



FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

Trabajo de
Fin de Grado

**Concentración de ácido retinoico en
plasma y riesgo de malignización de
Leucoplasia Oral y Leucoplasia
Verrugosa Proliferativa**

**Concentración de ácido retinoico en
plasma e risco de malignización da
Leucoplasia Oral e Leucoplasia
Verrucosa Proliferativa**

**Retinoic acid concentration in serum
and risk of malignization of Oral
Leukoplakia and Proliferative Verrucose
Leukoplakia**

Autor/a/es/as: Sara Alexandra Prieto Barros

Titor/a: Mario Pérez-Sayáns García

Cotitor/a: Cintia Micaela Chamorro Petronacci

Departamento: Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

Julio 2023

Trabajo de Fin de Grado presentado en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela para la obtención del Grado en Odontología

Agradecimientos

Al Dr. Mario Pérez-Sayáns García y la Dra. Cintia Micaela Chamorro Petronacci, por su gran apoyo durante todo el proceso y por brindarme la oportunidad de participar en un trabajo de este calibre.

A la Dra. Susana Belén Bravo López (responsable de la plataforma de Proteómica), al Dr. Esteban Guitian Fernández (responsable de la Unidad de Espectrometría de Masas y Proteómica) y a todo el personal de laboratorio involucrado, por su esfuerzo y colaboración sustancial en este estudio.

Y a la Dra. Yerena Muíños Díaz y a los compañeros de la Unidad de Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la USC, por su empeño y su ayuda en la recogida de muestras.

Ellos son el corazón de este trabajo.

Resumen

Introducción y objetivos: La Leucoplasia Oral (LO) es el desorden oral potencialmente maligno más prevalente y la Leucoplasia Verrugosa Proliferativa (LVP), el de mayor riesgo de malignización. Estudios previos revelaron la importancia de la concentración de ácido retinoico (AR) en plasma en relación con el riesgo de pacientes a desarrollar cáncer, siendo el objetivo del presente estudio conocer la concentración de AR en pacientes con LO y LVP para compararlo con pacientes sanos y comprobar si existe asociación con el riesgo de malignización y otras variables clínicas.

Material y Métodos: Se realizó un estudio observacional ambispectivo con una muestra inicial de 40 pacientes. Se obtuvieron muestras de plasma sanguíneo, de las cuales se extrajo el AR para su cuantificación por medio de tecnología de espectrometría de masas.

Resultados: Un total de 36 muestras fueron incluidas para el análisis funcional de AR. La concentración media de AR fue de 2.1706 ± 0.39432 pg/ml en los pacientes con LO, de 2.6421 ± 0.5588 pg/ml en aquellos con LVP y 2.6580 ± 0.92032 pg/ml en pacientes sanos. Esta diferencia resultó significativa al comparar los grupos de LO con los de LVP y control ($p=0.009$ y $p=0.039$, respectivamente). Sin embargo, no se hallaron diferencias entre las concentraciones de pacientes con LVP y controles sanos, ni relación significativa entre las concentraciones de AR y sexo, consumo de tabaco o malignización de la lesión.

Conclusiones: Una concentración menor de AR resultó especialmente significativa en las muestras de LO comparado con los otros dos grupos de estudio. La concentración de AR no se asoció con las muestras que malignizaron de LVP. Los resultados sugieren que la medición de AR puede ser un predictor en la evolución de la LO siendo necesario en un futuro un mayor tamaño muestral y un seguimiento a más largo plazo para poder asociarla con riesgo de malignización.

Palabras clave: ácido retinoico, riesgo de malignización, leucoplasia oral, leucoplasia verrugosa proliferativa.

Resumo

Introdución e obxectivos: A Leucoplasia Oral (LO) é o trastorno oral potencialmente maligno máis frecuente e a Leucoplasia Verrucosa Proliferativa (LVP), o de maior risco de malignización. Estudos previos revelaron a importancia da concentración do ácido retinoico (AR) en plasma en relación co risco dos pacientes a desenvolver cancro, polo que o obxectivo do presente estudo é coñecer a concentración de AR en pacientes con LO e LVP para comparalo con pacientes sans e comprobar si existe asociación co risco de malignización e outras variables clínicas.

Material e Métodos: Realizouse un estudo observacional ambispectivo cunha mostra inicial de 40 pacientes. Conseguíronse mostras de plasma sanguíneo, das que se extraeu o AR para a súa cuantificación por medio de tecnoloxía de espectrometría de masas.

Resultados: Un total de 36 mostras foron incluídas para a análise funcional do AR. A concentración media de AR foi de 2.1706 ± 0.39432 pg/ml nos pacientes con LO, de 2.6421 ± 0.5588 pg/ml nos pacientes con LVP e 2.6580 ± 0.92032 pg/ml nos pacientes sans. Esta diferenza resultou significativa ao comparar os grupos de LO cos de LVP e control ($p=0.009$ e $p=0.039$, respectivamente). Sen embargo, no se atoparon diferenzas entre as concentracións de pacientes con LVP e pacientes sans, nin relación significativa entre as concentracións de AR e sexo, consumo de tabaco ou malignización da lesión.

Conclusións: Unha concentración menor de AR resultou especialmente significativa nas mostras de LO comparado cos outros dous grupos de estudo. A concentración de AR non se asociou coas mostras que malignizaron de LVP. Os resultados suxiren que a medición de AR pode ser un preditor na evolución da LO, sendo necesario nun futuro un maior tamaño da mostra e un seguimento a máis longo prazo para poder asociala co risco de malignización.

Palabras clave: ácido retinoico, risco de malignización, leucoplasia oral, leucoplasia verrucosa proliferativa.

Abstract

Introduction and aims: Oral Leukoplakia (OL) is the most prevalent oral potentially malignant disorder, while Proliferative Verrucose Leukoplakia (PVL) has the highest malignant transformation risk. Previous studies revealed the importance of retinoic acid (RA) concentration in serum in relation with the patients' risk of developing cancer, so the aim of this work is to study the RA concentration in patients with OL and PVL to compare it with healthy patients and to check out if it exists association with the risk of malignization and other clinical variables.

Material and Methods: An ambispective observational study was carried out with an initial sample of 40 patients. Serum samples were taken for the extraction and quantification of RA using technology of mass spectrometry.

Results: A total of 36 samples were included for the functional analysis of RA. The mean concentration of RA was 2.1706 ± 0.39432 pg/ml in patients with OL, $2.6421 \pm 0,5588$ pg/ml in patients with PVL and 2.6580 ± 0.92032 pg/ml in healthy patients. This difference resulted statistically significant when comparing the groups of OL with the PVL and control ones ($p=0.009$ and $p=0.039$, respectively). However, no differences were found between RA concentrations of patients with PVL and healthy controls, neither was significant the relation between RA concentrations and sex, tobacco consumption or lesions malignization.

Conclusions: A lower concentration of RA resulted particularly significant in the samples of OL compared with the other two groups of study. Concentration of RA was not associated with the PVL samples that went malignant. The results suggested that the measurement of RA can be a predictor in the evolution of the OL. In the future, it would be necessary a greater sample size and a longer-term follow-up to be able to associate RA concentration with risk of malignization.

Key words: retinoic acid, risk of malignization, oral leukoplakia, proliferative verrucose leukoplakia.

Índice

1. Introducción	9
2. Objetivos.....	15
2.1. <i>Objetivo general</i>	15
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	15
3. Material y métodos	16
3.1. <i>Criterios de inclusión y exclusión</i>	16
3.2. <i>Extracción y tratamiento de muestras de sangre</i>	18
3.3. <i>Proceso de extracción del AR</i>	19
3.4. <i>Análisis de masas</i>	20
3.5. <i>Análisis estadístico</i>	21
4. Resultados.....	22
5. Discusión	25
6. Conclusiones	29
7. Bibliografía.....	30
8. Anexos.....	34
8.1. <i>Anexo 1</i>	34
8.2. <i>Anexo 2</i>	35

1. Introducción

Las alteraciones o desórdenes orales potencialmente malignos (DOPM) son todas aquellas presentaciones clínicas que conllevan a un mayor riesgo de desarrollo de cáncer en la cavidad oral, ya sea en una lesión precursora definible clínicamente, o en mucosa oral clínicamente normal. En otras palabras, son “condiciones patológicas que implican, a la vez, un potencial de malignización y un indicador de riesgo de neoplasias malignas” (1).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) lleva inmersa en este tema desde el año 1987, y desde entonces se han llevado a cabo múltiples actualizaciones sobre cómo definir lo que es un DOPM. La más reciente es la del 2020, donde se revisó el listado de patologías definibles como tales, destacando dentro de estas la leucoplasia oral (LO) y leucoplasia verrugosa proliferativa (LVP), la eritroplasia, la queilitis actínica, el liquen plano oral y la fibrosis oral submucosa, entre otras (1).

La determinación de estas lesiones ha supuesto un gran paso para la prevención del cáncer. Por eso el diagnóstico y tratamiento precoz de las DOPM es fundamental para disminuir las tasas de mortalidad de cáncer oral (CO), convirtiendo su estudio en la principal motivación de muchas investigaciones actuales.

La LO es el DOPM más frecuente en la actualidad, presentando una prevalencia mundial del 4.11% (2,3). No obstante, los datos de incidencia son escasos (3). Se define como una “placa blanquecina de riesgo cuestionable, habiéndose excluido otras patologías conocidas o desórdenes que no llevan a mayor riesgo de transformarse en cáncer” (2). En muchos casos de LO, la presentación clínica de las lesiones no se ve acompañada por síntomas que alarmen al paciente. Por ello, la necesidad de tratamiento se reduce a la prevención de cáncer, y no a la enfermedad en sí. En cuanto al análisis histológico de la LO, se caracteriza por condiciones varias como hiperqueratosis epitelial, hiperplasia y displasia en diferentes grados hasta llegar a carcinoma (4). Se han descrito tasas de transformación maligna de LO de entre 0-39%, en función del grado de displasia y población de estudio (3,5), y de acuerdo a la revisión bibliográfica y metaanálisis de Aguirre-Urizar et al (2021), que incluyó 24 estudios de los últimos 5 años, se describió una media estimada del 9,8% de transformación maligna para la LO (6). Además, se han descrito posibles factores de riesgo asociados a la malignización de la LO como el género

femenino, el tiempo transcurrido hasta el diagnóstico, la localización y tamaño de la lesión, sus características morfológicas, el tabaco o el grado de displasia (7,8).

Mientras, la LVP ha sido definida como una forma diferenciada de la LO, que se caracteriza por una serie de hallazgos histopatológicos y clínicos típicos, así como por la progresión clínica de las lesiones distinguible (9). Se ha descrito asimismo como una variante clínica particularmente más agresiva que la LO, que se asocia a una alta probabilidad de recidiva y una tasa de malignización que alcanza hasta el 70% (2). En cuanto a la distribución por sexo y edad, es más frecuente en mujeres (66,7%) de edad avanzada (edad media: 70,2 años) (10). Además, según la literatura, el consumo de tabaco y alcohol no parecen tener relevancia en la aparición de estas lesiones, al contrario que sucede en la LO, para la cual se ha reconocido al hábito tabáquico como el único factor de riesgo claro (10). En la Figura 1 pueden apreciarse formas clínicas características de LO y LVP.

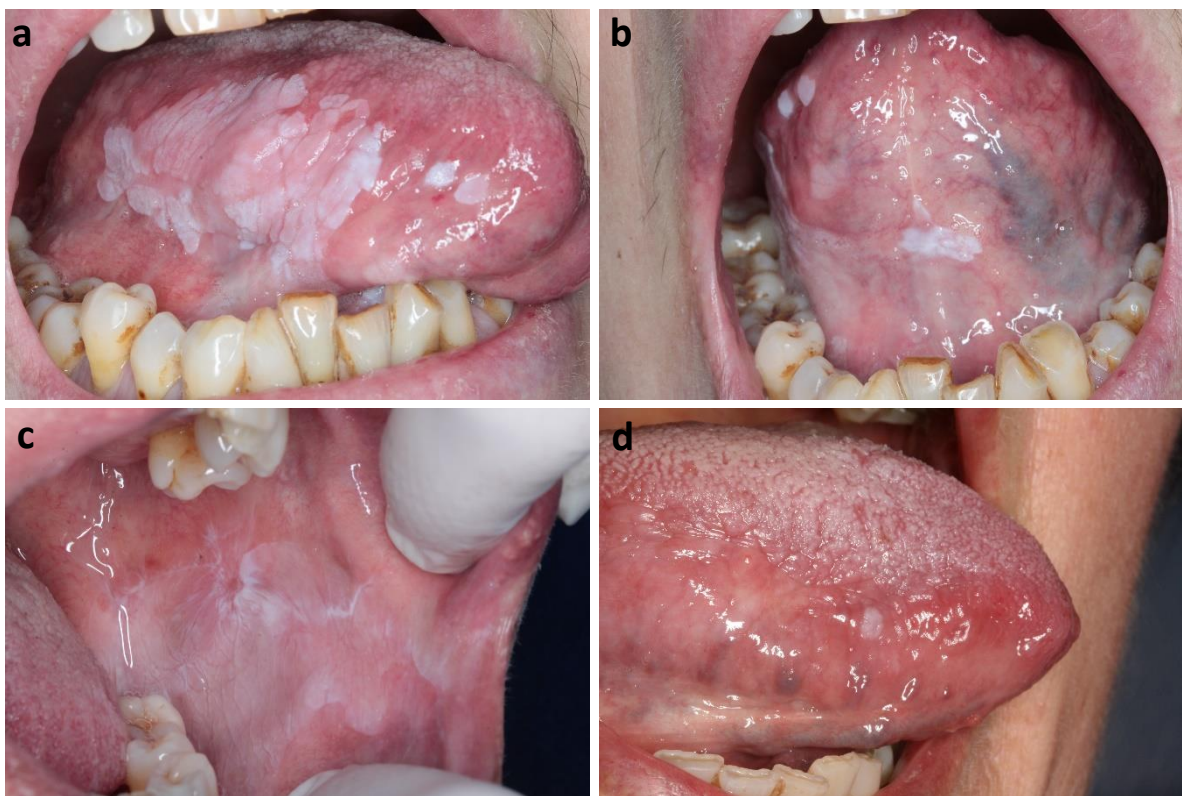


Figura 1. Imágenes clínicas de LO y LVP. (a) LVP extenso en lateral derecho de lengua. (b) LVP en región de la inserción del frenillo lingual en cara ventral de la lengua. (c) LO homogénea en mucosa yugal izquierda. (d) LO homogénea en borde lateral derecho de la lengua.

Imágenes cedidas por la Unidad de Medicina Oral de la Universidad de Santiago de Compostela

En cuanto a la prevención, existen pocos estudios que demuestren la eficacia de los tratamientos para evitar la malignización de la LO y LVP (11). De hecho, algunos autores defienden que no hay evidencia suficiente hasta la fecha que demuestre que tratar las lesiones de LO reduzcan el riesgo de desarrollar CO a lo largo de su vida (3). Aunque el riesgo de transformación maligna es objeto de diferentes tipos de investigaciones, encontramos descritos algunos factores que se han relacionado con ese riesgo aumentado de desarrollar cáncer, como la expresión del Δ Np63, de podoplanina o la presencia de clusters de células inflamatorias intraepiteliales (11), que se han identificado como posibles biomarcadores para determinar qué pacientes tienen riesgo aumentado.

Otros muchos marcadores se han estudiado asociados al desarrollo de CO a partir de DOPM. En el “World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia and proliferative verrucous leukoplakia” (2020) se recopilaron en una revisión sistemática que incluía 54 estudios retrospectivos un conjunto de biomarcadores para la LO y LVP. Comenzando por la LVP, algunos de los descritos fueron p53, Ki-67, ADN VPH, Bcl-2 o COX-2. Para la LO se destacó la ploidía de ADN (cantidad de ADN celular, que puede ser normal o anormal (aneuploide)), EZH2, ARNs ADH1 y ADH2 de *Cándida*, o hallazgos en la cromatina nuclear (2). La aneuploidía se ha propuesto asimismo como biomarcador de la LVP, apareciendo hasta en el 92% (95% CI 80-99%) de los casos según se vio en una revisión sistemática de la literatura, aunque aún debe estudiarse más para validarse (12). En el estudio de Habiba et al. (2015) se estudió la expresión del ALDH1 y podoplanina en muestras de 79 pacientes con LO durante un período de 3.4 años, obteniéndose una expresión en el 61 y 67% de los pacientes respectivamente, y llegándose a observar incluso la evolución a CO en el 66% de ellos. Se demostró una correlación positiva entre la expresión de estas proteínas y el riesgo aumentado de transformación maligna (3.02 veces más riesgo para ALDH1 y 2.62 para podoplanina) (13). También se han descrito como biomarcadores las citoquinas salivares encontrándose significativamente más elevadas IL-6 y TNF- α en los pacientes con DOPM comparado con controles sanos (14,15). Sin embargo, ningún biomarcador ha resultado tan significativo como para utilizarlo específicamente como predictor de malignización para LO o LVP.

El ácido retinoico (AR) es un metabolito hormonalmente activo de la vitamina A (componente crítico de la inmunidad), la cual se utiliza desde hace años como agente quimiopreventivo para disminuir las lesiones de LO. Son muchos los ensayos clínicos randomizados en los que se ha visto una mejoría clínica significativa al intervenir con estos agentes (16). Sin embargo, estas recidivan en una altísima proporción y vienen acompañadas igualmente por efectos adversos. Por tanto, sigue sin haber evidencia de tratamientos realmente efectivos para la LO y LVP para evitar su transformación maligna (2).

El AR puede presentarse en realidad como 5 isómeros químicos distintos, siendo el ácido all-trans-retinoico (at-AR) la forma isomérica biológicamente activa y producto primario de la actividad enzimática (17), si bien se tratará de forma genérica como AR en este trabajo. Este compuesto es fundamental sobre todo en el desarrollo embriológico, si bien en el paciente adulto tiene funciones esenciales en la diferenciación celular (de células B, células T y células dendríticas), la homeostasis de los tejidos (como la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias) (17–20) y en la migración de células del sistema inmune (17). Los retinoides, análogos de la vitamina A, también participan en las funciones de proliferación y diferenciación de células mesenquimales y epiteliales (19). Lo que hacen es regular estos procesos, gracias a su papel como moléculas de señalización en la embriogénesis y a su potente poder inductor de apoptosis (19). En la literatura se ha descrito la importancia del AR y los retinoides en la señalización de varios procesos biológicos y en determinadas enfermedades, viéndose su influencia en la modulación de la actividad inflamatoria que acompaña a muchas patologías (17).

Desde hace muchos años se estudia el papel del AR en el desarrollo del cáncer, concretamente a fin de demostrar la efectividad de esta molécula en la supresión de la carcinogénesis (18). Desde el año 1925, estudios epidemiológicos, preclínicos y clínicos han asociado la deficiencia de la vitamina A a una incidencia aumentada de oncogénesis en el humano y otros mamíferos como los roedores (4,17). Se han recogido datos al respecto en cáncer de mama, de próstata, o, lo que viene al caso, tumores malignos de la cavidad oral (18,21). Además, la vitamina A se ve alterada ante procesos de inflamación e infección, según se pudo observar en ensayos de laboratorio a partir de reducciones de su concentración en plasma (20), lo cual concuerda con una situación de

LO, LVP o CO si atendemos a las alteraciones que también sufren los tejidos en estas patologías.

Los niveles del AR pueden verse afectados al alterar su síntesis y/o su catabolismo (20). Es aquí donde entran en juego los citocromos P450, que componen una familia de enzimas proteolíticas (enzimas oxidativas hemo-proteicas enlazadas a membrana) específicas para el AR conocidas como CYP26 (20). En el ser humano, existen 3 proteínas en esta familia: CYP26A, CYP26B y CYP26C. Las tres enzimas CYP26 son capaces de convertir at-AR en 4-hidroxi-AR, 4-oxo-at-AR y 18-hidroxi-at-AR como los principales productos (20,21). Comparten menos de la mitad de aminoácidos idénticos entre sí, lo que las hace esenciales individualmente para llevar estas funciones (20). Aunque no se han definido con claridad cuáles son estas, se ha demostrado que las enzimas resultantes de la expresión del citocromo CYP26 juegan un rol en la homeostasis al restringir el acceso del AR a la maquinaria de transcripción de los tejidos (18). En otras palabras, la expresión de estas enzimas protege a las células sensibles al AR gracias a que evitan las transcripciones inapropiadas mediadas por esta molécula (21). Sin embargo, las funciones de las CYP26 también pueden ser bloqueadas químicamente por agentes bloqueantes del metabolismo del AR (21). Un ejemplo es el talarozol, para el cual se ha descrito su uso en terapia tópica en lesiones epidérmicas (22).

También debemos destacar que las CYP26 participan en el metabolismo de otros compuestos distintos al AR (20). Trabajos anteriores han descrito el papel de estas enzimas en las principales rutas metabólicas de hormonas, drogas y xenobióticos (20). Lo que es más, se han llegado a referir a las CYP26 como “importantes reguladores de la diferenciación y modulares de posibles estados patológicos (por medio del control de la concentración de retinoides) y de la homeostasis” (18,19,21). Otros autores han descrito órganos diana para cada una de estas enzimas, donde se sintetizan en mayor proporción. Esto podría estar relacionado con sus funciones, si bien también hay que considerar las capacidades individuales de oxidación hepática del AR en cada paciente (20). Así, en presencia de variables genéticas que disminuyesen la actividad de las CYP26, se observaría una disminución en las concentraciones de AR en los tejidos en los que se expresarían normalmente estas enzimas (17). Las células madre por ejemplo

almacenan cerca del 80% de la vitamina A y sus funciones se ven influidas por el AR a nivel celular (18).

Se ha especulado con la posibilidad de que determinadas rutas de señalización en la expresión del CYP26A1 puedan influir en el origen de eventos oncogénicos (18). Se ha visto que en pacientes con cáncer pueden detectarse determinados metabolitos de la vitamina A, una gran expresión de enzimas CYP26A1 y elevada actividad catabólica del AR (18). Estudios epidemiológicos aportaron evidencia de que ante una baja biodisponibilidad de AR se suprimen los procesos de apoptosis celular (18), lo cual se relacionaría con una mayor probabilidad de desarrollar cáncer dada la respuesta disminuida a los inductores de muerte celular. De hecho, en el ser humano ya se han determinado algunos polimorfismos que involucran a las CYP26 en relación con mutaciones causantes de ciertas enfermedades. Por ejemplo, los polimorfos CYP26A1 y CYP26B1, ya sea combinados o por separado, suponen un mayor riesgo de cáncer orofaríngeo (21). Por otro lado, en una investigación sobre la caracterización del citocromo P450 en relación con el AR se estudiaron muestras de piel, diferenciando entre áreas expuestas a los UV del sol de manera crónica y áreas no expuestas, para relacionarlo con la expresión de las enzimas. Se observó que, en las primeras, la expresión de CYP26A1 era mucho mayor, asociado a los cambios displásicos de la queratosis actínica. Por tanto, se vio una relación entre la displasia de los tejidos (con riesgo de malignización) y la expresión de los polimorfismos de las CYP26 (18).

Un estudio realizado recientemente por la Unidad de Medicina Oral (Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas) de la Facultad de Odontología de la USC en colaboración con la fundación Pública Gallega de Medicina Genómica, identificó a 17 individuos de una misma familia de 3 generaciones, de los cuales 3 habían desarrollado carcinoma oral de células escamosas (COCE) y 1 un adenocarcinoma de esófago. Dada la ausencia de factores de riesgo conocidos en estos individuos para desarrollar cáncer, y suponiendo una herencia monogénica, se llevó a cabo una investigación con el primer objetivo de estudiar las variantes genéticas posiblemente asociadas al desarrollo de COCE. Tras el genotipado de los pacientes, se observó que la variante más interesante, el CYP26B1 de la familia de citocromos P450, estaba implicada en el metabolismo de la vitamina A. Así, el segundo objetivo fue valorar el efecto de dicha variante en el organismo analizando la concentración de AR en tres

tipos de pacientes: en los que desarrollaron COCE, en familiares sanos, y en un grupo control. Con esto, se confirmó una correlación positiva estadísticamente significativa entre la presencia de la variante del CYP26B1 y una concentración disminuida del AR (23).

Esto motivó el desarrollo de este trabajo y comprobar si se podía obtener información similar en muestras de pacientes con DOPM, concretamente en pacientes diagnosticados de LO o LVP, y poder predecir su malignización.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es estudiar la concentración en plasma de AR en pacientes con LO y LVP, y compararlo con controles sanos.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar si existe una asociación entre la expresión del AR y el riesgo de malignización de las lesiones.
2. Estudiar la asociación entre la expresión de AR y características clínicas de LO y LVP.

3. Material y métodos

Este trabajo consiste en un estudio ambispectivo de tipo observacional. Las fases de este proyecto se pueden ver en la Figura 2.

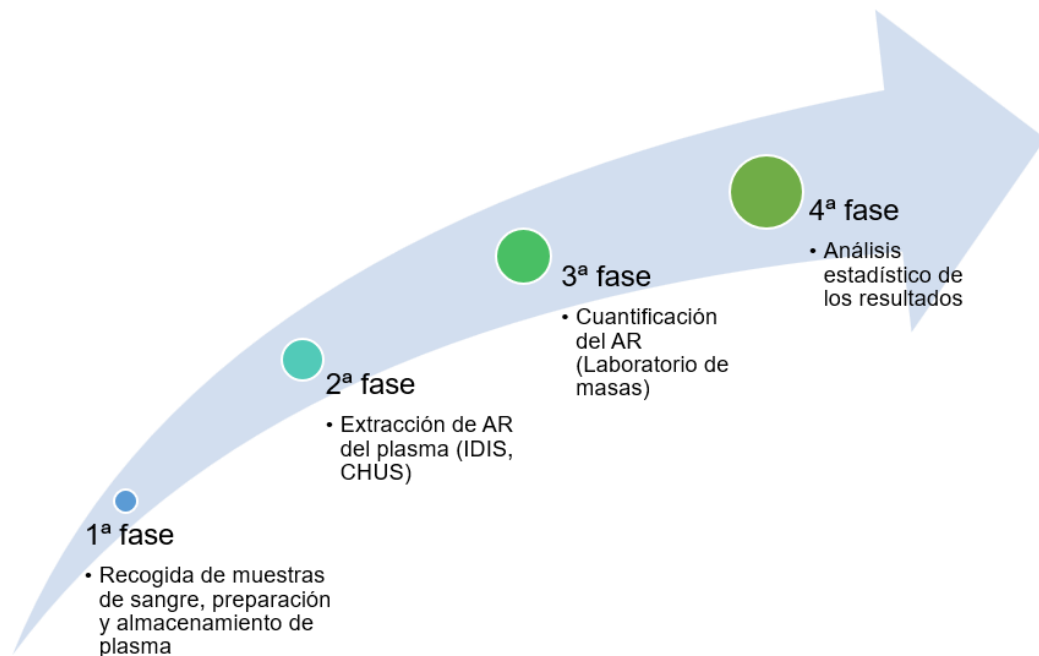


Figura 2. Planificación del proyecto

La población de estudio fueron individuos diagnosticados de LO y LVP. Dichos pacientes se reclutaron de la Unidad de Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la USC, donde ya estaban siendo atendidos y monitorizados. Se recogió el consentimiento por escrito de los pacientes de acuerdo con la Declaración de Helsinki (Anexo 1). Todo el proceso se llevó a cabo bajo la aprobación del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo, (Ref: 2018/503).

3.1. Criterios de inclusión y exclusión

Todos los pacientes incluidos en este estudio cumplían con todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

Para conformar los grupos de casos se determinaron los siguientes criterios:

- Criterios de inclusión para los grupos de casos: pacientes mayores de edad, con diagnóstico definitivo, confirmado por biopsia por el Servicio de Anatomía Patología del CHUS (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela), de LO o LVP (grupos GLO y GLVP, respectivamente).
- Criterios de exclusión para los grupos de casos: pacientes con diagnóstico actual de cáncer, así como otras formas de DOPM (liquen plano, fibrosis oral submucosa, etc.). Pacientes con Incapacidad para entender las instrucciones verbales y escritas (de cara a obtener el consentimiento informado)

Se determinaron así tres grupos de estudio:

- Pacientes con LO: Grupo de Leucoplasia Oral (GLO)
- Pacientes con LVP: Grupo de Leucoplasia Verrugosa Proliferativa (GLVP)
- Pacientes control: Grupo Control (GC)

Tanto el grupo GLO como el grupo GLVP estaban conformados por 10 pacientes; es decir, 20 pacientes como muestra de estudio en total.

Por otro lado, un total de 20 pacientes fueron incluidos como grupo control. Los controles, pareados por sexo y edad (± 5 años) a los pacientes que formaban parte de la muestra de LO y LVP, procedían de dos centros sanitarios: el Servicio de Integrada de Adultos de la Facultad de Odontología de la USC, y el Hospital Vithas Vigo (Vigo, Pontevedra). Estos fueron reclutados de la agenda de los dos centros sanitarios anteriormente mencionados, conforme acudían a sus citas médicas/odontológicas por otros motivos, como la realización de un empaste o un chequeo en su centro de salud. Para esta selección se comprobaron primeramente las historias médicas de los pacientes, asegurándose de que estuvieran actualizadas, y se les realizó una exploración de la cavidad oral por el personal sanitario encargado para la detección rápida de anomalías en mucosa que hicieran descartar al individuo del estudio.

- Criterios de inclusión para el grupo control: edad y sexo pareado a los pacientes GLO y GLVP.
- Criterios de exclusión para el grupo control: diagnóstico actual de cáncer, diagnóstico de cualquier DOPM, presencia de lesiones de origen no traumático en mucosa oral a la simple exploración (sin diagnóstico definitivo). Paciente

con incapacidad para entender las instrucciones verbales y escritas (de cara a obtener el consentimiento informado)

3.2. Extracción y tratamiento de muestras de sangre

La recogida de muestras de los grupos GLO y GLVP se llevó a cabo en la misma Unidad de Medicina Oral de la Facultad de Odontología, por medio de la extracción de sangre de los pacientes en las citas correspondientes a la revisión de sus lesiones de LO o LVP. Para el grupo GC, se recogieron las muestras en su horario de consulta en los centros de reclutamiento.

De cada paciente se obtuvieron 2 tubos de sangre. Para la preparación de las muestras, los tubos fueron centrifugados a 4 mil revoluciones durante 15 minutos (centrifugadora angular analógica, marca Quirumed (Valencia, España), CNT800D) para la separación de los componentes sanguíneos. A continuación, se pipeteó únicamente el plasma en el interior de los tubos de Eppendorf estériles y se congelaron a -20°C inmediatamente para su conservación.

Para la identificación de cada paciente, se codificaron las muestras pertenecientes a cada uno de acuerdo con su grupo de estudio o control de la siguiente manera:

- GLO: GLO1 - GLO10
- GLVP: GLVP1 - GLVP10
- GC: GC1 - GC20

En los tres casos, las dos muestras pertenecientes a cada paciente se distinguieron adicionalmente como A y B. Con todo ello, se reunieron las muestras que se muestran en la Figura 3.

Una vez obtenidas todas las muestras, fueron transportadas en frío al Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), en el CHUS, donde se realizaría la extracción de AR para su posterior cuantificación en el Laboratorio de masas.

Grupo Control			Grupo Leucoplasia Oral			Grupo Leucoplasia Verrugosa Proliferativa		
Código	Sexo/edad control	Edad pct	Código	Sexo	Edad	Código	Sexo	Edad
GC1A y B	Mujer 65±5	64	GLO1A y B	Hombre	56	GLVP1A y B	Hombre	71
GC2A y B	Mujer 48±5	51	GLO2A y B	Mujer	48	GLVP2A y B	Mujer	65
GC3A y B	Mujer 44±5	47	GLO3A y B	Hombre	74	GLVP3A y B	Hombre	49
GC4A y B	Hombre 49±5	49	GLO4A y B	Mujer	76	GLVP4A y B	Hombre	64
GC5A y B	Hombre 56±5	58	GLO5A y B	Mujer	44	GLVP5A y B	Mujer	59
GC6A y B	Mujer 54±5	50	GLO6A y B	Mujer	79	GLVP6A y B	Mujer	55
GC7A y B	Mujer 55±5	50	GLO7A y B	Hombre	87	GLVP7A y B	Mujer	56
GC8A y B	Mujer 56±5	56	GLO8A y B	Mujer	54	GLVP8A y B	Mujer	57
GC9A y B	Mujer 57±5	54	GLO9A y B	Hombre	75	GLVP9A y B	Mujer	83
GC10A y B	Hombre 56±5	58	GLO10A y B	Hombre	77	GLVP10A y B	Hombre	56
GC11A y B	Mujer 59±5	63						
GC12A y B	Hombre 64±5	62						
GC13A y B	Hombre 71±5	69						
GC14A y B	Hombre 75±5	76						
GC15A y B	Hombre 77±5	80						
GC16A y B	Mujer 83±5	85						
GC17A y B	Hombre 87±5	83						
GC18A y B	Hombre 74±5	78						
GC19A y B	Mujer 76±5	77						
GC20A y B	Mujer 79±5	79						

Figura 3. Resumen codificación de las muestras por grupo, indicando edad y sexo

3.3. Proceso de extracción del AR

Esta fase del procedimiento se llevó a cabo en el servicio de Proteómica del IDIS, CHUS. Se siguió el procedimiento recogido en el artículo “Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS” de Ken et al. (2005) (24). Se empleó un solo tubo por paciente (muestra A) para reducir la exposición del personal de laboratorio a los disolventes, reservándose el segundo tubo por si hiciera falta más adelante (muestra B). Una vez obtuvieron las muestras de plasma congeladas, se agregaron 200 µl de suero a un tubo de cultivo de vidrio desechable (16 mm x 150 mm), junto a un volumen de 15 µl de patrón interno (4,4-dimetil RA 50 nM en acetonitrilo). Se incorporó 1 ml de MKOH en etanol y se mezcló en vórtex. A continuación, se agregaron 10 ml de hexano, se volvió a mezclar en vórtex y se centrifugaron las muestras a 60 rpm durante 1-3 min para conseguir la separación de las fases. Una vez obtenidas estas fases, se eliminó la capa de hexano, que contenía lípidos (entre ellos retinol y ésteres de retinilo) con especial y se realizaron una serie de pasos para recuperar el AR. Se agregaron 60 µl de HCl 4 M a la fase acuosa y se mezcló con vórtex, seguido de la incorporación de un volumen de 10 ml de hexano y nuevamente mezclado con vórtex,

tras lo cual se centrifugó bajo las mismas pautas descritas antes. Se separaron las fases y el disolvente de la segunda fase de hexano (que contenía AR) fue retirada bajo una corriente suave de nitrógeno a 25-30°C, con especial cuidado para evitar la contaminación de esta capa de hexano con la capa acuosa ácida (que catalizaría la isomerización del AR). El residuo resultante se disolvió en 60-100 µl de acetonitrilo y se llevó a un autoinyector de vidrio desactivado para realizar el posterior análisis (24).

3.4. Análisis de masas

Para el análisis de masas se empleó la tecnología de espectrometría de masas con analizador tipo triple cuadrupolo. Se empleó el equipo API 4000 de AB SCIEX acoplado a un HPLC de la casa Agilent (Santa Clara, California, EEUU) modelo 1200RR. La fuente de ionización fue APCI POSITIVO, la temperatura de la fuente 350°C y la temperatura del horno de 30°C.

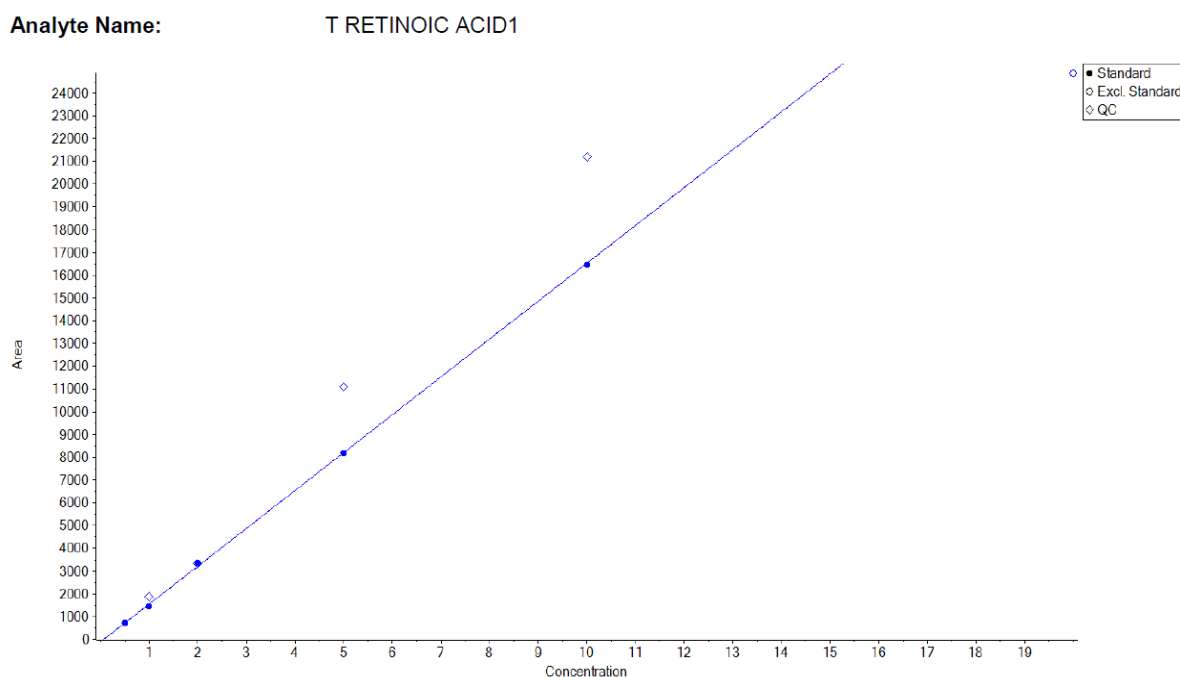


Figura 4. Recta de calibrado de ácido retinoico

Se emplearon 20 µl de cada muestra de AR obtenido en el proceso explicado en el apartado *Proceso de extracción del AR*. Antes de comenzar, se llevaron a cabo

pruebas de calibrado del sistema en Acetonitrilo (0.5-20 ppb). Para ello se empleó el estándar original disuelto en DMSO (dimetilsulfóxido) de la casa Sigma-Aldrich. La gráfica de calibrado puede verse en la Figura 4, donde viene dada la concentración por área (ppb). El mismo calibrado se repitió tras un determinado número de muestras para resetear el sistema y evitar errores en el análisis.

En la Figura 5 podemos ver un ejemplo de una muestra con resultados positivos para la concentración de AR.

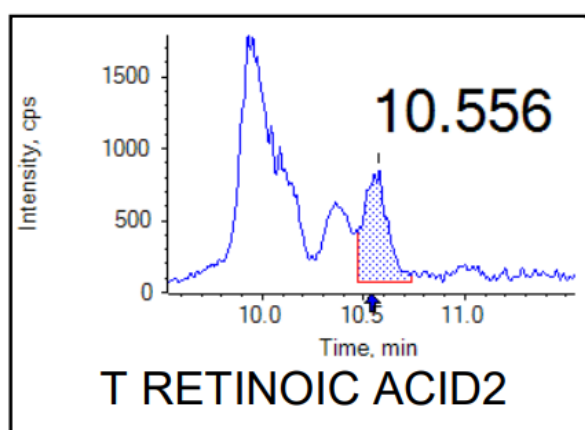


Figura 5. Ejemplo de espectrometría de masas de una muestra de AR

Para la realización de esta fase se requirió la participación de la Red de Infraestructuras de Apoyo a la Investigación y el Desarrollo Tecnológico (RIAIDT): Servicio de Espectrometría de Masas y Proteómica.

3.5. Análisis estadístico

Se creó una base de datos específica para el estudio donde se recogieron las variables: grupo de la muestra (LO/GLVP/GC), sexo (hombre/ mujer), edad, consumo de tabaco (cigarrillos/día), fecha de diagnóstico de LO/LVP, malignización (sí/no) y su fecha de diagnóstico de malignidad y localización si se diera el caso, última fecha de revisión, tratamiento recibido (seguimiento/láser/exéresis) y concentración de AR (pg/ml) por cada muestra.

El programa SPSS v.28 (IBM) fue empleado para el análisis estadístico. Los resultados recabados se expresaron en frecuencias y porcentajes o medias con su correspondiente desviación estándar. Se aplicó la prueba Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de las muestras. Se crearon tablas de contingencia y se utilizó la prueba Chi2 con correcciones de plausibilidad. Para comparar las medias se empleó el test ANOVA de una vía para comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni. El estudio de correlación se realizó mediante la r de Pearsons. Aquellos valores de p con un valor inferior a 0.05 se determinaron como significativas.

4. Resultados

Un total de 40 pacientes fueron incluidos en este estudio. De las 40 muestras de partida para analizar la concentración de AR, 4 de ellas tuvieron que ser descartadas ya que los valores observados eran demasiado bajos y caían por debajo de la curva de calibrado. Los datos descriptivos de los pacientes pueden verse en la Tabla 1.

Variable clínica		N (%)
Grupo	Verrucosa proliferativa	9 (25)
	Leucoplasia Oral	10 (27,8)
	Control	17 (47,2)
Sexo	Hombre	15 (41,7)
	Mujer	21 (58,3)
Tabaco	No fumador	21 (58,3)
	Fumador	5 (13,9)
	Exfumador	10 (27,8)
Malignización	No	33 (91,7)
	Si	3 (8,3)
Tratamiento	Seguimiento	9 (25)
	Exéresis	4 (11,1)
	Lasser	6 (16,7)

Tabla 1. Análisis descriptivo de la muestra

La edad media de los pacientes en el momento en que se obtuvieron las muestras de sangre fue de 64.28±12.27 años (rango 44-87 años). El diagnóstico de LO y LVP en los pacientes de la muestra se hizo a una edad media de 58.79±12.12 años (rango 39-80 años).

De las 36 muestras incluidas solo tres pacientes desarrollaron cáncer, todos ellos con antecedente de LVP. Estos eran dos hombres y una mujer. La transformación maligna se produjo a una edad media de 62.67±12.70 años (rango 48-70 años). Los tres malignizaron en una zona de la cavidad oral diferente: uno en encía, otro en mucosa yugal y el tercero en reborde alveolar. De estos pacientes, solo 1 de ellos era fumador (20 cigarrillos/día), sin bien tras el diagnóstico abandonó el hábito tabáquico.

Variable		Media (SD)	Mín-máx	Valor-p
Grupo	Leucoplasia Oral (N=18)	2,1706 (0,39432)	1,75-3,09	0,009
	Leucoplasia Verrugosa Proliferativa (N=14)	2,6421 (0,5588)	1,95-3,95	
	Leucoplasia Oral (N=18)	2,1706 (0,39432)	1,75-3,09	0,039
	Control (N=30)	2,6580 (0,92032)	1,45-4,76	
	Leucoplasia Verrugosa Proliferativa (N=14)	2,6421 (0,5588)	1,95-3,95	
	Control (N=30)	2,6580 (0,92032)	1,45-4,76	
Sexo	GLO	Hombre (N=8)	1,9950 (0,26431)	0,091
		Mujer (N=10)	2,3110 (0,43595)	
	GC	Hombre (N=14)	2,8279 (0,90661)	0,353
		Mujer (N=16)	2,5094 (0,93523)	
Tabaco	GLO	No fumador (N=10)	2,0570 (0,32153)	0,395
		Fumador (N=2)	2,3950 (0,36062)	
		Exfumador (N=6)	2,2850 (0,50489)	
	GC	No fumador (N=18)	2,8422 (1,04204)	0,184
		Exfumador (N=12)	2,3817 (0,64496)	
Tratamiento	GLO	Seguimiento (N=12)	2,2917 (0,41118)	0,063
		Láser (N=6)	1,9283 (0,22605)	

Tabla 2. Concentración de AR en los pacientes según las variables clínicas. Los valores destacados en negrita corresponden a los que demuestran una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

La concentración de AR promedio fue de 2.1706 ± 0.39432 pg/ml para el GLO, 2.6421 ± 0.5588 pg/ml para el GLVP y 2.6580 ± 0.92032 pg/ml para el GC. En el análisis de asociación general, no se vieron diferencias significativas entre la concentración de AR y variables como el sexo ($p=0.918$), el consumo de tabaco ($p=0.838$) o la malignización de la lesión ($p=0.276$). En la Tabla 2 se muestran todos los datos desglosados por variables.

De los 18 pacientes con LO y LVP que se consideraron al final como muestra de estudio, el tratamiento recibido fue seguimiento en 9 de ellos (25%), vaporización con láser en 6 (16.7%) y exéresis quirúrgica en 4 (11.1%).

El análisis ANOVA de un factor reveló que la concentración media de las muestras del GLO era significativamente más baja que en las muestras del GC ($p=0.039$). Esta diferencia se mantuvo al comparar el GLO con el GLVP, es decir que la concentración de AR en los pacientes con LO también era significativamente menor que en los pacientes con LVP ($p=0.009$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre muestras del GLVP y del GC ($p=0.953$). En la Figura 6 se puede ver la dispersión de los resultados agrupados por grupos (GLO, GLVP y GC). Los asteriscos muestran los valores de p.

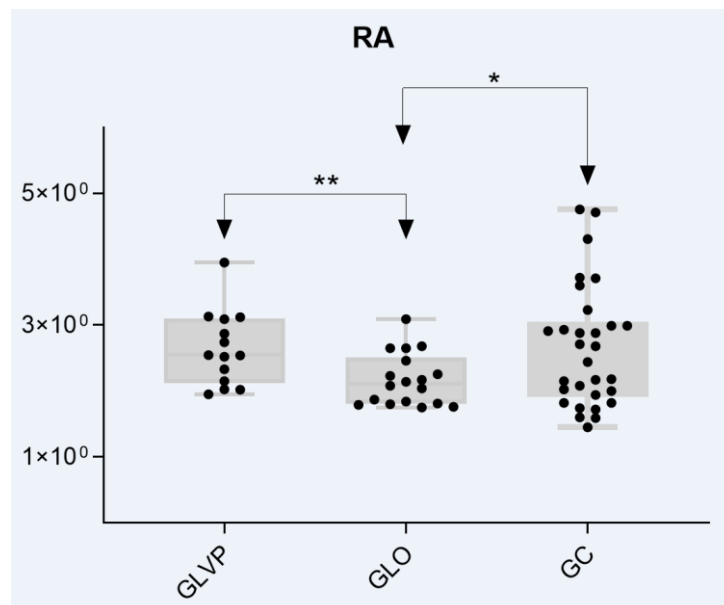


Figura 6. Dispersión de los valores de concentración de AR en gráfica de cajas y bigotes. Esta representación se obtuvo empleando todos los datos brutos de las réplicas técnicas como muestras individuales, una vez se retiraron las muestras que no podían considerarse válidas por alejarse demasiado de la recta de calibrado de AR.

5. Discusión

Un total de 36 muestras fueron incluidas en este estudio para analizar la concentración de AR en pacientes con LO, LVP y controles sanos. A fin de comprobar si el AR puede emplearse como herramienta de determinación del riesgo de malignización de las lesiones, se analizaron las características clínicas de los pacientes con LO y LVP con la concentración de AR, y se comparó la concentración media entre grupos. A través de los resultados obtenidos, se ve que en los pacientes con LO la concentración de AR es más baja comparado con el GLVP y el GC ($p=0.009$ y $p=0.039$, respectivamente). Es el único parámetro en el que se demuestra asociación estadísticamente significativa, mientras que entre pacientes con LVP y pacientes sanos no se observa diferencia.

Respecto a las variables clínicas, el AR no parece estar relacionado con el sexo del paciente. En cambio, cuando se analizaron los datos por grupos de estudio asociado al sexo, se puede ver que los hombres con LO tienen una concentración de AR menor que las mujeres, aunque no es estadísticamente significativo ($p=0.091$). Curiosamente, la literatura coincide en que la incidencia de COCE en hombres es del doble respecto a la incidencia en mujeres, si bien esta tendencia se está igualando poco a poco (25). Además, comparando con el estudio de Pérez-Sayáns et al. (2023), en este tampoco se hallaron diferencias significativas entre sexos con respecto a la concentración de AR ($p=0.31$) (23).

Tampoco se halló correlación entre el consumo de tabaco y la concentración de AR con respecto al grupo de pacientes con LO ($p=0.395$), lo que nuevamente coincide con los resultados de Pérez-Sayáns et al. ($p=0.56$) (23). El análisis de correlación de la concentración de AR y la edad no demostró que existiera correlación significativa entre estos factores, ni para los pacientes con LO ni para los pacientes sanos ($p=0.948$ y $p=0.682$ respectivamente). Los resultados de Pérez-Sayáns et al. son similares en este aspecto, puesto que crearon dos grupos de edad con su muestra y obtuvieron que los pacientes menores de 60 años presentaban en promedio una concentración de AR de 4.34 ± 1.6 pg/ml frente a la media de 3.63 ± 1.74 pg/ml de los pacientes mayores de 60 años. Así, se vio en su estudio que no había variación significativa de la concentración de AR con la edad ($p=0.33$) (23).

En lo que respecta al tratamiento recibido desde el momento del diagnóstico de cada paciente, no hallamos asociación estadísticamente significativa con ninguno de los tres parámetros (láser/seguimiento/exéresis) y la concentración de AR ($p=0.063$), si bien se observa similitud en los resultados de los pacientes que recibieron terapia con láser en contraposición con aquellos que simplemente habían sido monitorizados para el control de sus lesiones. Cabe aclarar que todos los pacientes habían y continúan recibiendo atención acorde a su patología para la exploración rutinaria de las lesiones, independientemente de que se les hubiera realizado exéresis o vaporización con láser, por lo que se considera “seguimiento” solo a aquellas situaciones en las que no se haya puesto en práctica ningún otro tipo de tratamiento para la LO y la LVP desde el momento de diagnóstico. Este hecho va en sintonía con lo que indica la literatura sobre la eficacia de los tratamientos con láser, que describe tasas de recidiva bastante elevadas (de hasta el 31%) (26), lo que estaría reflejando la continuidad del factor precipitante a la aparición de las lesiones.

En la actualidad, es bien conocido que la LVP maligniza en forma de ciertos tipos de carcinomas con mayores índices de supervivencia, los cuales presentan entre las características clínicas comunes el aspecto verrugoso, son más reincidentes, etc. (10). Los resultados de este estudio apoyarían estas premisas, ya que las concentraciones de AR de los pacientes con LVP fueron muy similares a los controles sanos, lo que podría relacionarse quizás con un comportamiento menos agresivo y se podría pensar que estas lesiones tienen afectados mecanismos moleculares y celulares diferentes a los que suscitan la malignización en las LO (3). Así pues, en el caso de la transformación maligna de una LO la supervivencia es menor y está asociado a factores de riesgo diferentes a los descritos para la LVP (27).

En el artículo de Pérez-Sayáns et al. (2023) se asocian los pacientes con mayor tendencia a tener cáncer con una menor concentración de AR comparado con pacientes sanos (23), lo cual entra en consonancia con los resultados del presente estudio aunque los datos difieran ligeramente. La concentración media de AR de los pacientes que malignizaron en la investigación de Pérez-Sayáns et al. fue de 1.67 ± 0.49 pg/ml, frente a una concentración promedio de 4.25 ± 1.56 pg/ml de los que no malignizaron ($p=0.03$) (23). Si comparamos los valores de concentración de AR de ambos estudios, coincide que los valores más bajos serían los de los pacientes con CO (1.67 ± 0.49 pg/ml), seguido

de los pacientes con LO (2.17 ± 0.39 pg/ml) y por último los sanos (4.7370 ± 1.5992 pg/ml de media en los controles de Pérez-Sayáns, y 2.6580 ± 0.92032 pg/ml de media en los controles de este trabajo). Si bien llama la atención la discrepancia de concentración que presentan los controles de un estudio frente a los controles del otro, hay que tener en cuenta que el tamaño muestral fue menor en el trabajo de Pérez-Sayáns et al. y que el tipo de población era diferente, puesto que el grupo control era pareado con los familiares de los pacientes de estudio y no con las DOPM específicas aquí incluidas.

Todos estos aspectos ponen de manifiesto la necesidad de seguir trabajando en la materia. Se requerirían nuevas investigaciones para continuar el estudio de todos estos parámetros y, a ser posible, incluir otros, como la asociación con el consumo de alcohol o infecciones víricas en LO y LVP, o incluso dirigir este modelo de investigación a otras DOPM. Cabe señalar algunas mejoras a tener en cuenta para posibles futuras reproducciones de este estudio. En primer lugar, una de las limitaciones más importantes es el tamaño muestral con el que se ha trabajado, si bien al incluir controles pareados por edad y sexo para llevar a cabo la comparación de los resultados ha solventado este problema en cierta medida. Todos los casos de malignización incluidos pertenecían al grupo de LVP, y sería interesante incluir también pacientes con LO que presenten cierta tasa de malignización.

Otra limitación es el tiempo de seguimiento, puesto que lo ideal sería incluir en el estudio la monitorización de las lesiones de LO y LVP durante un período de tiempo mayor. A pesar de ello, este estudio sirve como punto de partida para futuros proyectos en los que se pretende continuar vigilando la evolución de estos y otros pacientes.

En el diseño del modelo de investigación se consideraron varios aspectos. En primer lugar, se apostó por muestras de sangre ya que en el estudio de Pérez-Sayáns et al. se observó que el AR no podía detectarse en saliva (23). Para el análisis de asociación se utilizaron réplicas técnicas, además de las réplicas biológicas inicialmente tomadas. Así, para todos los compuestos se optimizó un mínimo de dos transiciones: una cuantitativa más intensa, y otra cualitativa de menor intensidad que se empleó para comprobar el resultado cuantitativo (de ahí que para cada muestra se obtuvieran 2 valores de concentración de AR). Esto se hizo para comprobar la reproductibilidad de la técnica, ya que tendrían que dar resultados similares si ambas se habían extraído de la

misma fuente. Además, se incrementó al mismo tiempo el número de muestras a tratar en el estudio, con lo que se pretendía ver si había asociación de los parámetros realmente significativa.

Se decidió emplear la espectrometría de masas, ya que consiste en un procedimiento microanalítico que permite obtener información de la estructura y masa molecular del compuesto a estudiar, en este caso el AR. Es un proceso en el cual la muestra es consumida durante el propio análisis y, aunque la técnica difiere en cada caso particular, en todas las técnicas la energía es transferida a la molécula, dando lugar a su ionización. De ahí surge el ion molecular, el cual se fragmenta y origina el espectro de masas (28).

Para poder hacer esto, hubo que extraer primero el AR endógeno de las muestras de plasma de los pacientes. En este proceso fue clave el uso de material adecuado para la extracción. Únicamente se pudieron emplear recipientes, pipetas y jeringas calibradas de vidrio, debido a que los retinoides se adhieren a los plásticos, lo que ocasionaría pérdidas de hasta un 40% de la muestra que alteraría la veracidad de los resultados (24). Cabe señalar que las muestras resuspendidas permanecían estables a temperatura ambiente hasta por 2 días en acetonitrilo, el cual se seleccionó por ser el que mantenía las muestras más estables comparado con otros disolventes (24,29).

En lo que se refiere a las enzimas CYP26 y sus variantes, la literatura deja claro que aún queda mucho por conocer sobre las funciones de estas enzimas en la regulación del AR, tanto en el desarrollo y regeneración de los tejidos, como en términos de salud y enfermedad, poniendo especial atención al rol que puedan tener en el desarrollo del cáncer y su cura (21).

Por todo ello, siguen siendo necesarios más estudios sobre este tema para concretar si la concentración de AR endógeno obtenido de muestras de plasma sanguíneo puede ser o no un indicador de potencial maligno en los pacientes con LO y LVP, o incluso en otras DOPM. Lo que sí queda demostrado con el presente estudio es que la LO y la LVP son dos entidades completamente diferentes, a pesar de que la literatura a menudo delimite a la LVP como una variante de la LO.

6. Conclusiones

1. Al estudiar la concentración de AR en los tres grupos de estudio (GLO, GLVP y GC), se observó una diferencia estadísticamente significativa en los pacientes con LO, en los cuales la concentración de AR era menor que en los otros dos grupos. Esto apoya la idea de que la LO y la LVP son dos entidades independientes que han de estudiarse como tal.
2. No se cumplió la hipótesis de asociación entre la concentración de AR y el riesgo de malignización de la LO y la LVP.
3. No se pudo demostrar asociación estadísticamente significativa entre el AR y otras variables clínicas de los pacientes con LO y LVP, como sexo, edad, o consumo de tabaco.

7. Bibliografía

1. Castro JGL, Gastelum DAG, Cristóbal LFE, González JCC, Carrillo KLT, López SYR, et al. Lesiones potencialmente malignas de la cavidad bucal. *Cienc En Front* [Internet]. 26 de febrero de 2021 [citado 19 de mayo de 2023]; Disponible en: <https://erevistas.uacj.mx/ojs/index.php/cienciafrontera/article/view/3594>
2. Celentano A, Glurich I, Borgnakke WS, Farah CS. World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia and proliferative verrucous leukoplakia—A systematic review of retrospective studies. *Oral Dis.* mayo de 2021;27(4):848-80.
3. Lodi G, Franchini R, Warnakulasuriya S, Varoni EM, Sardella A, Kerr AR, et al. Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. Cochrane Oral Health Group, editor. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 29 de julio de 2016 [citado 23 de mayo de 2023];2016(7). Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD001829.pub4>
4. Gorsky M, Epstein JB. The effect of retinoids on premalignant oral lesions: Focus on topical therapy. *Cancer.* 15 de septiembre de 2002;95(6):1258-64.
5. Chaturvedi AK, Udaltsova N, Engels EA, Katzel JA, Yanik EL, Katki HA, et al. Oral Leukoplakia and Risk of Progression to Oral Cancer: A Population-Based Cohort Study. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1 de octubre de 2020;112(10):1047-54.
6. 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(8):1881-95.
7. Pinto AC, Caramês J, Francisco H, Chen A, Azul AM, Marques D. Malignant transformation rate of oral leukoplakia—systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* junio de 2020;129(6):600-611.e2.

8. Lyu M yue, Guo Y si, Li S, Yang D, Hua H. Hospital-based epidemiological and clinical characterisation of the malignant transformation of oral leukoplakia in a Chinese population. *Int Dent J.* 1 de agosto de 2017;67(4):252-9.
9. 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.* 28 de septiembre de 2021;13(19):4843.
10. 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.* 13 de agosto de 2021;13(16):4085.
11. Saintigny P, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan YH, Feng L, et al. Δ Np63 Overexpression, Alone and in Combination with Other Biomarkers, Predicts the Development of Oral Cancer in Patients with Leukoplakia. *Clin Cancer Res.* 1 de octubre de 2009;15(19):6284-91.
12. Rintala M, Vahlberg T, Salo T, Rautava J. Proliferative verrucous leukoplakia and its tumor markers: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck.* mayo de 2019;41(5):1499-507.
13. Habiba U, Hida K, Kitamura T, Matsuda AY, Higashino F, Ito YM, et al. ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia. *Oncol Lett.* enero de 2017;13(1):321-8.
14. Chiamulera MMA, Zancan CB, Remor AP, Cordeiro MF, Gleber-Netto FO, Baptistella AR. Salivary cytokines as biomarkers of oral cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* diciembre de 2021;21(1):205.
15. Huang Y, Zhang Q, Guo Z, Deng G, Chen R, Zheng Y. Potential noninvasive biomarkers for the malignant transformation of oral leukoplakia: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 18 de mayo de 2023;cam4.6095.
16. Xie T, Liu J. Chemoprevention of oral cancer in leukoplakia patients: A systematic review and meta-analysis. *J Pak Med Assoc.* 2017;67(9).

17. Stevison F, Jing J, Tripathy S, Isoherranen N. Role of Retinoic Acid-Metabolizing Cytochrome P450s, CYP26, in Inflammation and Cancer. En: *Advances in Pharmacology* [Internet]. Elsevier; 2015 [citado 23 de mayo de 2023]. p. 373-412. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105435891500037X>
18. Osanai M. Cellular retinoic acid bioavailability in various pathologies and its therapeutic implication: Letter to the Editor. *Pathol Int.* junio de 2017;67(6):281-91.
19. Haque M, Andreola F, DeLuca LM. The Cloning and Characterization of a Novel Cytochrome P450 Family, CYP26, with Specificity Toward Retinoic Acid. *Nutr Rev.* 27 de abril de 2009;56(3):84-5.
20. Catharine Ross A, Zolfaghari R. Cytochrome P450s in the Regulation of Cellular Retinoic Acid Metabolism. *Annu Rev Nutr.* 21 de agosto de 2011;31(1):65-87.
21. Roberts C. Regulating Retinoic Acid Availability during Development and Regeneration: The Role of the CYP26 Enzymes. *J Dev Biol.* 5 de marzo de 2020;8(1):6.
22. Pavez Loriè E, Cools M, Borgers M, Wouters L, Shroot B, Hagforsen E, et al. Topical treatment with CYP26 inhibitor talarozole (R115866) dose dependently alters the expression of retinoid-regulated genes in normal human epidermis. *Br J Dermatol.* enero de 2009;160(1):26-36.
23. Pérez-Sayáns M, Chamorro-Petronacci CM, Bravo SB, Padín-Iruegas ME, Guitián-Fernández E, Barros-Angueira F, et al. Genetic linkage analysis of head and neck cancer in a Spanish family. *Oral Dis.* 7 de abril de 2023;
24. Kane MA, Chen N, Sparks S, Napoli JL. Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem J.* 15 de mayo de 2005;388(1):363-9.
25. Dioguardi M, Spirito F, Sovereto D, La Femina L, Campobasso A, Cazzolla AP, et al. Biological Prognostic Value of miR-155 for Survival Outcome in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Systematic Review, Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. *Biology.* mayo de 2022;11(5):651.

26. Rodríguez Luján A. Estudio clínico de la leucoplasia oral y el tratamiento con láser de dióxido de carbono. *Proy Investig* [Internet]. 5 de julio de 2022 [citado 29 de junio de 2023]; Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/122110>
27. Datta S, Ray A, Singh R, Mondal P, Basu A, De Sarkar N, et al. Sequence and expression variations in 23 genes involved in mitochondrial and non-mitochondrial apoptotic pathways and risk of oral leukoplakia and cancer. *Mitochondrion*. 1 de noviembre de 2015;25:28-33.
28. Seneviratne HK, Hendrix CW, Fuchs EJ, Bumpus NN. MALDI Mass Spectrometry Imaging Reveals Heterogeneous Distribution of Tenofovir and Tenofovir Diphosphate in Colorectal Tissue of Subjects Receiving a Tenofovir-Containing Enema. *J Pharmacol Exp Ther*. octubre de 2018;367(1):40-8.
29. Chen Y, Wang S, Jia J, Tian X, Xu H, Ning M, et al. Stable Protein Gel Storage in Acetonitrile for Mass Spectrometric Analysis. *PROTEOMICS*. julio de 2018;18(13):1700336.

8.2. Anexo 2

Resultados de cuantificación de AR por medio de técnica de Espectrometría de masas y cálculo del valor promedio de concentración de AR por cada paciente.

Resultados GLVP y GLO			Resultados GC		
Muestra	[AR]	[AR]medio	Muestra	[AR]	[AR]medio
GLVP-1	1,45	1,69	GC-1	2,15	2,52
GLVP-1	1,93		GC-1	2,88	
GLVP-2	2,02	2,28	GC-2	1,45	1,70
GLVP-2	2,54		GC-2	1,94	
GLVP-3	2,03	2,29	GC-3	1,17	1,28
GLVP-3	2,55		GC-3	1,39	
GLVP-4	2,33	2,73	GC-4	2,93	3,32
GLVP-4	3,12		GC-4	3,71	
GLVP-5	2,15	2,45	GC-6	1,72	1,73
GLVP-5	2,74		GC-6	1,74	
GLVP-6	3,13	3,54	GC-7	2,44	2,72
GLVP-6	3,95		GC-7	2,99	
GLVP-7	2,87	2,98	GC-8	1,08	1,09
GLVP-7	3,09		GC-8	1,10	
GLVP-8	1,95	2,24	GC-9	3,72	4,24
GLVP-8	2,52		GC-9	4,76	
GLVP-9	0,98	1,04	GC-10	2,00	2,36
GLVP-9	1,09		GC-10	2,71	
GLO-1	1,87	1,84	GC-11	1,60	1,84
GLO-1	1,80		GC-11	2,08	
GLO-2	2,14	2,40	GC-12	2,17	2,54
GLO-2	2,65		GC-12	2,91	
GLO-3	1,84	2,01	GC-13	4,31	4,51
GLO-3	2,17		GC-13	4,71	
GLO-4	2,04	2,36	GC-15	2,68	2,84
GLO-4	2,68		GC-15	2,99	
GLO-5	2,23	2,66	GC-17	2,18	2,53
GLO-5	3,09		GC-17	2,88	
GLO-6	2,08	2,37	GC-18	1,59	1,71
GLO-6	2,65		GC-18	1,82	
GLO-7	1,81	2,14	GC-19	1,82	1,93
GLO-7	2,46		GC-19	2,03	
GLO-8	1,79	1,78	GC-20	3,23	3,42
GLO-8	1,76		GC-20	3,60	
GLO-9	1,75	2,01			
GLO-9	2,26				
GLO-10	0,52	0,50			
GLO-10	0,47				