientes). Todos los pacientes presentaban alguna lesión en el lado izquierdo de sus mucosas.

En cuanto al tipo de lesiones, las lesiones verrugosas se encontraron en la totalidad de los pacientes, de los cuales tres pacientes presentaban lesiones verrugosas tumorales confirmadas mediante estudio histopatológico (e incluidas como muestras para esta tesis). Las leucoplasias homogéneas también fueron muy frecuentes (tabla 22 y figura 28). En el lado derecho predominaron las lesiones de tipo verrugosas, sin embargo, en el lado izquierdo las de tipo leucoplasias homogéneas.

Tipo de lesión	Encía mx	Encía mb	Paladar	Lengua	Suelo boca	Mucosa yugal	Labios	Lado derecho	Lado izquierdo	Total*
L. Homogénea		2	1	5	1	5		4	6	6 (75%)
L. Verrugosa	5	3	3	4	2	1		6	3	8 (100%)
Eritroleucoplasia	1		2							1 (13%)
Mixta							1	1	1	1 (13%)
Tumoración	5	2			2	1		2	5	8 (100%)
Total*	7 (88%)	7 (88%)	6 (75%)	7 (88%)	4 (50%)	6 (75%)	1 (13%)	7 (88%)	8 (100%)	

Tabla 22. Tipo de lesión y localización de las lesiones de los pacientes pertenecientes al grupo LVP - COCE. * El porcentaje total representa la proporción de pacientes con afectación en las distintas localizaciones y según el tipo de lesión. Mx: maxilar. Mb: mandibular.

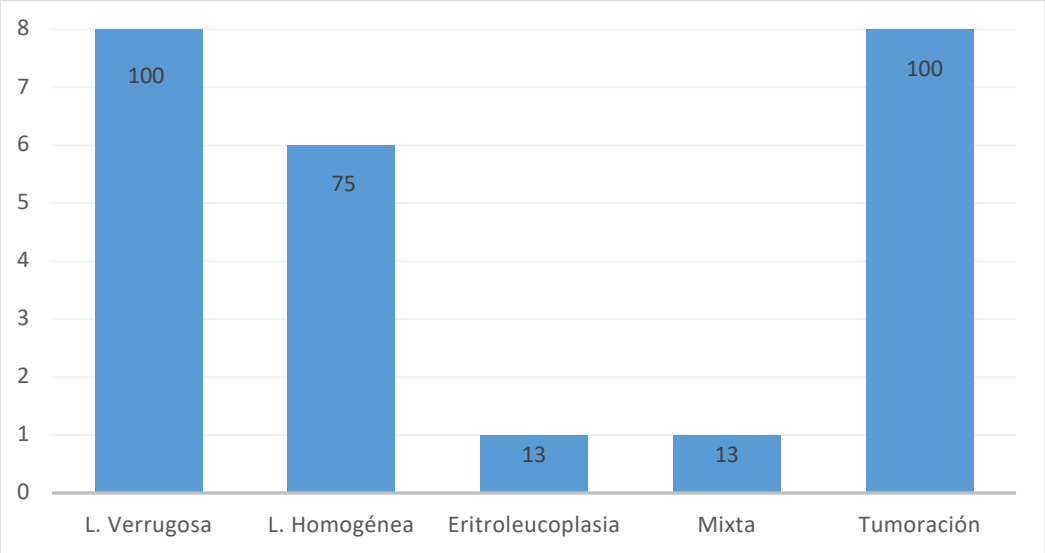


Figura 28. Porcentaje del tipo de lesiones presentes en los ocho pacientes del grupo LVP – COCE.

PACIENTES LVP – no cáncer:

Todos los pacientes pertenecientes a este grupo presentaban afectación gingival. Un 92% presentaba alguna lesión en las encías mandibulares y un 83% en las encías maxilares. Las siguientes localizaciones más frecuentemente afectadas fueron la mucosa yugal y el paladar. La media del porcentaje de afectación de la mucosa oral fue de 50,65 ± 15,96 % (tabla 23).

	Localizaciones afectadas	% afectación mucosa oral *1
LVP 1	Encía (1º, 2º, 3º, 4º), mucosa yugal, paladar, trígono retromolar	54
LVP 2	Encía (1º, 3º, 4º), mucosa yugal, paladar, suelo de boca	31
LVP 3	Encía (1º, 4º), mucosa yugal, paladar	23
LVP 4	Encía (2º, 3º, 4º), mucosa yugal, paladar, labios, lengua	70
LVP 5	Encía (1º, 2º, 3º, 4º), mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua	77
LVP 6	Encía (3º, 4º), mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua	35
LVP 7	Encía (1º, 2º, 3º, 4º), mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua	54
LVP 8	Encía (1º, 2º, 3º, 4º), mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua	62

LVP 9	Encía (1º, 2º), mucosa yugal, paladar, labios	46
LVP 10	Encía (3º, 4º), mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua	42
LVP 11	Encía (1º, 2º, 3º, 4º), mucosa yugal, lengua, labios	62
LVP 12	Encía (1º, 3º), mucosa yugal, paladar, lengua	54

Tabla 23. Localización y porcentaje de afectación de la totalidad de la mucosa oral de lesiones de los pacientes pertenecientes al grupo LVP. 1º: encía del cuadrante superior derecha. 2º: encía del cuadrante superior izquierda. 3º: encía del cuadrante inferior izquierda. 4º: encía del cuadrante inferior derecha.

5.4. VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS.

Nuevamente se van a presentar los resultados en dos apartados diferenciados según las características de cada subgrupo de pacientes.

LESIONES TUMORALES:

El 50% de los pacientes pertenecientes a cada grupo con lesiones tumorales presentaron un grado tumoral bien diferenciado (figura 29). El resto de pacientes del grupo COCE convencional presentaron un grado de diferenciación tumoral moderado (figura 29). La infiltración ósea afectó de forma similar a ambos grupos y la infiltración muscular fue muy rara, sólo se observó en un paciente del grupo COCE convencional (tabla 24). No encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

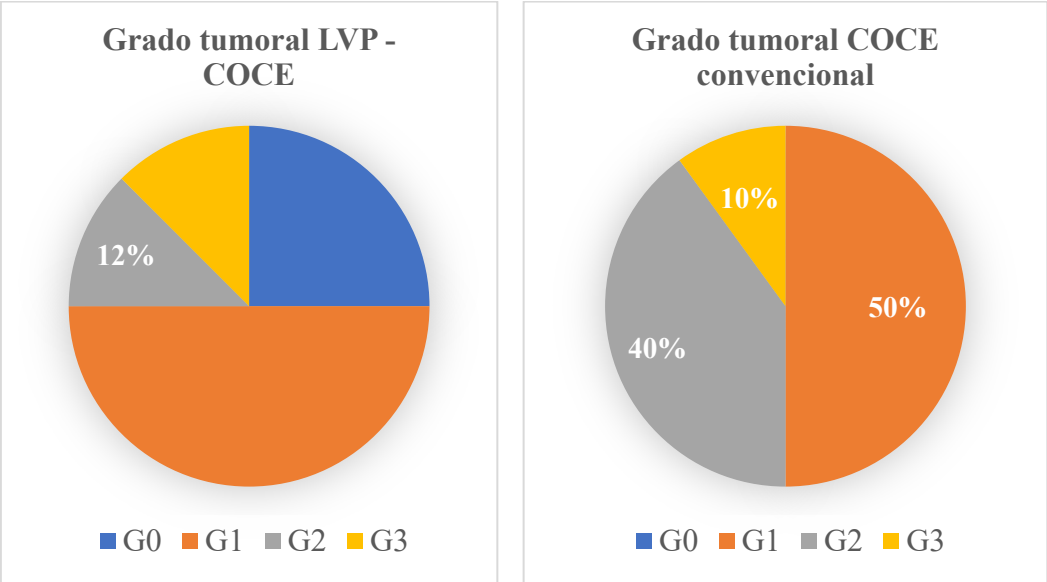


Figura 29. Porcentaje de cada grado tumoral de los pacientes con LVP – COCE y los pacientes con COCE convencional.

La media de la profundidad de invasión de las lesiones tumorales del grupo LPV – COCE fue de 3,62 ± 2,21 y la del grupo COCE convencional de 6,39 ± 2,18. A pesar de las diferencias, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney p = 0,075).

En los pacientes con COCE convencional se encontró presencia de invasión perineural o linfovascular en el 70% y 20%, respectivamente (figuras 30 - 31). A diferencia de la infiltración perineural y linfovascular del grupo LVP-COCE que fue del 25% (tabla 24 y figuras 30 - 31). De igual modo no encontramos diferencias significativas ni en la infiltración perineural (Chi^2 p = 0,058) ni en la linfovascular (Chi^2 p = 0,8).

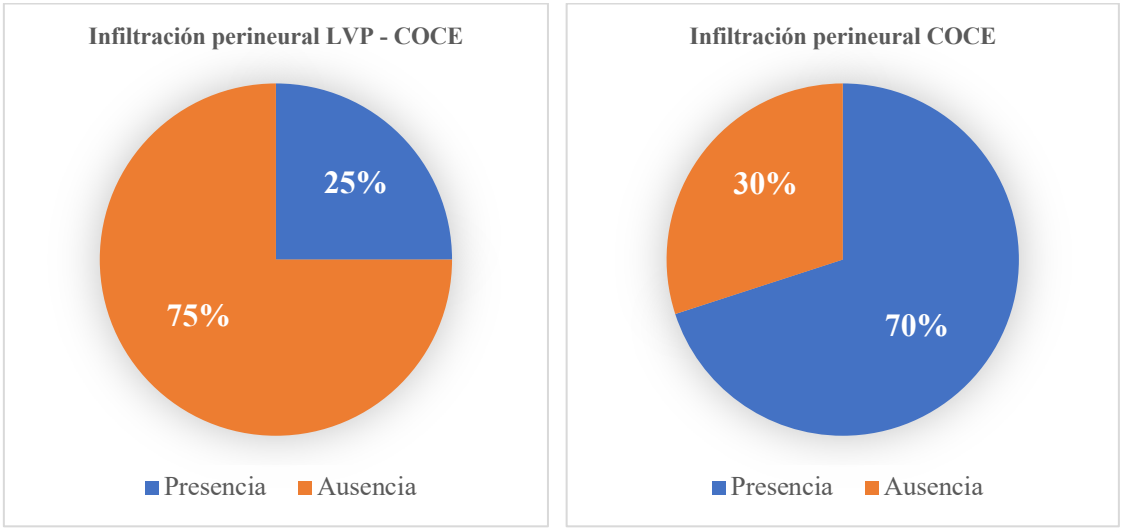


Figura 30. Presencia de infiltración perineural en cada grupo de pacientes con lesiones tumorales analizadas.

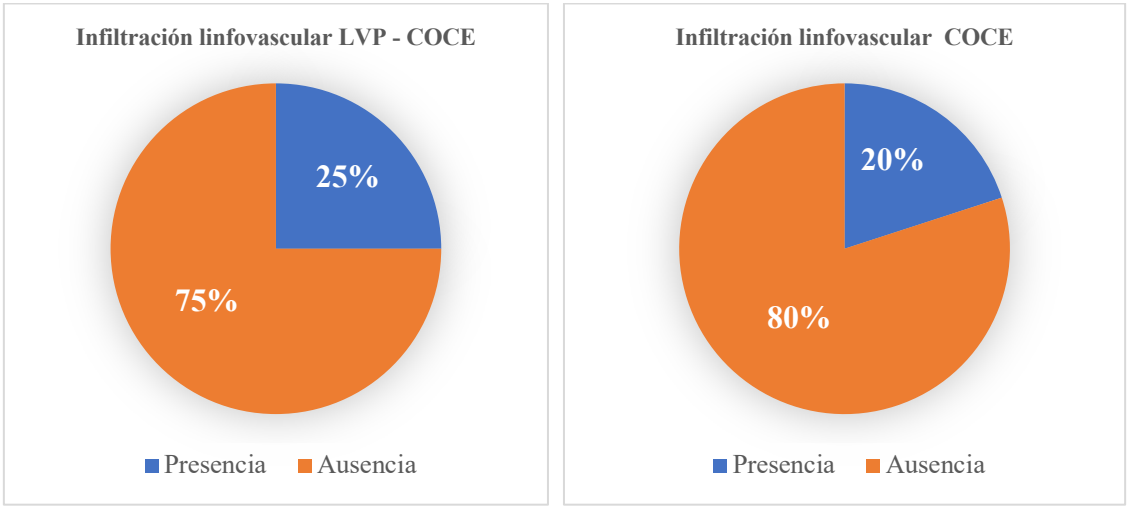


Figura 31. Presencia de infiltración linfovascular en cada grupo de pacientes.

La afectación de los márgenes quirúrgicos se observó en el 28% de los pacientes LVP – COCE en comparación al 10% del otro grupo. Sin embargo, la presencia de metástasis ganglionar fue más común en el grupo COCE convencional. La metástasis a distancia fue excepcional y ocurrió sólo en un paciente del grupo COCE convencional que sufrió metástasis pulmonar a los 19 meses. En ninguna de estas características obtuvimos diferencias significativas ($p > 0,05$).

A modo resumen se encuentran las características histopatológicas en la tabla 24.

		LVP – COCE n = 8	COCE convencional n = 10
Grado tumoral	G0	2 (25%)	-
	G1	4 (50%)	5 (50%)
	G2	1 (12,5%)	4 (40%)
	G3	1 (12,5%)	1 (10%)
Infiltración	Ausencia	5 (62,5%)	6 (60%)
	Ósea	3 (37,5%)	3 (30%)
	Muscular	-	1 (10%)
DOI (mm)		3,62 ± 2,21	6,39 ± 2,18
Presencia invasión perineural		2 (25)	7 (70%)
Presencia invasión linfovascular		2 (25)	2 (20%)
Márgenes quirúrgicos	Libres	5 (72%)	9 (90%)
	Afectos	2 (28%)	1 (10%)
Presencia metástasis ganglionar		1 (12,5%)	3 (30%)
Presencia metástasis a distancia		-	1 (10%)

Tabla 24. Características histopatológicas de las lesiones tumorales de ambos grupos.

ESTADIAJE TUMORAL CLÍNICO Y PATOLÓGICO:

Clínicamente, la distribución de estadios, tanto iniciales como avanzados, fue similar en el grupo LVP - COCE. Sin embargo, fueron más frecuentes los estadios avanzados en el grupo COCE convencional (60%) (figura 32). Una vez realizado el consecuente estudio histopatológico postoperatorio, el estadio del TNM patológico no se modificó en el grupo LVP – COCE; sin embargo, en el grupo COCE convencional dos

pacientes más fueron catalogados como estadio IV (tabla 25 y figura 33).

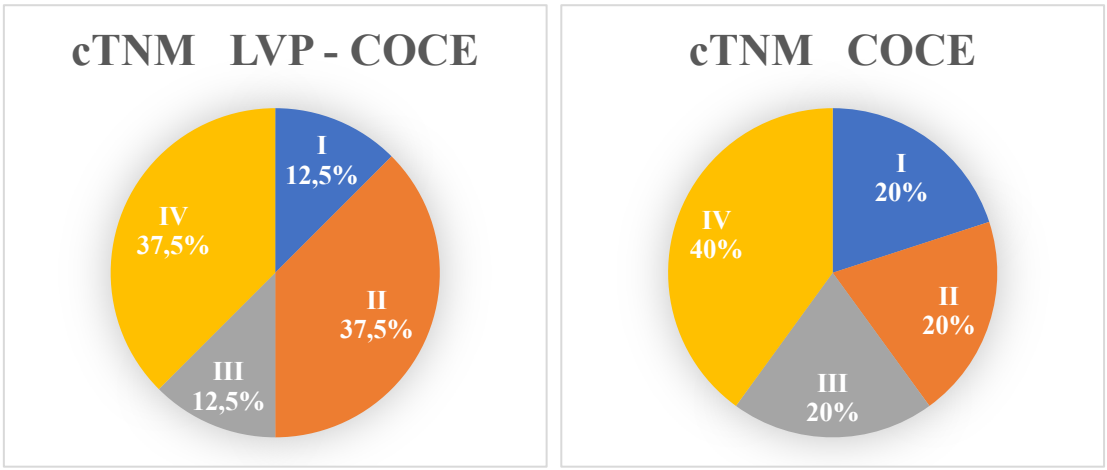


Figura 32. Frecuencias del estadiaje TNM clínico de cada grupo de pacientes oncológicos.

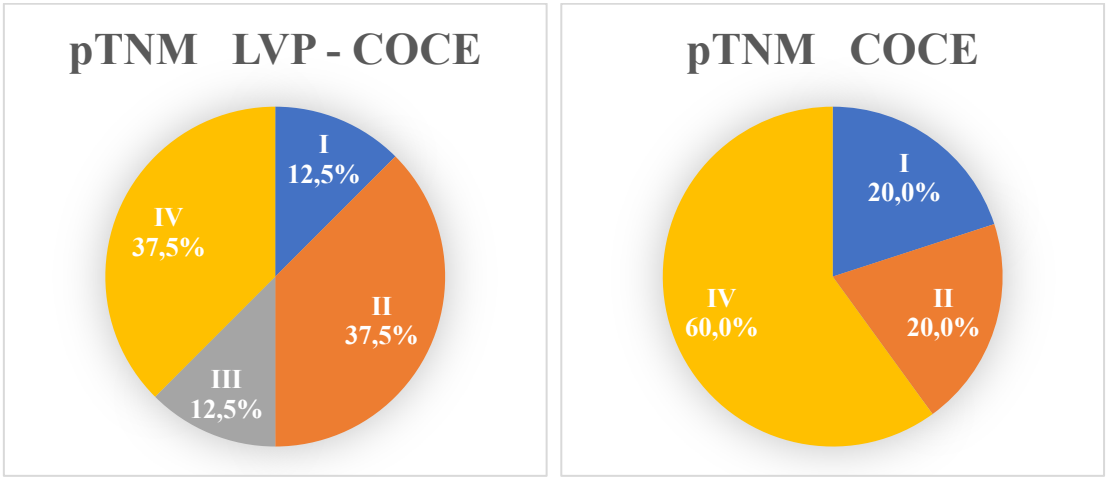


Figura 33. Frecuencias del estadiaje TNM patológico de cada grupo de pacientes.

Estadio		LVP – COCE (n = 8)	COCE convencional (n = 10)
cTNM	I	1 (12,5%)	2 (20%)
	II	3 (37,5%)	2 (20%)
	III	1 (12,5%)	2 (20%)
	IV	3 (37,5%)	4 (40%)
pTNM	I	1 (12,5%)	2 (20%)
	II	3 (37,5%)	2 (20%)
	III	1 (12,5%)	-
	IV	3 (37,5%)	6 (60%)

Tabla 25. Estadiaje TNM clínico y patológico de los pacientes oncológicos.

LESIONES NO TUMORALES:

En el momento del diagnóstico de las muestras biopsiadas, se observó la presencia de displasia epitelial en el 75% de los pacientes LVP – no cáncer y de las leucoplasias homogéneas. Del mismo modo, en ambos grupos fue más frecuente la presencia de displasia epitelial leve (tabla 26 y figura 34).

	Leucoplasias homogéneas n = 8	LVP – no cáncer n = 12
Sin displasia	2 (25%)	3 (25%)
Displasia leve	5 (62,5%)	7 (58,4%)
Displasia moderada	1 (12,5%)	1 (8,3%)
Displasia severa	-	1 (8,3%)

Tabla 26. Distribución del grado de displasia epitelial inicial en los grupos de lesiones no malignas.

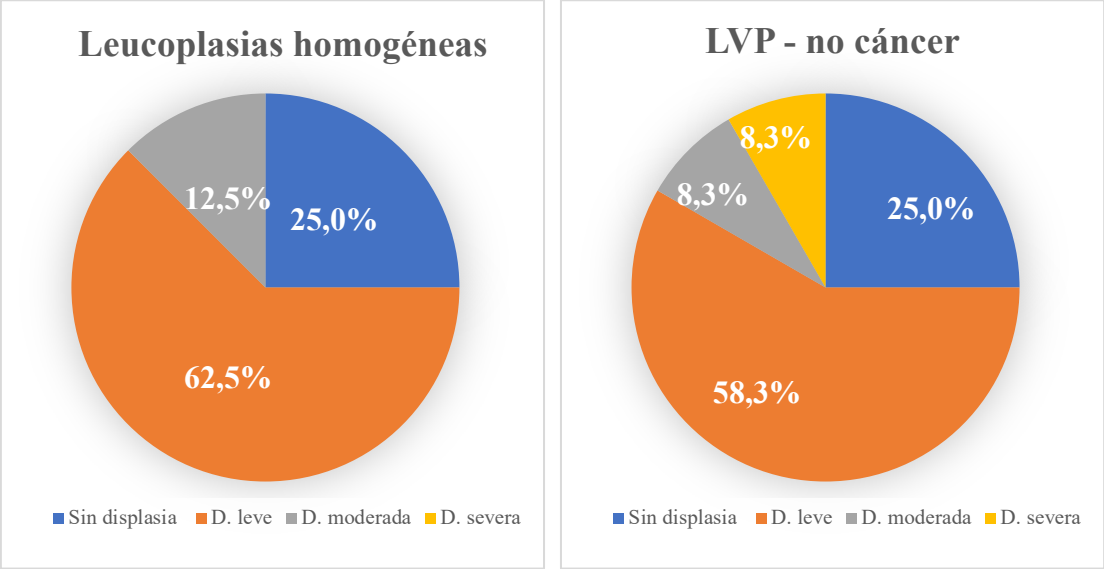


Figura 34. Frecuencias del resultado del estudio histopatológico de las LVP – no cáncer y de las leucoplasias homogéneas.

5.5. VARIABLES EVOLUTIVAS:

5.5.1. MANEJO Y TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES.

PACIENTES ONCOLÓGICOS:

En ambos grupos fue más frecuente la extirpación quirúrgica. En el grupo LVP –

COCE un paciente rechazó cualquier tratamiento. En el grupo COCE convencional, el resto de pacientes recibieron radioterapia o quimioterapia subyacente (tabla 27).

	LVP – COCE n = 7	COCE convencional n = 10
Extirpación quirúrgica (QX)	5 (72%)	6 (60%)
Quimioterapia (QT)	1 (14%)	-
QX + RT	-	3 (30%)
QX + RT + QT	-	1 (10%)
Radioterapia + Cetuximab	1 (14%)	-

Tabla 27. Manejo terapéutico empleado en los pacientes oncológicos.

PACIENTES NO ONCOLÓGICOS:

A los pacientes con leucoplasias o LVP y ausencia de displasia epitelial o presencia de displasia leve se les realizó controles periódicos sucesivos cada 3 o 6 meses. Los pacientes que presentaban displasia epitelial moderada o severa recibieron tratamiento quirúrgico convencional. Si en posteriores controles evolutivos, clínicamente presentaban variaciones en la apariencia, forma o tamaño, se les realizaba una o varias biopsias para el consiguiente estudio histopatológico.

PACIENTES CON LEUCOPLASIA VERRUGOSA PROLIFERATIVA:

En el grupo de pacientes con leucoplasia verrugosa proliferativa y ausencia de antecedentes de carcinoma oral, registramos todos los tratamientos realizados a lo largo de su seguimiento así como la presencia de recidiva (tabla 28). Como se puede observar, el 75% de las lesiones de los pacientes tratados recidivaron tras su manejo terapéutico.

	Tratamientos realizados	Recidiva
LVP 1	Biopsias seriadas	Sí
LVP 2	Escisión quirúrgica + láser CO_2	Sí
LVP 3	Escisión quirúrgica + láser CO_2 + biopsias seriadas	Sí
LVP 4	Láser CO_2 + biopsias seriadas	Sí
LVP 5	Escisión quirúrgica + láser CO_2 + retinoides tópicos + biopsias seriadas	Sí

LVP 6	Escisión quirúrgica + láser CO_2 + biopsias seriadas	Sí
LVP 7	Biopsias seriadas	No
LVP 8	Biopsias seriadas	No
LVP 9	Biopsias seriadas	No
LVP 10	Escisión quirúrgica + láser CO_2 + metotrexato + terapia fotodinámica + biopsias seriadas	Sí
LVP 11	Escisión quirúrgica + biopsias seriadas	Sí
LVP 12	Escisión quirúrgica + láser CO_2	Sí

Tabla 28. Manejo terapéutico a lo largo del seguimiento de cada paciente con LVP y ausencia de antecedentes de carcinoma oral.

En los pacientes incluidos con esta enfermedad, tanto con lesiones tumorales como no, registramos el número total de biopsias realizadas. En el grupo de LVP con presencia de malignización, la media de número de biopsias realizadas fue mayor, así como el número mínimo y máximo de biopsias (tabla 29). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney p = 0,087).

Pacientes	n	Media	SD	Mínimo	Máximo
LVP - COCE	8	8,63	2,26	5	12
LVP no cáncer	12	5,91	3,31	2	11

Tabla 29. Número de biopsias realizadas en cada grupo de pacientes LVP en su seguimiento.

5.5.2. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

ENFERMEDAD TUMORAL:

Sólo un paciente en cada grupo presentó recidiva local de la enfermedad (tabla 30). El paciente del grupo LVP – COCE recidivó a los 8 meses y fue tratado con quimioterapia y radioterapia. El paciente con COCE convencional recidivó a los 6 meses y fue tratado de la misma forma que el anterior.

	LVP – COCE n = 8	COCE convencional n = 10
Recidiva local	1 (13%)	1 (10%)

Segundo tumor primario	4 (50%)	2 (20%)
Metástasis a distancia	-	1 (10%)
Exitus	1 (13%)	2 (20%)

Tabla 30. Número de pacientes y frecuencia de presencia de recidiva, segundos tumores primarios, metástasis a distancia o exitus en cada grupo de pacientes con patología tumoral.

La presencia de segundos tumores primarios fue mayor en el grupo LVP – COCE, ya que el 50% de estos pacientes desarrollaron al menos un segundo tumor primario. Uno de los cuales desarrolló dos segundos tumores primarios y otro tres (tabla 31). El 20% de los pacientes del grupo COCE convencional desarrollaron un segundo tumor primario. No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos (Chi^2 p = 0,18).

Pacientes	Tumoración primaria	1º segundo tumor primario	2º segundo tumor primario	3º segundo tumor primario
LVP – COCE 1	Paladar izq	Encía mx	Encía mb	Suelo boca
LVP – COCE 2	Yugal der	Encía mb		
LVP – COCE 4	Encía mb izq	Encía mx	Yugal izq	
LVP – COCE 6	Encía mx der ant	Encía mx der post		
COCE convencional 3	Lengua lat	Suelo boca		
COCE convencional 8	Encía mb	Yugal izq		

Tabla 31. Número y localización de segundos tumores primarios en los pacientes oncológicos. Izq: izquierda. Der: derecha. Mx: maxilar. Mb: mandibular. Lat: lateral. Post: posterior.

Se objetivaron metástasis a distancia del tumor primario únicamente en un paciente del grupo COCE convencional. La paciente fue diagnosticada de metástasis pulmonar a los 19 meses y tratada con quimioterapia.

Al final del seguimiento, fallecieron tres pacientes, uno perteneciente al grupo LVP – COCE y dos con COCE convencional debido a la evolución de la enfermedad.

ENFERMEDAD NO TUMORAL:

Ningunas de las leucoplasias homogéneas incluidas en el estudio transformaron a

carcinoma oral. Sin embargo, el 42% de los pacientes con LVP sufrieron transformación maligna a COCE a lo largo de su seguimiento. De hecho, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Chi^2 p = 0,035). Los 5 pacientes que transformaron a carcinoma oral de células escamosas, previamente presentaron lesiones verrugosas con distintos grados de displasia. El tiempo medio de trasformación maligna fue de 6,8 ± 5,54 meses. En todos los pacientes se realizó la extirpación quirúrgica de la lesión como tratamiento, a excepción de un paciente al cual también se le administró radioterapia coadyuvante (tabla 32).

Pacientes	Localización	Histopatología previa	Tiempo TM	Tratamiento
LVP – no cáncer 3	Encía mb der	D. severa	8 meses	QX
LVP – no cáncer 5	Paladar der	D. moderada	4 meses	QX
LVP – no cáncer 6	Trígono retro izq	D. leve	16 meses	QX + RT
LVP – no cáncer 10	Encía mb der	D. leve	3 meses	QX
LVP – no cáncer 12	Lengua izq	D. leve	3 meses	QX

Tabla 32. Pacientes del grupo LVP – no cáncer que sufrieron transformación maligna a COCE. Mb: mandibular. Der: derecha. Izq: izquierda. D: displasia. Qx: extirpación quirúrgica. Rt: radioterapia.

5.6. INTERVALOS TEMPORALES.

5.6.1. TIEMPO DE SEGUIMIENTO:

El tiempo medio de seguimiento en años de los pacientes pertenecientes a la cohorte de leucoplasias verrugosas proliferativas fue mayor al de los otros dos grupos. Así mismo, fue mayor el tiempo de seguimiento en los pacientes con LVP que transformaron a carcinoma oral de células escamosas (tabla 33 y figura 35).

Pacientes	Media (años)	SD	Mínimo (años)	Máximo (años)
Leucoplasia homogénea	7,05	8,34	1,39	21,17
LVP – no cáncer	9,53	4,67	2,07	20,06
LVP - COCE	11,11	7,58	1,27	24,33
COCE convencional	2,14	0,8	0,42	3,05

Tabla 33. Tiempo de seguimiento de cada grupo de pacientes expresado en años.

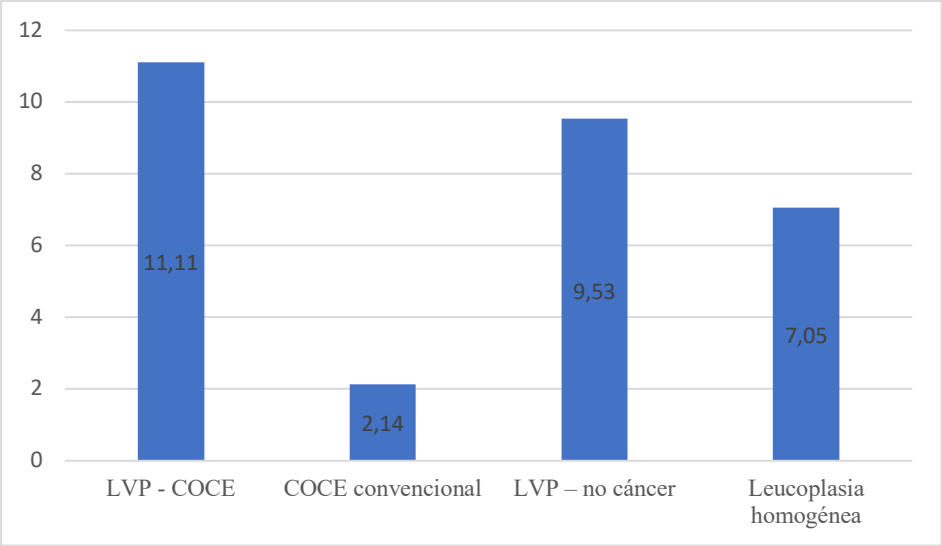


Figura 35. Tiempo medio de seguimiento expresado en años de cada uno de los grupos de pacientes incluidos en el estudio.

5.6.2. TIEMPO DE TRANSFORMACIÓN MALIGNA GRUPO LVP - COCE:

El tiempo medio de transformación maligna desde la fecha de la primera visita y exploración hasta el desarrollo del primer carcinoma (cuyas muestras están incluidas en la presente tesis) fue de 9,21 ± 7,11 años, con un valor mínimo de 0,14 años y máximo de 21,18 años. La paciente que evolucionó a carcinoma oral en mes y medio, fue derivada a nuestro servicio desde su centro de seguimiento por la evolución y empeoramiento de la enfermedad y refería un seguimiento previo de 4 años.

5.6.3. TIEMPO DE SUPERVIVENCIA:

El tiempo de supervivencia fue calculado desde la toma de la biopsia incluida en este estudio hasta la última revisión del seguimiento en febrero de 2022 o hasta la fecha de exitus del paciente (tabla 34). No encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos de pacientes incluidos ($p > 0,05$).

Pacientes	Media	SD	Mínimo	Máximo
Leucoplasia homogénea	2,38	0,78	1,33	3,26
LVP – no cáncer	1,95	0,87	0,69	3,17
LVP - COCE	1,9	1,06	0,12	3,15
COCE convencional	2,14	0,8	0,42	3,05

Tabla 34. Tiempo de supervivencia de cada grupo de pacientes expresado en años.

5.7. ANÁLISIS EPIGENÓMICO.

En la evaluación mediante fluorimetría con Qubit® y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,3% para valorar la calidad, concentración e integridad del ADN total se observó que todas las muestras cumplían las condiciones necesarias para la realización del presente estudio epigenómico.

COMPARACIÓN DEL EPIGENOMA ENTRE LOS GRUPOS LVP – COCE vs COCE convencional.

PERFIL DE METILACIÓN GLOBAL (Genome – Wide DNA Methylation).

Análisis exploratorio no supervisado.

En el análisis de componentes principales no se encontraron diferencias claras entre ambos grupos (figura 36). Como era de esperar, no se observaron conglomerados evidentes entre los distintos grupos de pacientes ni valores anómalos en los datos.

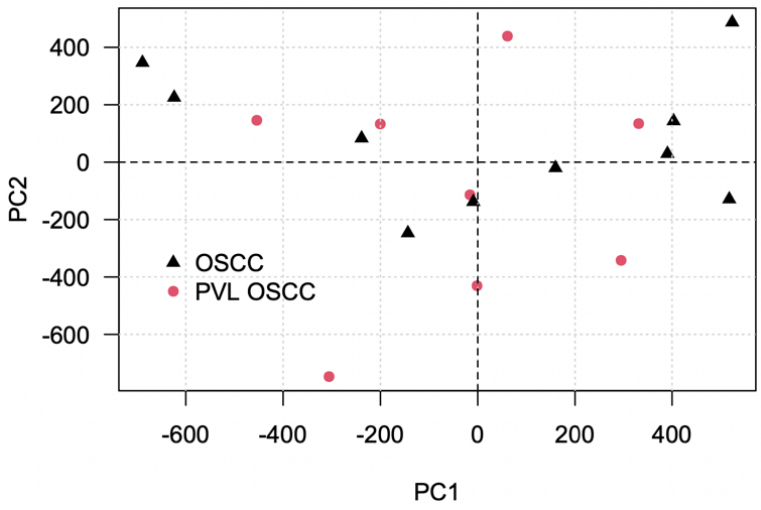


Figura 36. Análisis de componentes principales diferenciando por color y forma los dos grupos de pacientes estudiados.

Para complementar el análisis PCA, se realizó un mapa de calor con 5.000 CpGs seleccionadas al azar y un análisis de conglomerados jerárquico en las observaciones como variables (figura 37). Los resultados coincidieron con el análisis anterior, al no observarse una distinción clara entre grupos. Esta ausencia de conglomerados evidentes puede explicarse por el hecho de que ambos grupos están formados por pacientes con carcinomas orales de células escamosas.

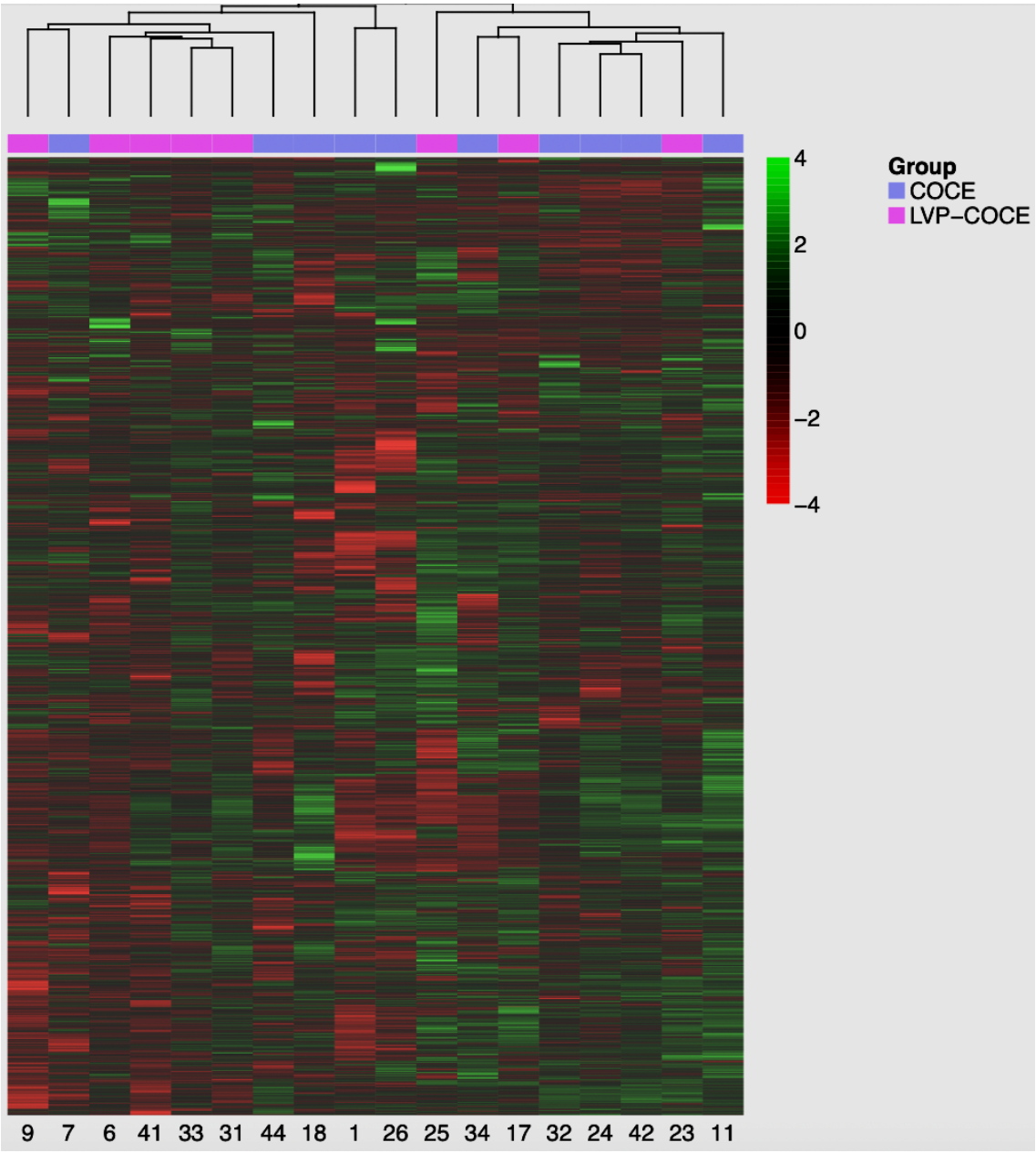


Figura 37. Mapa de calor (Heatmap) y agrupación jerárquica de las 5.000 CpGs aleatorias evaluadas en los 18 pacientes incluidos.

Análisis diferencial de metilación supervisado.

Como hemos detectado que un análisis no supervisado no hace distinción entre grupos, hemos realizado este análisis para encontrar las CpGs con diferencias significativas en metilación que permitieran distinguir a cada grupo.

Se realizó un análisis de metilación diferencial mediante el ajuste de modelos de regresión basada en rangos para cada valor de metilación CpG. Después de corregir las comparaciones múltiples mediante *False Discovery Rate*, se encontraron 14 CpGs

correspondientes a 10 genes con diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p ajustado < 0,05) (tabla 35). Además de esto, los resultados también se representaron en un mapa de calor con los valores de estas CpGs y se confirmó visualmente las diferencias existentes entre ambos grupos al usar los 14 CpGs (figura 38).

CpG	Gen	Metilación diferencial	Relación con la isla CpG	Región estructural
cg24794734	AGL	-0.007	playa	TSS1500, 5'UTR, 1er Exon
cg24179734	BRD9	-0.30	playa	Cuerpo
cg04407470	NR2E1	0.49	isla	Cuerpo
cg25440307	ZNF777	-0.019	isla	Cuerpo
cg06728147	PITRM1	-0.47	mar abierto	Cuerpo
cg01128042	CASP7	0.35	mar abierto	Cuerpo
cg26134913	-	0.32	playa	-
cg24578679	CYP11A1	0.25	isla	Cuerpo, TSS200
cg07808661	C18orf18	0.27	isla	Cuerpo, TSS200
cg15787284	ZNF433	0.28	isla	TSS20
cg27119318	WRB	-0.19	playa	Cuerpo, TSS200
cg21736411	WRB	-0.08	playa	Cuerpo, TSS200
cg19684207	WRB	-0.18	playa	Cuerpo, TSS200
cg15977137	WRB	-0.16	playa	Cuerpo, 5'UTR, 1er Exon

Tabla 35. CpGs y sus correspondientes genes resultados del análisis de metilación diferencial mediante el ajuste de modelos de regresión basados en rangos. De cada CpG se ha incluido su ubicación con respecto a la isla CpG y la región génica a la que pertenece (TSS1500 si se localizan en una región entre 200-1500 pares de bases aguas arriba del sitio de inicio transcripcional (TSS); TSS200 si se localiza de 0-200 pares de bases aguas arriba de TSS; 5'UTR representa la región no traducida 5'; 1er Exon es la abreviatura del primer exón del gen; Cuerpo si se localiza en el interior del gen; 3'UTR representa la región no traducida 3').

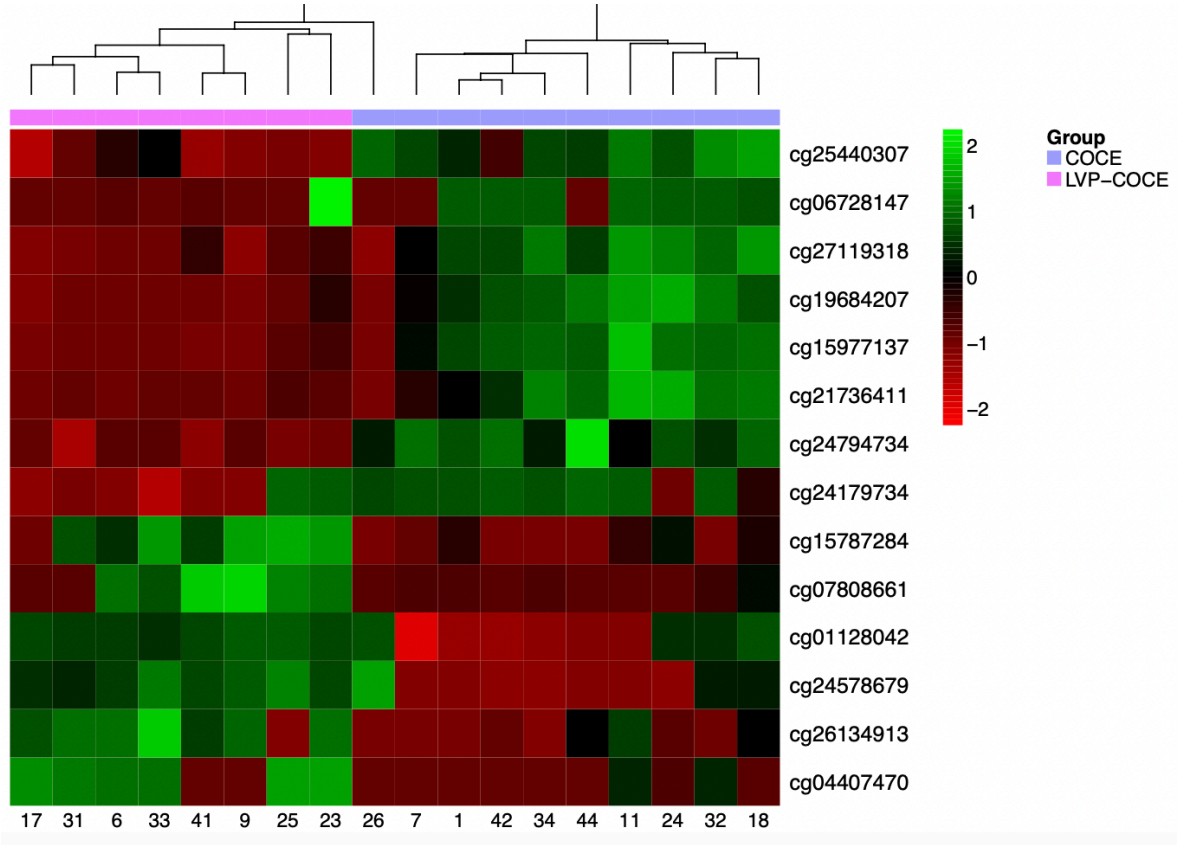


Figura 38. Mapa de calor y agrupación jerárquica con los valores de metilación de las CpGs diferencialmente metiladas según el análisis de regresión basa en rangos. Los resultados de la metilación diferencial muestran una clara discriminación entre ambos grupos al usar las 14 CpGs. Las CpG con mayor ganancia de metilación están representadas de color verde.

Posteriormente, como análisis adicional, se ajustó otro modelo de regresión logística penalizada mediante *Elastic Net* con el objetivo de desarrollar una firma específica de CpGs capaz de discriminar entre individuos con carcinomas orales de células escamosas y antecedentes o no de leucoplasia verrugosa proliferativa. Las 500 repeticiones del procedimiento de validación cruzada determinaron un valor lambda de penalización de 0,95 y un valor alpha de 0,4 como óptimos para el ajuste del modelo. Finalmente, el modelo seleccionó 9 CpGs diferencialmente metilados correspondientes a

6 genes que permiten discriminar a los pacientes entre los distintos perfiles (tabla 36). Además de esto, los resultados también se representaron en una agrupación jerárquica con mapa de calor para visualizar las diferencias existentes entre ambos grupos (figura 39).

CpG	Gen	OR	Relación con la isla CpG	Región estructural
cg24794734	AGL	0.001	playa	TSS1500, 5'UTR, 1er Exon
cg11369761	-	1.01	playa	
cg15199741	FGD5	0.98	mar abierto	Cuerpo
cg09643539	ARL15	0.93	mar abierto	Cuerpo
cg09365002	DAXX	0.99	playa	Cuerpo
cg17251196	DAXX	0.99	playa	Cuerpo
cg24104268	-	0.83	isla	
cg12003952	ZNF429	0.96	playa	TSS1500
cg15977137	WRB	0.98	playa	Cuerpo, 5'UTR, 1er Exon

Tabla 36. Resultados del modelo de regresión logística penalizada.

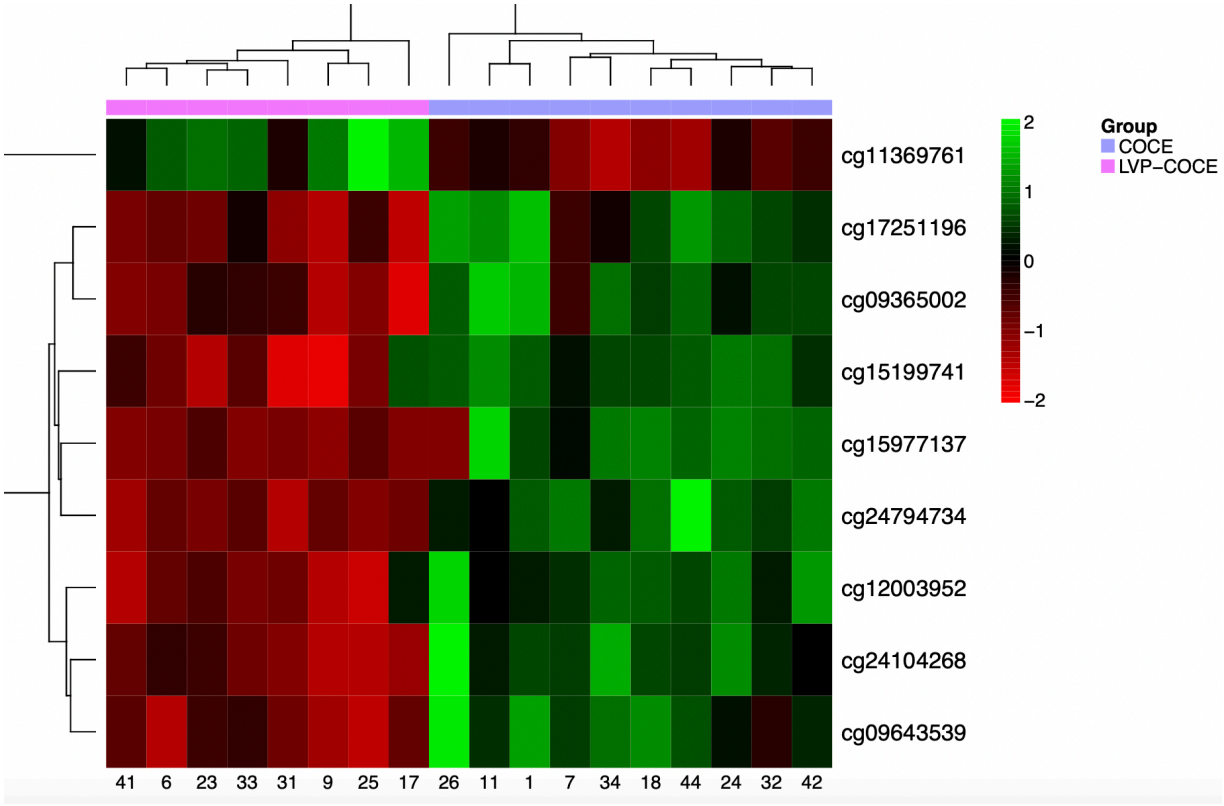


Figura 39. Agrupación jerárquica con mapa de calor según la lista de CpGs capaces de discriminar entre ambos grupos tras ajustar el modelo de regresión logística penalizada mediante *Elastic Net*.

Interesantemente, al cruzar los resultados de las CpGs significativas de los dos análisis, se observó que había dos genes que eran significativos en ambos análisis. Los CpG que coincidían correspondían al gen WRB y al gen AGL (tabla 37).

CpG	Símbolos del gen	Nombre	Localización	Descripción
cg24794734	AGL (GDE)	amilo-alfa-1, 6-glucosidasa, 4-alfa-glucanotransferasa.	Cromosoma 1: 1p21.2	Participa en la degradación del glucógeno. Gen supresor tumoral.
cg11369761	WRB (GET1)	Entrada guiada de proteínas ancladas en la cola factor 1.	Cromosoma 21: 21q22.2	Proteína básica rica en triptófano. Se encuentra en superficie de retículo endoplasmático.

Tabla 37. Características de los genes que coincidieron en los resultados de los dos análisis realizados.

Debido a que el tamaño muestral limitado conlleva una baja potencia estadística, los resultados de los dos análisis anteriores no fueron completamente similares. Para sopesar estas limitaciones y ganar potencia estadística, hicimos uso de datos de un estudio transcriptómico realizado de forma paralela a la presente tesis en las mismas muestras tisulares de estos pacientes.

ANÁLISIS DE INTEGRACIÓN DE DATOS DE EXPRESIÓN Y METILACIÓN.

En dicho estudio previo de RNAseq realizado por nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo el análisis global de expresión génica diferencial (EGD) entre los dos grupos de pacientes (LVP – COCE vs COCE). Como resultado del análisis se obtuvo 133 genes expresados diferencialmente con diferencias significativas entre ambos grupos. De las 842.179 CpGs válidas para el estudio de metilación global inicial, se seleccionaron con la ayuda del manifiesto de Illumina MethylationEPIC V1.0 B4 las 472 CpGs localizadas en los promotores de esos 133 genes expresados diferencialmente con el objetivo de explorar la regulación de esos EGD.

Posteriormente, se realizó un nuevo análisis con una mayor potencia estadística al reducir el número de variables de 842.179 CpGs a las 472 CpGs localizadas en los promotores de los 133 EGD. Se llevó a cabo una regresión logística penalizada mediante *Elastic Net* y se encontró que 37 CpGs correspondientes a 26 genes de los 133 EGD estarían potencialmente regulados por metilación (tabla 38) y son capaces de discriminar entre ambos grupos tal y como se puede observar en el mapa de calor y agrupación jerárquica donde hay una clara separación entre ambos grupos según su estado de metilación (figura 40).

CpG	Gen
cg21209091	*DKK4*
cg06017775	*TMPRSS11B*
cg12074493	*SLC6A4*
cg12481531	*VSIG2*
cg09202227	SMPD3
cg20473025	
cg08694014	
cg26013099	
cg24267699	ABO
cg20955080	
cg07153207	*SLC51A*

cg06926332	*GALNT5*	**cg04299135**	*BARX2*
cg01378878	GPX3	**cg03345145**	*ACAA2*
cg22005145		**cg21416261**	SLC25A42
cg00742603	DBNDD1	**cg22145172**	
cg01386792		**cg11376470**	PPAP2B
cg10156298	*TMEM88B*	**cg11160051**	
cg12728517	*ZNF215*	**cg01065605**	HIBADH
cg02353041	SLC46A2	**cg22168087**	
cg10726357		**cg18618789**	*COX7B2*
cg11724516		**cg11889045**	*LINC00624*
cg04182207	*CLCN1*	**cg21184111**	*RCL1*
cg15325641	*KRT3*	**cg08283682**	*HIST1H1C*
cg06854084	*NKX2-3*	**cg08857308**	*NCLN*

Tabla 38. CpGs y sus genes asociados resultados del análisis de regresión logística penalizada para investigar las 472 CpGs localizadas en los promotores de los 133 EGD que son capaces de discriminar entre ambos grupos según el estado de metilación.

Cabe destacar que 29 de las 37 CpG (78%) estaban hipermetiladas en el grupo de pacientes LVP-COCE. Y 28 de los 37 CpG (76%) se localizaban en islas o playas CpG. Por lo tanto, al integrar los resultados de la expresión génica con los niveles de metilación de los promotores de esos genes expresados diferencialmente entre los dos grupos de pacientes, se identificaron 26 genes cuya alteración en la expresión está regulada por metilación.

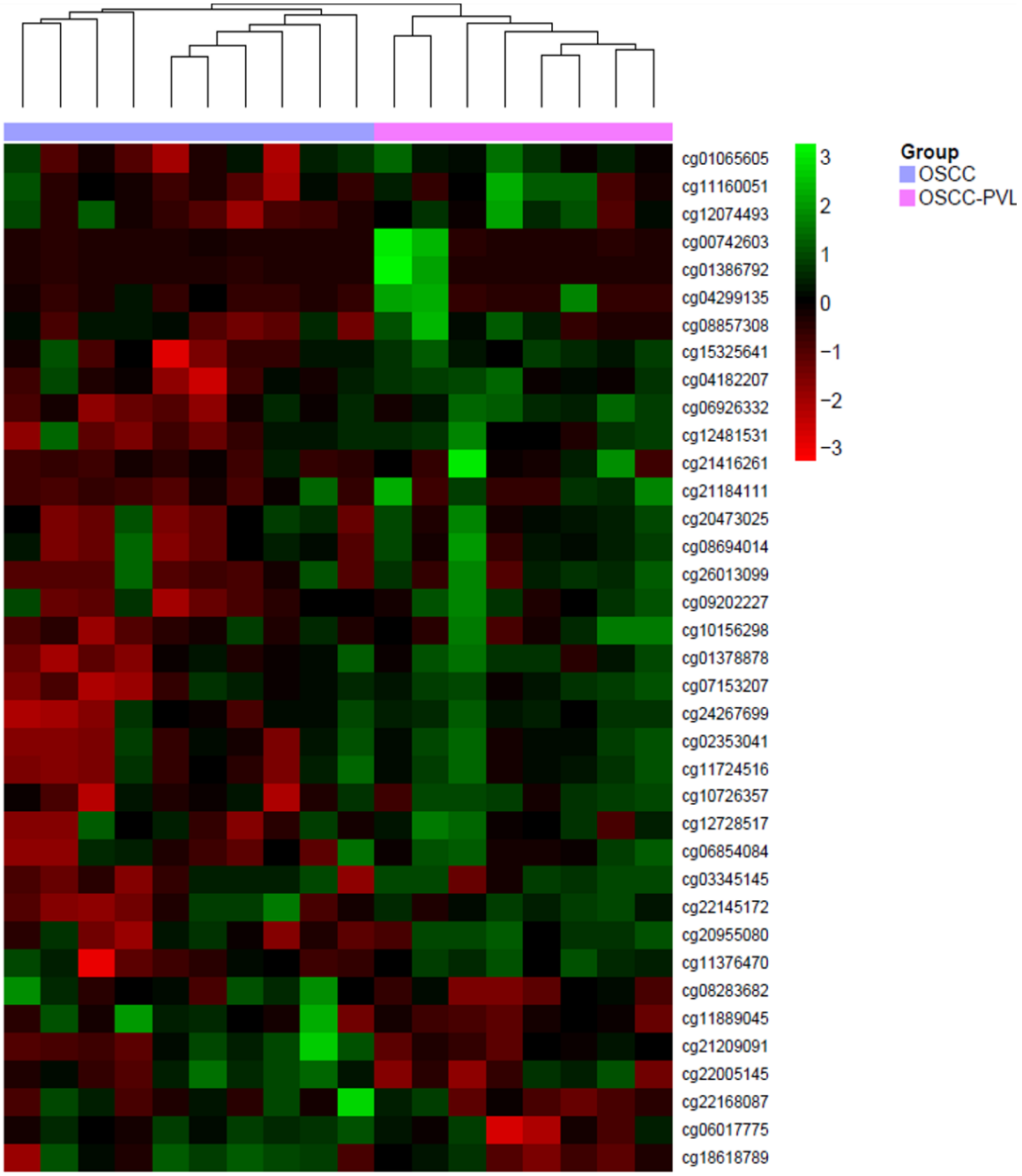


Figura 40. Mapa de calor representativo de las posiciones de las 37 CpG que corresponden a los 26 genes situadas en las zonas promotoras con diferencias de metilación estadísticamente significativas ordenadas según la agrupación jerárquica. El nivel de metilación se representa en una gradación o escala de colores, representando el verde la ganancia de metilación.

6. DISCUSIÓN

La leucoplasia verrugosa proliferativa fue descrita por primera vez en 1985 por Hansen y cols.[10] como una forma particularmente agresiva de leucoplasia oral cuyo origen se desconocía y que a lo largo de su evolución se iba expandiendo y volviéndose multifocal. Pasados treinta y ocho años desde su descripción inicial, se han publicado varias definiciones sobre esta enfermedad[1][11][12][13][14][48], todas ellas variando muy poco de la original[10]. Cabe destacar la reciente actualización coordinada por el Centro Colaborador de la OMS para el Cáncer Oral celebrada en 2020, en la que expertos internacionales en los ámbitos de medicina y patología oral, además de consensuar el nombre de esta enfermedad, definieron a este grupo de pacientes como "una forma distinta de leucoplasia oral multifocal caracterizada por tener un curso clínico progresivo, persistente e irreversible con presencia de múltiples leucoplasias orales que frecuentemente se transforman en áreas verrugosas"[1].

El hito de dicha actualización recae en el hecho de que por primera vez y de forma oficial se haya reconocido a esta enfermedad como una entidad diferenciada de las leucoplasias orales clásicas[1]. También es cierto, que previamente algunos autores ya habían clasificado estas enfermedades como dos fenotipos clínicos distintos basados en las disimilitudes clínicas, epidemiológicas, evolutivas e incluso genómicas existentes entre ambas[14][15][38][41][170]. Pese a que estas dos enfermedades son consideradas como trastornos orales potencialmente malignos, presentan tasas de transformación maligna muy variables[43][52][55]. Por lo que, distinguir una leucoplasia oral clásica de la LVP resulta de especial importancia debido a las implicaciones que suponen en el seguimiento y manejo de cada paciente.

Por el momento, el diagnóstico de la LVP se realiza de forma retrospectiva en base a ciertos criterios diagnósticos publicados. En 2010, Cerero – Lapiedra *y cols.*[46] fueron los primeros en establecer, de forma muy acertada, una serie de características que debían cumplir los pacientes para ser diagnosticados de LVP. Propusieron la combinación de unos criterios mayores con otros menores. Tres años más tarde estos criterios se simplificaron[47]. Y ya en 2018, Villa *y cols.*[14] propusieron y modificaron ligeramente estos criterios. Entre los aspectos más destacados se encontraba la inclusión tanto de lesiones multifocales no contiguas como de lesiones mayores de 4cm en una sola localización o de 3 cm y que afecten a localizaciones contiguas[14]. Del mismo modo, todos coincidían en que estos pacientes presentaban leucoplasias que en su evolución progresaban hacia la multifocalidad y en la necesidad del estudio histopatológico ante

cualquier cambio[14][46][47]. A pesar del continuo esfuerzo de conseguir unos criterios que no sean tan restrictivos o complejos, continúa siendo muy difícil poder realizar un diagnóstico precoz debido, sobre todo, a que resulta complejo saber qué placas simples de leucoplasia van a recidivar y cuales en su evolución muestran multifocalidad[10][45].

En estos últimos años, se ha descrito la posible superposición de características clínico-patológicas de leucoplasias orales clásicas y lesiones liquenoides en estadios tempranos de la LVP que podrían dificultar su diagnóstico precoz[16][31][35][49][171]. Sin embargo, estas posibles lesiones liquenoides como manifestaciones iniciales de LVP, sólo han sido presentadas en pequeñas series de casos con 10 pacientes de una cohorte de 80 pacientes (12%)[16], 14 pacientes[35], 15 pacientes (44%)[172], 17 pacientes (48%)[49] o 30 pacientes (59%)[31]. Por lo que, el grado de evidencia científica es escaso, teniendo en cuenta que grandes cohortes de pacientes no han mostrado estas características, lo que no permite corroborar estas hipótesis[10][15][18][20][21][29]. Además, es importante que los autores especifiquen los criterios diagnósticos empleados en cada enfermedad así como los periodos de seguimiento llevados a cabo. Esto lo reflejan, por ejemplo, Villa y cols.[14] en su cohorte de 42 pacientes, 3 de los cuales habían sido diagnosticados inicialmente de liquen plano, sin embargo, al revisar las imágenes no observaron signos claros de enfermedad liquenoide en ninguna localización de la mucosa, por lo que estaban ante un error diagnóstico inicial. Por lo tanto, falta evidencia sobre esta cuestión controvertida para saber si el liquen plano puede evolucionar hacia LVP o si estamos ante una misma condición precancerosa en un escenario de cancerización de campo[171].

Durante la progresión de la enfermedad, en las mucosas orales de estos pacientes se producen cambios clínico-patológicos de forma dinámica dando como resultado la multifocalidad y transformación maligna características[1][18][29][38][172]. Se han descrito tasas de transformación maligna del 44 al 66%[43][55] e incluso cifras superiores en varias cohortes[10][14][29][49]. Sin embargo, todavía hay un conocimiento limitado sobre qué pacientes con LVP desarrollarán COCE o segundos tumores primarios a lo largo de su seguimiento[14][15][18][21][26] y cuál es la mejor manera para monitorizarlos y tratarlos.

Los objetivos principales de esta tesis han sido describir las diferencias clínico-patológicas y evolutivas entre pacientes con LVP, leucoplasias orales clásicas y COCE. Así como los cambios en el metiloma de los pacientes con carcinoma oral de células escamosas precedidos o no de leucoplasia verrugosa proliferativa.

ESTUDIO CLÍNICO – PATOLÓGICO Y EVOLUTIVO.

1. EDAD.

No encontramos diferencias significativas entre las edades de los cuatro grupos de pacientes incluidos. Coincidimos con la literatura científica en que los pacientes con LVP y que aún no han desarrollado patología tumoral maligna se diagnostican en la sexta década de vida[10][14][15][16][18][49][173]. En la descripción inicial de Hansen y cols.[10] describieron a 30 pacientes con una edad media de 66 años, similares resultados obtuvieron posteriormente Villa y cols.[14] en su cohorte de 42 pacientes cuya edad era de 68,5 años. En las dos cohortes más grandes de LVP, con 81[15] y 80[16] pacientes cada una, la edad media de estos pacientes fue de 62 años. En nuestros pacientes con LVP que evolucionaron a carcinomas orales, la edad media fue mayor, siendo de 80,25 años. Resultado en concordancia con las publicaciones sobre la transformación maligna de LVP[26][37][43], en las que se concluye que la malignización ocurre en edades avanzadas.

Los pacientes con carcinomas orales de células escamosas, las leucoplasias homogéneas y los controles sanos fueron emparejados según la edad y el sexo con los pacientes con LVP. Es por ello que la edad media de los pacientes con carcinomas orales no precedidos de TOPM fue de 72,8 años; edad ligeramente mayor a las reportadas en otros estudios[36][74]. Y la edad media de las leucoplasias homogéneas fue de 68,7 años, que coincide con las de otros estudios[42] pero también es mayor a las descritas por otros[7][19]. Como el de Rubert y cols.[7] que comunicaron una edad media de 56,9 años en los 412 pacientes con leucoplasias orales estudiados.

2. SEXO.

Al igual que en la edad, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el sexo de los grupos incluidos porque los pacientes también estaban emparejados según el sexo, lo que demuestra la correcta selección de las muestras para su comparación. En nuestras cohortes de pacientes con LVP observamos un alto predominio del sexo femenino, hecho que está ampliamente corroborado en la literatura científica, ya que, la mayoría de los pacientes con LVP son mujeres[10][11][14][15][173]. Sin embargo, cabe destacar que existe cierta disparidad en cuanto al porcentaje de afectación de pacientes de sexo femenino, ya que, en la literatura científica existen rangos que oscilan del 50[18][20][31] al 80%[10][14][21][29][35] de las series de casos publicadas.

3. HÁBITOS TÓXICOS.

La mayoría de nuestros pacientes con LVP no referían ser fumadores ni consumidores de alcohol en la anamnesis. Aunque es cierto que existe disparidad entre algunos estudios con un porcentaje de fumadores inferior al 30%[14][18][19][29][31][57] y otras con un porcentaje mayor al 60%[10][20][26]; está ampliamente aceptado en las diferentes publicaciones científicas la ausencia de asociación de la LVP con carcinógenos de primer grado como son el tabaco y el alcohol[1][12][14][41]. Por lo que, el tabaco no parece tener ningún papel etiológico en la LVP ni en su evolución hacia la malignización[38][57][173].

Sin embargo, por otro lado, en las leucoplasias orales se ha relacionado el tabaco como su principal factor etiológico[1][17][41], ya que, los fumadores tienen un mayor riesgo de desarrollar leucoplasias que los no fumadores[9][174] y existe una relación dosis-respuesta entre el consumo de tabaco y las leucoplasias orales[174].

4. CUADRO CLÍNICO.

Los dos grupos de pacientes con LVP incluidos presentaban leucoplasias orales multifocales, una de las características principales y patognomónicas de estos pacientes[1][10][171]. Ambos grupos tenían una afectación cercana al 50% de toda su mucosa oral con algún tipo de lesión del espectro LVP y todos presentaban afectación gingival seguida de la lingual y yugal. Estos resultados concuerdan con lo disponible en la literatura científica[1][14][15][20][21][173]. Del mismo modo, todos nuestros pacientes presentaron alguna lesión verrugosa. Otra de las características perfectamente definida desde su descripción inicial, fundamental para el diagnóstico de estos pacientes[1][10]. Pese a que algunos autores rechacen este criterio, en la última actualización celebrada en Glasgow sobre los TOPM se consensuó que una de las características de los pacientes con LVP es que en el curso de su evolución presenten un patrón verrugoso[10].

Observamos diferencias estadísticamente significativas entre la forma de presentación clínica de las lesiones tumorales de ambos grupos de pacientes ($p = 0,022$). Nuestros pacientes con LVP – COCE tenían mayor prevalencia de lesiones tumorales verrugosas en encías o paladar, localizaciones claramente involucradas en la transformación maligna de la LVP[15][18][29][43][56][81]. En el estudio de Bagán y cols[15], de los 33 pacientes que desarrollaron carcinomas orales, el 60% estaban localizados en las encías y el 40% en forma de lesiones exofíticas. En un reciente meta-análisis sobre la

transformación maligna de la LVP, describieron que el 48% de los pacientes que transformaron en COCE presentaban la lesión tumoral en las encías o paladar[43]. Del mismo modo, al igual que en nuestros pacientes, se ha observado una mayor incidencia de lesiones tumorales verrugosas en pacientes LVP en otras cohortes[15][18]. Por ejemplo, Favia y cols.[18] informaron que en su cohorte de 48 pacientes que sufrieron TM, el 74% presentaba lesiones exofíticas. Por el contrario, casi la totalidad de nuestros pacientes con COCE convencional presentaban lesiones ulceradas y en la lengua, que son la forma clínica y localización típica del COCE[69][71][175].

No encontramos diferencias estadísticas entre la media del diámetro mayor o del área total de las lesiones neoplásicas entre ambos grupos de pacientes. En este sentido, Favia y cols.[18] obtuvieron resultados similares a los nuestros en cuanto al tamaño de las lesiones tumorales de los pacientes con LVP, pues oscilaban entre 0,5–3cm. En un estudio realizado por nuestro equipo en 2019[37], observamos que el tamaño medio de las lesiones de los 30 pacientes con LVP y COCE localizados en las encías era ligeramente menor a los obtenidos en el presente estudio. Del mismo modo, el estudio de Akrish y cols.[60] describieron que el 70% de los 38 carcinomas orales en pacientes con antecedentes de LVP tenían un tamaño tumoral inferior a 2cm.

5. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS.

La mitad de nuestros pacientes de cada grupo oncológico presentaba un grado tumoral bien diferenciado en el resultado histopatológico, por lo que no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Estos resultados fueron coincidentes con los del estudio publicado por Alkan y cols.[49], en el cual el 56% de los 32 COCES correspondientes a 14 LVP presentaban un grado tumoral bien diferenciado. Así mismo, en un reciente meta-análisis, se concluyó que mayoritariamente los pacientes con LVP desarrollaban COCEs bien diferenciados (78,41%. IC 95%: 37,2 – 95)[58] resultados muy similares a los de la revisión sistemática de Akrish y cols.[81].

Al analizar las diferencias encontradas entre la profundidad de invasión de ambos grupos mediante la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,075$). Desde su incorporación en 2017 en la octava edición de la AJCC[70], la profundidad de invasión tumoral se ha establecido como factor pronóstico desfavorable en COCE de tal manera

que se ha descrito una asociación entre el aumento de DOI y el empeoramiento de la supervivencia global (SG) o supervivencia libre de enfermedad (SLE) de estos pacientes[176][177][178][179]. Por ejemplo, en el estudio de Faisal y cols[179], realizado en 531 pacientes, observaron que a medida que aumentaba la profundidad de invasión disminuía la SG y la SLE tanto en el análisis univariante como el multivariante. En nuestros pacientes, la profundidad de invasión tumoral fue mayor en el grupo COCE en comparación a LVP - COCE. No hemos encontrado en la literatura científica disponible estudios que comparen este parámetro entre ambos grupos de pacientes para poder contrastar nuestros resultados. A pesar de que hubo un intento en la revisión sistemática de Akrish y cols.[81] al evaluar este parámetro en 72 tumoraciones y concluir que el 50% eran "superficialmente invasivos" según estos autores (DOI < 0,4cm); sin embargo, al revisar los estudios referenciados, no encontramos en ninguno la valoración del DOI por parte de los respectivos autores.

En cuanto a la invasión linfovascular y perineural tampoco encontramos diferencias estadísticas entre ambos grupos ($p > 0,05$), si bien hay que considerar que estábamos ante una muestra muy limitada en número de casos. Estos mismos resultados mostraron Akrish y cols.[60][61] en cuanto a la invasión perineural, ya que, pese a no encontrar diferencias significativas, al igual que en nuestros pacientes, el porcentaje de pacientes con presencia de IPN fue mayor en el grupo COCE convencional. Es conocido el impacto terapéutico y pronóstico que supone la presencia de la invasión perineural en COCE, ya que varios estudios lo relacionan como un factor de riesgo independiente de mal pronóstico[180][181]. De hecho, se ha descrito que los carcinomas derivados de LVP aunque sean más voluminosos carecen tanto de pleomorfismo marcado como de aumento de mitosis, por lo que resulta menos probable la invasión celular en el estroma subyacente en comparación con los carcinomas de células escamosas convencionales[44]. En este sentido, el equipo de Akrish y cols. en sus estudios inmunohistoquímicos de lesiones tumorales en pacientes con LVP observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de p53[60] y en la presencia de fibroblastos asociados al cáncer[61], siendo menor que en los carcinomas convencionales. Los autores concluyeron que posiblemente esta fuese la causa de que los tumores tengan un crecimiento más lento y menos invasivo.

Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en las demás características histopatológicas analizadas entre los grupos oncológicos. Esto podría deberse al limitado tamaño muestral del estudio[182]. También es cierto, que observamos

una tendencia hacia mejor pronóstico en los pacientes LVP – COCE al compararlos con los COCE convencionales, ya que presentaban una menor DOI, ausencia de invasión perineural o metástasis regional o a distancia y unos estadios cTNM y pTNM iniciales (50% vs 40%). En un estudio previo realizado por nuestro grupo[37], observamos que el 27 de los 30 pacientes con LVP – COCE presentaban estadios iniciales, de los cuales el 66,7% correspondían a un cTNM I. Mismos resultados obtuvieron Akrish y cols.[60], en su cohorte de 11 pacientes que desarrollaron 30 COCEs. La discordancia que observamos entre el cTNM y pTNM de los dos pacientes con COCE tras el estudio histopatológico postoperatorio fue debido a que estos pacientes en un principio presentaban clínicamente afectación ganglionar ipsilateral sin ENE y posteriormente en el estudio histopatológico de la pieza quirúrgica se observó la rotura capsular ganglionar con extensión extranodal, por lo que pasaron de un estadio III a un estadio IV. La posible variación entre el estadio TNM pre y post tratamiento se ha descrito en la literatura científica, así como su importancia en la necesidad o no de realizar tratamientos coadyuvantes. A pesar de los avances en las técnicas radiológicas y la experiencia de los clínicos, el estadiaje pTNM se ha demostrado que presenta una calidad pronóstica superior[183].

En cuanto a las lesiones no tumorales incluidas en el presente estudio, observamos que el 75% de nuestros pacientes presentaban algún tipo de displasia epitelial. En un estudio de nuestro grupo, en el que se evaluaron 412 pacientes con leucoplasias orales se observó que el 34% presentaba algún grado de displasia epitelial, de los cuales sólo el 7,5% correspondían a leucoplasias homogéneas. Actualmente, en la quinta edición de la "Clasificación de tumores de la cabeza y cuello" de la OMS publicada en 2022[164] se continúa recomendando el empleo del sistema de clasificación de la displasia epitelial en tres niveles, ya que, por el momento, el sistema de clasificación binario necesita una mayor validación[41][184]. De la misma forma, se ha observado que las leucoplasias clásicas y la LVP comparten características histopatológicas de displasia epitelial similares[42]. La prevalencia de displasia epitelial en las biopsias de LVP varía entre las diferentes cohortes. Por ejemplo, en el estudio de Silverman y cols.[29], el 30% de los 54 pacientes presentaban displasia en la biopsia inicial, resultados similares obtuvieron McParland y cols.[31] al presentar displasia el 23% de los 51 pacientes incluidos. Sin embargo, en el estudio de Villa y cols[14], observaron una mayor prevalencia de displasia (43,6%) que posteriormente lo corroboraron en otro estudio realizado sobre 59 pacientes de los cuales el 54% tenía algún grado de displasia[185]. En un reciente meta-análisis, se observó que el

31% de los 162 pacientes con LVP incluidos presentaban algún grado de displasia epitelial en sus biopsias iniciales y que el 41% de pacientes que desarrollaron carcinomas orales presentaron inicialmente displasia epitelial[43]. Del mismo modo se ha observado que lesiones con resultado histopatológico inicial de hiperqueratosis no reactiva pueden evolucionar hacia la displasia epitelial en biopsias sucesivas de estos pacientes[39][185]. Por lo que, aunque inicialmente un gran porcentaje de pacientes con LVP no presenten signos de displasia epitelial en el estudio histopatológico, independientemente de ello, la evolución natural de la enfermedad va a progresar hacia la presencia de displasia epitelial, carcinoma verrugoso o carcinoma de células escamosas[10][26][29][47].

6. MANEJO Y TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES.

En ambos grupos oncológicos el tratamiento más empleado fue la extirpación quirúrgica con fines curativos. Por el momento, el manejo de ambas entidades se basa en el tratamiento quirúrgico junto al vaciamiento cervical, si estuviese indicado[15][18][38][60]. Los pacientes que presentaban estadios avanzados recibieron quimioterapia o radioterapia coadyuvante al igual que en otras cohortes[179][183].

El manejo de los pacientes sin lesiones tumorales se basó en el protocolo previamente descrito por nuestro grupo[38]. De forma resumida, ante cambios en la apariencia clínica o presencia de displasia en las biopsias, las lesiones se trataban mediante extirpación quirúrgica. Además, todos los pacientes entraban en un protocolo estricto de seguimiento cada 3 – 6 meses en función de la progresión/gravedad de la enfermedad[14][51]. En nuestro grupo de 12 pacientes con LVP que aún no habían progresado hacia la transformación maligna, se puede observar como a lo largo de su seguimiento fueron tratados con diferentes modalidades terapéuticas y aun así se observaron recidivas en el 75% de los pacientes en un corto periodo de tiempo. Estos resultados son similares a los que encontramos en nuestro meta-análisis de recurrencias en los tratamientos de LVP publicado en 2021 en *Journal of Oral Pathology and Medicine* en el que obtuvimos una alta tasa de recurrencia global (67,2%. IC95% 48,3 – 81,8)[51]. Es por ello, que el manejo de estos pacientes supone un desafío complejo para los clínicos[50][51]. La mayoría de autores coinciden en que se les realiza una mayor cantidad de tratamientos o combinaciones de los mismos y que las biopsias seriadas son importantes en su seguimiento[14][15][19][20][29]. El objetivo de las múltiples biopsias es realizar un correcta correlación clínico patológica y diagnosticar de forma precoz la

presencia de lesiones tumorales, de displasia epitelial o conocer el grado de la misma[43]. A todos nuestros pacientes con leucoplasia verrugosa proliferativa se les realizó una media de 7 biopsias a lo largo del seguimiento, con un rango de 2 a 12 biopsias. Estos resultados coincidían con los del estudio de Alkan y cols.[49] cuya media de biopsias fue de 7,1 (rango 3 – 15) en su cohorte de 35 pacientes. Medias ligeramente inferiores han sido publicadas en otros estudios[14][26][170], en comparación a las descritas originalmente por Hansen y cols.[10]. Pese a no encontrar diferencias estadísticas entre nuestros pacientes con LVP que transformaron o no en cáncer, el grupo LVP – COCE presentaba una mayor media de número de biopsias realizadas (8,63 ± 2,26); si bien volvemos a insistir en el número reducido de pacientes incluidos en cada grupo. Estos resultados son concordantes con lo publicado en la literatura científica[14][15][185], ya que, como se ha comentado anteriormente, a los pacientes con LVP que han desarrollado carcinomas orales se les ha seguido durante un mayor periodo de tiempo y por lo tanto se les ha hecho más cantidad de biopsias a lo largo de su seguimiento.

7. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Las recidivas tumorales fueron similares en ambos grupos oncológicos evaluados. Sin embargo, las metástasis a distancia y la muerte por la enfermedad fue ligeramente mayor en el grupo COCE convencional. En este sentido, se ha descrito que los carcinomas orales derivados de paciente con LVP presentan un pronóstico más favorable con menores tasas de recurrencias, de metástasis y de mortalidad[185][58], por lo que, presentan mejores tasas de supervivencia[58][18][44][163].

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en referencia a la presencia de segundos tumores primarios entre los grupos de pacientes oncológicos. Sin embargo, el 50% de pacientes del grupo LVP – COCE desarrollaron por lo menos un STP, cuya localización fue en la totalidad de pacientes en las encías. En nuestra serie publicada en 2019 obtuvimos resultados similares en nuestros 33 pacientes con STP[15], ya que fue común la afectación gingival en forma de eritroleucoplasias y en estadios iniciales. El carácter proliferativo o multifocal junto con las elevadas tasas de transformación maligna y desarrollo de STP son características distintivas de la LVP. Se han descrito prevalencias de desarrollo de STP en estos pacientes del 32 al 46%[15][18][21][29][38][185]. De la misma forma, se ha informado que a mayor tiempo seguimiento los pacientes presentan mayor riesgo de desarrollar STP[15].

En cuanto a la transformación maligna, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las LVP no cáncer y las leucoplasias homogéneas. El 42% de las LVP que inicialmente no presentaban antecedentes de cáncer oral ni lesiones clínicas sospechosas de malignidad desarrollaron por lo menos una transformación maligna en COCE. Como ya se ha comentado a lo largo de la tesis, basándonos en los datos publicados en la literatura científica, el riesgo de transformación maligna de los pacientes con LVP es muy alto[10][14][29][43][55][186]. Y en comparación con grupos control, los carcinomas en LVP tienen mayor predilección por el sexo femenino[19][21][49]. En otros estudios de casos controles que comparaban pacientes con LVP y leucoplasias orales, también encontraron tasas de transformación maligna significativamente mayores en el primer grupo[19][49][170][187][188]. Por ejemplo, en el estudio de Hanna y cols.[170] que comparaban a nivel molecular 29 pacientes en cada grupo, observaron que el 59% de las LVP y el 7% de las leucoplasias orales clásicas evolucionaron hacia la transformación maligna.

Uno de los principales factores que pueden afectar a las variaciones en las tasas de transformación maligna obtenidas es la baja calidad metodológica en el diseño de los estudios, así como la ausencia de unos criterios diagnósticos ampliamente aceptados y unos periodos de seguimiento adecuados[43][51][55]. Además, muchos estudios evalúan de forma retrospectiva el desarrollo de la malignización, por lo que, podría suponer un sesgo de selección para valorar las tasas de TM e identificar su verdadera frecuencia[43]. Muchos de los estudios sobre LVP, se han realizado en EEUU y Europa a diferencia de los estudios de leucoplasia y cáncer oral que se realizan en países como India, China o Pakistán. Una explicación podría ser que esta entidad no se relaciona con aspectos etiopatológicos conocidos para la leucoplasia y cáncer oral como son el betel quid, areca nut y tabaco[43][51]. Es más, a pesar de que en los resultados de los meta-análisis sobre la TM se observó una considerable heterogeneidad, cuando se realizó el análisis de subgrupos por países u continentes se encontró una mayor homogeneidad, por lo que el área geográfica podría considerarse como una fuente explicativa de la heterogeneidad[55].

8. INTERVALOS TEMPORALES.

El tiempo medio de seguimiento de los pacientes con LVP, indistintamente de la presencia de lesiones tumorales o no, fue mayor en comparación a las leucoplasias orales y los carcinomas convencionales. Es conocida la necesidad de realizar un estrecho y largo

seguimiento a estos pacientes para poder observar su comportamiento evolutivo hacia la multifocalidad, desarrollo de lesiones verrugosas y transformación maligna[1][10][83][186]. El tiempo medio de transformación maligna de los pacientes LVP – COCE incluidos fue de 9,21 ± 7,11 años. Estos resultados coinciden con algunas publicaciones mencionadas anteriormente y que informaron tasas de transformación maligna del 41%[15], 71%[29], 45%[30] y 100%[49] en un periodo medio de seguimiento de 6 a 8 años aproximadamente. Se ha demostrado que el aumento de la tasa de TM es proporcional a la duración del seguimiento, es decir, los pacientes que desarrollan carcinomas orales tienen un periodo de seguimiento más largo que aquellos que no lo hicieron[14][15][26][185][186]. Un aspecto que puede afectar en la publicación de los diferentes tiempos de seguimiento y evolución de estos pacientes, es la demora en su derivación a los centros de referencia hospitalarios, ya que, muchas veces los pacientes son remitidos en un estado avanzado de la enfermedad o sin la suficiente información de su evolución o pruebas complementarias realizadas[49], por lo que, resulta complejo cuantificar con total certeza el tiempo de evolución y seguimiento de estos pacientes.

A pesar de la gran tendencia de los pacientes con LVP a desarrollar carcinomas orales, segundos tumores primarios y recurrencias a lo largo de su seguimiento, los pacientes presentan lesiones menos agresivas, menos infiltrantes y como consecuencia menos metástasis a distancia, por lo que presentan un mejor pronóstico y tasas de supervivencia superiores a los carcinomas orales convencionales[18][59][60][44][163].

ESTUDIO EPIGENÓMICO.

Los carcinomas de cabeza y cuello forman un grupo heterogéneo de neoplasias malignas localizados en diferentes áreas del tracto aerodigestivo superior y que presentan diferentes factores de riesgo o características moleculares y distinto comportamiento clínico y respuesta a tratamientos[189][190][191]. De entre ellos, el carcinoma oral de células escamosas es uno de los tipos de cáncer más agresivos caracterizado por un mal pronóstico y altas tasas de metástasis y recurrencias locorregionales[69][71][72]. Desde hace años se ha discutido e hipotetizado que los cánceres de la cavidad oral presentan subentidades con diferencias clínicas, biológicas y evolutivas; como los carcinomas linguales, los carcinomas asociados al virus del papiloma humano o los carcinomas derivados de trastornos orales potencialmente malignos[1][192][193][194]. Es por ello que resulta razonable suponer que los carcinomas orales de células escamosas en pacientes con leucoplasia verrugosa proliferativa pueden representar un fenotipo diferenciado de COCE. Fenotipo que podría explicarse por una epigenética diferencial.

En la presente tesis realizamos un análisis epigenómico para caracterizar e investigar las diferencias moleculares entre carcinomas orales de células escamosas precedidos o no de LVP.

La metilación del ADN es el mecanismo epigenético desregulado más estudiado en el cáncer[120][123][195]. Desde un punto de vista químico, la metilación implica la adición de un grupo metilo al carbono 5 de los residuos de citosina en los dinucleótidos CpG que se encuentran agrupados principalmente en las llamadas islas CpG localizadas habitualmente dentro de los promotores de genes[195]. La metilación de ADN es uno de los mecanismos cruciales en la regulación de la expresión génica y, por tanto, de muchos procesos biológicos u enfermedades[130]. De hecho, se han descrito numerosas alteraciones en la metilación de ADN en el cáncer oral[146][148][156]. El silenciamiento de la expresión génica asociado a la metilación aberrante de ciertos promotores de genes puede ocurrir tanto en el inicio como en la progresión del cáncer[195]. Cuando iniciamos el proyecto de tesis, ya existía suficiente evidencia científica de la implicación de las alteraciones en la metilación de ADN en el cáncer[120][123][133], sin embargo, ha sido en 2022 cuando se ha reconocido de forma clara la implicación de la reprogramación epigenética en el cáncer según la última actualización de los sellos distintivos del cáncer publicada por el profesor Hanahan[79].

En los últimos años, la caracterización de los epigenomas ha sido posible gracias al desarrollo de tecnologías de alto rendimiento[126][131]. Existen varias plataformas con distintas metodologías para el estudio del epigenoma, algunas de las cuales requieren protocolos muy laboriosos y costosos[130][131].

1. PERFIL DE METILACIÓN GLOBAL (LVP – COCE vs COCE).

Para llevar a cabo el objetivo de la presente tesis, se empleó la plataforma Infinium 850K EPICMethylation que permite el estudio de unos 862.927 sitios CpGs distribuidos por todo el genoma que cubren el 99% de los genes y el 95% de islas CpG[166]. Distintos grupos de investigación han evaluado la solidez y validez de esta plataforma, desde su lanzamiento en 2016, para detectar alteraciones en el metiloma humano y han obtenido resultados con una alta reproducibilidad y confiabilidad[132][166].

Hasta la fecha, no hemos encontrado estudios que hayan evaluado las alteraciones del metiloma en pacientes con LVP que han desarrollado COCE. Del mismo modo, no hemos encontrado estudios que hayan empleado esta tecnología para la evaluación del epigenoma en muestras de tejido congelado de pacientes con COCE. Por lo que, según nuestro conocimiento, somos los primeros en estudiar el perfil de metilación global de carcinomas orales de células escamosas que presentan diferentes comportamientos evolutivos.

En una primera aproximación, los resultados del análisis de componentes principales no supervisado y del agrupamiento jerárquico no supervisado del mapa de calor de las 5.000 CpGs seleccionadas al azar no revelaron diferencias claras a nivel del perfil del metiloma entre ambos grupos de pacientes. Esto puede ser debido a que ambos grupos pertenecían a pacientes con carcinomas orales de células escamosas y por tanto su epigenoma no es tan diferencial. De hecho, sólo se esperarían diferencias globales y clasificadoras al realizar comparaciones entre muestras de cáncer y tejido sano intraindividual[159], cáncer y controles sanos interindividuales[196] o en enfermedades con mutaciones en las enzimas de ADN metiltransferasas que producirían un cambio global del perfil de metilación[120][197]. Por ejemplo, en el estudio de Jithesh y cols.[159] en el que compararon el metiloma de 43 muestras tisulares de COCE con su tejido sano emparejado adyacente y se identificaron dos grupos claramente separados según el perfil de metilación. Al igual que en el estudio de Milutin y cols.[196] realizado sobre muestras

citológicas de la mucosa oral mediante hisopos orales en el cual el metiloma permitió diferenciar de forma clara los tres grupos evaluados (carcinomas de cabeza y cuello (orofaringe y oral), enfermedad liquenoide oral y controles sanos). O el estudio de Simo-Riudalbas y cols.[197] dirigido por uno de mis codirectores en el que observaron que los pacientes con la enfermedad rara autosómica recesiva denominada Síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad de la región centromérica y anomalías faciales y que presentaban mutaciones en el gen DNMT3B mostraban una reducción global de la metilación de ADN en todos los cromosomas.

Además, cabe destacar que en nuestro análisis PCA tampoco observamos agrupaciones definidas en cada tipo de muestras tumorales, lo que puede reflejar aún más la heterogeneidad biológica de los carcinomas orales de células escamosas.

Con el fin de identificar firmas de metilación diferencial entre ambos grupos de pacientes, realizamos de forma paralela dos análisis bioestadísticos supervisados. A partir de ellos, hemos identificado 14 CpGs correspondientes a 10 genes en el análisis mediante el ajuste de modelos de regresión basada en rangos y 9 CpGs diferencialmente metiladas correspondientes a 6 genes en el modelo de regresión logística penalidad mediante *Elastic Net* que permitían la discriminación entre ambos grupos.

En una búsqueda bibliográfica de la literatura científica publicada sobre estos genes, hemos observado que su desregulación se ha asociado al desarrollo de diferentes tipos de cáncer, como cáncer de cérvix[198], cáncer hepatocelular[199], cáncer pulmonar[200], cáncer de próstata[201], cáncer cerebral[202], cáncer de vejiga[203] y cáncer renal[204]. Incluso se ha relacionado su desregulación en enfermedades neurodegenerativas[205] o como biomarcadores terapéuticos predictivos de mala respuesta a la radioterapia con cisplatino en el cáncer de cuello uterino localmente avanzado[206]. Así mismo, se ha descrito la participación de alguno de estos genes en procesos celulares importantes como la apoptosis (CASP7)[198], regulación transcripcional (ZNF777)[207] (ZNF433)[204] (DAXX)[208], degradación mitocondrial (PITRM1)[205] o biosíntesis de esteroides (CYP11A1)[201]. Por lo que, la desregulación de estos procesos podría favorecer la proliferación celular asociada al cáncer en nuestro modelo de estudio. Posiblemente la alteración de mecanismos apoptóticos podría favorecer la proliferación celular.

En cuanto al estado de la metilación aberrante de estos genes, se ha descrito que la metilación de la región promotora de BRD9 se asocia con una mayor supervivencia global y libre de progresión en cáncer de cérvix[206]. Por otra parte, se ha identificado que el gen NR2E1 está silenciado por mecanismos de hipermetilación en carcinomas hepatocelulares[199] y carcinomas pulmonares[200]. De la misma forma, se ha relacionado el aumento de metilación de CYP11A1 y el desarrollo de recurrencias del cáncer de próstata[201]. La hipermetilación de C18orf18, también conocido como LINC00526, se ha asociado con un mal pronóstico y supervivencia en el cáncer de vejiga[203]. Del mismo modo, se ha relacionado la hipermetilación de ZNF433 y su supresión génica con la progresión del carcinoma renal de células claras[204]. En la literatura también se ha identificado la metilación diferencial y sobreexpresión de DAXX en la progresión del leiomiosarcoma[209]. Como se puede observar, algunos de estos cambios en la metilación se han correlacionado con cambios de expresión génica en otros cánceres. Así mismo, esta desregulación está en concordancia con nuestros resultados de la regulación de la expresión génica tumoral mediada por metilación en COCE.

Se ha descrito que la expresión del gen ARL15 influye inversamente en los niveles de adiponectina circulante, por lo que se ha relacionado con un mayor riesgo y susceptibilidad al desarrollo de diabetes tipo II, cardiopatía coronaria e incluso artritis reumatoide[210][211][212]. Recientemente, un estudio bioinformático ha proporcionado la primera evidencia de que este gen puede regular la progresión y pronóstico del melanoma cutáneo y que su sobreexpresión se asocia con un pronóstico desfavorable[213]. FGD5 es un gen proangiogénico asociado a la progresión y angiogénesis tumoral. Se ha descrito a este gen como biomarcador pronóstico en cáncer de mama y cáncer gástrico[214][215][216]. En una cohorte noruega de 108 cánceres de mama metastásicos se observó que el 9,5% presentaba amplificación del gen FGD5. Este aumento del número de copias se asoció con una mayor proliferación tumoral y un peor pronóstico[214]. También se ha relacionado de forma significativa la mayor expresión de FGD5 con estadios avanzados en cáncer gástrico gracias a la inhibición de la ubiquinación del receptor del factor de crecimiento epidérmico que conlleva a la carcinogénesis y progresión tumoral[216]. Asimismo, se ha detectado en el cáncer de cérvix la implicación de la metilación aberrante de FGD5 en la carcinogénesis[217]. Recientemente en dos estudios genómicos se ha descubierto la mayor frecuencia de mutación del gen ZNF429 en el carcinoma tímico[218] y en la metástasis del cáncer de pulmón[219].

De forma interesante, a pesar del tamaño muestral y la potencia estadística limitada, hemos conseguido detectar con mayor robustez en nuestra población de estudio dos genes diferencialmente metilados (AGL y WRB) en ambos métodos de análisis bioinformáticos.

Por un lado, el gen AGL, también conocido como GDE, que participa en la degradación del glucógeno (glucogenolisis). Se han asociado mutaciones en AGL en diferentes grupos étnicos con la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo III, caracterizada por glucogenólisis irregular y acumulación anormal de glucógeno en el hígado[220][221][222]. También se ha descrito su papel como gen supresor tumoral en cáncer de vejiga y pulmón[223][224][225]. La pérdida de expresión se ha correlacionado con un mal pronóstico, crecimiento tumoral agresivo y unas altas tasas de mortalidad en el cáncer de vejiga, sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción[223][224]. Se cree que la pérdida de AGL conduce a la sobreexpresión de las enzimas SHMT2 y HAS2, lo que da como resultado un aumento de la síntesis de glicina y ácido hialurónico que conlleva a una mayor absorción y metabolismo de glucosa que promueve la rápida proliferación y crecimiento tumoral[223][224]. Según hemos podido corroborar, no se ha reportado en la literatura ninguna relación epigenética previa de este gen con alguna enfermedad.

Por otro lado, el gen WRB, proteína básica rica en triptófano, se encuentra localizado en la superficie del retículo endoplasmático en el cromosoma 21. Numerosos estudios han demostrado que la copia adicional del cromosoma 21 en el síndrome de Down afecta de manera diferencial los niveles de metilación del ADN en distintos sitios de dinucleótidos CpG y crea una desregulación transcripcional[226][227]. El gen WRB, que tiene impronta materna, se ha demostrado que presenta un patrón conservado de impronta con alelos maternos metilados en los casos de Síndrome de Down[226]. Así mismo, se ha replicado en varias cohortes la asociación significativa entre el estrabismo y el polimorfismo del gen WRB (rs2244352)[228][229]. Se cree que es posible que la herencia de la trisomía 21 aumente la expresión de WRB y contribuya a la esotropía, cuya incidencia además es mayor en pacientes con Síndrome de Down[228][229]. De igual manera que en el anterior gen, no existe literatura científica que asocie este gen con algún tipo de cáncer.

Teniendo en cuenta estos resultados, somos los primeros, en base a nuestro conocimiento, en relacionar la metilación aberrante de esos 16 genes como

biomarcadores relacionados con el pronóstico en el carcinoma oral de células escamosas. La identificación de biomarcadores de metilación en la carcinogénesis oral puede servir para la monitorización de TOPM como la LVP, para impulsar estrategias de cribado de detección precoz del COCE e incluso permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas[121]. Hasta la llegada de las técnicas "omicas", el estudio de la metilación del ADN en tejido tumoral se ha realizado sobre genes específicos. Gracias al desarrollo de tecnologías de alto rendimiento se ha podido comparar patrones de metilación globales de distintas enfermedades[126][127][230]. Según hemos podido comprobar, existen muy pocas publicaciones en la literatura científica que hayan realizado estudios epigenómicos sobre muestras de tejido congelado en pacientes con LVP[138] o COCE[146][150][156][158][159]. Cuatro de esos estudios emplearon versiones anteriores de la plataforma de microarray de metilación de Illumina[146][150][156][159], uno inmunoprecipitación de ADN metilado seguido de secuenciación (MeDIP-seq)[138] y otro seguido de análisis de arrays (MeDIP-Chip)[158]. A partir de estos estudios, se han obtenido perfiles de metilación diferencial entre carcinomas orales de células escamosas y tejidos sanos, lo que evidencia la implicación de vías epigenéticamente desreguladas en el cáncer oral[146][150][156][158][159]. Se han identificado firmas de metilación putativas en la diseminación extracapsular de las metástasis cervicales (DCC, CALCA, WT1) y en las recurrencias de COCE (MLLT6, MSH2, NOTCH4, PCGF4, TFPI2)[159]. Del mismo modo, se ha observado la metilación aberrante en promotores de genes silenciados implicados en las vías relacionadas con el cáncer WNT y MAPK[156]. En el estudio de Li y cols.[150], identificaron 34 CpG asociados a 29 genes capaces de diferenciar los distintos grupos, de los cuales la hipermetilación de FLT4, TFPI2, ASCL1 y KDR presentaron una especificidad del 100% y una sensibilidad superior al 70%. También identificaron 17 CpG de 15 genes capaces de detectar carcinomas orales en estadios tempranos, de los cuales FLT4, KDR y TFPI2 presentaron la mejor sensibilidad[150]. Adicionalmente, dos estudios realizaron la validación de sus resultados y reportaron diferencias estadísticamente significativas en la metilación aberrante de TNF, MAP3K14, RAS-GRF1[156] y FBLN1, ITIH5, RUNX3[158] en COCE en comparación a tejido sano. Por otro lado, Basu y cols.[146] describieron que en el desarrollo del COCE actuaban sinérgicamente dos mecanismos independientes de hipo e hipermetilación. La hipometilación se producía en promotores de genes implicados en la regulación de los linfocitos T que inducían a su sobreexpresión en el ambiente neoplásico. La ontología de genes y el estudio bioinformático mostró un enriquecimiento de promotores metilados implicados en vías de regulación inmunitaria, lo que confirmaba

que la metilación regulaba la respuesta inmunitaria en COCE[146]. En este mismo sentido, nuestro grupo describió, en el único estudio de metilación en muestras de tejido congelado en pacientes con LVP, que estos pacientes presentaban expresión diferencial de genes relacionados con la vigilancia inmunológica y en un posterior análisis integrador con la metilación encontramos cinco genes hipometilados y ocho hipermetilados, de los cuales CD8A y GATA3 estaban asociados con la respuesta inmune al tumor[102][138]. Siguiendo este mismo enfoque, recientemente en estudios de expresión génica inmunológica se ha reportado una alta densidad de células TCD8+[170][231], T reguladoras (Treg) y PD-L1 en LVP en comparación con leucoplasias orales clásicas[170].

Ninguna de las 21 CpG correspondientes a 14 genes identificadas en nuestro estudio coincidieron con los resultados de los trabajos previamente discutidos sobre el metiloma en muestras tisulares de COCE. Esto podría explicarse por el hecho de que ningún estudio ha evaluado este perfil en pacientes con lesiones tumorales y antecedentes de LVP. También debido a la heterogeneidad tumoral descrita en los carcinomas orales o al empleo de distintas plataformas en la evaluación del perfil de metilación.

2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE DATOS DE EXPRESIÓN Y METILACIÓN.

Con el fin de aumentar la potencia estadística de nuestro estudio[232], realizamos un análisis integrador del perfil transcripcional y del metiloma. Para ello evaluamos el estado de metilación de las 427 CpGs localizadas en los promotores de los 133 genes expresados diferencialmente con el propósito de explorar su regulación. Finalmente, identificamos una firma de metilación diferencial de 37 CpGs correspondientes a 26 genes que son capaces de discriminar los diferentes grupos de pacientes. Desafortunadamente, ninguna de las CpGs analizadas únicamente mediante la metilación global aparecen en las CpGs de los genes expresados diferencialmente, esto podría explicarse por los distintos enfoques estadísticos empleados al evaluar en el estado de metilación global 842.179 CpGs y en el análisis integrador sólo 472 CpGs.

La regulación de la expresión génica es compleja y se realiza a través de diversos mecanismos, algunos de los más estudiados son la remodelación de la estructura de la cromatina (modulado por factores de transcripción junto con histonas), la regulación epigenética o la regulación mediada por microRNA o el imprinting genómico[122][233].

Alteraciones en la regulación de la expresión génica puede contribuir al desarrollo de cáncer u otras enfermedades[123][233]. Numerosos estudios han propuesto que la marca epigenética de la metilación de ADN juega un papel importante en la regulación de la expresión génica en el cáncer[120][121][131][234]. En la presente tesis observamos que cerca del 20% de los genes expresados diferencialmente (26 de 133) estarían potencialmente regulados por metilación. Así mismo, de forma interesante, en el perfil del metiloma de los pacientes con LVP – COCE observamos que 28 de los 37 CpG (76%) se localizaban en islas o playas CpG, que son regiones de alta densidad de CpG que desempeñan un papel fundamental en la regulación transcripcional[81][122][235]. De hecho, las islas CpG se encuentran en más del 70% de los promotores de genes humanos y normalmente se encuentran libres de metilación, por lo que, la presencia de metilación *de novo* en ciertos promotores de genes se ha relacionado con el desarrollo de cáncer[122][235]. Resultados similares encontramos en nuestro análisis del perfil de metilación global, tanto en el análisis de regresión basado en rangos como en la regresión logística penalizada, en los que encontramos que respectivamente el 86% y el 78% de las CpGs se localizaban en islas o playas CpG. En un estudio previo de metilación global realizado por nuestro grupo sobre diez pacientes con LVP en comparación a controles sanos, también encontramos que el 86% de las regiones metiladas diferencialmente se localizaban en islas CpGs[138]. Del mismo modo, en el estudio de Basu y cols.[146], el 70% de las sondas metiladas diferencialmente en COCE se localizaban en islas CpG. Además, estos autores describieron que la hipermetilación se localizaba específicamente en las islas y playas CpG, mientras que la hipometilación se localizaba en mar abierto, lo que sugería que dos mecanismos independientes de hipo e hipermetilación podían actuar en el desarrollo de COCE[146].

En nuestro estudio también observamos que en 29 de las 37 CpGs (78%) presentaban un estado de hipermetilación en el grupo LVP – COCE. Estos resultados están en concordancia con estudios previos de epigenética, ya que, se ha descrito la hipermetilación de islas CpG asociadas a genes supresores tumorales o reguladores del desarrollo como una de las características claves del silenciamiento génico de células cancerosas[81][128][236]. Es decir, la hipermetilación de promotores de genes podría conducir a la regulación a la baja de genes supresores tumorales. De hecho, se ha considerado a genes hipermetilados como buenos candidatos a biomarcadores pronóstico del cáncer que se produce tanto en etapas tempranas como en la progresión

tumoral[121][128][236].

Para reducir el riesgo de interferencia de variables que pudieran afectar el estado de metilación, implementamos unos criterios de inclusión y exclusión estrictos. Es por ello que la mayoría de pacientes incluidos no eran fumadores, ya que la exposición al tabaco se ha asociado con cambios en la metilación de ADN, pero según la evidencia disponible, una de las particularidades de la LVP es la ausencia de asociación etiopatogénica con el tabaco[1][14][38][43]. Por lo que alteraciones en el estado de metilación de estos pacientes no se relacionarían con la exposición al tabaco.

Al realizar una búsqueda bibliográfica de los genes cuya firma de metilación diferencial nos ha permitido diferenciar ambos grupos de pacientes, encontramos que once de estos genes ya se habían descrito en COCE. Por ejemplo, la metilación de los promotores DKK4[237] y SMPD3[238] se ha correlacionado con el grado tumoral[237] y la regulación a la baja[238] en COCE. En otro estudio no se observó la implicación del polimorfismo del promotor de SLC6A4 en el riesgo de COCE[239]. El gen ABO codifica las proteínas del primer sistema de grupos sanguíneo descubierto. El papel de los grupos sanguíneos y el riesgo de COCE es un tema controvertido, ya que, en un estudio realizado sobre 30 carcinomas orales y zonas displásicas adyacentes se relacionó la hipermetilación del promotor y la pérdida de expresión del antígeno A/B como un evento temprano de la carcinogénesis[240]. Sin embargo, Verma y cols.[241] informaron que los pacientes A+ presentaban un mayor riesgo de desarrollar COCE, mientras que otros autores concluyeron que presentaban mayor susceptibilidad genética los B+ y O+ que tenían hábitos de masticación de tabaco[242]. En un estudio de expresión de genes implicados en el metabolismo antioxidante se concluyó que GPX3 estaba regulado a la baja en COCE[243]. Por otro lado, Lee y cols.[244] identificaron a GPX3 como un gen supresor tumoral potencialmente silenciado por metilación relacionado con la exposición al tabaco. La desregulación a la baja de CLCN1 se ha descrito como biomarcador pronóstico de mala supervivencia en COCE[245]. En una investigación de expresión diferencial de genes relacionados con la autofagia se identificó la regulación a la baja de NKX2-3 como un potencial biomarcador en COCE[246] y el silenciamiento del gen NKX2-3 por metilación en COCE así como su implicación en la transformación maligna de las leucoplasias orales[149]. En otro análisis de expresión diferencial se informó que KRT3 podría emplearse como un biomarcador de diagnóstico y seguimiento en leucoplasias orales[247]. Lin y cols.[248] publicaron que la expresión de BARX2 se reguló a la baja en

COCE, sobre todo en tumores avanzados con metástasis ganglionares, y que su regulación epigenética es mediada por miR-187. De manera similar, en dos estudios transcriptómicos destacaron que PPAP2B se reguló a la baja en los tejidos tumorales de COCE y que su expresión se correlacionó negativamente con el tamaño tumoral[249] y que la sobreexpresión de NCLN se correlacionó de forma significativa con la presencia de bacterias patógenas asociadas con la inflamación crónica en COCE[250].

En algunos de los genes anteriormente nombrados no se han descrito alteraciones en el estado de metilación en COCE. Sin embargo, se han relacionado con otras enfermedades como la metilación del promotor de SLC6A4 en el estrés, la depresión y el agotamiento[251] o la hipermetilación del promotor de BARX2 y la correlación con su expresión a la baja en cáncer gástrico[252]. Por otro lado, en los genes CLCN1, KRT3, PPAP2B y NCLN no se ha registrado en la literatura ninguna regulación epigenética previa en estos genes.

También encontramos que 17 CpG correspondientes a 13 genes habían sido previamente identificados con valor pronóstico en otros tipos de cáncer. Por ejemplo, el estado de metilación diferencial de VSIG2 ha permitido predecir la supervivencia global del cáncer de páncreas[253] y del adenocarcinoma de pulmón[254] y su expresión se ha utilizado como biomarcador pronóstico para la leucemia mieloide aguda[255]. La sobreexpresión de TMPRSS11B[256] y GALNT5[257] se ha asociado con una peor supervivencia en el cáncer de pulmón[256] y en el colangiocarcinoma[257], respectivamente. Se ha descrito que GALNT5 promueve la progresión tumoral a través del proceso de transición epitelial mesenquimatoso y de la activación de la señalización de AKT/ERK[257]. Además, su expresión al alza se ha propuesto como biomarcador candidato para la tumorigénesis del hepatoblastoma[258]. En un estudio del metiloma completo en pacientes con cáncer de próstata, se identificó la hipermetilación de ZNF215 como un biomarcador pronóstico independiente[259]. Asimismo, se ha informado su sobreexpresión como un biomarcador de diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama de tipo basal[260]. El papel del gen SLC46A2, también denominado TSCOT, en el cáncer no está del todo claro, ya que, su expresión se ha encontrado disminuida en el cáncer de pulmón[261] pero parece estar implicada en la predisposición genética al cáncer de cérvix[262]. En un reciente meta - análisis, se identificó a DBNDD1 como un nuevo gen putativo de susceptibilidad al melanoma[263]. En un estudio transcripcional se ha propuesto a ACAA2 como un biomarcador pronóstico en los gliomas de bajo grado[264].

En una publicación reciente, se ha relacionado la expresión de SLC25A42 con el nivel de infiltración de células presentadoras de antígenos, por lo que podría tratarse como una diana terapéutica para la inmunoterapia en adenocarcinomas pulmonares[265]. Se ha identificado la sobreexpresión del gen relacionado con el metabolismo COX7B2 en pacientes con carcinoma hepatocelular[266]. Además, un polimorfismo raro de este gen se ha relacionado con el carcinoma nasofaríngeo familiar[267]. El gen RCL1 ha mostrado un gran potencial para predecir la supervivencia global y libre de enfermedad de los pacientes con carcinoma hepatocelular[268] y predecir de forma independiente el pronóstico del cáncer de mama[269]. La sobreexpresión del oncogen LINC00624 se ha asociado con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de próstata[270] y en pacientes con cáncer de hígado[271]. De igual forma, el aumento de la expresión de HIST1H1C se ha relacionado con peor pronóstico y malos resultados clínicos en el carcinosarcoma uterino[272] y con una mala supervivencia y estadios avanzados en el carcinoma suprarrenal cortical[273]. Recientemente, se ha relacionado la supresión de la expresión de SLC51A mediada por la sobreexpresión de miR-382-5p en la progresión del carcinoma hepatocelular[274]. Por lo tanto, la metilación diferencial de estos genes también se podría relacionar con la progresión tumoral del COCE. Por otro lado, no hemos encontrado en la literatura ninguna implicación de los genes TMEM88B y HIBADH en algún tipo de cáncer.

Todos estos hallazgos evidencian las diferencias a nivel molecular entre los pacientes con LVP – COCE y los COCE convencionales y respaldan la hipótesis de que la clasificación de subtipos definidos molecularmente en carcinomas de cabeza y cuello podría mejorar el desarrollo terapéutico y seguimiento adecuado de los pacientes[191]. De igual forma se respalda la hipótesis de que la desregulación del metiloma es un sello distintivo de las células cancerígenas[79].

La estratificación del riesgo de transformación maligna de las leucoplasias orales no es un proceso simple y requiere de la integración de factores predictivos como características clínicas, localización, tamaño, asociación de hábitos tóxicos o presencia de multifocalidad o displasia epitelial[50][275]. La evaluación en el resultado histopatológico de la displasia epitelial se considera el "estándar de oro" para estratificar el riesgo de progresión a cáncer y orientar el tratamiento de las leucoplasias, sin embargo, es un método subjetivo con bajos niveles de concordancia intra e inter observador[41][50][275]. Por lo que, identificar qué pacientes tienen mayor riesgo de

recurrencias o progresión hacia la transformación maligna no es sencillo con estas herramientas. Es por ello, que podría resultar útil el desarrollo de biomarcadores moleculares que impulsen el inicio y la progresión de los carcinomas orales de células escamosas. En este sentido, en la presente tesis, hemos identificado firmas de metilación diferencial capaces de discriminar los dos fenotipos de carcinomas orales de células escamosas. Para ser exactos, se identificaron 26 genes cuya metilación aberrante se podría emplear como potenciales biomarcadores pronóstico de COCE en pacientes con LVP.

Este estudio del metiloma es el más extenso y detallado que se haya hecho en pacientes con carcinomas orales precedidos de LVP. Hasta donde sabemos, somos los primeros en estudiar las diferencias a nivel molecular de los carcinomas orales en pacientes con LVP. Es tentador hipotetizar que el fenómeno epigenético que subyace a la evolución de la LVP podría ser la responsable del mejor pronóstico evolutivo de estos pacientes. Además, nuestros resultados podrían ayudar en un futuro a desarrollar terapias epigeneticas para revertir los cambios aberrantes de metilación en los pacientes con LVP. De hecho, el uso de terapias epigenéticas se ha convertido en una estrategia emergente y prometedora en el tratamiento de algunos cánceres[121][276] gracias al desarrollo de fármacos inhibidores de metiltransferasas o agentes desmetilantes para restaurar la reexpresión y la función normal de los genes supresores de tumores.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Aunque estos resultados son preliminares, respaldan investigaciones anteriores que señalan la importancia de las alteraciones epigenéticas en el cáncer oral y el valor de los biomarcadores de metilación de ADN en el pronóstico de los pacientes con COCE. También es cierto que es necesario la validación de nuestros resultados en cohortes de pacientes con LVP-COCE más grandes y en estudios multicéntricos. Así mismo, se podría evaluar el estado de metilación en cohortes de pacientes con LVP previamente al desarrollo de la malignización.

Hemos planteado las bases moleculares epigenómicas en pacientes con LVP. A partir de esto, hay que continuar investigando las implicaciones de los biomarcadores de metilación de ADN en la LVP comparándolo con los demás grupos. Al ampliar el número de pacientes, también se podría realizar correlaciones entre los perfiles de metilación y las características clínico - patológicas. Del mismo modo, se podrían emplear para el estudio del metiloma muestras biológicas obtenidas mediante técnicas no invasivas como la saliva.

Por último, se podría profundizar en los mecanismos subyacentes de regulación epigenética de estos genes mediante tratamientos en cultivos celulares para conocer completamente la implicación de estas alteraciones en el carcinoma oral de células escamosas.

7. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados confirmaron que la leucoplasia verrugosa proliferativa (LVP) es una enfermedad diferenciada e independiente de las leucoplasias orales (LO) clásicas. Las lesiones tumorales de los pacientes con LVP presentaron una mayor variedad de formas clínicas, menores niveles de profundidad de invasión tumoral y menor presencia de invasión perineural que los carcinomas orales de células escamosas (COCE) convencionales sin antecedentes de LVP. Así mismo, los pacientes con LVP presentaron mayores tasas de transformación maligna y recurrencias en comparación a las leucoplasias orales clásicas.

2. Los carcinomas orales de células escamosas en pacientes con LVP presentaron un mejor pronóstico en comparación a los carcinomas orales convencionales debido a su menor agresividad.

3. El análisis no supervisado de los perfiles de metilación global no permitió diferenciar los carcinomas orales de células escamosas según estuvieran precedidos o no de LVP. Sin embargo, los dos análisis de metilación diferencial supervisados confirmaron la existencia de dos fenotipos de carcinomas orales de células escamosas distintos. Se identificaron a los genes AGL y WRB como potenciales biomarcadores de pronóstico.

4. El análisis integrativo de datos transcriptómicos y metilómicos en los pacientes con LVP – COCE también permitió diferenciarlos de los carcinomas orales de células escamosas convencionales. Se determinó que el 20% de los 133 genes expresados diferencialmente entre los dos grupos de pacientes oncológicos se regulaban potencialmente por metilación.

5. Finalmente, se identificó una firma epigenética de metilación diferencial compuesta por 37 CpGs asociadas a 26 genes que son capaces de discriminar los dos fenotipos diferentes de carcinomas orales.

8. BIBLIOGRAFÍA

1) Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, Lodi G, Mello FW, Monteiro L, Ogden GR, Sloan P, Johnson NW. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. Oral Dis. 2020; 00: 1 – 19.

2) Mello FW, Miguel AFP, Dutra KL, Porporatti AL, Warnakulasuriya S, Guerra ENS, Rivero ERC. Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. J Oral Pathol Med. 2018; 47: 633 - 40.

3) Warnakulasuriya S. Oral potentially malignant disorders: A comprehensive review on clinical aspects and management. Oral Oncol. 2020; 102: 104550.

4) Liu W, Wu L, Zhang Y, Shi L, Yang X. Bibliometric analysis of research trends and characteristics of oral potentially malignant disorders. Clin Oral Investig. 2020; 24: 447 - 54.

5) van der Waal I. Historical perspective and nomenclature of potentially malignant or potentially premalignant oral epithelial lesions with emphasis on leukoplakia-some suggestions for modifications. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2018; 125: 577 - 81.

6) Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med. 2007; 36: 575 - 80.

7) Rubert A, Bagán L, Bagán JV. Oral leukoplakia, a clinical-histopathological study in 412 patients. J Clin Exp Dent. 2020;12: e540 - 6.

8) Muthukrishnan A, Warnakulasuriya S. Oral health consequences of smokeless tobacco use. Indian J Med Res. 2018; 148: 35 - 40.

9) Villa A, Woo SB. Leukoplakia - A diagnostic and management algorithm. J Oral Maxillofac Surg. 2017; 75: 723 - 34.

10) Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1985; 60: 285 - 98.

11) Fettig A, Pogrel MA, Silverman S Jr, Bramanti TE, Da Costa M, Regezi JA. Proliferative verrucous leukoplakia of the gingiva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000; 90: 723 - 30.

12) Cabay RJ, Morton TH Jr, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. J Oral Pathol Med. 2007; 36: 255 - 61.

13) Aguirre-Urizar. Proliferative multifocal leukoplakia better name that proliferative verrucous leukoplakia. World J Surg Oncol. 2011; 9: 122.

14) Villa A, Menon RS, Kerr AR, de Abreu-Alves F, Guollo A, Ojeda D, Woo SB. Proliferative leukoplakia: Proposed new clinical diagnostic criteria. Oral Dis. 2018; 24: 749 – 760.

15) Bagan J, Murillo-Cortes J, Poveda-Roda R, Leopoldo-Rodado M, Bagan L. Second primary tumors in proliferative verrucous leukoplakia: A series of 33 cases. Clin Oral Investig. 2020; 24: 1963 – 9.

16) Thomson PJ, Goodson ML, Smith DR. Potentially malignant disorders revisited-The lichenoid lesion/proliferative verrucous leukoplakia conundrum. J Oral Pathol Med. 2018; 47: 557 - 65.

17) Ramasamy J, Sivapathasundharam B. A study on oral mucosal changes among tobacco users. J Oral Maxillofac Pathol. 2021; 25: 470 – 7.

18) Favia G, Capodiferro S, Limongelli L, Tempesta A, Maiorano E. Malignant transformation of oral proliferative verrucous leukoplakia: a series of 48 patients with suggestions for management. Int J Oral Maxillofac Surg. 2021; 50: 14 - 20.

19) Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, Capra G, Colella G, Di Liberto C, Gandolfo S, Pentenero M, Carrozzo M, Serpico R, D'Angelo M. Proliferative verrucous vs conventional leukoplakia: no significantly increased risk of HPV infection. Oral Oncol. 2004; 40: 835 - 40.

20) Borgna SC, Clarke PT, Schache AG, Lowe D, Ho MW, McCarthy CE, Adair S, Field EA, Field JK, Holt D, Risk JM, Rajlawat BP, Triantafyllou A, Shaw RJ. Management

of proliferative verrucous leukoplakia: Justification for a conservative approach. Head Neck. 2017; 39: 1997 - 2003.

21) Gandolfo S, Castellani R, Pentenero M. Proliferative verrucous leukoplakia: a potentially malignant disorder involving periodontal sites. J Periodontol. 2009; 80: 274 - 81.

22) Palefsky JM, Silverman S Jr, Abdel-Salaam M, Daniels TE, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. J Oral Pathol Med. 1995; 24: 193 - 7.

23) Gopalakrishnan R, Weghorst CM, Lehman TA, Calvert RJ, Bijur G, Sabourin CL, Mallery SR, Schuller DE, Stoner GD. Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997; 83: 471 - 7.

24) Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Gavaldá C, Poveda R, Scully C, Alberola TM, Torres-Puente M, Pérez-Alonso M. Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. J Oral Maxillofac Surg. 2007; 65: 46 - 9.

25) García-López R, Moya A, Bagan JV, Pérez-Brocal V. Retrospective case-control study of viral pathogen screening in proliferative verrucous leukoplakia lesions. Clin Otolaryngol. 2014; 39: 272 - 80.

26) Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Islam MN, Bhattacharyya I, Cohen DM. A retrospective 20-year analysis of proliferative verrucous leukoplakia and its progression to malignancy and association with high-risk human papillomavirus. Head Neck Pathol. 2018; 12: 500 - 10.

27) Bagan JV, Jiménez Y, Murillo J, Poveda R, Díaz JM, Gavaldá C, Margaix M, Scully C, Alberola TM, Torres Puente M, Pérez Alonso M. Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008; 13: E110 - 3.

28) Bagan L, Ocete-Monchon MD, Leopoldo-Rodado M, Murillo-Cortes J, Díaz-Fernández JM, Medina-Gonzalez R, Gimeno-Cardona C, Bagan JV. Prevalence of

salivary Epstein-Barr virus in potentially malignant oral disorders and oral squamous cell carcinoma. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2016; 21: e157 - 60.

29) Silverman S Jr, Gorsky M. Proliferative verrucous leukoplakia: a follow-up study of 54 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997; 84: 154 - 7.

30) Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Islam MN, Bhattacharyya I, Narayana N, Cohen DM. Marginal linear gingival leukoplakia progressing to "ring around the collar"-An ominous sign of proliferative verrucous leukoplakia. J Periodontol. 2021; 92: 273 - 85.

31) McParland H, Warnakulasuriya S. Lichenoid morphology could be an early feature of oral proliferative verrucous leukoplakia. J Oral Pathol Med. 2021; 50: 229 - 35.

32) Mete O, Keskin Y, Hafiz G, Kayhan KB, Unur M. Oral proliferative verrucous leukoplakia: Underdiagnosed oral precursor lesion that requires retrospective clinicopathological correlation. Dermatol Online J. 2010; 16: 6.

33) Lopes MA, Feio P, Santos-Silva AR, Vargas PA. Proliferative verrucous leukoplakia may initially mimic lichenoid reactions. World J Clin Cases. 2015; 3: 861 - 3.

34) Müller S. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2018; 125: 591 - 602.

35) Garcia-Pola MJ, Llorente-Pendás S, González-Garcia M, García-Martín JM. The development of proliferative verrucous leukoplakia in oral lichen planus. A preliminary study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2016; 21: e328 - 34.

36) Bagan L, Sáez GT, Tormos MC, Labaig-Rueda C, Murillo-Cortes J, Bagan JV. Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. Clin Oral Investig. 2016; 20: 737 - 43.

37) Bagan J, Murillo-Cortes J, Leopoldo-Rodado M, Sanchis-Bielsa JM, Bagan L. Oral cancer on the gingiva in patients with proliferative leukoplakia: A study of 30 cases. J Periodontol. 2019; 90: 1142 - 8.

38) Bagan JV, Jiménez-Soriano Y, Diaz-Fernandez JM, Murillo-Cortés J, Sanchis-Bielsa

JM, Poveda-Roda R, Bagan L. Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: a series of 55 cases. Oral Oncol. 2011; 47: 732 - 5.

39) Batsakis JG, Suarez P, el-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. Oral Oncol. 1999; 35: 354 - 9.

40) Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Cohen DM, Bilodeau EA, Bhattacharyya I, Lewis JS Jr, Lai J, Wright JM, Bishop JA, Leon ME, Islam MN, Seethala R, Padilla RJ, Carlos R, Müller S, Thompson LDR. Inter-observer variability in the diagnosis of proliferative verrucous leukoplakia: Clinical implications for oral and maxillofacial surgeon understanding: A collaborative pilot study. Head Neck Pathol. 2020; 14: 156 - 65.

41) Woo SB. Oral epithelial dysplasia and premalignancy. Head Neck Pathol. 2019; 13: 423 - 39.

42) Li CC, Almazrooa S, Carvo I, Salcines A, Woo SB. Architectural alterations in oral epithelial dysplasia are similar in unifocal and proliferative leukoplakia. Head Neck Pathol. 2021; 15: 443 - 60.

43) Lafuente Ibáñez de Mendoza I, Lorenzo Pouso AI, Aguirre Urízar JM, Barba Montero C, Blanco Carrión A, Gándara Vila P, Pérez Sayáns M. Malignant development of proliferative verrucous/multifocal leukoplakia: A critical systematic review, meta-analysis and proposal of diagnostic criteria. J Oral Pathol Med. 2022; 51: 30 - 8.

44) Thompson LDR, Fitzpatrick SG, Müller S, Eisenberg E, Upadhyaya JD, Lingen MW, Vigneswaran N, Woo SB, Bhattacharyya I, Bilodeau EA, Carlos R, Islam MN, Leon ME, Lewis JS Jr, Magliocca KR, Mani H, Mehrad M, Purgina B, Richardson M, Wenig BM, Cohen DM. Proliferative verrucous leukoplakia: An expert consensus guideline for standardized assessment and reporting. Head Neck Pathol. 2021; 15: 572 - 87.

45) Ghosh S, Rao RS, Upadhyay MK, Kumari K, Sanketh DS, Raj AT, Parveen S, Alhazmi YA, Jethlia A, Mushtaq S, Sarode S, Reda R, Patil S, Testarelli L. Proliferative verrucous leukoplakia revisited: A retrospective clinicopathological study. Clin Pract. 2021; 11: 337 - 46.

46) Cerero-Lapiedra R, Baladé-Martínez D, Moreno-López LA, Esparza-Gómez G, Bagán JV. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010; 15: e839 - 45.

47) Carrard VC, Brouns ER, van der Waal I. Proliferative verrucous leukoplakia; a critical appraisal of the diagnostic criteria. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013; 18: e411 - 3.

48) González-Moles MÁ, Ramos-García P, Warnakulasuriya S. A scoping review on gaps in the diagnostic criteria for proliferative verrucous leukoplakia: A conceptual proposal and diagnostic evidence-based criteria. Cancers (Basel). 2021; 13: 3669.

49) Alkan U, Bachar G, Nachalon Y, Zlotogorsky A, Gal Levin E, Kaplan I. Proliferative verrucous leukoplakia: a clinicopathological comparative study. Int J Oral Maxillofac Surg. 2022: S0901-5027(22)00004 – 2. Online ahead of print.

50) Kerr AR, Lodi G. Management of oral potentially malignant disorders. Oral Dis. 2021; 27: 2008 - 25.

51) Proaño-Haro A, Bagan L, Bagan JV. Recurrences following treatment of proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review and meta-analysis. J Oral Pathol Med. 2021; 50: 820 - 8.

52) Aguirre-Urizar JM, Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral leukoplakia: Systematic review and meta-analysis of the last 5 years. Oral Dis. 2021; 27: 1881 - 95.

53) González-Moles MÁ, Ramos-García P, Warnakulasuriya S. An appraisal of highest quality studies reporting malignant transformation of oral lichen planus based on a systematic review. Oral Dis. 2021; 27: 1908 - 18.

54) Kujan O, Mello FW, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral submucous fibrosis: A systematic review and meta-analysis. Oral Dis. 2021; 27: 1936 - 46.

55) Ramos-García P, González-Moles MÁ, Mello FW, Bagan JV, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral proliferative verrucous leukoplakia: A systematic

review and meta-analysis. Oral Dis. 2021; 27: 1896 - 907.

56) Palaia G, Bellisario A, Pampena R, Pippi R, Romeo U. Oral proliferative verrucous leukoplakia: progression to malignancy and clinical implications. Systematic review and meta-analysis. Cancers (Basel). 2021; 13: 4085.

57) Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J, Scully C. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2003; 32: 379 - 82.

58) González-Moles MÁ, Warnakulasuriya S, Ramos-García P. Prognosis parameters of oral carcinomas developed in proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review and meta- analysis. Cancers. 2021; 13: 4843.

59) Faustino ISP, de Pauli Paglioni M, de Almeida Mariz BAL, Normando AGC, Pérez-de-Oliveira ME, Georgaki M, Nikitakis NG, Vargas PA, Santos-Silva AR, Lopes MA. Prognostic outcomes of oral squamous cell carcinoma derived from proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review. Oral Dis. 2022. doi: 10.1111/odi.14171. Epub ahead of print.

60) Akrish S, Ben-Izhak O, Sabo E, Rachmiel A. Oral squamous cell carcinoma associated with proliferative verrucous leukoplakia compared with conventional squamous cell carcinoma--a clinical, histologic and immunohistochemical study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2015; 119: 318 - 25.

61) Akrish SJ, Rachmiel A, Sabo E, Vered M, Ben-Izhak O. Cancer-associated fibroblasts are an infrequent finding in the microenvironment of proliferative verrucous leukoplakia-associated squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2017; 46: 353 - 8.

62) Bagán JV, Murillo J, Poveda R, Gavaldá C, Jiménez Y, Scully C. Proliferative verrucous leukoplakia: unusual locations of oral squamous cell carcinomas, and field cancerization as shown by the appearance of multiple OSCCs. Oral Oncol. 2004; 40: 440 - 3.

63) Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous cell carcinoma: Clinical implications of multicentric origins. Cancer. 1953;

6: 963 – 8.

64) Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. Cancer Res. 2003; 63: 1727 – 30.

65) Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2015; 51: 643 – 51.

66) Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021; 71: 209 - 49.

67) Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, Wangdale KV, Behera SK, Kurrey NK, Kalia K, Mandoli A. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. Oral Oncol. 2021; 121: 105451.

68) de Morais EF, Mafra RP, Gonzaga AKG, de Souza DLB, Pinto LP, da Silveira ÉJD. Prognostic factors of oral squamous cell carcinoma in young patients: A systematic review. J Oral Maxillofac Surg. 2017; 75: 1555 - 66.

69) Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. Oral Oncol. 2010; 46: 414 - 7.

70) Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual (8th edition).* Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017.

71) Lee DS, Ramirez RJ, Lee JJ, Valenzuela CV, Zevallos JP, Mazul AL, Puram SV, Doering MM, Pipkorn P, Jackson RS. Survival of young versus old patients with oral cavity squamous cell carcinoma: A meta-Analysis. Laryngoscope. 2021; 131: 1310 - 19.

72) Gigliotti J, Madathil S, Makhoul N. Delays in oral cavity cancer. Int J Oral Maxillofac Surg. 2019; 48: 1131 - 7.

73) Mitchell DA, Kanatas A, Murphy C, Chengot P, Smith AB, Ong TK. Margins and survival in oral cancer. Br J Oral Maxillofac Surg. 2018; 56: 820 - 9.

74) Zanoni DK, Montero PH, Migliacci JC, Shah JP, Wong RJ, Ganly I, Patel SG. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015). Oral Oncol. 2019; 90: 115 – 21

75) Liu SA, Wong YK, Lin JC, Poon CK, Tung KC, Tsai WC. Impact of recurrence interval on survival of oral cavity squamous cell carcinoma patients after local relapse. Otolaryngol Head Neck Surg. 2007; 136: 112 - 8.

76) Mücke T, Wagenpfeil S, Kesting MR, Hölzle F, Wolff KD. Recurrence interval affects survival after local relapse of oral cancer. Oral Oncol. 2009; 45: 687 - 91.

77) van der Waal I, de Bree R. Second primary tumours in oral cancer. Oral Oncol. 2010; 46: 426 - 8.

78) Sumioka S, Sawai NY, Kishino M, Ishihama K, Minami M, Okura M. Risk factors for distant metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. J Oral Maxillofac Surg. 2013; 71: 1291 - 7.

79) Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions. Cancer Discov. 2022; 12: 31 - 46.

80) Nikitakis NG, Pentenero M, Georgaki M, Poh CF, Peterson DE, Edwards P, Lingen M, Sauk JJ. Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2018; 125: 650 - 69.

81) Hsu PJ, Yan K, Shi H, Izumchenko E, Agrawal N. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2020; 102: 104552.

82) Lingen MW, Pinto A, Mendes RA, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne WM, Partridge M, Peterson DE, Woo SB. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. Oral Dis. 2011; 17: 7 - 22.

83) Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13: 51 - 61.

84) Chen SH, Hsiao SY, Chang KY, Chang JY. New insights into oral squamous cell carcinoma: from clinical aspects to molecular tumorigenesis. Int J Mol Sci. 2021; 22: 2252.

85) Vallina C, López-Pintor RM, González-Serrano J, de Vicente JC, Hernández G, Lorz C. Genes involved in the epithelial-mesenchymal transition in oral cancer: A systematic review. Oral Oncol. 2021; 117: 105310.

86) Ramos-García P, González-Moles MÁ, Warnakulasuriya S. Significance of p53 overexpression in the prediction of the malignant transformation risk of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. Oral Oncol. 2022; 126: 105734.

87) Sinevici N, O'sullivan J. Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. Oral Oncol. 2016; 61: 12 - 8.

88) Tabatabaeifar S, Kruse TA, Thomassen M, Larsen MJ, Sørensen JA. Use of next generation sequencing in head and neck squamous cell carcinomas: a review. Oral Oncol. 2014; 50: 1035 - 40.

89) Ramos-García P, González-Moles MÁ, González-Ruiz L, Ruiz-Ávila I, Ayén Á, Gil-Montoya JA. Prognostic and clinicopathological significance of cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. Oral Oncol. 2018; 83: 96 - 106.

90) Salahshourifar I, Vincent-Chong VK, Kallarakkal TG, Zain RB. Genomic DNA copy number alterations from precursor oral lesions to oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2014; 50: 404 - 12.

91) Chen HH, Yu CH, Wang JT, Liu BY, Wang YP, Sun A, Tsai TC, Chiang CP. Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. Oral Oncol. 2007; 43: 122 - 9.

92) Tanis T, Cincin ZB, Gokcen-Rohlig B, Bireller ES, Ulusan M, Tanyel CR, Cakmakoglu B. The role of components of the extracellular matrix and inflammation on oral squamous cell carcinoma metastasis. Arch Oral Biol. 2014; 59: 1155 - 63.

93) Johnstone S, Logan RM. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2006; 42: 337 - 42.

94) Kargahi N, Torabinia N, Razavi SM, Tahririan D, Kamani H, Nazari M. Immunohistochemically detection of angiogenesis in oral pre-cancerous lesions compared with oral invasive carcinomas. Asian Pac J Cancer Prev. 2018; 19: 1805-8.

95) Hsieh YT, Chen YF, Lin SC, Chang KW, Li WC. Targeting cellular metabolism modulates head and neck oncogenesis. Int J Mol Sci. 2019; 20: 3960.

96) Li CX, Sun JL, Gong ZC, Lin ZQ, Liu H. Prognostic value of GLUT-1 expression in oral squamous cell carcinoma: A prisma-compliant meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2016; 95: e5324.

97) Kujan O, Shearston K, Farah CS. The role of hypoxia in oral cancer and potentially malignant disorders: a review. J Oral Pathol Med. 2017; 46: 246 - 52.

98) Qian J, Wenguang X, Zhiyong W, Yuntao Z, Wei H. Hypoxia inducible factor: a potential prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma. Tumour Biol. 2016; 37: 10815 - 20.

99) Lenouvel D, González-Moles MÁ, Ruiz-Ávila I, Gonzalez-Ruiz L, Gonzalez-Ruiz I, Ramos-García P. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 overexpression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and comprehensive meta-analysis. Oral Oncol. 2020; 106: 104722.

100) Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, Burtness B, Gillison ML, Harrington KJ, Le QT, Lee NY, Leidner R, Lewis RL, Licitra L, Mehanna H, Mell LK, Raben A, Sikora AG, Uppaluri R, Whitworth F, Zandberg DP, Ferris RL. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). J Immunother Cancer. 2019; 7: 184.

101) Pisani LP, Estadella D, Ribeiro DA. The role of Toll Like Receptors (TLRs) in oral carcinogenesis. Anticancer Res. 2017; 37: 5389 - 94.

102) Llorens C, Soriano B, Trilla-Fuertes L, Bagan L, Ramos-Ruiz R, Gamez-Pozo A,

Peña C, Bagan JV. Immune expression profile identification in a group of proliferative verrucous leukoplakia patients: a pre-cancer niche for oral squamous cell carcinoma development. Clin Oral Investig. 2021; 25: 2645 – 57.

103) Ali J, Sabiha B, Jan HU, Haider SA, Khan AA, Ali SS. Genetic etiology of oral cancer. Oral Oncol. 2017; 70: 23 - 8.

104) Chen C, Zhang Y, Loomis MM, Upton MP, Lohavanichbutr P, Houck JR, Doody DR, Mendez E, Futran N, Schwartz SM, Wang P. Genome-Wide loss of heterozygosity and DNA copy number aberration in HPV-negative oral squamous cell carcinoma and their associations with disease-specific survival. PLoS One. 2015; 10: e0135074.

105) Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, Bengtsson L, Moorthy S, Neskey DM, Zhao M, Ortega Alves MV, Chang K, Drummond J, Cortez E, Xie TX, Zhang D, Chung W, Issa JP, Zweidler-McKay PA, Wu X, El-Naggar AK, Weinstein JN, Wang J, Muzny DM, Gibbs RA, Wheeler DA, Myers JN, Frederick MJ. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. Cancer Discov. 2013; 3: 770 - 81.

106) Okoturo EM, Risk JM, Schache AG, Shaw RJ, Boyd MT. Molecular pathogenesis of proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review. Br J Oral Maxillofac Surg. 2018; 56: 780 - 5.

107) Niklander SE. Inflammatory mediators in oral cancer: pathogenic mechanisms and diagnostic potential. Front Oral Health. 2021; 2: 642238.

108) Dikova V, Jantus-Lewintre E, Bagan J. Potential non-invasive biomarkers for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. J Clin Med. 2021; 10: 1658.

109) Frejborg E, Salo T, Salem A. Role of cyclooxygenase-2 in head and neck tumorigenesis. Int J Mol Sci. 2020; 21: 9246.

110) Pontes HA, Pontes FS, Fonseca FP, de Carvalho PL, Pereira EM, de Abreu MC, de Freitas Silva BS, dos Santos Pinto D Jr. Nuclear factor κB and cyclooxygenase-2 immunoexpression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. Ann Diagn Pathol. 2013; 17: 45 - 50.

111) Vig N, Mackenzie IC, Biddle A. Phenotypic plasticity and epithelial-to-mesenchymal transition in the behaviour and therapeutic response of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2015; 44: 649 - 55.

112) Biddle A, Gammon L, Liang X, Costea DE, Mackenzie IC. Phenotypic plasticity determines cancer stem cell therapeutic resistance in oral squamous cell carcinoma. EBioMedicine. 2016; 4: 138 - 45.

113) Parkinson EK, James EL, Prime SS. Senescence-derived extracellular molecules as modulators of oral cancer development: A mini-review. Gerontology. 2016; 62: 417-24.

114) Bascones-Martínez A, López-Durán M, Cano-Sánchez J, Sánchez-Verde L, Díez-Rodríguez A, Aguirre-Echebarría P, Alvarez-Fernández E, González-Moles MA, Bascones-Ilundain J, Muzio LL, Campo-Trapero J. Differences in the expression of five senescence markers in oral cancer, oral leukoplakia and control samples in humans. Oncol Lett. 2012; 3: 1319 - 25.

115) Lim Y, Totsika M, Morrison M, Punyadeera C. Oral microbiome: A new biomarker reservoir for oral and oropharyngeal cancers. Theranostics. 2017; 7: 4313 - 21.

116) Chattopadhyay I, Verma M, Panda M. Role of oral microbiome signatures in diagnosis and prognosis of oral cancer. Technol Cancer Res Treat. 2019; 18: 1533033819867354.

117) Sami A, Elimairi I, Stanton C, Ross RP, Ryan CA. The role of the microbiome in oral squamous cell carcinoma with insight into the microbiome-treatment axis. Int J Mol Sci. 2020; 21: 8061.

118) Robledo-Sierra J, Ben-Amy DP, Varoni E, Bavarian R, Simonsen JL, Paster BJ, Wade WG, Kerr R, Peterson DE, Frandsen Lau E. World Workshop on Oral Medicine VII: Targeting the oral microbiome Part 2: Current knowledge on malignant and potentially malignant oral disorders. Oral Dis. 2019; 25: 28 - 48.

119) Herreros-Pomares A, Llorens C, Soriano B, Zhang F, Gallach S, Bagan L, Murillo J, Jantus-Lewintre E, Bagan J. Oral microbiome in Proliferative Verrucous

Leukoplakia exhibits loss of diversity and enrichment of pathogens. Oral Oncol. 2021; 120: 105404.

120) Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. Curr Opin Genet Dev. 2012; 22: 50 – 5.

121) Flausino CS, Daniel FI, Modolo F. DNA methylation in oral squamous cell carcinoma: from its role in carcinogenesis to potential inhibitor drugs. Crit Rev Oncol Hematol. 2021; 164: 103399.

122) Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature. 2004; 429: 457 - 63.

123) Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. Cell Res. 2011; 21: 502 – 17.

124) Gaździcka J, Gołąbek K, Strzelczyk JK, Ostrowska Z. Epigenetic modifications in head and neck cancer. Biochem Genet. 2020; 58: 213 - 44.

125) Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer. J Pathol. 2007; 211: 261 - 8.

126) Li S, Tollefsbol TO. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. Methods. 2021; 187: 28 - 43.

127) Schenkel LC, Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, Paré G, Sadikovic B. DNA methylation analysis in constitutional disorders: Clinical implications of the epigenome. Crit Rev Clin Lab Sci. 2016; 53: 147 - 65.

128) Ehrlich M. DNA hypermethylation in disease: mechanisms and clinical relevance. Epigenetics. 2019; 14: 1141 - 63.

129) Pajares MJ, Palanca-Ballester C, Urtasun R, Alemany-Cosme E, Lahoz A, Sandoval J. Methods for analysis of specific DNA methylation status. Methods. 2021; 187: 3-12.

130) Khodadadi E, Fahmideh L, Khodadadi E, Dao S, Yousefi M, Taghizadeh S, Asgharzadeh M, Yousefi B, Kafil HS. Current advances in DNA methylation analysis methods. Biomed Res Int. 2021: 8827516.

131) Soozangar N, SaEGDhi MR, Jeddi F, Somi MH, Shirmohamadi M, Samadi N. Comparison of genome-wide analysis techniques to DNA methylation analysis in human cancer. J Cell Physiol. 2018; 233: 3968 - 81.

132) Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, Van Djik S, Muhlhausler B, Stirzaker C, Clark SJ. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. Genome Biol. 2016; 17: 208.

133) D'Souza W, Saranath D. Clinical implications of epigenetic regulation in oral cancer. Oral Oncol. 2015; 51: 1061-8.

134) Hayden JA, Côté P, Bombardier C. Evaluation of the quality of prognosis studies in systematic reviews. Ann Intern Med. 2006; 144: 427 – 37.

135) Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. Stat Med. 2002; 21: 1539 – 58.

136) Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. BMJ. 2003; 327: 557 – 60.

137) Viechtbauer W, Cheung MW. Outlier and influence diagnostics for meta-analysis. Res Synth Methods. 2010; 1: 112 – 25.

138) Herreros-Pomares A, Llorens C, Soriano B, Bagan L, Moreno A, Calabuig-Fariñas S, et al. Differentially methylated genes in proliferative verrucous leukoplakia reveal potential malignant biomarkers for oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2021; 116: 105191.

139) Supic G, Stefik D, Ivkovic N, Sami A, Zeljic K, Jovic S, Kozomara R, Vojvodic D, Stosic S. Prognostic impact of miR-34b/c DNA methylation, gene expression, and promoter polymorphism in HPV-negative oral squamous cell carcinomas. Sci Rep. 2022; 12: 1296.

140) Sun R, Zhang WB, Yu Y, Yang HY, Yu GY, Peng X. Evaluation of DNA methylation in matched oral swab and tissue specimens from Chinese patients with oral squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg. 2021; 50: 725 - 32.

141) Strzelczyk JK, Krakowczyk Ł, Owczarek AJ. Aberrant DNA methylation of the p16, APC, MGMT, TIMP3 and CDH1 gene promoters in tumours and the surgical margins of patients with oral cavity cancer. J Cancer. 2018; 9: 1896 - 904.

142) Strzelczyk JK, Krakowczyk Ł, Owczarek AJ. Methylation status of SFRP1, SFRP2, RASSF1A, RARβ and DAPK1 genes in patients with oral squamous cell carcinoma. Arch Oral Biol. 2019; 98: 265 - 72.

143) Zhou Y, Zheng S, Luo Q, Huang X, Zhou Y, Li Z. Hypermethylation of DcR1, DcR2, DR4, DR5 gene promoters and clinical significance in tongue carcinoma. Am J Otolaryngol. 2019; 40: 102258.

144) Allameh A, Moazeni-Roodi A, Harirchi I, et al. Promoter DNA methylation and mRNA expression level of p16 gene in oral squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological characteristics. Pathol Oncol Res. 2019; 25: 1535 - 43.

145) Eljabo N, Nikolic N, Carkic J, Jelovac D, Lazarevic M, Tanic N, et al. Genetic and epigenetic alterations in the tumour, tumour margins, and normal buccal mucosa of patients with oral cancer. Int J Oral Maxillofac Surg. 2018; 47: 976 - 82.

146) Basu B, Chakraborty J, Chandra A, Katarkar A, Baldevbhai JRK, Dhar Chowdhury D, Ray JG, Chaudhuri K, Chatterjee R. Genome-wide DNA methylation profile identified a unique set of differentially methylated immune genes in oral squamous cell carcinoma patients in India. Clin Epigenetics. 2017; 9: 13.

147) Bhat S, Kabekkodu SP, Jayaprakash C, Radhakrishnan R, Ray S, Satyamoorthy K. Gene promoter-associated CpG island hypermethylation in squamous cell carcinoma of the tongue. Virchows Archiv. 2017; 470: 445 - 54.

148) Sushma PS, Jamil K, Kumar PU, Satyanarayana U, Ramakrishna M, Triveni B. PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. Tumour Biol. 2016; 37: 7625-32.

149) Abe M, Yamashita S, Mori Y, Abe T, Saijo H, Hoshi K, Ushijima T, Takato T. High-risk oral leukoplakia is associated with aberrant promoter methylation of multiple genes. BMC Cancer. 2016; 16: 350.

150) Li YF, Hsiao YH, Lai YH, et al. DNA methylation profiles and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. Epigenetics. 2015;10: 229 - 36.

151) Xiao C, Wang LL, Zhu LF, Zhang CP, Zhou JH. Secreted frizzled-related protein 2 is epigenetically silenced and functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma. Mol Med Rep. 2014; 10: 2293 - 8.

152) Lai YH, He RY, Chou JL, Chan MW, Li YF, Tai CK. Promoter hypermethylation and silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 in oral squamous cell carcinoma. J Transl Med. 2014; 12: 237.

153) Zhang HZ, Xia XY, Zhu F, Shen H, Song K, Shang ZJ. Correlation of deregulated like-acetylglucosaminyl transferase and aberrant α-dystroglycan expression with human tongue cancer metastasis. J Oral Maxillofac Surg. 2014; 72: 1106 - 18.

154) Bhatia V, Goel MM, Makker A, Tewari S, Yadu A, Shilpi P, Kumar S, Agarwal SP, Goel SK. Promoter region hypermethylation and mRNA expression of MGMT and p16 genes in tissue and blood samples of human premalignant oral lesions and oral squamous cell carcinoma. Biomed Res Int. 2014; 2014: 248419.

155) Asokan GS, Jeelani S, Gnanasundaram N. Promoter hypermethylation profile of tumour suppressor genes in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. J Clin Diagn Res. 2014; 8: ZC09 - 12.

156) Towle R, Truong D, Hogg K, Robinson WP, Poh CF, Garnis C. Global analysis of DNA methylation changes during progression of oral cancer. Oral Oncol. 2013; 49: 1033 - 42.

157) Li C, Wang L, Su J, Zhang R, Fu L, Zhou Y. mRNA expression and hypermethylation of tumor suppressor genes apoptosis protease activating factor-1 and death-associated protein kinase in oral squamous cell carcinoma. Oncol Lett. 2013; 6: 280 - 6.

158) Zhang S, Feng XL, Shi L, Gong CJ, He ZJ, Wu HJ, Ling TY. Genome-wide analysis of DNA methylation in tongue squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2013; 29: 1819 - 26.

159) Jithesh PV, Risk JM, Schache AG, Dhanda J, Lane B, Liloglou T, Shaw RJ. The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 2013; 108: 370 - 9.

160) Liu Y, Zhou ZT, He QB, Jiang WW. DAPK promoter hypermethylation in tissues and body fluids of oral precancer patients. Med Oncol. 2012; 29: 729 – 33.

161) de Pauli Paglioni M, Migliorati CA, Schausltz Pereira Faustino I, Linhares Almeida Mariz BA, Oliveira Corrêa Roza AL, Agustin Vargas P, Franco Paes Leme A, Bianca Brandão T, Prado Ribeiro AC, Ajudarte Lopes M, Santos-Silva AR. Laser excision of oral leukoplakia: Does it affect recurrence and malignant transformation? A systematic review and meta-analysis. Oral Oncol. 2020; 109: 104850.

162) Monteiro L, Barbieri C, Warnakulasuriya S, Martins M, Salazar F, Pacheco JJ, Vescovi P, Meleti M. Type of surgical treatment and recurrence of oral leukoplakia: A retrospective clinical study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2017; 22: e520 - 6.

163) Akrish S, Eskander-Hashoul L, Rachmiel A, Ben-Izhak O. Clinicopathologic analysis of verrucous hyperplasia, verrucous carcinoma and squamous cell carcinoma as part of the clinicopathologic spectrum of oral proliferative verrucous leukoplakia: A literature review and analysis. Pathol Res Pract. 2019; 215: 152670.

164) WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and neck tumours (WHO classification of tumours series, 5th ed. vol. 9). Lyon (France): International Agency for Research on Cancer 2022.

165) Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. Berlin: Springer-Verlag; 1997.

166) Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. Epigenomics. 2016; 8: 389 – 99.

167) Zhou W, Laird PW, Shen H. Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes. Nucleic Acids Res. 2017; 45: e22.

168) Ringnér M. What is principal component analysis? Nat Biotechnol. 2008; 26: 303-4.

169) Jaeckel, L A. Estimating regression coefficients by minimizing the dispersion of residuals. Ann Math Statist. 1972; 43: 1449 – 58.

170) Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent. J Stat Softw. 2010; 33: 1 - 22.

171) Gilligan G, Garola F, Piemonte E, Leonardi N, Panico R, Warnakulasuriya S. Lichenoid proliferative leukoplakia, lichenoid lesions with evolution to proliferative leukoplakia or a continuum of the same precancerous condition? A revised hypothesis. J Oral Pathol Med. 2021; 50: 129 - 35.

172) Barba-Montero C, Lorenzo-Pouso AI, Gándara-Vila P, Blanco-Carrión A, Marichalar-Mendía X, García-García A, Pérez-Sayáns M. Lichenoid areas may arise in early stages of proliferative verrucous leukoplakia: A long-term study of 34 patients. J Oral Pathol Med. 2022; 51: 573 - 81.

173) Pentenero M, Meleti M, Vescovi P, Gandolfo S. Oral proliferative verrucous leucoplakia: are there particular features for such an ambiguous entity? A systematic review. Br J Dermatol. 2014; 170: 1039 - 47.

174) Bánóczy J, Gintner Z, Dombi C. Tobacco use and oral leukoplakia. J Dent Educ. 2001; 65: 322 - 7.

175) Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar Rde C, Silva TA. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109:e74-9.

176) Jangir NK, Singh A, Jain P, Khemka S. The predictive value of depth of invasion and tumor size on risk of neck node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity: A prospective study. J Cancer Res Ther. 2022; 18: 977 - 83.

177) van Lanschot CGF, Klazen YP, de Ridder MAJ, Mast H, Ten Hove I, Hardillo JA, Monserez DA, Sewnaik A, Meeuwis CA, Keereweer S, Aaboubout Y, Barroso EM, van der Toom QM, Bakker Schut TC, Wolvius EB, Baatenburg de Jong RJ,

Puppels GJ, Koljenović S. Depth of invasion in early stage oral cavity squamous cell carcinoma: The optimal cut-off value for elective neck dissection. Oral Oncol. 2020; 111: 104940.

178) Noda Y, Ishida M, Ueno Y, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K. Novel pathological predictive factors for extranodal extension in oral squamous cell carcinoma: a retrospective cohort study based on tumor budding, desmoplastic reaction, tumor-infiltrating lymphocytes, and depth of invasion. BMC Cancer. 2022; 22: 402.

179) Faisal M, Dhanani R, Ullah S, Bakar MA, Irfan N, Malik KI, Loya A, Boban EM, Hussain R, Jamshed A. Prognostic outcomes of treatment naïve oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC): a comprehensive analysis of 14 years. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2021; 278: 3045 - 53.

180) da Dolens ES, de Morais EF, Paranaíba LMR, Rangel ALCA, Almangush A, Salo T, Brennan PA, Coletta RD. Prognostic significance of the neural invasion in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2023. In press.

181) Marzouki HZ, Bukhari AF, Al-Ghamdi DA, Abdullah RM, Al-Hajeili M, Khayyat S, Alzahrani RM, Alotaibi YR, Al-Wassia R, Al-Marzouki H, Merdad M. Worst pattern of invasion and other histopathological features in oral cancer as determinants of prognosis and survival rate: A retrospective cohort analysis. Oncol Lett. 2023; 25: 75.

182) Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies. Biochem Med (Zagreb). 2021; 31: 010502.

183) Kreppel M, Nazarli P, Grandoch A, Safi AF, Zirk M, Nickenig HJ, Scheer M, Rothamel D, Hellmich M, Zöller JE. Clinical and histopathological staging in oral squamous cell carcinoma - Comparison of the prognostic significance. Oral Oncol. 2016; 60: 68 - 73.

184) Muller S, Tilakaratne WM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. Head Neck Pathol. 2022; 16: 54 - 62.

185) Alabdulaaly L, Villa A, Chen T, Kerr A, Ross N, Abreu Alves F, Guollo A, Woo SB. Characterization of initial/early histologic features of proliferative leukoplakia and correlation with malignant transformation: a multicenter study. Mod Pathol. 2022; 35: 1034 - 44.

186) Bagan J, Scully C, Jimenez Y, Martorell M. Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. Oral Dis. 2010; 16: 328 - 32.

187) Koh J, Kurago ZB. Expanded expression of Toll-Like Receptor 2 in proliferative verrucous leukoplakia. Head Neck Pathol. 2019; 13: 635 - 42.

188) Schoelch ML, Sekandari N, Regezi JA, Silverman S Jr. Laser management of oral leukoplakias: a follow-up study of 70 patients. Laryngoscope. 1999; 109: 949 - 53.

189) Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. Nat Rev Cancer. 2018; 18: 269 - 82.

190) Chow LQM. Head and Neck Cancer. N Engl J Med. 2020; 382: 60 - 72.

191) Supic G, Stefik D, Ivkovic N, Sami A, Zeljic K, Jovic S, Kozomara R, Vojvodic D, Stosic S. Prognostic impact of miR-34b/c DNA methylation, gene expression, and promoter polymorphism in HPV-negative oral squamous cell carcinomas. Sci Rep. 2022; 12: 1296.

192) Sathyan K, Sailasree R, Jayasurya R, et al. Carcinoma of tongue and the buccal mucosa represent different biological subentities of the oral carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2006; 132: 601 – 9.

193) Bell R, Kademani D, Homer L, et al. Tongue cancer: is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? J Oral Maxillofac Surg. 2007; 65: 229 – 36.

194) Rautava J, Luukkaa M, Heikinheimo K, Alin J, Grenman R, Happonen RP. Squamous cell carcinomas arising from different types of oral epithelia differ in their tumor and patient characteristics and survival. Oral Oncol. 2007; 43: 911 - 9.

195) Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? Nat Rev Cancer. 2006; 6: 107 - 16.

196) Milutin Gašperov N, Sabol I, Božinović K, Dediol E, Mravak-Stipetić M, Licastro D, Dal Monego S, Grce M. DNA methylome distinguishes head and neck cancer from potentially malignant oral lesions and healthy oral mucosa. Int J Mol Sci. 2020; 21: 6853.

197) Simo-Riudalbas L, Diaz-Lagares A, Gatto S, Gagliardi M, Crujeiras AB, Matarazzo MR, Esteller M, Sandoval J. Genome-wide DNA methylation analysis identifies novel hypomethylated non-pericentromeric genes with potential clinical implications in ICF Syndrome. PLoS One. 2015; 10: e0132517.

198) Shi TY, He J, Wang MY, Zhu ML, Yu KD, Shao ZM, Sun MH, Wu X, Cheng X, Wei Q. CASP7 variants modify susceptibility to cervical cancer in Chinese women. Sci Rep. 2015; 5: 9225.

199) Shen J, LeFave C, Sirosh I, Siegel AB, Tycko B, Santella RM. Integrative epigenomic and genomic filtering for methylation markers in hepatocellular carcinomas. BMC Med Genomics. 2015; 8: 28.

200) Rauch TA, Wang Z, Wu X, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP. DNA methylation biomarkers for lung cancer. Tumour Biol. 2012; 33: 287 - 96.

201) Horning AM, Awe JA, Wang CM, Liu J, Lai Z, Wang VY, Jadhav RR, Louie AD, Lin CL, Kroczak T, Chen Y, Jin VX, Abboud-Werner SL, Leach RJ, Hernandez J, Thompson IM, Saranchuk J, Drachenberg D, Chen CL, Mai S, Huang TH. DNA methylation screening of primary prostate tumors identifies SRD5A2 and CYP11A1 as candidate markers for assessing risk of biochemical recurrence. Prostate. 2015; 75: 1790 - 801.

202) Yan J, Li Y, Xu C, Tang B, Xie S, Hong T, Zeng E. Long noncoding RNA LINC00526 represses glioma progression via regulating miR-5581-3p/BEX1. J Oncol. 2021; 2021: 8171250.

203) Wang L, Shi J, Huang Y, Liu S, Zhang J, Ding H, Yang J, Chen Z. A six-gene prognostic model predicts overall survival in bladder cancer patients. Cancer Cell Int. 2019; 19: 229.

204) Heyliger SO, Soliman KFA, Saulsbury MD, Reams RR. The identification of

Zinc-Finger Protein 433 as a possible prognostic biomarker for clear-cell renal cell carcinoma. Biomolecules. 2021; 11: 1193.

205) Brunetti D, Catania A, Viscomi C, Deleidi M, Bindoff LA, Ghezzi D, Zeviani M. Role of PITRM1 in mitochondrial dysfunction and neuroEGDeneration. Biomedicines. 2021; 9: 833.

206) Contreras-Romero C, Pérez-Yépez EA, Martinez-Gutierrez AD, Campos-Parra A, Zentella-Dehesa A, Jacobo-Herrera N, López-Camarillo C, Corredor-Alonso G, Martínez-Coronel J, Rodríguez-Dorantes M, de León DC, Pérez-Plasencia C. Gene promoter-methylation signature as biomarker to predict cisplatin-radiotherapy sensitivity in locally advanced cervical cancer. Front Oncol. 2022; 12: 773438.

207) Al Chiblak M, Steinbeck F, Thiesen HJ, Lorenz P. DUF3669, a "domain of unknown function" within ZNF746 and ZNF777, oligomerizes and contributes to transcriptional repression. BMC Mol Cell Biol. 2019; 20: 60.

208) Mahmud I, Liao D. DAXX in cancer: phenomena, processes, mechanisms and regulation. Nucleic Acids Res. 2019; 47: 7734 - 52.

209) Vargas AC, Gray LA, White CL, Maclean FM, Grimison P, Ardakani NM, Bonar F, Algar EM, Cheah AL, Russell P, Mahar A, Gill AJ. Genome wide methylation profiling of selected matched soft tissue sarcomas identifies methylation changes in metastatic and recurrent disease. Sci Rep. 2021; 11: 667.

210) Richards JB, Waterworth D, O'Rahilly S, Hivert MF, Loos RJ, Perry JR, Tanaka T, Timpson NJ, Semple RK, Soranzo N, Song K, Rocha N, Grundberg E, Dupuis J, Florez JC, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Sladek R, Aulchenko Y, Evans D, Waeber G, Erdmann J, Burnett MS, Sattar N, Devaney J, Willenborg C, Hingorani A, Witteman JC, Vollenweider P, Glaser B, Hengstenberg C, Ferrucci L, Melzer D, Stark K, Deanfield J, Winogradow J, Grassl M, Hall AS, Egan JM, Thompson JR, Ricketts SL, König IR, Reinhard W, Grundy S, Wichmann HE, Barter P, Mahley R, Kesaniemi YA, Rader DJ, Reilly MP, Epstein SE, Stewart AF, Van Duijn CM, Schunkert H, Burling K, Deloukas P, Pastinen T, Samani NJ, McPherson R, Davey Smith G, Frayling TM, Wareham NJ, Meigs JB, Mooser V, Spector TD; GIANT Consortium. A genome-wide association study reveals variants in ARL15 that

influence adiponectin levels. PLoS Genet. 2009; 5: e1000768.

211) Pandey AK, Saxena A, Dey SK, Kanjilal M, Kumar U, Thelma BK. Correlation between an intronic SNP genotype and ARL15 level in rheumatoid arthritis. J Genet. 2021; 100: 26.

212) Negi S, Juyal G, Senapati S, Prasad P, Gupta A, Singh S, Kashyap S, Kumar A, Kumar U, Gupta R, Kaur S, Agrawal S, Aggarwal A, Ott J, Jain S, Juyal RC, Thelma BK. A genome-wide association study reveals ARL15, a novel non-HLA susceptibility gene for rheumatoid arthritis in North Indians. Arthritis Rheum. 2013; 65: 3026 - 35.

213) Brito C, Costa-Silva B, Barral DC, Pojo M. Unraveling the relevance of ARL GTPases in cutaneous melanoma prognosis through integrated bioinformatics analysis. Int J Mol Sci. 2021; 22: 9260.

214) Valla M, Engstrøm MJ, Ytterhus B, Hansen ÅK, Akslen LA, Vatten LJ, Opdahl S, Bofin AM. FGD5 amplification in breast cancer patients is associated with tumour proliferation and a poorer prognosis. Breast Cancer Res Treat. 2017; 162: 243 - 53.

215) Valla M, Mjønes PG, Engstrøm MJ, Ytterhus B, Bordin DL, van Loon B, Akslen LA, Vatten LJ, Opdahl S, Bofin AM. Characterization of FGD5 expression in primary breast cancers and lymph node metastases. J Histochem Cytochem. 2018; 66: 787 - 99.

216) Chen N, Han X, Yin B, Bai X, Wang Y. FGD5 facilitates tumor growth by regulating EGFR ubiquitination in gastric cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2021; 562: 43 - 9.

217) Senchenko VN, Kisseljova NP, Ivanova TA, Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva AV, Panasenko GV, Tsitrin EB, Lerman MI, Kisseljov FL, Kashuba VI, Zabarovsky ER. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. Epigenetics. 2013; 8: 409 - 20.

218) Yang W, Chen S, Cheng X, Xu B, Zeng H, Zou J, Su C, Chen Z. Characteristics of genomic mutations and signaling pathway alterations in thymic epithelial tumors. Ann Transl Med. 2021; 9: 1659.

219) Kong K, Hu S, Yue J, Yang Z, Jabbour SK, Deng Y, Zhao B, Li F. Integrative genomic profiling reveals characteristics of lymph node metastasis in small cell lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 2023; 12: 295 - 311.

220) Perveen S, Gupta N, Kumar M, Kaur P, Chowdhury MR, Kabra M. Spectrum of amyloglucosidase mutations in Asian Indian patients with Glycogen storage disease type III. Am J Med Genet A. 2020; 182: 1190 - 200.

221) Abdullah IS, Teh SH, Khaidizar FD, Ngu LH, Keng WT, Yap S, Mohamed Z. Intron retention is among six unreported AGL mutations identified in Malaysian GSD III patients. Genes Genomics. 2019; 41: 885 - 93

222) Endo Y, Horinishi A, Vorgerd M, Aoyama Y, Ebara T, Murase T, Odawara M, Podskarbi T, Shin YS, Okubo M. Molecular analysis of the AGL gene: heterogeneity of mutations in patients with glycogen storage disease type III from Germany, Canada, Afghanistan, Iran, and Turkey. J Hum Genet. 2006; 51: 958 - 63.

223) Massari F, Ciccarese C, Santoni M, Iacovelli R, Mazzucchelli R, Piva F, Scarpelli M, Berardi R, Tortora G, Lopez-Beltran A, Cheng L, Montironi R. Metabolic phenotype of bladder cancer. Cancer Treat Rev. 2016; 45: 46 - 57.

224) Weinhaus B, Guin S. Involvement of glycogen debranching enzyme in bladder cancer. Biomed Rep. 2017; 6: 595 - 8.

225) Richmond CS, Oldenburg D, Dancik G, Meier DR, Weinhaus B, Theodorescu D, Guin S. Glycogen debranching enzyme (AGL) is a novel regulator of non-small cell lung cancer growth. Oncotarget. 2018; 9: 16718 - 30.

226) Alves da Silva AF, Machado FB, Pavarino ÉC, Biselli-Périco JM, Zampieri BL, da Silva Francisco Junior R, Mozer Rodrigues PT, Terra Machado D, Santos-Rebouças CB, Gomes Fernandes M, Chuva de Sousa Lopes SM, Lopes Rios ÁF, Medina-Acosta E. Trisomy 21 alters DNA methylation in parent-of-origin-dependent and -independent manners. PLoS One. 2016; 11: e0154108.

227) Docherty LE, Rezwan FI, Poole RL, Jagoe H, Lake H, Lockett GA, Arshad H, Wilson DI, Holloway JW, Temple IK, Mackay DJ. Genome-wide DNA methylation analysis of patients with imprinting disorders identifies differentially methylated

regions associated with novel candidate imprinted genes. J Med Genet. 2014; 51: 229 - 38.

228) Shaaban S, MacKinnon S, Andrews C, Staffieri SE, Maconachie GDE, Chan WM, Whitman MC, Morton SU, Yazar S, MacGregor S, Elder JE, Traboulsi EI, Gottlob I, Hewitt AW; Strabismus Genetics Research Consortium, Hunter DG, Mackey DA, Engle EC. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for comitant esotropia and suggests a parent-of-origin effect. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018; 59: 4054 - 64.

229) Plotnikov D, Pärssinen O, Williams C, Atan D, Guggenheim JA. Commonly occurring genetic polymorphisms with a major impact on the risk of nonsyndromic strabismus: replication in a sample from Finland. J AAPOS. 2021: S1091-8531(21)00617-0.

230) Skvortsova K, Stirzaker C, Taberlay P. The DNA methylation landscape in cancer. Essays Biochem. 2019; 63: 797 - 811.

231) Fernandes D, Barbeiro CO, Palaçon MP, Biancardi MR, Ferrisse TM, Silveira HA, Castilho RM, de Almeida LY, Leon JE, Bufalino A. High density of CD8 T cell and immune imbalance of T lymphocytes subsets are associated with proliferative verrucous leukoplakia. Immunology. 2023; 168: 96 - 109.

232) Singer BD. A practical guide to the measurement and analysis of DNA methylation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2019; 61: 417 - 28.

233) Lee TI, Young RA. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. Cell. 2013; 152: 1237 - 51.

234) Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. Adv Genet. 2010; 70: 27 - 56.

235) Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. Genes Dev. 2011; 25: 1010 - 22.

236) Nishiyama A, Nakanishi M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. Trends Genet. 2021; 37: 1012 – 27.

237) Kheirandish S, Eshghyar N, Yazdani F, Amini Shakib P, Hosseini-Bereshneh A,

Nouri Z, Kheiran-Dish A, Karami F. Methylation assessment of two DKK2 and DKK4 genes in oral squamous cell carcinoma patients. Iran J Public Health. 2020; 49: 1947 - 53.

238) abalee J, Towle R, Lawson J, Dickman C, Garnis C. Sphingomyelin phosphodiesterase 3 methylation and silencing in oral squamous cell carcinoma results in increased migration and invasion and altered stress response. Oncotarget. 2020; 11: 523 - 34.

239) Abdo EN, Correia-Silva Jde F, Gomes CC, Pordeus IA, Gomez RS. Serotonin transporter gene polymorphisms: a case-control study. Braz Dent J. 2012; 23: 68 - 71.

240) Gao S, Worm J, Guldberg P, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, Reibel J, Dabelsteen E. Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2004; 109: 230 - 7.

241) Verma P, Kumar A, Dixit S, Mohan K, Gupta N, Mandal G. Assessment of relationship of ABO blood groups in oral cancer patients - a retrospective study. Ann Maxillofac Surg. 2021; 11: 80 - 5.

242) Ramesh G, Katiyar A, Raj A, Kumar A, Nagarajappa R, Pandey A. Assessment of relationship of ABO blood groups among tobacco induced oral cancer patients of Kanpur Population, Uttar Pradesh. J Exp Ther Oncol. 2017; 12: 129 - 35.

243) Pedro NF, Biselli JM, Maniglia JV, Santi-Neto D, Pavarino ÉC, Goloni-Bertollo EM, Biselli-Chicote PM. Candidate biomarkers for oral squamous cell carcinoma: differential expression of oxidative stress-related genes. Asian Pac J Cancer Prev. 2018; 19: 1343 - 9.

244) Lee CH, Pan KL, Tang YC, Tsai MH, Cheng AJ, Shen MY, Cheng YM, Huang TT, Lin P. LDOC1 silenced by cigarette exposure and involved in oral neoplastic transformation. Oncotarget. 2015; 6: 25188 – 201.

245) Cao R, Wu Q, Li Q, Yao M, Zhou H. A 3-mRNA-based prognostic signature of survival in oral squamous cell carcinoma. PeerJ. 2019; 7: e7360.

246) Zhu L, Yan D, Chen Y, Chen S, Chen N, Han J. The identification of autophagy-

related genes in the prognosis of oral squamous cell carcinoma. Oral Dis. 2020; 26: 1659 - 67.

247) Li C, Shi Y, Zuo L, Xin M, Guo X, Sun J, Chen S, Zhao B, Yang Z, Sun Z, Zhao H. Identification of biomarkers associated with cancerous change in oral leukoplakia based on integrated transcriptome analysis. J Oncol. 2022; 2022: 4599305.

248) Lin SC, Kao SY, Chang JC, Liu YC, Yu EH, Tseng SH, Liu CJ, Chang KW. Up-regulation of miR-187 modulates the advances of oral carcinoma by targeting BARX2 tumor suppressor. Oncotarget. 2016; 7: 61355 - 65.

249) Vishwakarma S, Agarwal R, Goel SK, Panday RK, Singh R, Sukumaran R, Khare S, Kumar A. Altered expression of sphingosine-1-phosphate metabolizing enzymes in oral cancer correlate with clinicopathological attributes. Cancer Invest. 2017; 35: 139 - 41.

250) Moghimi M, Bakhtiari R, Mehrabadi JF, Jamshidi N, Jamshidi N, Siyadatpanah A, Mitsuwan W, Nissapatorn V. Interaction of human oral cancer and the expression of virulence genes of dental pathogenic bacteria. Microb Pathog. 2020; 149: 104464.

251) Bakusic J, Schaufeli W, Claes S, Godderis L. Stress, burnout and depression: A systematic review on DNA methylation mechanisms. J Psychosom Res. 2017; 92: 34 - 44.

252) Ma J, Xia LL, Yao XQ, Zheng SM, Li S, Xu LS, Sha WH, Li ZS. BARX2 expression is downregulated by CpG island hypermethylation and is associated with suppressed cell proliferation and invasion of gastric cancer cells. Oncol Rep. 2020; 43: 1805 - 18.

253) Deng GC, Sun DC, Zhou Q, Lv Y, Yan H, Han QL, Dai GH. Identification of DNA methylation-driven genes and construction of a nomogram to predict overall survival in pancreatic cancer. BMC Genomics. 2021; 22: 791.

254) Meng J, Cao L, Song H, Chen L, Qu Z. Integrated analysis of gene expression and DNA methylation datasets identified key genes and a 6-gene prognostic signature for primary lung adenocarcinoma. Genet Mol Biol. 2021; 44: e20200465.

255) Yan H, Qu J, Cao W, Liu Y, Zheng G, Zhang E, Cai Z. Identification of prognostic genes in the acute myeloid leukemia immune microenvironment based on TCGA data analysis. Cancer Immunol Immunother. 2019; 68: 1971 - 8.

256) UpEGDraff BL, Zhou X, Guo Y, Padanad MS, Chen PH, Yang C, Sudderth J, Rodriguez-Tirado C, Girard L, Minna JD, Mishra P, DeBerardinis RJ, O'Donnell KA. Transmembrane protease TMPRSS11B promotes lung cancer growth by enhancing lactate export and glycolytic metabolism. Cell Rep. 2018; 25: 2223.

257) Detarya M, Lert-Itthiporn W, Mahalapbutr P, Klaewkla M, Sorin S, Sawanyawisuth K, Silsirivanit A, Seubwai W, Wongkham C, Araki N, Wongkham S. Emerging roles of GALNT5 on promoting EGFR activation in cholangiocarcinoma: a mechanistic insight. Am J Cancer Res. 2022; 12: 4140 - 59.

258) Rodrigues TC, Fidalgo F, da Costa CM, Ferreira EN, da Cunha IW, Carraro DM, Krepischi AC, Rosenberg C. Upregulated genes at 2q24 gains as candidate oncogenes in hepatoblastomas. Future Oncol. 2014; 10: 2449 - 57.

259) Angulo JC, Andrés G, Ashour N, Sánchez-Chapado M, López JI, Ropero S. Development of castration resistant prostate cancer can be predicted by a DNA hypermethylation profile. J Urol. 2016; 195: 619 - 26.

260) Maind A, Raut S. Identifying condition specific key genes from basal-like breast cancer gene expression data. Comput Biol Chem. 2019; 78: 367 - 74.

261) Kim KY, Lee G, Yoon M, Cho EH, Park CS, Kim MG. Expression analyses revealed thymic stromal co-transporter/Slc46A2 is in stem cell populations and is a putative tumor suppressor. Mol Cells. 2015; 38: 548 - 61.

262) Engelmark MT, Ivansson EL, Magnusson JJ, Gustavsson IM, Beskow AH, Magnusson PK, Gyllensten UB. Identification of susceptibility loci for cervical carcinoma by genome scan of affected sib-pairs. Hum Mol Genet. 2006; 15: 3351 - 60.

263) Fang S, Lu J, Zhou X, Wang Y, Ross MI, Gershenwald JE, Cormier JN, Wargo J, Sui D, Amos CI, Lee JE. Functional annotation of melanoma risk loci identifies novel susceptibility genes. Carcinogenesis. 2020; 41: 452 - 7.

264) Wu C, Song H, Fu X, Li S, Jiang T. Transcriptomic analysis of glioma based on IDH status identifies ACAA2 as a prognostic factor in lower grade glioma. Biomed Res Int. 2020; 2020: 1086792.

265) Bai M, Liu X, Wang L. Identification of potential tumor antigens and immune subtypes for lung adenocarcinoma. Med Oncol. 2023; 40: 100.

266) Wang Z, Embaye KS, Yang Q, Qin L, Zhang C, Liu L, Zhan X, Zhang F, Wang X, Qin S. A novel metabolism-related signature as a candidate prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. J Hepatocell Carcinoma. 2021; 8: 119 - 32.

267) Liang H, Chen H, Shen Y, Feng Q, Jin W, Huang W, Zeng Y. A rare polymorphism of the COX7B2 gene in a Cantonese family with nasopharyngeal carcinoma. Sci China C Life Sci. 2004; 47: 449 - 53.

268) Ye J, Lin Y, Gao X, Lu L, Huang X, Huang S, Bai T, Wu G, Luo X, Li Y, Liang R. Prognosis-related molecular subtypes and immune features associated with hepatocellular carcinoma. Cancers (Basel). 2022; 14: 5721.

269) Ren X, Cui H, Wu J, Zhou R, Wang N, Liu D, Xie X, Zhang H, Liu D, Ma X, Dang C, Kang H, Lin S. Identification of a combined apoptosis and hypoxia gene signature for predicting prognosis and immune infiltration in breast cancer. Cancer Med. 2022; 11: 3886 - 901.

270) Zhou J, Li J, Qian C, Qiu F, Shen Q, Tong R, Yang Q, Xu J, Zheng B, Lv J, Hou J. LINC00624/TEX10/NF-κB axis promotes proliferation and migration of human prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2022; 601: 1 - 8.

271) Li Z, Lu X, Liu Y, Zhao J, Ma S, Yin H, Huang S, Zhao Y, He X. Gain of LINC00624 enhances liver cancer progression by disrupting the histone deacetylase 6/Tripartite Motif Containing 28/Zinc Finger Protein 354C Corepressor Complex. Hepatology. 2021; 73: 1764 - 82.

272) An Y, Wang Q, Sun F, Zhang G, Wang F, Zhang L, Li Y, Ren W, Zhu W, Li Y, Ji S, Guo X. OSucs: An online prognostic biomarker analysis tool for uterine carcinosarcoma. Genes (Basel). 2020; 11: 1040.

273) Alshabi AM, Vastrad B, Shaikh IA, Vastrad C. Identification of important invasion and proliferation related genes in adrenocortical carcinoma. Med Oncol. 2019; 36: 73.

274) Nie X, Liu H, Wei X, Li L, Lan L, Fan L, Ma H, Liu L, Zhou Y, Hou R, Chen WD. miRNA-382-5p suppresses the expression of Farnesoid X receptor to promote progression of liver cancer. Cancer Manag Res. 2021; 13: 8025 - 35.

275) Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. Oral Dis. 2021; 27: 1947 - 76.

276) Berdasco M, Esteller M. Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation. Nat Rev Genet. 2019; 20: 109 - 27.

9. ANEXOS

ANEXO I: Tablas suplementaria I. Características clínico – patológicas y evolutivas de cada paciente del grupo LVP – COCE.

	Características sociodemográficas				Características clínicas			Características patológicas			Evolución					
	Sexo	Edad	Tabaco	Alcohol	Localización	Forma clínica	Tiempo TM (años)	Grado tumoral	Infiltración	Metástasis ganglionar	Tratamiento	Recidiva	2º tumores	Seguimiento (años)	Total biopsias	Estado
LVP-COCE 1	M	89	No	No	Paladar izq	Mixta	21,18	G0	Ósea	No	RT + Cetuximab	No	3 (encía mx, encía mb, suelo)	24,3	10	V
LVP-COCE 2	V	67	No	No	Yugal derc	Ulcerada	7,1	G3	No	Si	QX	Si	1 (encía mb)	10,2	9	V
LVP-COCE 3	M	96	No	No	Encía 3ºc	Mixta	6,3	G2	No	No	QT	No	No	6,4	6	M
LVP-COCE 4	M	84	Si	No	Encía 3ºc	Verrugosa	5,4	G1	Ósea	No	QX	No	2 (encía mx, yugal izq)	8,1	8	V
LVP-COCE 5	V	90	No	No	Encía 2ºc	Eritroplasia	4,8	G1	No	No	QX	No	No	6,8	5	V
LVP-COCE 6	M	84	No	No	Encía 1ºc	Verrugosa	18,1	G0	No	No	REV	No	1 (encía der)	20,1	10	V
LVP-COCE 7	M	71	No	No	Paladar izq	Eritroplasia	10,5	G1	No	No	QX	No	No	11,7	12	V
LVP-COCE 8	M	61	No	No	Encía 2ºc	Verrugosa	0,14	G1	Ósea	No	QX	No	No	1,3	9	V

Tabla suplementaria II. Características clínico – patológicas y evolutivas de cada paciente del grupo COCE convencional.

	Características sociodemográficas				Características clínicas - patológicas					Evolución				
	Sexo	Edad	Tabaco	Alcohol	Localización	Forma clínica	Grado tumoral	Infiltración	Metástasis ganglionar	Tratamiento	Recidiva	Nuevos 2º tumores	Seguimiento (años)	Estado
COCE 1	V	83	Si	No	Paladar der	Mixta	G2	Ósea	No	QX + RT	No	No	3	V
COCE 2	V	68	Si	No	Encía mx	Ulcerada	G1	Ósea	No	QX	No	No	3	V
COCE 3	M	78	Si	No	Lengua lat izq	Ulcerada	G2	No	No	QT	Si	1 (suelo boca)	2,7	V
COCE 4	V	82	Si	No	Labio inf	Ulcerada	G2	Muscular	No	QX	No	No	0,4	M
COCE 5	V	62	No	Si	Suelo boca	Ulcerada	G3	No	No	QX	No	No	2,6	V
COCE 6	M	83	No	No	Lengua lat izq	Ulcerada	G2	No	No	QX	No	No	2,3	V
COCE 7	M	59	No	No	Lengua lat izq	Ulcerada	G1	No	si	QX + RT	No	No	2	M
COCE 8	M	66	No	No	Encía mb	Ulcerada	G1	Ósea	Si	QX + RT	No	1 (yugal)	1,9	V
COCE 9	M	78	No	No	Lengua lat izq	Ulcerada	G1	No	No	QX	No	No	1,9	V
COCE 10	M	69	No	No	Encía mb	Mixta	G1	No	Si	QX + RT + QT	No	No	1,4	V

Tabla suplementaria III. Características clínico – patológicas y evolutivas de cada paciente de los grupos no oncológicos (LO y LVP).

Pacientes con Leucoplasias orales									
Paciente	Edad	Sexo	Fumadores	Seguimiento (años)	Número de localizaciones	Localizaciones	Tamaño leucoplasias orales (cm)	Resultado histopatológico	Transformación maligna
1	65	F	Si	4,07	1	Paladar		Displasia leve	No
2	82	F	No	3,13	1	Encía maxilar		Hiperqueratosis sin displasia	No
3	64	M	No	21,17	1	Lengua	4	Displasia leve	No
4	68	F	No	19,75	1	Lengua		Displasia leve	No
5	54	M	No	2,07	1	Mucosa yugal	2	Displasia leve	No
6	70	M	Si	3,32	1	Lengua	2	Hiperqueratosis sin displasia	No
7	58	F	Si	1,38	1	Suelo de boca		Displasia moderada	No
8	64	F	Si	1,48	1	Suelo de boca	2	Displasia leve	No
Pacientes con Leucoplasia verrugosa proliferativa									
Paciente	Edad	Sexo	Fumadores	Seguimiento (años)	Número de localizaciones	Porcentaje de afectación con lesiones orales	Localizaciones orales afectadas	Resultado histopatológico	Transformación maligna (tiempo hasta TM)
1	76	F	No	3,22	14	54	Encía, mucosa yugal, paladar, trígono retromolar	Displasia leve	No
2	56	F	Si	12,51	8	31	Encía, mucosa yugal, paladar, suelo de boca	Displasia leve	No
3	55	M	Si	15,02	6	23	Encía, mucosa yugal, paladar	Displasia severa	Si* (8 meses)
4	52	F	Si	7,76	18	70	Encía, mucosa yugal, paladar, labios, lengua	Hiperqueratosis sin displasia	No
5	84	F	No	20,06	20	77	Encía, mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua	Displasia moderada	Si* (4 meses)
6	67	M	Si	8,19	9	35	Encía, mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua , trígono retromolar	Displasia leve	Si* (16 meses)
7	70	F	No	5,93	14	54	Encía, mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua	Hiperqueratosis sin displasia	No
8	63	F	Si	10,68	16	62	Encía, mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua	Hiperqueratosis sin displasia	No
9	82	F	No	7,04	12	46	Encía, mucosa yugal, paladar, labios	Displasia leve	No
10	65	F	No	11,12	11	42	Encía, mucosa yugal, paladar, suelo de boca, lengua	Displasia leve	Si* (3 meses)
11	82	F	No	7,69	16	62	Encía, mucosa yugal, labio, lengua	Displasia leve	No
12	50	M	No	5,16	14	54	Encía, mucosa yugal, paladar, lengua	Displasia leve	Si* (3 meses)

ANEXO II: Publicaciones, comunicaciones y premios.

A partir de la presente tesis doctoral, se han publicado artículos sobre el tema de la tesis en los que el doctorando Alexander Proaño Haro es coautor de los mismos. Artículos publicados en revistas incluidas en SCI – JCR:

- Proaño-Haro A, Bagan L, Bagan JV. Recurrences following treatment of proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review and meta-analysis. J Oral Pathol Med. 2021; 50: 820 - 8. doi: 10.1111/jop.13178. PMID: 33765364.

- Herreros-Pomares A, Hervás D, Bagan-Debon L, Proaño A, Garcia D, Sandoval J, Bagan J. Oral cancers preceded by proliferative verrucous leukoplakia exhibit distinctive molecular features. Oral Dis. 2023 Mar 9. doi: 10.1111/odi.14550. Epub ahead of print. PMID: 36892444.

Comunicaciones orales y póster defendidos en congresos nacionales e internacionales durante el desarrollo de la Tesis Doctoral:

- Proaño A, Bagán L, Murillo Cortes J, Poveda Roda R, Bagán JV. Características clínico – patológicas de carcinomas orales de células escamosas asociados a leucoplasia verrugosa proliferativa. Formato: Póster. XVI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Oral – Online. Junio 2021.

- Proaño – Haro A, Bagán L, Bagán JV. Recurrences following management of proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review and meta-analysis. Formato: Póster. IX Simposio Internacional Cáncer Oral – Online. Julio 2022.

- Proaño A, Bagán – Debón L, Bagán J. Biomarcadores tisulares de metilación de ADN en carcionomas orales de células escamosas y leucoplasias orales: Una revisión sistemática y meta – análisis. Formato: Póster. XVII Congreso SEMO y XVIII Reunión AIPMB. Santiago de Compostela. Mayo 2023. Accesit póster.

- Proaño – Haro A, Llorens C, Bagán L, Peña C, Bagán J. Immune expression profile in proliferative verrucous leukoplakia. 15TH Biennial Congress EUROPEAN ASSOCIATION OF ORAL MEDICINE. September 2021. Premio a mejor investigador joven de la Sociedad Europea de Medicina Oral.

EUROPEAN ASSOCIATION OF ORAL MEDICINE

AWARD

Best Young Researcher/Clinician

First Prize

EAOM Porto 2021
Porto, Portugal
24-25th September 2021
awarded to

Alex Proaño

Professor Nikos Nikitakis
President

Dr. Jairo Robledo
Secretary

Received: 16 December 2020 | Revised: 26 January 2021 | Accepted: 16 February 2021

DOI: 10.1111/jop.13178

Journal of Oral Pathology & Medicine WILEY

ORIGINAL ARTICLE

Recurrences following treatment of proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review and meta-analysis

Alex Proaño-Haro[1] | Leticia Bagan[1,2] | Jose V. Bagan[3,4,5,6]

[1]Department of Stomatology, Oral Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

[2]Dto. De Bioquimica y Biologia Molecular, Facultad de Medicina y Odontologia-INCLIVA, Unidad de apatologia Oxidativa-UPOX-UV, Valencia, Spain

[3]Department of Stomatologia and Maxillofacial Surgery, University Hospital of Valencia, Spain

[4]Valencia University, Valencia, Spain

[5]CIBERONIC, Valencia, Spain

[6]PI19/00790-Fondo de Investigación Sanitaria, ISCIII, Valencia, Spain

Correspondence
Jose V. Bagan, Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery, University General Hospital of Valencia, Ave. Tres Cruces s/n. 46014. Valencia. Spain.
Email: bagan@uv.es

[Correction added on 23 June 2021, after first online publication: The copyright line was changed.]

Abstract

Background: A systematic review and meta-analysis were made of the incidence of recurrences in patients with proliferative verrucous leukoplakia (PVL) subjected to different types of treatment.

Methods: The study was carried out following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement guidelines. A literature search was made in the Medline (PubMed), EMBASE, and Web of Science databases, together with a manual search, covering the period from 1985 to January 2020, with no language restrictions. Studies were included if they described treatments applied to at least 10 patients with the corresponding outcomes. Methodological quality was evaluated using Jadad scale and Newcastle-Ottawa tool. Global incidence was calculated by random effects meta-analysis using the Comprehensive Meta-analysis version 3.0 software. Publication bias was assessed using funnel plots and the Duval and Tweedie trim and fill method.

Results: Of the 922 identified articles, 12 were found to meet the inclusion criteria. Most of them presented moderate or low risk of bias. A total of 397 patients were analyzed. The mean age was 62.34 years and 248 were women (62.5%). The mean follow-up was 79.3 months. The most frequent treatment was surgical removal with a cold scalpel or laser (339 patients). A total of 232 subjects presented lesion recurrence. The combination of proportions global effect meta-analysis yielded a recurrence rate of 67.2% (95% CI: 48.3–81.8), with the absence of publication bias.

Conclusions: There is not enough scientific evidence to conclude that any treatment strategy is able to reduce the recurrence in PVL.

KEYWORDS
meta-analysis, proliferative verrucous leukoplakia, recurrences, treatments

1 | INTRODUCTION

Proliferative verrucous leukoplakia (PVL) was first described in 1985 by Hansen et al.[1] as a long-evolving aggressive form of oral leukoplakia initially manifesting as a simple white hyperkeratotic plaque, and which gradually spreads over time, becoming multifocal, confluent, and proliferative. Although PVL typically develops as homogeneous white plaques, multiple verrucous zones usually appear over time, along with erythematous and erosive areas. In a recent study by our group,[2] these areas have been found to be associated with an increased risk of oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Some authors such as Villa et al.[3] have suggested the term "proliferative leukoplakia," for although the disorder typically develops a verrucous/nodular pattern over time, this is not always the case.[2]

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2021 The Authors. *Journal of Oral Pathology & Medicine* published by John Wiley & Sons Ltd.

Received: 30 October 2022 | Revised: 17 February 2023 | Accepted: 22 February 2023

DOI: 10.1111/odi.14550

ORIGINAL ARTICLE

ORAL DISEASES WILEY

Oral cancers preceded by proliferative verrucous leukoplakia exhibit distinctive molecular features

Alejandro Herreros-Pomares[1,2] | David Hervás[3] | Leticia Bagan-Debon[4] | Alex Proaño[4] | Diana Garcia[5] | Juan Sandoval[5,6] | Jose Bagan[2,4,7,8]

[1]Department of Biotechnology, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain

[2]Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer, CIBERONC, Madrid, Spain

[3]Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain

[4]Medicina Oral Unit, Stomatology Department, Valencia University, Valencia, Spain

[5]Epigenomics Unit, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain

[6]Biomarkers and Precision Medicine Unit, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain

[7]Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

[8]Precancer and oral cancer research group of Valencia University, Valencia, Spain

Correspondence
Jose Bagan, Servicio de Estomatología y Cirugía Maxilofacial. Hospital General Universitario de Valencia. Avda. Tres Cruces s/n 46014 Valencia, Spain.
Email: jose.v.bagan@uv.es

Juan Sandoval, Biomarkers and Precision Medicine Unit and Epigenomics Unit, Health Research Institute La Fe. Av. Fernando Abril Martorell, 106, 46026 Valencia, Spain.
Email: epigenomica@iislafe.es

Funding information
Instituto de Salud Carlos III

Abstract

Objective: Proliferative verrucous leukoplakia (PVL) has high rates of malignant transformation into oral squamous cell carcinoma (OSCC), but the clinical and evolutionary pattern of OSCC from PVL (PVL-OSCC) is more favorable than that of OSCC not preceded by PVL (OSCC). Here, we aimed to explore the pathophysiologic differences between PVL-OSCC and OSCC through transcriptomic and DNA methylation analyses.

Materials and methods: In this case-control study, oral biopsies from 8 PVL-OSCC and 10 OSCC patients were obtained for global sequencing using RNAseq and a genome-wide DNA methylation analysis via the Infinium EPIC Platform (graphical abstract).

Results: One hundred and thirty-three differentially expressed genes (DEGs) were detected, 94 of them upregulated in OSCC. Most of these genes were previously described in cancer and associated with prognosis. The integrative analysis revealed 26 DEGs, corresponding to 37 CpGs, whose promoters were regulated by DNA methylation. Twenty-nine of the CpGs were found as hypermethylated in PVL-OSCC. Only 5 of the genes that were aberrantly methylated and differentially expressed were upregulated in PVL-OSCC patients, whereas 21 were underexpressed.

Conclusions: PVL-OSCC patients presented lower expression of cancer-related genes. Hypermethylation of the promoter region of many genes was also noticed, indicating that DNA methylation could be a regulatory mechanism.

KEYWORDS
differential expression, differential methylation, oral cancer, oral squamous cell carcinoma, proliferative verrucous leucoplakia, RNAseq

Alejandro Herreros-Pomares and David Hervás should both be considered as first authors.

Juan Sandoval and Jose Bagan, should both be considered as the last authors.

The manuscript has not been previously presented.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2023 The Authors. *Oral Diseases* published by Wiley Periodicals LLC.