



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Sergio  
Piñeiro Donís

*Tesis doctoral*

Evaluación molecular de genes  
de reparación y análisis de la  
recurrencia en la leucoplasia oral

Santiago de Compostela, 2022





TESIS DE DOCTORADO

**EVALUACIÓN MOLECULAR  
DE GENES DE REPARACIÓN  
Y ANÁLISIS DE LA  
RECURRENCIA EN LA  
LEUCOPLASIA ORAL**

Sergio Piñeiro Donís

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE  
LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021







## DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D. **Sergio Piñeiro Donís**

Título de la tesis: **Evaluación molecular de genes de reparación y análisis de la recurrencia en la leucoplasia oral**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, 27 de noviembre de 2021.

**Firma electrónica**







## **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS**

### **Evaluación molecular de genes de reparación y análisis de la recurrencia en la leucoplasia oral**

D. Mario Pérez-Sayáns García

D. Andrés Blanco Carrión

#### **INFORMAN:**

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. **Sergio Piñeiro Donís**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de COMPENDIO DE PUBLICACIONES, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 29 de noviembre de 2021.

**Firma electrónica**







## DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

D. Sergio Piñeiro Donís declara no tener ningún conflicto de intereses en relación con la Tesis Doctoral titulada:

### **Evaluación molecular de genes de reparación y análisis de la recurrencia en la leucoplasia oral**

En Santiago de Compostela, 27 de noviembre de 2021.

**Firma electrónica**





## Agradecimientos

Al Profesor Doctor Mario Pérez-Sayáns García, por tu apoyo, tu dedicación y tu amistad. Por enseñarme y ayudarme en todo lo que he necesitado desde que te conocí hasta el día de hoy. Espero que la amistad que nos une siga muchos años más en el futuro. Esta tesis ha sido posible gracias a tu ayuda, tus enseñanzas y tu paciencia. Gracias por tu confianza y por animarme a ser Doctor.

Al Profesor Doctor Andrés Blanco Carrión, por su disposición y apoyo en la elaboración y desarrollo de esta tesis doctoral. Por inculcarme el interés hacia la Medicina Oral mientras estaba en la carrera y por darme la oportunidad de seguir formándome y aprendiendo durante mi etapa en el Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología. Le estaré siempre agradecido.

A los Doctores y Doctoras del grupo de investigación de São José dos Campos (São Paulo, Brasil), por su colaboración y participación en el estudio de los genes reparadores del ADN.

Al Profesor Doctor José Manuel Suárez Peñaranda, por su labor en el estudio histopatológico de las muestras en el análisis de la recurrencia.

Al Profesor Doctor Xavier Marichalar-Mendía, por su ayuda inestimable con el apartado estadístico de esta Tesis.

Al resto de Profesores y compañeros que he tenido la suerte de tener en Máster de Medicina Oral, quienes con sus enseñanzas y su trabajo han contribuido directa o indirectamente al desarrollo de esta Tesis Doctoral.



## Dedicatoria

A mis padres, por educarme en los valores del esfuerzo, sacrificio y superación. Y por ser el espejo en el que me miro cada día.

A mi hermano, por ayudarme con su consejo y estar siempre ahí cuando lo he necesitado.

A mis mejores amigos y amigas, por el tiempo robado y el apoyo incondicional.



## Resumen

**Introducción y objetivos.** La leucoplasia oral (LO) es la principal lesión dentro de los trastornos orales potencialmente maligno (TOPM). El manejo terapéutico de esta lesión se basa en su exéresis o vaporización con márgenes de seguridad. Sin embargo, los resultados de las diferentes técnicas de tratamiento quirúrgico siguen mostrando tasas de recurrencia variables. La ausencia de una técnica de elección y su evidente potencial de malignización, confirman a la LO como una entidad patológica donde el diagnóstico y el manejo temprano resultan sumamente necesarios para mejorar el pronóstico y supervivencia de los pacientes. Uno de los desafíos más importantes en el diagnóstico de la LO es predecir la progresión a carcinoma oral de células escamosas (COCE). Los avances en el estudio de la saliva la han convertido en una herramienta diagnóstica de interés, así como una fuente de biomarcadores comparable con la sangre y la orina. La búsqueda de marcadores proteicos en saliva abre nuevas posibilidades a la comprensión de las interrelaciones estructurales de los TOPM y cómo estos podrían determinar la progresión a COCE. Diversos aspectos de la biología del cáncer se han relacionado con alteraciones de proteínas que participan en los mecanismos de reparación del ADN. La expresión reducida en algunos de los genes reparadores (MLH1, MSH2, MRE11 y XRCC1) se ha observado en patologías asociadas con defectos del sistema de reparación del desajuste del

ADN (sistema MMR). El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar la expresión proteica de marcadores relacionados con la reparación de ADN en la LO, analizar el papel de diferentes biomarcadores salivales en su diagnóstico mediante una revisión sistemática con metaanálisis y evaluar los factores clínico patológicos involucrados en su evolución.

**Material y métodos.** Para el análisis de la recurrencia se analizaron distintas variables clínicas en 83 lesiones de LO en pacientes que habían presentado leucoplasia verrucosa en algún momento del seguimiento (2004–2017). Para la realización del metaanálisis, se consideraron elegibles artículos sobre biomarcadores basados en proteínas en saliva, que proporcionaban expresión cuantitativa en individuos con diagnóstico clínico e histopatológico de TOPM o LO. Las búsquedas se realizaron en ocho bases de datos electrónicas. La calidad metodológica se evaluó mediante la herramienta Quality Assessment of Diagnostic Studies (QUADAS-2). También se realizó un análisis funcional de las proteínas seleccionadas. El estudio de los genes de reparación incluyó 45 muestras de pacientes. Se recogieron datos clínicos de los pacientes y de la estadificación tumoral. En todos los casos se hizo tinción con hematoxilina-eosina y fueron revisados por un patólogo. El diagnóstico se obtuvo según las recomendaciones internacionales para el análisis histopatológico y se realizó inmunohistoquímica para MLH1, MSH2, MRE11 y XRCC1. Se describen los resultados en forma de frecuencia y porcentaje, media y desviación estándar (DE) y sus correspondientes intervalos de confianza al 95% (IC95%). Para el análisis bivariante se utilizaron las pruebas de Chi cuadrado y ANOVA según condiciones de aplicación, fijando el nivel de significación en 0,05. Se construyeron curvas de Kaplan Meier para el análisis de supervivencia y recurrencia. Los datos fueron analizados

con el programa SPSS 24.0 y los metaanálisis mediante la herramienta OpenMeta (Analyst).

**Resultados.** En el análisis de la recurrencia los pacientes presentaron una edad media de 66,5 años, DE=8,92, con edades comprendidas entre 46 y 86 años. La recurrencia en la forma nodular aparece a los 12,05 meses en promedio (IC95% 6,81 a 17,29), seguida de la forma homogénea a los 32,08 meses (IC 15,33 a 48,83), verrugosa a los 52,57 meses (IC95% 38,01 a 67,14) y eritroleucoplasia moteada a los 79,01 meses (IC95% 0,00-164,24) (Log Rank 16,596;  $p = 0,001$ ). El tiempo medio hasta la recurrencia para los pacientes sin displasia fue de 35,33 meses (IC95% 23,43–47,23). La recurrencia media de los pacientes con displasia fue 56,7 meses (IC95% 37,8-75,5,  $p = 0,048$ ). En la revisión sistemática se incluyeron un total de 986 pacientes, distribuidos en los siguientes grupos: controles sanos (HCG) (N=335), LO (N=20), TOPM (N=267) y COCE (N=364). Los marcadores analizados fueron: CEA (antígeno carcinoembrionario), CYFRA21 (fragmento soluble de citoqueratina 19), IL-6 (interleukina 6) e IL-8 (interleukina 8). Para el subgrupo COCE/TOPM, sólo dos marcadores resultaron significativos, CEA y CYFRA21, ambos con una heterogeneidad muy baja. CEA presentaba un OE=25.854 (IC 95%: 13.215–38.492,  $p<0.001$ ,  $I^2=0$ ) y CYFRA21 un OE=9.317 (IC 95%: 9.014–9.619,  $p<0.001$ ,  $I^2=0$ ). Para el subgrupo TOPM/HCG, sólo CYFRA21 ha resultado ser un buen marcador discriminativo, con un OE=3.679 (IC 95%: 0.663–6.696,  $p=0.017$ ) aunque con una heterogeneidad alta ( $I^2=91.24$ ). La muestra del estudio de los genes de reparación estaba formada por 45 participantes con una media de edad de 68.24 años (DE=10.98) de los cuales 29 eran mujeres (64.4 %) y 16 hombres (35.6%). Se encontró diferencia significativa entre los grupos sólo para la expresión de MSH2 ( $p=0,020$ ). La expresión de MSH2 se asoció significativamente con displasia ( $p=0.019$ ) y localización de la biopsia ( $p=0.026$ ), siendo

positiva en el 100% de pacientes con LO con displasia o COCE ( $p=0.019$ ). Al observar la positividad simultánea para los cuatro marcadores encontramos diferencias significativas con la presencia de comorbilidades ( $p=0.006$ ).

**Conclusiones.** Nuestros hallazgos apoyan la evidencia de la posible implicación de la sobreexpresión de proteínas MSH2 en el desarrollo de LO con displasia y COCE. Las proteínas de reparación MSH2, MRE11, MLH1 y XRCC1 se asociaron significativamente con la presencia de comorbilidades. Los marcadores salivales CEA y CYFRA21 mostraron ser particularmente útiles para diferenciar los COCE de los TOPM. El marcador salival CYFRA21 se mostró como la única proteína capaz de distinguir entre los TOPM y los HCG. La recurrencia de la LO en nuestro estudio aparece con mayor frecuencia en pacientes con lesiones sin displasia y con formas clínicas nodulares.

## Resumo

**Introdución e obxectivos.** A leucoplasia oral (LO) é a principal lesión dentro dos trastornos orais potencialmente malignos (TOPM). O manexo terapéutico desta lesión baséase na súa exérese ou vaporización con marxes de seguridade. Con todo, os resultados das diferentes técnicas de tratamento cirúrxico seguen mostrando taxas de recorrencia variables. A ausencia dunha técnica de elección e o seu evidente potencial de malignidade, confirman á O como unha entidade patolóxica onde o diagnóstico e o manexo cedo resultan sumamente necesarios para mellorar o prognóstico e supervivencia dos pacientes. Un dos desafíos máis importantes no diagnóstico da LO é predicir a progresión a carcinoma oral de células escamosas (COCE). Os avances no estudo da saliva convertérona nunha ferramenta diagnóstica de interese, así como unha fonte de biomarcadores comparable co sangue e os ouriños. A procura de marcadores proteicos en saliva abre novas posibilidades á comprensión das interrelacións estruturais dos TOPM e como estes poderían determinar a progresión a COCE. Diversos aspectos da bioloxía do cancro relacionáronse con alteracións de proteínas que participan nos mecanismos de reparación do ADN. A expresión reducida nalgúns dos xenes reparadores (MLH1, MSH2, MRE11 e XRCC1) observouse en patoloxías asociadas con defectos do sistema de reparación do desaxuste do ADN (sistema MMR). O obxectivo principal desta Tese

Doutoral é estudar a expresión proteica de marcadores relacionados coa reparación de ADN na O, analizar o papel de diferentes biomarcadores salivares no seu diagnóstico mediante unha revisión sistemática con metaanálise e avaliar os factores clínico patolóxicos involucrados na súa evolución.

**Material e métodos.** Para a análise da recorrencia analizáronse distintas variables clínicas en 83 lesións de LO en pacientes que presentaran leucoplasia verrugosa nalgún momento do seguimento (2004–2017). Para a realización do metaanálise, consideráronse elixibles artigos sobre biomarcadores baseados en proteínas en saliva, que proporcionaban expresión cuantitativa en individuos con diagnóstico clínico e histopatolóxico de TOPM ou LO. As procuras realizáronse en oito bases de datos electrónicas. A calidade metodolóxica avalíouse mediante a ferramenta Quality Assessment of Diagnostic Studies (QUADAS-2). Tamén se realizou unha análise funcional das proteínas seleccionadas. O estudo dos xenes de reparación incluíu 45 mostras de pacientes. Recolléronse datos clínicos dos pacientes e da estadificación tumoral. En todos os casos fíxose tinción con hematoxilina-eosina e foron revisados por un patólogo. O diagnóstico obtívose segundo as recomendacións internacionais para a análise histopatolóxico e realizouse inmunohistoquímica para MLH1, MSH2, MRE11 e XRCC1. Descríbense os resultados en forma de frecuencia e porcentaxe, media e desviación estándar (DE) e os seus correspondentes intervalos de confianza ao 95% (IC95%). Para a análise bivariante utilizáronse as probas de Chi cadrado e ANOVA segundo condicións de aplicación, fixando o nivel de significación en 0,05. Construíronse curvas de Kaplan Meier para a análise de supervivencia e recorrencia. Os datos foron analizados co programa SPSS 24.0 e os metaanálise mediante a ferramenta OpenMeta (Analyst).

**Resultados.** Na análise da recorrencia os pacientes presentaron unha idade media de 66,5 anos, DE=8,92, con idades comprendidas entre 46 e 86 anos. A recorrencia na forma nodular aparece aos 12,05 meses en media (IC95% 6,81 a 17,29), seguida da forma homoxénea aos 32,08 meses (IC 15,33 a 48,83), verrugosa aos 52,57 meses (IC95% 38,01 a 67,14) e eritroleucoplasia moteada aos 79,01 meses (IC95% 0,00-164,24) (Log Rank 16,596;  $p = 0,001$ ). O tempo medio ata a recorrencia para os pacientes sen displasia foi de 35,33 meses (IC95% 23,43–47,23). A recorrencia media dos pacientes con displasia foi 56,7 meses (IC95% 37,8-75,5,  $p=0,048$ ). Na revisión sistemática incluíronse un total de 986 pacientes, distribuídos nos seguintes grupos: controis sans (HCG) (N=335), LO (N=20), TOPM (N=267) e COCE (N=364). Os marcadores analizados foron: CEA (antíxeno carcinoembrionario), CYFRA21 (fragmento soluble de citoqueratina 19), IL-6 (interleukina 6) e IL-8 (interleukina 8). Para o subgrupo COCE/ TOPM, só dous marcadores resultaron significativos, CEA e CYFRA21, ambos cunha heteroxeneidade moi baixa. CEA presentaba un OE=25.854 (IC 95%: 13.215–38.492,  $p<0.001$ , I2=0) e CYFRA21 un OE=9.317 (IC 95%: 9.014–9.619,  $p<0.001$ , I2=0). Para o subgrupo TOPM/ HCG, só CYFRA21 resultou ser un bo marcador discriminatorio, cun OE=3.679 (IC 95%: 0.663–6.696,  $p=0.017$ ) aínda que cunha heteroxeneidade alta (I2=91.24). A mostra do estudo dos xenos de reparación estaba formada por 45 participantes cunha media de idade de 68.24 anos (DE=10.98) dos cales 29 eran mulleres (64.4 %) e 16 homes (35.6%). Atopouse diferenza significativa entre os grupos só para a expresión de MSH2 ( $p=0,020$ ). A expresión de MSH2 asociouse significativamente con displasia ( $p=0.019$ ) e localización da biopsia ( $p=0.026$ ), sendo positiva no 100% de pacientes con LO con displasia ou COCE ( $p=0.019$ ). Ao observar a positividade simultánea para os catro marcadores atopamos diferenzas significativas coa presenza de comorbilidades ( $p=0.006$ ).

**Conclusiones.** Os nosos achados apoian a evidencia da posible implicación da sobreexpresión de proteínas MSH2 no desenvolvemento do con displasia e COCE. As proteínas de reparación MSH2, MRE11, MLH1 e XRCC1 asociáronse significativamente coa presenza de comorbilidades. Os marcadores salivares CEA e CYFRA21 mostraron ser particularmente útiles para diferenciar os COCE dos TOPM. O marcador salivar CYFRA21 mostrouse como a única proteína capaz de distinguir entre os TOPM e os HCG. A recorrencia da LO no noso estudo aparece con maior frecuencia en pacientes con lesións sen displasia e con formas clínicas nodulares.

## Abstract

**Introduction and objectives.** Oral leukoplakia (OL) is the main lesion within the oral potentially malignant disorders (OPMD). The therapeutic management of this lesion is based on its excision or vaporization with safety margins. However, the results of the different surgical treatment techniques continue to show variable recurrence rates. The absence of a technique of choice and its evident potential for malignancy confirm OL as a pathological entity where early diagnosis and management are extremely necessary to improve the prognosis and survival of patients. One of the most important challenges in the diagnosis of OL is predicting the progression to oral squamous cell carcinoma (OSCC). Advances in the study of saliva have made it an interesting diagnostic tool, as well as a source of biomarkers comparable to blood and urine. The search for protein markers in saliva opens up new possibilities to understand the structural interrelationships of OPMD and how these could determine the progression to OSCC. Various aspects of cancer biology have been linked to protein alterations that are involved in DNA repair mechanisms. Reduced expression in some of the repair genes (MLH1, MSH2, MRE11 and XRCC1) has been observed in pathologies associated with defects of the DNA mismatch repair system (MMR system). The main objective of this Doctoral Thesis is to study the protein expression of markers related to DNA repair in OL, to analyze

the role of different salivary biomarkers in its diagnosis through a systematic review with meta-analysis, and to evaluate the clinicopathological factors involved in its evolution.

**Material and methods.** For the analysis of recurrence, different clinical variables were analyzed in 83 OL lesions in patients who had presented verrucous leukoplakia at some point during follow-up (2004–2017). For the meta-analysis, articles on protein-based biomarkers in saliva, which provided quantitative expression in individuals with a clinical and histopathological diagnosis of OPMD or OL, were considered eligible. Searches were carried out in eight electronic databases. The methodological quality was evaluated using the Quality Assessment of Diagnostic Studies (QUADAS-2) tool. A functional analysis of the selected proteins was also performed. The repair gene study included 45 patient samples. Patient clinical data and tumor staging were collected. In all cases, hematoxylin-eosin staining was done and they were reviewed by a pathologist. The diagnosis was obtained according to international recommendations for histopathological analysis and immunohistochemistry was performed for MLH1, MSH2, MRE11 and XRCC1. The results are described in the form of frequency and percentage, mean and standard deviation (SD) and their corresponding 95% confidence intervals (95% CI). For the bivariate analysis, the Chi square and ANOVA tests were used according to application conditions, setting the level of significance at 0.05. Kaplan Meier curves were constructed for survival and recurrence analysis. The data were analyzed with the SPSS 24.0 program and the meta-analyzes using the OpenMeta (Analyst) tool.

**Results.** In the analysis of recurrence, the patients had a mean age of 66.5 years, SD = 8.92, with ages between 46 and 86 years. Recurrence in the nodular form appears at 12.05 months on average

(95% CI 6.81 to 17.29), followed by the homogeneous form at 32.08 months (CI 15.33 to 48.83), verrucous at 52.57 months (95% CI 38.01 to 67.14) and mottled erythro-leukoplakia at 79.01 months (95% CI 0.00-164.24) (Log Rank 16.596;  $p = 0.001$ ). The mean time to recurrence for patients without dysplasia was 35.33 months (95% CI 23.43–47.23). The mean recurrence of patients with dysplasia was 56.7 months (95% CI 37.8-75.5,  $p = 0.048$ ). A total of 986 patients were included in the systematic review, distributed in the following groups: healthy controls (HCG) (N = 335), OL (N = 20), OPMD (N = 267) and OSCC (N = 364). The markers analyzed were: CEA (carcinoembryonic antigen), CYFRA21 (soluble fragment of cytokeratin 19), IL-6 (interleukin 6) and IL-8 (interleukin 8). For the OSCC / OPMD subgroup, only two markers were significant, CEA and CYFRA21, both with very low heterogeneity. CEA had an OE = 25.854 (95% CI: 13.215–38.492,  $p < 0.001$ ,  $I^2 = 0$ ) and CYFRA21 had an OE = 9.317 (95% CI: 9.014–9.619,  $p < 0.001$ ,  $I^2 = 0$ ). For the OPMD / HCG subgroup, only CYFRA21 turned out to be a good discriminative marker, with an OE = 3.679 (95% CI: 0.663–6.696,  $p = 0.017$ ) although with high heterogeneity ( $I^2 = 91.24$ ). The study sample of repair genes consisted of 45 participants with a mean age of 68.24 years (SD = 10.98) of which 29 were women (64.4%) and 16 men (35.6%). A significant difference between the groups was found only for the expression of MSH2 ( $p = 0.020$ ). The expression of MSH2 was significantly associated with dysplasia ( $p = 0.019$ ) and location of the biopsy ( $p = 0.026$ ), being positive in 100% of patients with OL with dysplasia or OSCC ( $p = 0.019$ ). When observing the simultaneous positivity for the four markers, we found significant differences with the presence of comorbidities ( $p = 0.006$ ).

**Conclusions.** Our findings support the evidence for the possible implication of MSH2 protein overexpression in the development of OL with dysplasia and OSCC. The repair proteins MSH2, MRE11,

MLH1 and XRCC1 were significantly associated with the presence of comorbidities. The salivary markers CEA and CYFRA21 were shown to be particularly useful in differentiating OSCC from OPMD. The salivary marker CYFRA21 was shown to be the only protein capable of distinguishing between OPMD and HCG. The recurrence of OL in our study appears more frequently in patients with lesions without dysplasia and with nodular clinical forms.

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico)
ANOVA	Análisis de Varianza)
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero)
CEA	Antígeno Carcinoembrionario)
COCE / OSCC	Carcinoma Oral de Células Escamosas / Oral Squamous Cell Carcinoma)
CYFRA21	Fragmento Soluble de Citoqueratina 19)
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
HCG	Healthy Control Group / Grupo Control Sano)
HNPPC	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico)
ICT-UNESP	Instituto de Ciência e Tecnologia - Univesidade Estadual Paulista)
IL-6	Interleukina 6)
IL-8	Interleukina 8)
LVP	Leucoplasia Verrugosa Proliferativa)
MMR	Mismatch repair)
OE	Overall Expression / Expresión Global)

OL / LO	Oral Leukoplakia / Leucoplasia Oral)
OMS	Organización Mundial de la Salud)
PANTHER	Protein Analysis Through Evolutionary Relationships)
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses)
QUADAS	Quality Assessment Diagnostic Accuracy Studies)
ROC	Receiver Operating Characteristic)
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)
STROBE	STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology)
TOPM / OPML	Trastornos Orales Potencialmente Malignos / Oral Potentially Malignant Lesions)
USC	Universidad de Santiago de Compostela)

# ÍNDICE

<b>Introducción .....</b>	<b>33</b>
<b>Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>43</b>
<b>1. Material y método para el artículo 1- Análisis de la recurrencia en lesiones de leucoplasia oral en función de sus características clínico-patológicas .....</b>	<b>47</b>
1.1. Diseño del estudio y selección de pacientes .....	47
1.2 Criterios de inclusión y exclusión.....	48
1.3 Estudio histológico .....	50
1.4 Análisis estadístico .....	50
<b>2. Material y método para el artículo 2- Estudio de los marcadores salivales basados en proteínas y análisis de su eficacia en el diagnóstico de enfermedades orales. ....</b>	<b>53</b>
2.1 Pregunta PICO .....	55
2.2 Criterios para incluir estudios en esta revisión .....	56
2.2.1 Tipos de estudio .....	56
2.2.2 Participantes.....	56
2.2.3 Control y condiciones objetivo .....	57

2.2.4 Estándar de referencia .....	57
2.2.5 Prueba (s) de índice .....	58
2.2.6 Otros criterios de exclusión.....	58
2.3 Métodos de búsqueda para la identificación y selección de estudios .....	58
2.3.1 Fuentes de información y estrategia de búsqueda.....	58
2.3.2 Selección de estudios .....	60
2.4 Recopilación y análisis de datos .....	63
2.4.1 Selección de estudios .....	63
2.4.2 Evaluación de heterogeneidad .....	68
<b>3. Material y método para el estudio 3 - análisis de proteínas de reparación en lesiones de leucoplasia oral y cáncer oral ....</b>	<b>71</b>
3.1 Diseño del estudio.....	71
3.2 Selección de muestras y evaluación histológica .....	71
3.3 Evaluación inmunohistoquímica.....	74
3.4 Análisis estadístico.....	75
<b>Discusión .....</b>	<b>79</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>107</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>111</b>
<b>Anexo. Relación de publicaciones.....</b>	<b>133</b>
<b>Anexo 1 - Impacto de los aspectos clínico-patológicos en la recurrencia de la leucoplasia oral: estudio retrospectivo en una cohorte de 83 pacientes del norte de España.....</b>	<b>139</b>

<b>Anexo 2 - Utilidad de los marcadores salivales basados en proteínas en el diagnóstico de trastornos orales potencialmente malignos: revisión sistemática y metaanálisis. ....</b>	<b>145</b>
<b>Anexo 3 - MLH1, MSH2, MRE11 y XRCC1 en leucoplasia oral y carcinoma oral de células escamosas. ....</b>	<b>161</b>



# INTRODUCCIÓN

---



## INTRODUCCIÓN

De entre todas las lesiones orales potencialmente malignas, la leucoplasia es la que aparece con más frecuencia en la práctica clínica. A lo largo de la historia, la definición de la lesión ha ido añadiendo modificaciones a medida que avanza el estudio sobre su propia naturaleza. En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la describe por primera vez como *“una mancha o placa blanca que no puede ser caracterizada clínica o patológicamente como ninguna otra enfermedad”*<sup>1</sup>. En 1984, durante la primera conferencia internacional de leucoplasia oral desarrollada en Suecia, añaden a la definición la nula relación etiológica de la lesión con ningún agente físico o químico a excepción del tabaco<sup>2</sup>). Posteriormente, en 1996 durante el simposio internacional celebrado en Uppsala, el concepto de la lesión vuelve a redefinirse como: *“Una lesión predominantemente blanca de la mucosa oral que no puede caracterizarse como ninguna otra enfermedad definible”*<sup>3</sup>. Un año más tarde, la OMS decide realizar una leve modificación de su descripción inicial cambiando la frase *“ninguna otra enfermedad”* por *“ninguna otra lesión”*<sup>4</sup>.

En la última reunión de la OMS, celebrada en 2005, la leucoplasia se definió como: *“Una placa blanca de riesgo cuestionable que excluye (otras) enfermedades o trastornos conocidos que no conllevan un mayor riesgo de cáncer”*. Finalmente, en 2020, Warnakulasuriya y colaboradores sugieren una actualización del término que se mantendría hasta la actualidad, presentando la lesión de leucoplasia como *“una lesión predominantemente blanca de riesgo cuestionable*

*habiendo excluido otros desórdenes o enfermedades conocidos que no aumentan el riesgo de cáncer<sup>5</sup>.*

La leucoplasia oral (LO) es la principal lesión dentro de los trastornos orales potencialmente malignos (TOPM). Los TOPM son entidades clínicas que tienen una capacidad de transformación maligna variable. En este grupo de lesiones se encuentra la leucoplasia, la eritroplasia, la eritroleucoplasia, liquen plano, estomatitis nicotínica, queilitis actínica, entre otras<sup>6-8</sup>.

Se estima que la prevalencia global en España es del 1,72 - 2,60%. Sin embargo, este rango varía considerablemente según la región del país, los hábitos tóxicos habituales, los factores que condicionan la respuesta al tratamiento y el riesgo de recurrencia<sup>9,10</sup>. Suele diagnosticarse en la cuarta década de la vida, siendo más frecuentes en hombres y en fumadores<sup>11</sup>.

Etiológicamente no se relaciona con ningún agente causal ya sea físico o químico, con la excepción del tabaco, el hábito de mascar de betel y el consumo de alcohol<sup>3</sup>. Pueden clasificarse etiológicamente como lesiones de leucoplasia relacionadas con el tabaco o idiopáticas en función de si la lesión desaparece tras eliminar el agente causal.

Existen dos tipos de lesiones de leucoplasia atendiendo a sus características clínicas, clasificándose en lesiones homogéneas y no homogéneas. Por una parte, las lesiones homogéneas cursan con placas blancas, uniformemente planas, que no se desprenden al raspado y que no se sobrelevan en comparación al resto de la mucosa. Son generalmente asintomáticas<sup>5</sup>.

Por otra parte, las lesiones no homogéneas se subdividen en 3 grupos: nodulares (pequeñas elevaciones polipoides o redondeadas), verrugosas (la lesión presenta una superficie exofítica, arrugada u

ondulada) y eritroleucoplasia (pueden tener coloración mixta, blanca y roja, aunque tienden a conservar un carácter predominantemente blanco, pudiendo presentar márgenes irregulares y cursando con dolor)<sup>5</sup>.

Ante la presencia de esta lesión blanca, debe realizarse un diagnóstico diferencial con otras entidades patológicas similares tales como: nevus esponjoso blanco, queratosis friccional, lesión por agente químico, infección crónica por *Candida*, leucoedema, manchas de Fordyce, enfermedad de injerto contra huésped, leucoplasia vellosa oral, palatitis nicotínica, lesiones por virus del papiloma humano (condiloma), lengua geográfica, liquen plano erosivo o lesiones liquenoides<sup>5</sup>.

Tras haber excluido otros desórdenes o patologías a través de la exploración clínica y la anamnesis previa, se obtiene un diagnóstico clínico provisional de leucoplasia que debe confirmarse mediante la toma de biopsia para su posterior estudio anatomopatológico. Esta lesión puede presentar aspectos microscópicos que abarcan desde hiperqueratosis, con o sin diversos grados de displasia (bajo o alto grado), hasta un carcinoma in situ<sup>6,12,13</sup>.

Existen varias modalidades quirúrgicas para el tratamiento de la leucoplasia oral: escisión con bisturí frío, criocirugía, escisión con láser o vaporización con láser y terapia fotodinámica. Sin embargo, los resultados de estas técnicas no ofrecen un consenso universal para sugerir una técnica de elección<sup>10</sup>. Las diferentes modalidades de tratamiento notificaron una amplia gama de tasas de recurrencia de LO, del 2% al 40%, y una tasa de recurrencia anual del 5% al 10%<sup>14-18</sup>.

La leucoplasia es la lesión dentro de los TOPM que presenta la mayor tasa de transformación maligna, siendo la media global anual

entre 1 a 2%<sup>6,7,19</sup>. Sin embargo, estas estimaciones pueden ser mayores dependiendo de la región geográfica observada y el grado de displasia asociado a la lesión, logrando tasas iguales o mayores al 39%<sup>6</sup>. Esta mayor tendencia a la malignización se relaciona con factores de riesgo tales como: el sexo femenino, largo tiempo de evolución, leucoplasias idiopáticas no relacionadas con el tabaco, formas no homogéneas, presencia de displasia epitelial, tamaño de la lesión mayor a 200 mm<sup>2</sup> y localizaciones específicas (suelo de boca, lateral de la lengua y paladar blando)<sup>20</sup>.

Ante la ausencia de una técnica de elección terapéutica que permita reducir las tasas de recurrencia en esta patología, sumado a la evidencia de su potencial de malignización, la leucoplasia oral se confirma como una entidad patológica donde el diagnóstico y el manejo temprano adquieren vital importancia para evitar un diagnóstico tardío de esta lesión precancerosa que conlleve la aparición de una neoplasia en la cavidad oral.

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) representa más del 95% del total de neoplasias malignas de la cavidad oral<sup>6,21</sup>. Esta patología se caracteriza por una alta prevalencia y morbilidad, con 354.900 nuevos casos y 177.400 muertes por año en todo el mundo, dichas cifras han aumentado durante el último decenio<sup>22</sup>. A pesar de los avances en los protocolos del tratamiento para los diferentes tumores malignos, la tasa de supervivencia del COCE a los 5 años no supera el 50%-60% de los casos<sup>12,21</sup>.

En consecuencia, la prevención y el diagnóstico precoz resultan sumamente necesarios para mejorar el pronóstico y la supervivencia de los pacientes.

Actualmente, el diagnóstico basado en estos criterios clínicos e histopatológicos representan un problema, debido a que son poco

reproducibles y poseen una gran variabilidad interobservador, impidiendo una estandarización real en la detección temprana y prevención del desarrollo del COCE<sup>6,23-25</sup>. Por ello, uno de los desafíos más importantes en el diagnóstico de la leucoplasia oral es predecir que lesiones progresarán a COCE.

La saliva es una matriz biológica compleja, cuya composición puede cambiar dependiendo de la estimulación simpática y parasimpática, ritmo circadiano, hábitos y espectro de salud-enfermedad, entre otros factores<sup>26-28</sup>. Esta variabilidad ha generado un gran interés por utilizar la saliva como un método de diagnóstico y de control de diferentes enfermedades tanto sistémicas como de la cavidad oral (periodontitis, cáncer, estomatitis aftosa recurrente, TOPM, etc.)<sup>27,28</sup>. Esta nueva herramienta diagnóstica también resulta atractiva por presentar ventajas clínicas y económicas como la poca invasividad, la facilidad en la obtención de las muestras, así como también el bajo coste que supone<sup>27</sup>. Los avances en el estudio de la saliva han permitido establecer la utilidad de la misma como una fuente de biomarcadores comparable con la sangre, líquido cerebrospinal, líquido pleural y orina<sup>27-30</sup>, lo que permitiría un diagnóstico precoz y screening de las diferentes enfermedades a través de las “*biopsias líquidas*”<sup>28,29,31</sup>.

A pesar de las innovaciones en el campo de la identificación proteica, que supone diversos procedimientos de alta sensibilidad, incluso cuando son aplicados a fluidos complejos como la saliva<sup>29,30,32-34</sup>, el método ELISA sigue siendo uno de los más utilizados, dada su amplia difusión, reproductibilidad y bajo coste, en contraste con las nuevas técnicas ómicas.

Existe un cambio de paradigma sobre la multiplicidad de funciones de una misma proteína. Se propone que dicha proteína no es únicamente el resultado de una transcripción para un solo fin, sino que

la existencia de un mismo elemento proteico virtualmente tendría múltiples funciones en la célula, determinadas por las relaciones estructurales presentes<sup>35-38</sup>. Consecuentemente, la búsqueda de marcadores proteicos en saliva abre nuevas posibilidades al entendimiento de las interrelaciones estructurales de los TOPM y cómo éstos podrían determinar la progresión al carcinoma oral.

El daño del ADN se acumula en las células a lo largo del tiempo como resultado de factores tanto exógenos como endógenos. Durante el metabolismo normal del ADN se pueden producir errores que, de no ser reparados, pueden generar mutaciones en las células causando disfunción y enfermedad. Para evitar estos efectos nocivos y preservar la integridad del genoma, las células poseen múltiples mecanismos para reparar el daño del ADN y prevenir mutaciones, siendo uno de ellos la reparación de desajuste del ADN.

Las proteínas exclusivas del sistema MMR (mismatch repair) (proteínas "Mut") se identificaron originalmente en organismos procariontas, donde su pérdida aumenta la acumulación de errores de replicación del ADN y da como resultado un fenotipo mutador.

Las proteínas clave en MMR están altamente conservadas desde bacterias hasta mamíferos, lo que ha sido clave para definir los componentes de los sistemas de MMR eucariotas, donde existen múltiples homólogos de las proteínas bacterianas clave de MutS y MutL<sup>39</sup>.

Las patologías asociadas a los defectos del sistema MMR han sido estudiadas en humanos, especialmente en los procesos cancerosos<sup>40</sup>, donde se observa la expresión reducida de algunos de estos genes reparadores. Diversos aspectos de la biología del cáncer se han asociado con alteraciones de las proteínas que participan en estos mecanismos de reparación del ADN.

La expresión de estos genes, así como algunos de sus polimorfismos, ha sido ampliamente estudiada en cáncer de colon<sup>41,42</sup>, específicamente en cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) o síndrome de Lynch<sup>43</sup>. También en otros tipos de tumores como: cáncer de pulmón, tiroides, cérvix, ovarios, endometrio, laringe, esófago y piel<sup>44-51</sup>.

Por otra parte, se ha encontrado relación entre estas proteínas del sistema MMR, sus polimorfismos y el cáncer de cabeza y cuello, en especial con XRCC1<sup>52-54</sup>, MLH1<sup>55-58</sup> y MSH2<sup>58,59</sup>. En cuanto al MRE11, pocos estudios han abordado este tema. Aunque Ziólkowska y colaboradores<sup>60</sup> encuentran que las alteraciones en MRE11 no contribuyen a un mayor riesgo de cáncer, consideramos necesario investigar más profundamente el tema. En nuestra opinión, estos genes son los más relevantes y los que con mayor frecuencia se asocian a un riesgo incrementado de padecer un proceso tumoral.

Centrándonos en la cavidad oral, en concreto en la leucoplasia oral y en el cáncer oral de células escamosas, se han estudiado diferentes polimorfismos de diversos genes.

Por una parte, ATM ha sido ampliamente estudiado y tiene un papel importante en el control del ciclo celular<sup>61-64</sup>. Se ha estudiado la hipermetilación de hMLH1 y hMSH2 y su papel en la carcinogénesis oral<sup>65</sup> que puede correlacionarse con una tendencia a desarrollar múltiples malignidades orales<sup>66,67</sup>. También se ha evidenciado su importancia en el cáncer de lengua<sup>68</sup>.

Con respecto al XRCC1, Dos Reis y colaboradores creen que no es un marcador adecuado para el diagnóstico de cáncer oral<sup>69</sup>. Sin embargo, la mayoría de autores consideran que el XRCC1 contribuye al desarrollo de COCE y a LO<sup>70,71</sup>. Una variante de este marcador resultó ser el determinante más significativo de la susceptibilidad de

un individuo a LO<sup>72</sup>. En relación a MRE11A, a pesar de que es conocida su importancia<sup>73</sup>, encontramos poca evidencia de su rol en el riesgo de cáncer<sup>74</sup>, por lo cual consideramos que debe ser analizado en profundidad.

En cuanto al impacto que pueden tener factores ambientales sobre los polimorfismos, se ha estudiado que el tabaco produce hipermetilación y reducción de la expresión génica de MRE11A y XRCC1<sup>75</sup>, también de MLH1 y MSH2<sup>65</sup>, así como una mayor propensión a LO en ciertos haplotipos<sup>71,72</sup>.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de este trabajo propone que existen marcadores basados en proteínas en saliva cuya expresión cuantitativa en los TOPM es diferente a la de grupos controles sanos y a la de lesiones malignas, pudiendo establecer puntos de expresión diferencial

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar la expresión proteica de marcadores relacionados con la reparación de ADN en la leucoplasia oral, analizar el papel de diferentes biomarcadores salivales en su diagnóstico y evaluar los factores clínico patológicos involucrados en su evolución.

Como objetivos secundarios se establecen:

- 1) Establecer un perfil de expresión inmunohistoquímica de MLH1, MSH2, MRE11 y XRCC1 en leucoplasia oral (con y sin displasia) y carcinoma oral de células escamosas y asociar el análisis inmunohistoquímico con la progresión maligna y parámetros clínicos de la leucoplasia.
- 2) Realizar un metaanálisis para obtener información sobre los marcadores basados en proteínas salivales descritos en la literatura para los TOPM y estudiar las diferencias de expresión con respecto a controles sanos y lesiones malignas de COCE.

- 3) Analizar el impacto de factores clínicos (tipo de lesión clínica) y patológicos (grado de displasia) en la variación del tiempo de recurrencia de lesiones de leucoplasia oral para determinar qué perfil de leucoplasia es más propenso a recidivar.

# 1

## **MATERIAL Y MÉTODO PARA EL ARTÍCULO 1- ANÁLISIS DE LA RECURRENCIA EN LESIONES DE LEUCOPLASIA ORAL EN FUNCIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS**

---



# 1. MATERIAL Y MÉTODO PARA EL ARTÍCULO 1- ANÁLISIS DE LA RECURRENCIA EN LESIONES DE LEUCOPLASIA ORAL EN FUNCIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

## 1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE PACIENTES

Se diseñó un estudio observacional retrospectivo realizado de acuerdo con las recomendaciones de las guías STROBE<sup>76</sup>. Se seleccionó una cohorte de pacientes que habían sido diagnosticados clínicamente de LO con confirmación histopatológica. Sus lesiones fueron tratadas con láser CO2 hasta su total eliminación, sin desarrollar recurrencia en un plazo de más de seis meses. Seleccionamos a todos los pacientes con lesiones que cumplían los criterios de inclusión y que habían sido atendidos en la Unidad de Medicina Oral de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. La muestra estuvo formada por 83 pacientes con lesiones LO.

Para el cálculo de la muestra y el poder estadístico, utilizamos el método de proporción / unilateral. Para una muestra de 80 pacientes, con un 50% de probabilidad de recurrencia y una tasa de error del 10%, el poder estadístico es de casi el 70%. Las variables clínicas que se analizaron fueron: edad, sexo, grado de displasia (según la clasificación de la OMS 2005), tabaquismo (fumador, no fumador, exfumador), apariencia clínica de leucoplasia (*Figura 1*): (homogénea, nodular, moteada-eritroplásica o verrugosa), número de lesiones

(únicas o múltiples), localización de la lesión, tamaño (< 2 cm, 2 - 4 cm y > 4 cm), seguimiento clínico (cambio / consistencia en la clasificación clínica inicial), tipo de biopsia (incisional o escisional), localización de la biopsia, transformación maligna y recurrencia. Este estudio fue aprobado por el comité ético de Galicia (Ref. 2016/337).



Figura 1 (Anexo 1 - Figura 1): Formas clínicas de la LO. a) Homogénea. b) Verrugosa. c) Nodular. d) Moteada-Eritroleucoplasia.

## 1.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

**Inclusión:** Se incluyeron pacientes que en algún momento habían presentado lesiones de leucoplasia que posteriormente habían sido confirmadas mediante biopsia. Para las lesiones que presentaron alteraciones en su forma clínica durante el seguimiento (a veces las lesiones sufren variaciones en su forma de presentación clínica), se consideró la forma clínica más frecuente de todas las citas de control.

## 1. Material y método para el Artículo 1

Exclusión: Se excluyeron sujetos con las siguientes características: pacientes sin diagnóstico histológico inicial, pacientes con un período de seguimiento menor a seis meses, pacientes con presentación clínica o hallazgos histológicos de enfermedad benigna blanca o predominantemente blanca, pacientes sin imagen clínica de la lesión analizada y pacientes sin ningún material anatomopatológico que nos permita confirmar el diagnóstico inicial.

La [Tabla 1](#) presenta un resumen de las características clínicas de la muestra de estudio.

Tabla 1 (Anexo 1 - Tabla 1). Características clínicas y patológicas de los pacientes

Características		Total Muestras (%)
Sexo	Hombres	59 (71,1)
	Mujeres	24 (28,9)
Tabaco	No fumadores	63 (75,9)
	Ex fumadores	16 (19,3)
	Fumadores	4 (4,8)
Número de lesiones		3,25
Tamaño de lesiones (cm)	< 2	6 (7,2)
	2- 4	17 (20,5)
	> 4	60 (72,3)
Localización de lesiones	Única	28 (33,7)
	Múltiple	55 (66,3)
Categorías clínicas	Homogénea	13 (15,7)
	Verrucosa	53 (63,9)
	Nodular	14 (16,9)
	Moteada - Eritroleucoplasia	3 (3,6)
Tipo de biopsia	Incisional	68 (81,9)
	Escisional	15 (18,1)
Localización de biopsia	Encía	32 (38,6)
	Lengua	26 (31,3)
	Mucosa yugal	18 (21,7)
	Mucosa palatina	5 (6)
	Suelo de boca	1 (1,2)
	Múltiple	1 (1,2)
Grado de displasia	No displasia	57 (68,7)
	Leve	21 (25,3)
	Moderada	4 (4,8)
	Severa	1 (1,2)
Cambio forma clínica	Sí	13 (15,7)
	No	70 (84,3)
Recurrencia	Sí	76 (91,6)
	No	7 (8,4)

### 1.3 ESTUDIO HISTOLÓGICO

A todos los pacientes incluidos en este estudio se les realizó una biopsia siguiendo el procedimiento habitual. En los casos donde las lesiones tenían un tamaño quirúrgico razonable, se decidió realizar biopsia escisional y eliminarlas de forma completa; de tal forma que además de conseguir una muestra para el análisis de la lesión, también se realizaba la exéresis con fin terapéutico. Las lesiones de más de 4 cm, localizadas en zonas comprometidas por estructuras vasculares o nerviosas, o de difícil acceso, fueron biopsiadas mediante técnica incisional y posteriormente tratadas mediante vaporización con láser de CO<sub>2</sub>.

### 1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis bivariante se utilizaron pruebas de Chi-cuadrado y ANOVA. Para verificar el riesgo relativo de las diferentes covariables de recurrencia se realizó un análisis de regresión logística multivariante. El tiempo medio de recurrencia se calculó mediante las curvas de Kaplan-Meier.

# 2

## **MATERIAL Y MÉTODO PARA EL ARTÍCULO 2- ESTUDIO DE LOS MARCADORES SALIVALES BASADOS EN PROTEÍNAS Y ANÁLISIS DE SU EFICACIA EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES ORALES**

---



## 2. MATERIAL Y MÉTODO PARA EL ARTÍCULO 2- ESTUDIO DE LOS MARCADORES SALIVALES BASADOS EN PROTEÍNAS Y ANÁLISIS DE SU EFICACIA EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES ORALES.

Se realizó una revisión sistemática de la literatura por un equipo multidisciplinar entre el 1 de diciembre de 2019 al 31 de enero de 2020. La revisión fue desarrollada siguiendo el Manual Cochrane de revisiones sistemáticas de intervenciones versión 51.0<sup>77</sup> y el checklist de la guía PRISMA<sup>78,79</sup> para revisiones sistemáticas (*Figura 2*).

Figura 2 (Anexo 2 - Suplementario 1) PRISMA 2009 Checklist

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
<b>TITLE</b>			Yes/No
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	y
<b>ABSTRACT</b>			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	N
<b>INTRODUCTION</b>			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	Y
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	Y
<b>METHODS</b>			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	Y

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	Y
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	Y
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	N
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	Y
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	Y
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	Y
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	Y
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	Y
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., $I^2$ ) for each meta-analysis.	Y
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	Y
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	Y
<b>RESULTS</b>			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	Y
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	Y
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	Y
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	Y
Synthesis of results	21	Present the main results of the review. If meta-analyses are done, include for each, confidence intervals and measures of consistency.	Y

## 2. Material y método para el Artículo 2

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	Y
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	Y
<b>DISCUSSION</b>			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	Y
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	Y
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	Y
<b>FUNDING</b>			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	Y

From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097 For more information, visit: [www.prisma-statement.org](http://www.prisma-statement.org).

### 2.1 PREGUNTA PICO

El trabajo se organizó basándose en la siguiente pregunta PICO: Patient, index test, comparison, outcome. P: ¿Existe algún biomarcador diagnóstico para la leucoplasia oral (LO)? I: proteínas en saliva. C: pacientes con carcinoma escamoso oral (COCE) y controles sanos (HCG). O: Diferencias de expresión entre LO y COCE-HCG. Con ello generamos la pregunta científica ¿Existen marcadores basados en proteínas en saliva que permitan de manera cuantitativa obtener diferencias diagnósticas entre controles sanos, TOPM y COCE?

## 2.2 CRITERIOS PARA INCLUIR ESTUDIOS EN ESTA REVISIÓN

### 2.2.1 Tipos de estudio

Se consideraron relevantes para esta revisión los estudios de marcadores moleculares basados en proteínas (index tests) en saliva que revelen resultados cuantitativos de expresión en relación a enfermedades diagnosticadas clínica e histopatológicamente (estándar de referencia). Por lo tanto, se incluyeron 1) Estudios de casos y controles en humanos, en lengua inglesa, considerando como estándar de referencia la LO y/o los TOPM que incluyan casos de LO; 2) Estudios que incluyan marcadores basados en proteínas y salivales exclusivamente; 3) Estudios que utilicen métodos de análisis mediante ELISA y/o equivalentes, con determinación de expresión cuantitativa (Bromocresol green method, Immunoturbidometry y LUMINEX). Como criterios de exclusión: 1) Estudios que analizan la expresión a nivel tisular y/o en plasma. 2) Estudios que cuantifiquen la expresión proteica en unidades de medida diferentes a peso/capacidad (es decir mg/dl, ng/dl ó pg/dl), tales como Sequence coverage, cociente masa/carga (m/z), Ion score, Fold-change o Mascot score. 3) Estudios que sólo incluyan grupo COCE u COCE/HCG. 4) Aquellos donde el marcador se expresa por debajo de un punto de corte mínimo. 5) Grupos controles poco claros o mal definidos.

### 2.2.2 Participantes

Los sujetos incluidos en el estudio fueron aquellos con diagnósticos claros y validados tanto clínica como histopatológicamente. Estudios en animales de experimentación o modelos in vitro fueron excluidos.

## 2. Material y método para el Artículo 2

### 2.2.3 Control y condiciones objetivo

Los pacientes incluidos fueron diagnosticados de acuerdo con la Clasificación de Tumores de Cabeza y Cuello de la OMS<sup>80</sup>. Los TOPM y LO se consideraron condición objetivo y el COCE y los HCG como grupo de controles tanto positivo (COCE) como negativo (HCG), según los subgrupos comparados.

El grupo HCG incluyó pacientes sin enfermedades sistémicas y sin medicación inmunosupresora.

### 2.2.4 Estándar de referencia

El estándar de referencia para el diagnóstico de LO, TOPM y COCE se basó en parámetros clínicos e histopatológicos (displasia y malignidad). Los estudios que no detallaron ningún estándar de referencia para el diagnóstico de las patologías descritas no fueron elegibles para su inclusión en esta revisión.

Ante la gran diversidad de estudios, se establecieron criterios diagnósticos inclusivos claros. Para el grupo COCE: pacientes diagnosticados clínicamente, verificados mediante estudio histopatológico, independientemente del grado de diferenciación, excluyendo casos de carcinomas verrugosos. Grupo TOPM: se incluyeron casos de liquen plano oral, eritroplasia, fibrosis oral submucosa y LO. Se consideró como TOPM aquellos trabajos donde no mencionan un diagnóstico clínico claro, pero sí una lesión no maligna con algún grado de displasia<sup>3,81</sup>. Grupo LO: lesiones blancas no desprendibles al raspado, homogéneas y no homogéneas (moteadas o verrugosas) con hiperqueratosis, acantosis y/o hiperplasia escamosa histológica, con cualquier grado de displasia (excepto carcinoma in situ que fueron excluidos).

### **2.2.5 Prueba (s) de índice**

Cualquier biomarcador basado en proteínas detectado en saliva, que fuera analizado desde un punto de vista cuantitativo para discriminar entre controles y las condiciones objetivo. Los estudios que analizan paneles de biomarcadores múltiples fueron excluidos por imposibilidad de análisis.

### **2.2.6 Otros criterios de exclusión**

Se excluyeron otros tipos de estudios: tesis, disertaciones, revisiones, cartas, opiniones personales, capítulos de libros, comunicaciones breves, resúmenes de congresos y patentes. Otras consideraciones: sin restricciones en la fecha de publicación, el estado de publicación y sólo en lengua inglesa.

## **2.3 MÉTODOS DE BÚSQUEDA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE ESTUDIOS**

### **2.3.1 Fuentes de información y estrategia de búsqueda**

Nuestra estrategia para esta investigación se basó en búsquedas electrónicas en MEDLINE a través de PubMed, EMBASE, OVID, Web of Science, Scopus, Cochrane Library, ClinicalTrials y las bases de datos bibliográficas regionales de la OMS (AIM, IMEMR, IMSEAR, WPRIM) y las bases de datos del Índice de Citas de la Conferencia. Este proceso se complementó con una búsqueda manual en una serie de revistas revisadas por pares con contenidos relacionados. Se buscaron artículos potencialmente relevantes que cualquiera de los autores conocía, y también se verificaron exhaustivamente las listas de referencias de los artículos de revisión recuperados y otras revisiones relevantes sobre el tema. Para disminuir

## 2. Material y método para el Artículo 2

la pérdida de cualquier estudio relevante, se evitó cualquier filtro de búsqueda basado en conceptos metodológicos. Siguiendo las recomendaciones establecidas por el Grupo Cochrane de Revisiones Sistemáticas de Exactitud de Pruebas de Diagnóstico<sup>82</sup>, la estrategia de búsqueda para identificar estudios de precisión incluyó tres conjuntos de términos relacionados con las condiciones objetivo (LO y TOPM), las pruebas de índice (biomarcadores basados en proteínas) y el tipo de muestra oral (saliva) (*Figura 3.1*).

Figura 3.1 (Anexo 2 - Suplementario 2.1): Estrategia de búsqueda, aplicada a las diferentes bases de datos.

Terms for target condition		
1. Oral Leukoplakia		
2. Oral Premalignant Lesion		
3. Oral Potentially Malignant Disorder		
4. 1 or 2 or 3 AND		
Terms for the type of oral sample analyzed		
5. Saliva AND/OR Protein		
Terms for the index tests		
6. 8-OHdG	53. Glycosaminoglycan	100. MMP-3
7. Activating factor	54. Glycosidase	101. MMP-7
8. Adipocytokine	55. Growth factor	102. MMP-8
9. Adiponectin	56. ERBB2	103. MMP-9
10. Albumin	57. HGF	104. MUC4
11. Amino acid	58. HSP27	105. MPO
12. Aminopeptidase	59. Hydroxyproline	106. Naa10p
13. Aminotransferase	60. ICTP	107. Neopterin
14. Amylase	61. IFN- $\alpha$	108. Neurokinin
15. Antibody	62. IFN- $\gamma$	109. Nitrate
16. Antitrypsin	63. IgA	110. NO
17. Arginase	64. IgA2	111. Nitrite
18. Arylsulfatase	65. IgE	112. NLRP3
19. ASC	66. IgG	113. OPG
20. Ascorbate	67. IgM	114. OPN
21. BGLAP	68. IL-1 $\alpha$	115. PDGF-BB
22. C4d	69. IL-1b	116. Peptidase
23. Ca <sup>+2</sup>	70. IL-6	117. Peptide
24. Calgranulin	71. IL-8	118. Peroxidase
25. Calprotectin	72. IL-10	119. PGE2
26. CASP1	73. IL-17	120. Phosphatase
27. Cathepsin	74. IL-18	121. Plasminogen
28. CD14	75. IL-21	122. PCT
29. CEA	76. IL-22	123. Progranulin
30. Chemerin	77. IL1RA	124. Prostaglandin
31. Chemokine	78. Immunoglobulin	125. Protease
32. Chitinase	79. Interferon	126. Protein
33. Chondroitin	80. Keratin	127. Proteinase

34. Collagenase	81. L-plastin	128. Pyridinoline
35. Complement C	82. LDH	129. RANKL
36. Cortisol	83. Lactoferrin	130. RANTES
37. Creatine	84. Laminin	131. Resistin
38. Creatinine	85. LDH	132. S100A8
39. CRP	86. Leptin	133. S100A9
40. CYFRA21	87. Leukotriene	134. sCD14
41. Cystatin	88. Lysozyme	135. SOD
42. Cytokine	89. Macroglobulin	136. SPARC
43. Dehydrogenase	90. MAF	137. Substance
44. Dipeptidyl peptidase	91. Marker	138. TIMP-1
45. EGF	92. MCP-1	139. TLR-2
46. Elastase	93. MDA	140. TLR-4
47. EDN1	94. Mediator	141. TNF- $\alpha$
48. Enzyme	95. Melatonin	142. VEGF
49. Esterase	96. Metabolite	143. Visfatin
50. Fibronectin	97. MMP	144. $\alpha$ -amylase
51. Gingipain	98. Microglobulin	
52. Glucuronidase	99. MIP-1 $\alpha$	

### 2.3.2 Selección de estudios

La manipulación de los datos identificados en las búsquedas se realizó utilizando el software SPSS (IBM Corp. 2011. IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Los resúmenes de todos los artículos se analizaron manualmente aplicando una serie de palabras positivas y negativas (*Figura 3.2*).

Figura 3.2 (Anexo 2 - Figura 3.2) Lista de las palabras positivas y negativas usadas para la selección de artículos seleccionables.

Positive words	Accuracy, sensitivity, specificity, threshold, area under curve, receiver operating, operating characteristic, positive predictive value, negative predictive value, true positive, true negative, false positive, false negative, point of care, chairside test, diagnostic test, prognostic test, logistic regression, canonic correlation, odd ratio, neuronal network, support vector machine, performance measure, predictive model, accurate, prediction, regression, discriminant, cluster, clustering, variance.
Negative words	dog, cat, animal, mouse, rat, vitro, monkey, pig, rabbit, review, metanalysis, overview.

## 2. Material y método para el Artículo 2

El proceso de extracción de datos fue previamente validado en una pequeña serie de documentos de expresión que cumplían con los criterios de inclusión. Los datos se extrajeron mediante un formulario estandarizado y probado por piloto. Este formulario incluía los siguientes ítems: Título (título original de la publicación revisada); Autores (aquellos que participaron en la publicación); Año (en qué momento se publicó el artículo); Grupo de estudio (COCE, LO, TOPM y HCG); Muestra (N, número de individuos que formaron parte desde el inicio del estudio); Tipo de biomarcador; Expresión cuantitativa; Método de análisis; Porcentaje de LO en muestras de TOPM; Presencia y grado de displasia (leve, moderada, severa); Tamaño de la LO; Aspecto clínico (Homogéneo/No-Homogéneo); Seguimiento (tiempo, recurrencia, evento oncológico).

El diagrama de flujo de la investigación y el procesamiento de datos se muestra en la **Figura 4**.

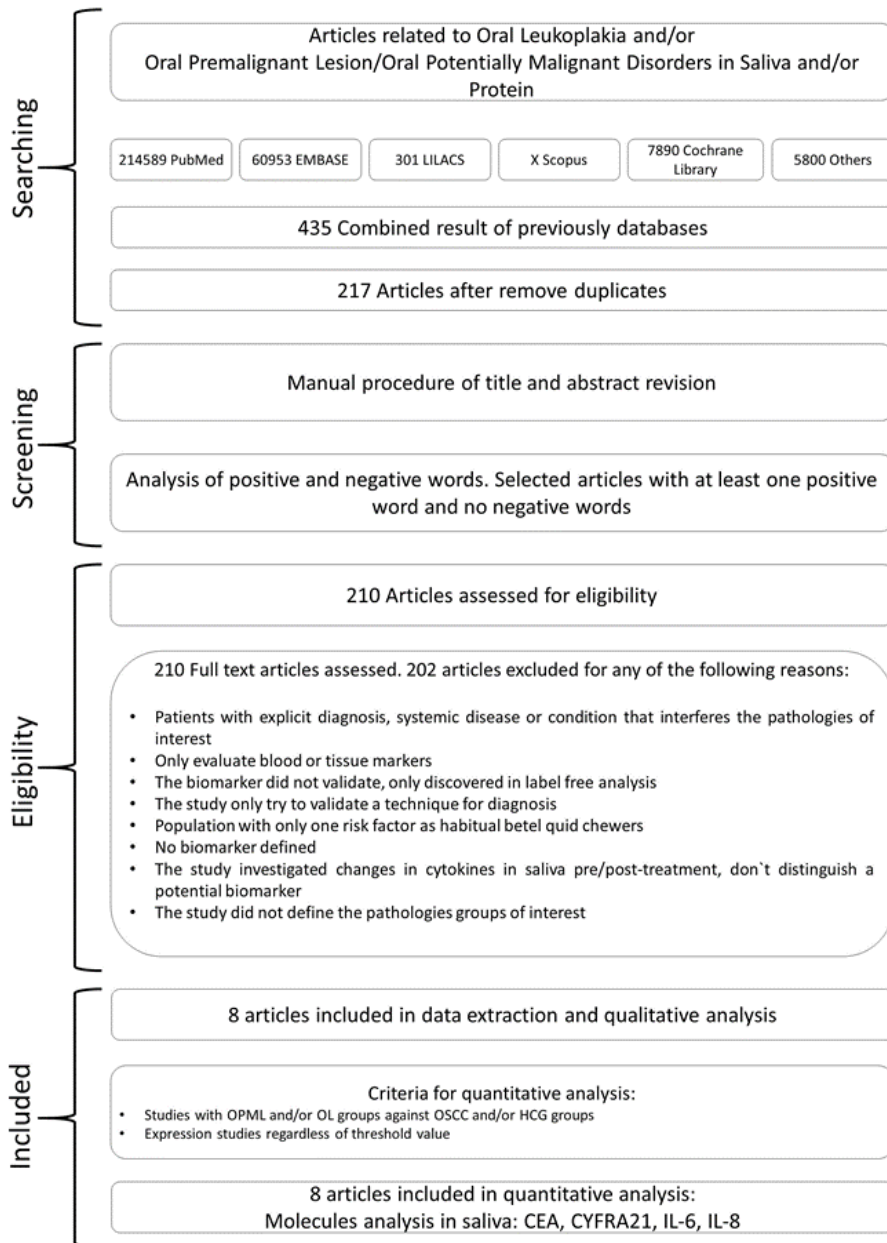


Figura 4 (Anexo 2 - Figura 1): Diagrama de flujo de la investigación.

## 2. Material y método para el Artículo 2

### 2.4 RECOPIACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

#### 2.4.1 Selección de estudios

La búsqueda fue realizada por 2 observadores (MPS y EAA). Cualquier desacuerdo continuo se resolvió mediante discusión con dos revisores diferentes (PGV y CMCP.). Se detallaron los motivos para excluir los estudios. En la primera ronda, se leyeron el título y el resumen de los artículos recuperados. Los estudios que cumplían los criterios de inclusión, así como aquellos que presentaban datos insuficientes para tomar una decisión clara, se juzgaron en texto completo. Luego, en una segunda ronda, todos los estudios que se consideraron elegibles se examinaron por completo y se tomó la decisión final de incluirlos o no.

#### *Extracción y gestión de datos*

Cuatro autores (MPS, EAA, CMCP, SPD) extrajeron los datos de forma independiente mediante el formulario indicado. Los dos primeros autores se centraron en las características de los artículos, y los segundos dos autores analizaron los datos de expresión de los estudios.

#### *Valoración de la calidad metodológica*

Dos revisores (MPS y EAA) evaluaron de forma independiente la calidad de los estudios incluidos mediante herramienta de Evaluación de calidad de los estudios de diagnóstico revisada (QUADAS - 2)<sup>83</sup> (Figura 5). Esta herramienta consta de cuatro dominios: 1) selección de pacientes, 2) prueba de índice, 3) prueba de referencia, 4) flujo y tiempo. Cada dominio se evalúa en términos de su riesgo de sesgo y los primeros tres dominios también se evalúan en términos de su aplicabilidad.

Figura 5 (Anexo 2 - Suplementario 3) - Herramienta QUADAS para la evaluación del riesgo de sesgo.

STUDY	YEAR	RISK OF BIAS				CONCERNS REGARDING APPLICABILITY		
		PATIENT SELECTION	INDEX TEST	REFERENCE STANDART	FLOW AND TIMING	PATIENT SELECTION	INDEX TEST	REFERENCE STANDART
Zheng, J. <i>et al.</i>	2018	HIGH	?	LOW	LOW	LOW	LOW	?
Airoldi, M. <i>et al.</i>	1986	HIGH	?	LOW	LOW	LOW	LOW	LOW
Awasthi, N. <i>et al.</i>	2017	HIGH	?	LOW	LOW	LOW	LOW	LOW
Rajkumar, K. <i>et al.</i>	2015	HIGH	?	LOW	LOW	LOW	LOW	LOW
Rhodus, N. L. <i>et al.</i>	2005	HIGH	?	LOW	LOW	LOW	LOW	LOW
Sharma, M. <i>et al.</i>	2011	HIGH	?	LOW	LOW	LOW	LOW	LOW
Gleber-Netto, F. O. <i>et al.</i>	2016	HIGH	?	LOW	LOW	LOW	LOW	LOW
Punyani, S. R. <i>et al.</i>	2012	HIGH	?	LOW	LOW	LOW	LOW	LOW

	RISK OF BIAS			CONCERNS REGARDING APPLICABILITY		
	Low Probability	Uncertan Probability	Low Probability	High Probability	Uncertan Probability	
Patient selection	0	8	0	8	0	0
Index test	0	0	8	8	0	0
Reference standart	8	0	0	7	0	1
Flow and timing	8	0	0	-	-	-

## 2. Material y método para el Artículo 2

### *Análisis cualitativo*

La unidad de análisis fue la expresión de cada biomarcador proteico en saliva, complementado por el autor y el año de publicación. En la mayoría de los estudios, se informó la expresión cuantitativa o nivel de una proteína cuantificable. En consecuencia, estos resultados se interpretaron como la presencia o ausencia de enfermedad (COCE, TOPM o LO) en base a una medición numérica que se clasificó de acuerdo con un umbral (predeterminado o no). Las estimaciones de expresión se mostraron como valores enteros y su desviación estándar para cada biomarcador y subgrupo. Para cada modelo se obtuvo la diferencia de medias ponderadas o Weighted Mean (WM) entre el grupo de casos y el grupo control, obteniendo el Overall Expression (OE) y el intervalo de confianza al 95% (IC95%). Hemos distribuido el metaanálisis en dos subgrupos, el primero COCE (estándar de referencia)/TOPM y el segundo TOPM (estándar de referencia)/HCG, incluyendo el único grupo aislado de LO dentro de TOPM.

### *Análisis cuantitativo*

Se realizó un metaanálisis cuando el número de datos de un biomarcador fue de al menos dos artículos y las unidades de medición del marcador eran las mismas. La estrategia de análisis fue incluir todos los estudios de expresión independientemente del valor umbral. El análisis estadístico de los resultados se realizó con la herramienta OpenMeta (Analyst).

### *Redes funcionales y mapeo de rutas*

El análisis de las vías biológicas dentro de los marcadores proteicos diferenciales se realizó utilizando la herramienta de análisis

de enriquecimiento PANTHER<sup>84</sup>, solo para interacciones con alta confianza (0,7) (Figura 6). El análisis de enriquecimiento de la vía biológica Reactome de proteínas de interés se realizó con la herramienta STRING<sup>85</sup> (Figuras 7, 8 y 9). En ambos casos utilizamos proteínas que presentaron diferencias estadísticamente significativas en nuestro estudio, realizando en algunos casos un enriquecimiento nodal para obtener más interacciones proteicas. Finalmente, utilizamos un análisis bioinformático sistemático que incluye la Base de Datos para Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado (DAVID) y el enriquecimiento de ontología genética<sup>86</sup>.

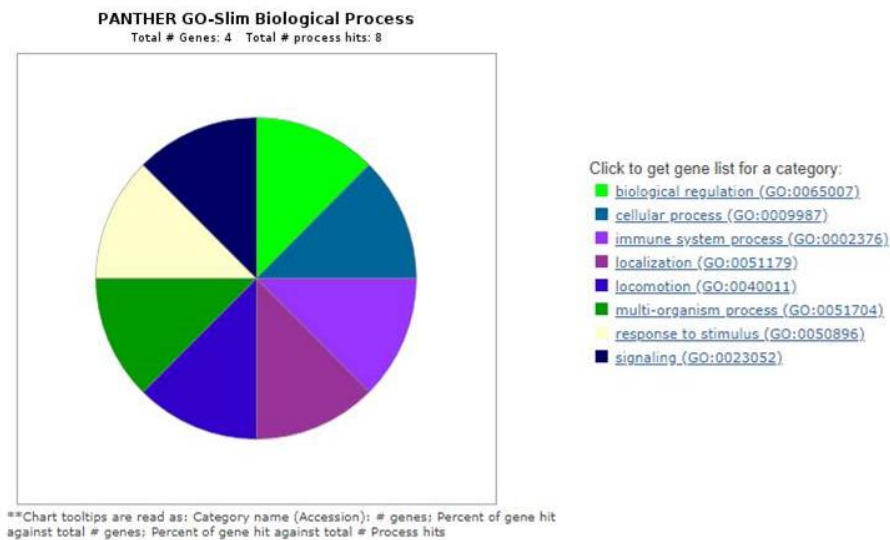


Figura 6 (Anexo 2 - Suplementario 6) - La herramienta de análisis PANTHER indica que las proteínas están involucradas en los procesos de señalización, el sistema inmunológico, la regulación, la localización y la locomoción.

## 2. Material y método para el Artículo 2

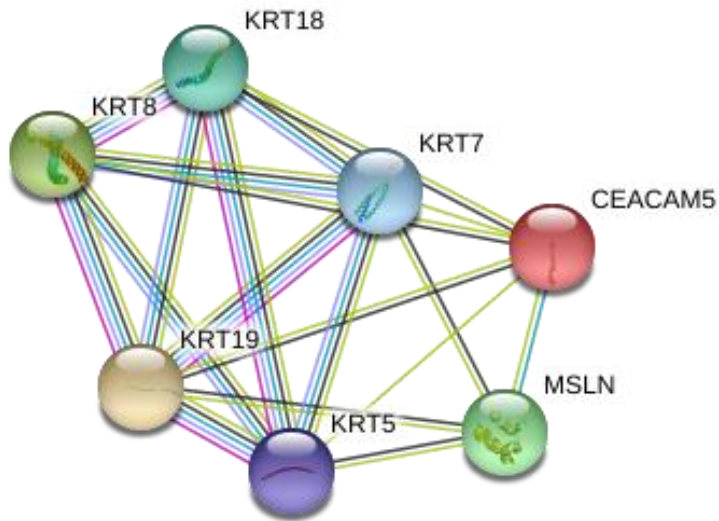


Figura 7 (Anexo 2 - Suplementario 7) - CYFRA21 parece tener interacciones con un complejo de proteínas del citoesqueleto y con la mesotelina (MSLN).

The screenshot shows a protein interaction database entry for KRT19 and CEACAM5. At the top, a small diagram shows a green sphere (KRT19) and a red sphere (CEACAM5) connected by a yellow line. Below this, the interaction details are displayed:

**Interaction**

**KRT19 [ENSP00000355124]**  
Keratin, type I cytoskeletal 19; involved in the organization of myofibers. Together with KRT8, helps to link the contractile apparatus to dystrophin at the costameres of striated muscle; Keratins, type I

**CEACAM5 [ENSP00000221992]**  
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5; Cell surface glycoprotein that plays a role in cell adhesion and in intracellular signaling. Receptor for E.coli Dr adhesins; CD molecules

**Evidence suggesting a functional link:**

Neighborhood in the Genome:	none / insignificant.
Gene Fusions:	none / insignificant.
Cooccurrence Across Genomes:	none / insignificant.
Co-Expression:	yes (score 0.088). <a href="#">Show</a>
Experimental/Biochemical Data:	none / insignificant.
Association in Curated Databases:	none / insignificant.
Co-Mentioned in PubMed Abstracts:	yes (score 0.836). <a href="#">Show</a>

Combined Score: 0.844

Figura 8 (Anexo 2 - Suplementario 8) - KRT19 está involucrado en la organización de miofibrillas junto con KRT8, mientras que CEA juega un papel muy importante en la adhesión celular y los procesos de señalización intracelular

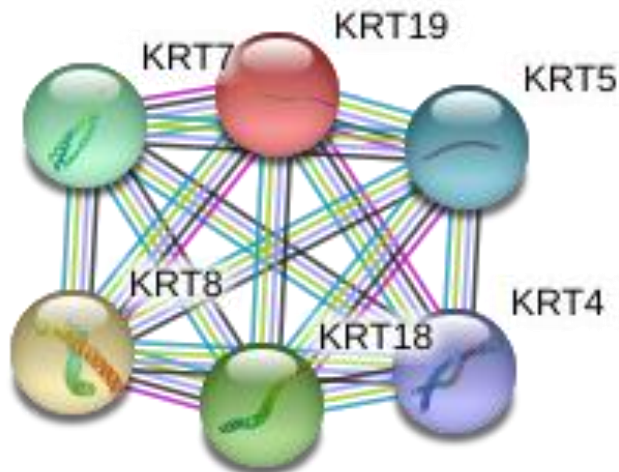


Figura 9 (Anexo 2 - Suplementario 9) - Interacción de un fuerte grupo de proteínas del citoesqueleto.

#### 2.4.2 Evaluación de heterogeneidad

En cuanto a la evaluación de la heterogeneidad de esta revisión destacamos, en primer lugar, que el efecto umbral de expresión se evaluó gráficamente observando el forest plot. En segundo lugar, el efecto umbral se evaluó estadísticamente mediante la prueba I<sup>2</sup>. Los valores  $p > 0,1$  y el índice  $I^2 < 50\%$ , indican una baja heterogeneidad entre los estudios por lo que se realizó el modelo de efecto-fijo (fixed-effect model), por el contrario, valores de  $p < 0,1$  e índice  $I^2 > 50\%$  indican una considerable heterogeneidad por lo que se llevó a cabo el modelo de efecto-aleatorio (random-effect model). Todas las diferencias bilaterales con un valor de  $p$  menor o igual a 0.05 se consideraron significativas<sup>87</sup>.

# 3

## **MATERIAL Y MÉTODO PARA EL ESTUDIO 3 - ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE REPARACIÓN EN LESIONES DE LEUCOPLASIA ORAL Y CÁNCER ORAL**

---



### **3. MATERIAL Y MÉTODO PARA EL ESTUDIO 3 - ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE REPARACIÓN EN LESIONES DE LEUCOPLASIA ORAL Y CÁNCER ORAL**

#### **3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se trata de un estudio observacional transversal, diseñado de acuerdo con las recomendaciones STROBE<sup>76</sup> y aprobado por el Comité Autnómico de Ética de Galicia (referencia 2019/271). La muestra se seleccionó en de la Unidad de Medicina Oral de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) y fue analizada en el Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil (ICT/UNESP). Todos los procedimientos se llevaron a cabo con la comprensión y el consentimiento por escrito de los sujetos de conformidad con la Declaración de Helsinki y sus modificaciones posteriores.

#### **3.2 SELECCIÓN DE MUESTRAS Y EVALUACIÓN HISTOLÓGICA**

El estudio incluyó 45 muestras de pacientes diagnosticados clínicamente con LO y COCE. En todos los casos se realizó tinción con hematoxilina-eosina y fueron revisados por un patólogo. El diagnóstico se obtuvo según las recomendaciones internacionales para el análisis histopatológico<sup>6,8</sup>. La distribución final de las muestras fue: 16 LO sin displasia, 14 LO con displasia y 15 con COCE. Los datos

clínicos de los pacientes y la estadificación tumoral fueron recogidos en una base de datos de la USC (Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 2 (Anexo 3 - Tabla 1). Datos descriptivos de hábitos y comorbilidades de los participantes.

Variables		LO sin displasia n (%)	LO con displasia n (%)	COCE n (%)
Sexo	Mujer	12 (41.4)	9 (31)	8 (27.6)
	Hombre	4 (25)	5 (31.3)	7 (43.8)
Tabaco	No	9 (37.5)	8 (33.3)	7 (29.2)
	Exfumador	3 (37.5)	3 (37.5)	2 (25)
	Sí	4 (33.3)	3 (25)	5 (41.7)
	No específica	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Alcohol	No	11 (42.3)	9 (34.6)	6 (23.1)
	Bebedor ocasional	0 (0)	0 (0)	3 (100)
	Sí	2 (28.6)	3 (42.9)	2 (28.6)
	No específica	3 (33.3)	2 (22.2)	4 (44.4)
Comorbilidad	No	5 (33.3)	4 (26.7)	6 (40)
	Sí	11 (36.7)	10 (33.3)	9 (30)
Comorbilidad específica	No	5 (33.3)	4 (26.7)	6 (40)
	Cardiovascular	2 (22.2)	1 (11.1)	6 (66.7)
	Psiquiátrico	1 (50)	0 (0)	1 (50)
	Dos o más patologías	8 (42.1)	9 (47.4)	2 (10.5)

### 3. Material y método para el Artículo 3

Tabla 3 (Anexo 3 - Tabla 2): Datos descriptivos de las muestras. NA: no se aplica.

Información sobre las lesiones		LO sin displasia n (%)	LO con displasia n (%)	COCE n (%)
Número de lesiones	Única	6 (26.1)	7 (30.4)	10 (43.5)
	Múltiples	10 (45.5)	7 (31.8)	5 (22.7)
Localización	Encía queratinizada	2 (66.7)	0 (0)	1 (33.3)
	Lengua	3 (17.6)	9 (52.9)	5 (29.4)
	Paladar	1 (33.3)	0 (0)	2 (66.7)
	Mucosa yugal	6 (46.2)	3 (23.1)	4 (30.8)
	Reborde alveolar	2 (33.3)	1 (16.7)	3 (50)
Tipo de biopsia	Labio inferior	0 (0)	1 (100)	0 (0)
	Zona retrocomisural	1 (100)	0 (0)	0 (0)
	Zona retromolar	1 (100)	0 (0)	0 (0)
	Incisional	7 (35)	7 (35)	6 (30)
	Escisional	9 (36)	7 (28)	9 (36)
Presentación clínica	LO Homogénea	13 (59.1)	9 (40.9)	NA
	LO Verrugosa	3 (50)	3 (50)	NA
	LO Eritroleucoplasia	0 (0)	2 (100)	NA
Displasia	Carcinoma	NA	NA	15 (100)
	No	13 (86.7)	2 (13.3)	NA
	Bajo grado	3 (25)	9 (75)	NA
Evolución clínica de las LOs en el periodo estudiado	Alto grado	0 (0)	3 (100)	NA
	Estable	10 (58.8)	7 (41.2)	NA
	Cambio de forma clínica	1 (100)	0 (0)	NA
	Evento oncológico	2 (40)	3 (60)	NA
	Recurrencia	1 (25)	3 (75)	NA
Estadio tumoral	Curación	2 (100)	0 (0)	NA
	No sabemos	0 (0)	1 (100)	NA
	I	NA	NA	8 (100)
	II	NA	NA	1 (100)
	III	NA	NA	1 (100)
Diferenciación del COCE	IV	NA	NA	5 (100)
	Bien	NA	NA	9 (100)
	Moderado	NA	NA	5 (100)
Tipo de tratamiento realizado	Pobre	NA	NA	1 (100)
	Seguimiento	11 (57.9)	8 (42.1)	NA
	Láser	1 (50)	1 (50)	NA
	Exéresis	4 (44.4)	5 (55.6)	NA
	No	NA	NA	2 (100)
RT	Sí	NA	NA	13 (100)
	No	NA	NA	10 (100)
QT	Sí	NA	NA	5 (100)
	No	NA	NA	3 (100)
CX	Sí	NA	NA	12 (100)
	No	14 (56)	11 (44)	NA
Carcinoma previo	Sí	2 (66.7)	1 (33.3)	NA
	No	0 (0)	2 (100)	NA
	Labio	12 (57.1)	9 (42.9)	NA
Antecedentes cáncer	No	1 (25)	3 (75)	NA
	En el mismo paciente	3 (60)	2 (40)	NA
	Familiar	NA	NA	10 (100)
Recidiva	Sí	NA	NA	5 (100)
	No	NA	NA	11 (100)
Exitus	Sí	NA	NA	4 (100)
	No	NA	NA	NA

### 3.3 EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó inmunohistoquímica para MLH1, MSH2, MRE11 y XRCC1. Las secciones histológicas fueron desparafinadas, rehidratadas y se sometieron a recuperación antigénica, de acuerdo con la **Figura 10**. Se incubaron en secuencia (de acuerdo con fabricantes) los anticuerpos primarios, el polímero HRP (Envision – Dako, Niterói, Brasil), el cromógeno DAB (Dako, Niterói, Brasil) y, finalmente, las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Se utilizaron muestras de adenocarcinoma de mama como control positivo. Como control negativo se utilizaron las mismas muestras, sin incubación del anticuerpo primario.

Figura 10 (Anexo 3 - Suplementario 1): Estandarización de anticuerpos

Anticuerpo	Clon (Fabricante)	Dilución	Recuperación antigénica	Incubación del anticuerpo
MLH1	ES05 (Dako)	1:25	Solución tampón de pH	1 hora
MSH2	FE11 (Dako)	1:25	9 (Dako), en microondas (potencia máxima por lo máximo 10 minutos después de hervir.)	18 horas (overnight)
XRCC1	33-2-5 (Abcam)	1:100	Tampón pH 9 (Dako), en olla a presión, por 3 minutos.	1 hora
MRE11	12D7 (Abcam)	1:100		

La extensión de la lámina se valoró a 10X, realizando una evaluación semicuantitativa de 4 campos diferentes con marcado nuclear positivo a nivel epitelial. Los casos fueron clasificados como: negativo (<5% de células teñidas), positividad débil (>5% y <50%) y positivo (>50%). El límite de intensidades entre negativo y positivo se realizó por comparación con el control interno.

### 3. Material y método para el Artículo 3

#### 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v.24.0 (IBM, Statistics, NY, USA). Para estudiar las relaciones entre las variables categóricas, los datos fueron sometidos al test chi cuadrado y Kruskal-Wallis. El nivel de significación se estableció en  $p \leq 0.05$ .



# DISCUSIÓN

---



## DISCUSIÓN

La leucoplasia es una entidad patológica oral que pertenece a un grupo amplio de lesiones con tendencia a la transformación maligna, las lesiones orales potencialmente malignas o lesiones precancerosas.

El manejo terapéutico del paciente con leucoplasia debe estar basado en dos objetivos: la prevención de la malignización a través del control periódico de las lesiones y el tratamiento fundamentado en la eliminación inicial de posibles factores etiológicos combinado con la exéresis quirúrgica de las lesiones.

Para ello, resulta fundamental que el clínico explore al paciente de forma rutinaria para poder detectar prematuramente las lesiones y evitar así que la enfermedad se manifieste de forma inicial en estadios avanzados. De igual manera, debe realizarse un diagnóstico clínico por exclusión de otras entidades patológicas que cursen con placas blancas que no se desprendan al raspado, lo que de forma consecuente y tras este descarte, obliga a la confirmación diagnóstica a través del análisis anatomopatológico<sup>88</sup>.

El diagnóstico definitivo debe realizarse mediante la toma de una muestra de la lesión a través de la exéresis parcial con una biopsia incisional, que abarque parte de la lesión y un fragmento de tejido sano con el que se pueda realizar una comparación histológica. Este análisis presenta un espectro de variación histológica que abarca desde la hiperqueratosis sin displasia hasta la presencia de displasia de bajo o alto grado.

El tratamiento de la leucoplasia se basa en su análisis histológico previo. En caso de que se observe presencia de hiperqueratosis sin displasia o si la displasia es de bajo grado, se recomienda realizar el seguimiento de la lesión cada 3 meses. Sin embargo, si la displasia es de alto grado, la actuación por parte del clínico debe ir encaminada a la realización de una exéresis quirúrgica que abarque el tamaño íntegro de la lesión y se extienda unos milímetros más como margen de seguridad para minimizar el riesgo de recurrencia. Esta exéresis de la lesión remanente puede realizarse mediante bisturí frío o a través de otras técnicas como el uso de láser CO<sub>2</sub> o crioterapia. Tras la exéresis de la lesión, el paciente debe acudir a revisiones periódicas para evaluar el seguimiento.

La recurrencia supone la aparición de una nueva lesión en la misma localización donde anteriormente se realizó una exéresis previa. Sin embargo, se ha observado que la tendencia a una mayor recurrencia es diferente en función de la forma clínica de la lesión. En el estudio de Sundberg y colaboradores, se encuentra una tasa de recurrencia mayor en las formas no homogéneas en comparación con la forma homogénea, estableciendo que el diagnóstico clínico de una forma no homogénea supone un riesgo dos veces mayor de desarrollar recurrencia<sup>89</sup>.

La literatura previa advierte sobre una mayor tendencia a la recurrencia por parte de la leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) sobre el resto de lesiones de leucoplasia. En su artículo de revisión, Capella y colaboradores encontraron una tasa de recurrencia media del 85%<sup>90</sup>. Esta elevada tasa de recurrencia fue observada en 6 estudios en los que se trataba la recurrencia con diferentes modalidades de tratamiento (exéresis quirúrgica y láser) en una muestra mínima de 30 pacientes por estudio<sup>91-96</sup>. Entre ellos, Bagán y colaboradores en su estudio del año 2003 evidenciaban una tasa de recurrencia del 86,3% en las lesiones de LVP<sup>94</sup>, muy superior a la tasa de recurrencia media de lesiones de leucoplasia situada en un amplio rango de 2 a 40% con una tasa de recurrencia anual de 5 a 10%<sup>97</sup>.

La tasa de recurrencia en nuestro estudio fue del 91,6% y el 15% de las lesiones presentaron cambios clínicos. Varios estudios han demostrado que el 7,7% - 45% de las lesiones recurren después del tratamiento quirúrgico<sup>15-18,98,99</sup>. En nuestro trabajo, el tiempo de seguimiento de las lesiones es muy extenso, llegando en algunos casos a casi 12 años. Esta duración explica la alta incidencia acumulada de recurrencia que observamos en nuestra cohorte y su potencial carcinogénico. Sundberg y colaboradores observan como la incidencia acumulada de la recurrencia en sus casos cambia según el año en que la analizan (45% a los 4 años y 49% a los 5 años)<sup>89</sup>.

Kuribayashi y colaboradores encontraron que la tasa de recurrencia después de la resección quirúrgica curativa fue del 15,1%, siendo la localización más común la encía<sup>18</sup>. La recurrencia fue más probable en los casos con márgenes positivos. No se observó asociación significativa entre la recurrencia y el grado de displasia epitelial<sup>18</sup>. Chandu y colaboradores observaron una supervivencia libre de enfermedad del 55,4% a los 3 años entre su cohorte de pacientes (tasa de recurrencia del 45%), en particular, en los pacientes que no abandonaron los hábitos tóxicos<sup>98</sup>. En nuestra serie, casi el 65% de las lesiones fueron verrugosas, con riesgo intrínseco de recurrencia, comportamiento proliferativo e incluso malignidad.

En nuestra investigación analizamos la relación de la recurrencia de las lesiones con las formas clínicas y el grado de displasia. La recurrencia la evaluamos de forma cuantitativa a través de un promedio del tiempo que transcurre desde la exéresis de la lesión hasta la aparición de la recurrencia, realizándose esta media sobre todas las lesiones.

Con respecto a la asociación entre el tiempo promedio de recurrencia y el grado de displasia (*Figura 11*), el fenómeno de recurrencia es más frecuente en pacientes sin displasia que en

pacientes con displasia (hallazgo similar a Kuribayashi y colaboradores)<sup>18</sup>. Después de 20 meses de seguimiento, más del 60% de los pacientes sin displasia ya habían experimentado recurrencia.

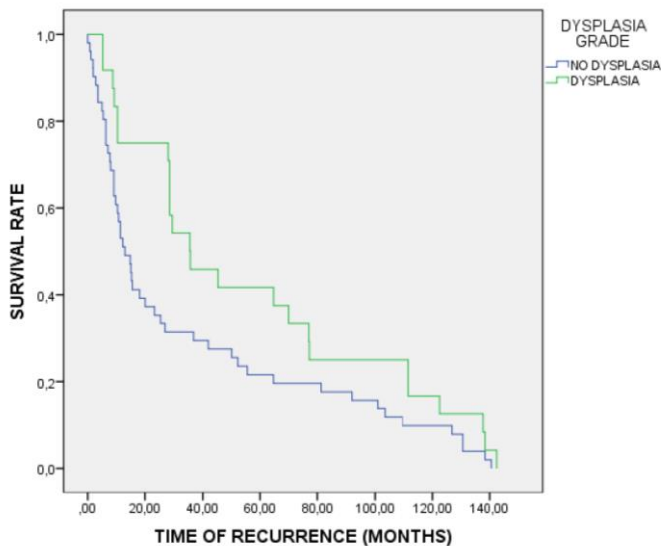


Figura 11 (Anexo 1 - Figura 3).  
Curvas de recurrencia basadas en el grado de displasia.

Por otro lado, menos del 30% de los pacientes con displasia habían experimentado recurrencia. En su estudio, Diajil y colaboradores describieron lesiones con alto grado de displasia que presentan una supervivencia libre de enfermedad del 62% a los 10 años de seguimiento<sup>99</sup>.

La displasia en las lesiones premalignas orales confiere la capacidad de estimular el crecimiento y división de las células contenidas en las capas basales del epitelio; por tanto, este tipo de lesión debería ser más susceptible a la recidiva y debería ser refractaria al tratamiento quirúrgico. Sin embargo, este hecho no ha sido demostrado<sup>100</sup>.

En su estudio de supervivencia de lesiones de leucoplasia, Gándara y colaboradores evaluaron la relación existente entre factores clínico-patológicos y la transformación maligna, observando que tanto el grado de displasia (leve, moderada o severa) como el aspecto clínico (lesiones no homogéneas) son los parámetros que se asocian de una manera estadísticamente significativa con una mayor tasa de transformación maligna<sup>100</sup>. Estas variables que tienen un impacto directo sobre la malignización también parecen relacionarse con una mayor tasa de recurrencia<sup>89</sup>.

Jerjes y colaboradores evaluaron la asociación entre la recidiva y el grado de displasia mediante un análisis bivariado, encontrando niveles de displasia moderada-grave en la recidiva de leucoplasia<sup>101</sup>. Por otro lado, Chainani-Wu y colaboradores, no encontraron diferencias significativas en el análisis de regresión logística que se realizó para evaluar la histopatología de la lesión y su recurrencia<sup>102</sup>.

Al comparar el tiempo medio de recurrencia y las formas clínicas (*Figura 12*), la recurrencia ocurre con menos frecuencia en la forma verrucosa que en las otras formas clínicas de leucoplasia.

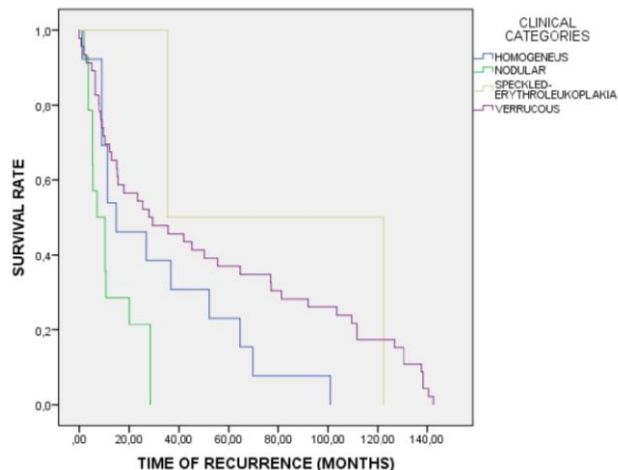


Figura 12 (Anexo 1 - Figura 2).  
Curvas de recurrencia basadas en las formas clínicas.

Después de 10 meses de seguimiento, aproximadamente el 60% de los pacientes sin leucoplasia verrugosa habían experimentado al menos un episodio de recurrencia. En el mismo período de tiempo, menos del 30% de los pacientes con leucoplasia homogénea habían experimentado recurrencia. Un estudio previo evaluó el riesgo de recurrencia según la forma clínica de las lesiones, determinando que las lesiones no homogéneas presentan el mayor riesgo<sup>16</sup>.

En cuanto al tiempo medio de recidiva entre todas las formas clínicas (nodular, eritroleucoplasia moteada, homogénea y verrugosa), la recidiva de la leucoplasia nodular es más frecuente y prematura en comparación con las otras formas clínicas. Antes de llegar al seguimiento de 20 meses, más del 70% de los pacientes con la forma nodular ya habían experimentado recurrencia al menos una vez. Por el contrario, solo el 45% y el 30% de los pacientes con las formas homogénea y verrugosa, respectivamente, habían experimentado recurrencia. En este período, no se registró la recurrencia de la forma de eritroleucoplasia moteada, probablemente debido a una escisión quirúrgica menos conservadora<sup>103</sup>.

Existen diferentes modalidades de tratamiento para las lesiones de leucoplasia; sin embargo, la literatura no ofrece una guía terapéutica definitiva. En un artículo reciente, Monteiro y colaboradores evaluaron el impacto de diferentes tipos de láser en las lesiones de leucoplasia en términos de su recurrencia. Concluyeron que el láser Er:YAG es una opción prometedora para el tratamiento de leucoplasia oral<sup>97</sup>. En una revisión sistemática posterior, se estudió el impacto sobre la recurrencia del láser de CO2 contra la técnica de bisturí frío. Los resultados de esta revisión consideran que este tipo de láser es una buena opción de tratamiento debido a su eficacia y su baja morbilidad<sup>104</sup>.

En un metaanálisis reciente, De Pauli Paglioni y colaboradores evaluaron el impacto de los diferentes tipos de láser en la tasa de recurrencia y transformación maligna. En este conjunto de estudios, las lesiones de leucoplasia fueron tratadas mediante vaporización o escisión usando distintos tipos de láser: láser Nd:YAG, láser Er:YAG, láser CO<sub>2</sub>, láser KTP y láser de diodo. Los resultados muestran un descenso en el número de recurrencias que sufren las lesiones de leucoplasia en comparación con el tratamiento conservador mediante exéresis con bisturí frío<sup>105</sup>.

Tal como se ha descrito anteriormente, el tipo de tratamiento es una variable importante para conseguir buenas evoluciones en el seguimiento de las lesiones tratadas. Por otra parte, se ha observado que la forma en la que se aplican estas modalidades terapéuticas sobre las lesiones también tiene relevancia a la hora de conseguir reducir las probabilidades de sufrir una recurrencia. En el estudio realizado por Romeo U y colaboradores, se evaluó la importancia de realizar márgenes de seguridad en la exéresis de lesiones de leucoplasia mediante el uso de láser CO<sub>2</sub>. En dicho estudio, a un grupo de pacientes se le aplicó una extensión de 3 milímetros en los márgenes y a otro no, siendo el primer grupo el que mostró una tasa de recurrencia significativamente más baja (36.4% vs 45.5%)<sup>106</sup>.

Las limitaciones de esta primera parte de nuestro estudio, donde evaluamos el impacto de las variables clínico-patológicas en relación con la recurrencia incluyen: la controversia en torno a la displasia y su gradación, el grado de coherencia entre varios patólogos durante numerosos años, las formas cambiantes de las lesiones y el efecto del consumo de agentes mutagénicos sobre el grado de displasia durante el período de seguimiento. Como podemos confirmar en este estudio, la recurrencia de leucoplasia oral y los cambios clínicos a formas más susceptibles de recurrencia es alta, incluso cuando el tratamiento ha

sido realizado por un especialista en Medicina Oral. Esto genera la necesidad de reducir los períodos de seguimiento de estos pacientes, en ocasiones incluso mensuales.

Previamente hemos destacado la importancia de obtener un diagnóstico definitivo a través de un análisis anatomopatológico que confirme un diagnóstico de sospecha realizado por el clínico. Otro aspecto de gran relevancia es conseguir un mejor pronóstico de esta patología.

La leucoplasia, así como otras lesiones precancerosas, tiene tendencia a la malignización. Esta tasa de transformación maligna oscila entre el 0,13% y el 34% y afecta con mayor frecuencia a los pacientes de edad avanzada, del género femenino, con presencia de lesiones con un tamaño superior a 200 mm<sup>2</sup>, formas no homogéneas y un grado de displasia moderada o severa<sup>107</sup>.

Cuando esta malignización sucede, se desarrolla una neoplasia en la cavidad oral. El carcinoma de células escamosas constituye más del 90% de todos los casos de cáncer que surgen en la región de la cabeza y el cuello, incluida la cavidad oral y la orofaringe<sup>108</sup>. Su diagnóstico se confirma con el estudio histológico de una biopsia de la lesión y la tasa de supervivencia media de esta patología a los 5 años se sitúa en el 60%, variando entre el 40% y el 80% según el estadio de la enfermedad<sup>109</sup>.

Mejorar el pronóstico de las lesiones precancerosas supone un mayor control de su evolución y una detección precoz de su malignización. Una forma de obtener un mayor conocimiento sobre el pronóstico de las lesiones premalignas es a través de los biomarcadores basados en proteínas presentes en saliva.

La saliva es un fluido biológico claro, ligeramente ácido (pH = 6,0 a 7,0) y complejo compuesto por secreciones de las glándulas salivales principales. Además de los componentes secretados por estas glándulas, la saliva contiene otras moléculas que pueden estar relacionadas con el fenotipo de enfermedades, facilitando el diagnóstico y el pronóstico, incluidos metabolitos, proteínas, ARNm, ADN, enzimas, hormonas, anticuerpos, componentes antimicrobianos y factor de crecimiento<sup>110</sup>.

El conjunto de las proteínas presentes en la saliva conforma el proteoma salival y el estudio de la expresión de estas proteínas, la proteómica, se lleva a cabo a través de múltiples técnicas entre las que destacan la electroforesis bidimensional en gel y la espectrometría de masas<sup>111</sup>.

En nuestro estudio, realizamos una revisión sistemática y metaanálisis que tuvo como objetivo determinar la existencia de biomarcadores basados en proteínas salivales que permitan la diferenciación entre pacientes con COCE y TOPM, así como entre pacientes con TOPM y los pertenecientes al grupo de controles sanos. Aunque encontramos estudios que analizaron 11 biomarcadores diferentes, solo fue posible realizar un metaanálisis en 8 estudios con 4 biomarcadores.

CEA es una glicoproteína transmembrana que tiene múltiples funciones. En el COCE de la lengua, su sobreexpresión se correlaciona con la infiltración de neutrófilos y ambos se asocian con un mal pronóstico<sup>112</sup>.

En nuestro metanálisis, CEA presentó diferencias en la OE entre COCE y TOPM de 25,854 (IC95%: 13.215–38.492) ( $p < 0,001$ ). El valor de la expresión en la población china<sup>113</sup> y la población italiana<sup>114</sup>

fue 29,3 (IC95%: 11,682-46,918) y 22,2 (IC95%: 4,060-40,340), respectivamente. (Tabla 4, Figura 13)

Sin embargo, CEA no presentó una diferencia significativa en la OE al comparar TOPM con HCG en los estudios considerados (Tabla 4).

Tabla 4 (Anexo 2 - Tabla 2A): Valores de overall expression (OE) para CEA, con su intervalo de confianza 95% y análisis de la heterogeneidad.

Marcador	Subgrupo	OE	IC 95% (p)	Heterogeneidad (I <sup>2</sup> , p)
CEA	OSCC/OPML	25.854	13.215-38.492 (p<0.001) *	Nula (I <sup>2</sup> =0, p=0.582)
	OPML/HCG	25.394	-1.221-52.008 (p=0.061)	Alta (I <sup>2</sup> =79.91, p=0.026)

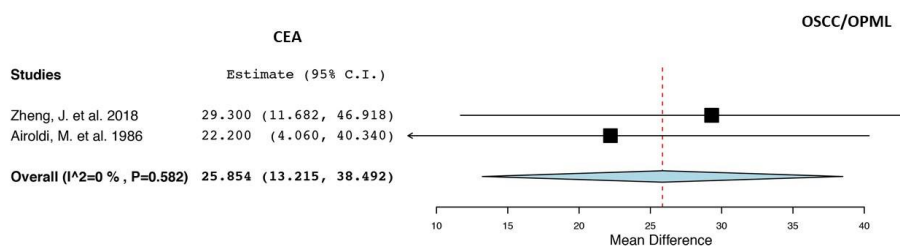


Figura 13 (Anexo 2 - Figura 2A) - CEA entre COCE vs TOPM

La distribución de hombres y mujeres en la población en el estudio de Zheng y colaboradores<sup>113</sup> fue similar, aunque el número de casos de COCE fue casi 4 veces mayor que el de TOPM (Tabla 5). Entre estos TOPM se incluyeron diagnósticos de liquen plano oral, LO y eritema, sin precisar el número de casos que correspondían a cada diagnóstico, lo que supone un riesgo de sesgo debido a la falta de datos de este estudio. Los niveles salivales de CEA en el grupo de COCE mostraron una asociación significativa con el estadio del tumor (p = 0,018) y la metástasis en los ganglios linfáticos (p = 0,035)<sup>113</sup>.

Por otro lado, más del 80% de los sujetos en el estudio de Airoidi y colaboradores<sup>114</sup> eran hombres, identificando que el 70,6% de los TOPM correspondía a LO (n = 12) (Tabla 5). En este estudio, la expresión de CEA fue significativamente mayor en COCE en comparación con TOPM (p <0.025) y HCG (<0.001).

Tabla 5 (Anexo 2 - Tabla 1<sup>a</sup>): Datos descriptivos de los estudios incluidos en el metaanálisis.

First Author	Year	Country	Study Subgroup	Proteomic Biomarker	N	Age	Male (%)	Smokers (%)	Mean Expression	Method	Dysplasia
Zheng	2018	China	OSCC	CEA	112	63.2	55.35	-	146.02	ELISA	-
			OPML	CEA	30	61.43	53.33	-	116.72	ELISA	-
			HCG	CEA	60	60.57	61.66	-	77.34	ELISA	-
Airoidi	1986	Italy	OPML	CEA	17	52	82.4	82	58.52	ELISA	-
			OSCC	CEA	11	66	81.8	81	80.72	ELISA	-
			HCG	CEA	19	58	70	42	46.31	ELISA	-

Históricamente, CYFRA21 se ha investigado como un biomarcador del carcinoma de pulmón de células no pequeñas y posteriormente se evaluó en otros trastornos malignos<sup>115</sup> y potencialmente malignos<sup>116</sup>. También puede ser un biomarcador útil en la región de la cabeza y el cuello<sup>117</sup>.

La OE para CYFRA21 fue altamente significativa en COCE (9,317 veces mayor) en comparación con TOPM (p <0,001), y este último grupo también mostró significación en comparación con HCG (p = 0,017) (Tabla 6). En los estudios considerados, se estudiaron poblaciones del mismo origen<sup>118,119</sup>. El grupo TOPM presentó una OE que fue 3.679 (IC95%: 0.663-6.696) veces mayor que la HCG, a pesar de esto, hubo una amplia heterogeneidad en la estimación de los estudios incluidos, para Awasthi y colaboradores<sup>118</sup> con 2.000

(IC95%: 0,211-3,789) y Rajkumar y colaboradores<sup>119</sup> con 5,090 (IC95%: 4,980-5,200) (Figura 14).

Tabla 6 (Anexo 2 - Tabla 2B): Valores de overall expresión para CYFRA21, con su intervalo de confianza 95% y análisis de la heterogeneidad.

Marcador	Subgrupo	OE	IC 95% (p)	Heterogeneidad (I <sup>2</sup> , p)
Cyfra21	OSCC/OPML	9.317	9.014-9.619 (p<0.001) *	Nula (I <sup>2</sup> =0, p=0.428)
	OPML/HCG	3.679	0.663-6.696 (p=0.017) *	Alta (I <sup>2</sup> =91.24, p<0.001)

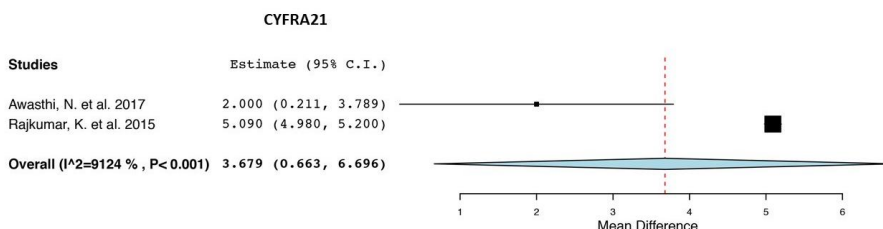


Figura 14 (Anexo 2 - Figura 3B) - CYFRA21 entre TOPM vs HCG

La población india, que fue estudiada por Awasthi y colaboradores<sup>118</sup>, estaba compuesta por más del 88% de hombres y evaluó una muestra de TOPM equivalente a 1/3 de los casos de COCE, especificando que el grupo de TOPM estaba compuesto por 5 LO, 2 fibrosis submucosas, 1 liquen plano y 1 papiloma escamoso (Tabla 7). CYFRA21 mostró una asociación positiva con el tamaño del tumor, el estadio clínico del tumor y de los ganglios linfáticos. Además, el análisis de la curva ROC mostró una sensibilidad del 90% y una especificidad del 97%, con un valor de corte mínimo de 8,7 ng / ml para la detección de COCE.

El estudio de Rajkumar y colaboradores<sup>119</sup> incluyó un grupo de TOPM que consistió en 50 casos de LO y 50 casos de fibrosis submucosa oral, con hombres representando casi el 60% de los casos y una tasa del 14% de fumadores tanto para COCE como para LO

(Tabla 7). El análisis de la curva ROC mostró especificidad y sensibilidad del 75%, con un límite de corte > 10.4ng / mL para diferenciar COCE de TOPM, adicionalmente mostró una especificidad del 95% y una sensibilidad del 83.6%, con > 7,91ng / mL para la detección de casos de COCE en contraste con HCG.

Tabla 7 (Anexo 2 - Tabla 1B): Datos descriptivos de los estudios incluidos en el metaanálisis.

First Author	Year	Country	Study Subgroup	Proteomic Biomarker	N	Age	Male (%)	Smokers (%)	Mean Expression	Method	Dysplasia
Awasthi	2017	India	OSCC	CYFRA 21	30	49.6	93.3	-	17.5	ELISA ng/ml	-
			OPML	CYFRA 21	9	34.2	88.9	-	5.9	ELISA ng/ml	-
			HCG	CYFRA 21	25	48.1	88	-	3.9	ELISA ng/ml	-
Rajkumar	2015	India	OSCC	CYFRA 21	100	55.5	68	14	17.46	ELISA ng/ml	-
			OPML	CYFRA 21	100	55.5	58	14	8.15	ELISA ng/ml	-
			HCG	CYFRA 21	100	43	65	0	3.06	ELISA ng/ml	-

En los estudios que se realizaron para determinar la interacción entre CEA y CYFRA21, los resultados demostraron que ambos presentan una fuerte asociación (*Figura 15*) y que están directamente relacionados con todo un grupo de queratinas involucradas en el citoesqueleto celular, uno de los factores clave de la carcinogénesis oral<sup>120</sup>. Todo ello en consonancia con estudios en los que se ha determinado que ambas proteínas pueden utilizarse como marcadores diagnósticos en otros tumores epiteliales como el cáncer de pulmón<sup>121</sup> y el cáncer de cabeza y cuello<sup>122</sup>, porque se expresan diferencialmente en tejidos sanos y potencialmente malignos.

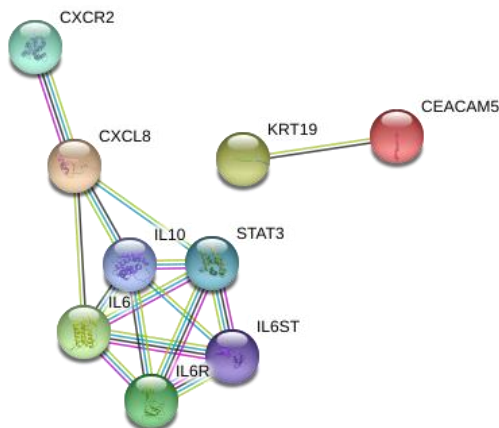


Figura 15 (Anexo 2 - Figura 4): Red de interacción proteica de los cuatro marcadores proteicos seleccionados utilizando las bases de datos de STRING.

El ARNm de IL-6 salival se identificó previamente como un biomarcador prometedor para COCE<sup>123</sup>. Sin embargo, los estudios sobre el papel de la expresión de proteínas en la saliva para TOPM son limitados. No hubo diferencia significativa en la OE salival de citocinas IL-6 entre el grupo TOPM y HCG (Tabla 8).

Tabla 8 (Anexo 2 - Tabla 2C): Valores de overall expression para la IL-6, con su intervalo de confianza 95% y análisis de la heterogeneidad.

Marcador	Subgrupo	OE	IC 95% (p)	Heterogeneidad ( $I^2$ , p)
IL-6	OPML/HCG	233.561	-88.265-555.387 (p=0.155)	Extrema ( $I^2=99.89$ , p<0.001)

Con respecto a la IL-6 al analizar TOPM frente a HCG, la OE fue de 397,800 (IC95%: 381,300-414,300) en el estudio de Sharma y colaboradores<sup>124</sup> en comparación con 69,400 (IC95%: 56,182–82.618) en el estudio de Rhodus y colaboradores<sup>125</sup>, lo que resultó en un valor de extrema heterogeneidad (Figura 16). En el estudio de Rhodus y colaboradores, no se indicaron diagnósticos clínicos en el grupo de TOPM, solo diferentes grados histológicos de displasia<sup>125</sup>.

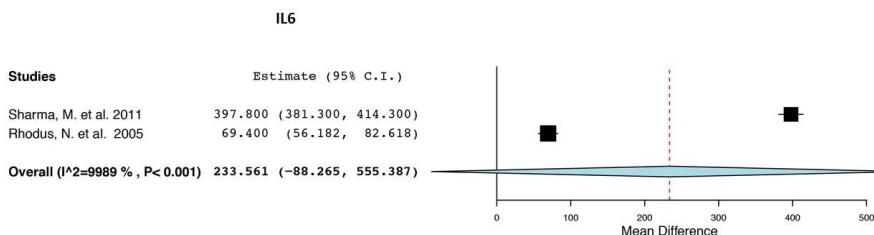


Figura 16 (Anexo 2 - Figura 3D) - IL-6 entre TOPM vs HCG

La concentración de IL-6 fue significativamente mayor en COCE y TOPM en comparación con HCG ( $p < 0,001$ )<sup>125</sup>.

Por otro lado, en el estudio de Sharma realizado en India, se informó una media de expresión salival en los casos de LO de la población india que fue casi 6 veces mayor que la observada en los casos de TOPM de la población estadounidense. En el estudio de Sharma, el grupo LO mostró una IL-6 media significativamente más alta en comparación con el HCG ( $p < 0,001$ ) (Tabla 9). Los niveles de IL-6 en pacientes fumadores y con mayor grado de displasia fueron siempre mayores<sup>124</sup>.

Tabla 9 (Anexo 2 - Tabla 1C): Datos descriptivos de los estudios incluidos en el metaanálisis.

First Author	Year	Country	Study Subgroup	Proteomic Biomarker	N	Age	Male (%)	Smokers (%)	Mean Expression	Method	Dysplasia	
Rhodus	2005	USA	OSCC	IL-6 (interleukin-6)	13	59.4	76.9	61.53	0.0882	ELISA pg/ml	-	
			OPML	IL-6 (interleukin-6)	13	56.7	30.7	53.84	0.0708	ELISA pg/ml	Moderate (38.46%) Severe (61.54)	
			HCG	IL-6 (interleukin-6)	13	58.7	53.8	4	0	0.0014	ELISA pg/ml	-
			OL	IL-6 (interleukin-6)	20	50	100	35	0.414	ELISA pg/ml	Mild (40%) Moderate (35%) Severe (25%)	
Sharma	2011	India	HCG	IL-6 (interleukin-6)	20	35	100	0	0.0172	ELISA pg/ml	-	

Los cambios en la expresión de las citocinas proinflamatorias pueden desempeñar un papel en la transformación maligna en el COCE y es probable que se utilicen como marcadores de diagnóstico en la saliva de los pacientes, debido a su producción excesiva por las células tumorales<sup>28</sup>, y de la misma forma también podrían actuar como posibles dianas farmacológicas.

La IL-8 desempeña un papel importante en la invasión del cáncer, la angiogénesis y las metástasis<sup>126</sup>. En este metaanálisis, no encontramos diferencias significativas para IL-8 entre COCE y TOPM, ni entre TOPM y HCG (Tabla 10).

Tabla 10 (Anexo 2 - Tabla 2D): Valores de overall expression para la IL-8, con su intervalo de confianza 95% y análisis de la heterogeneidad.

Marcador	Subgrupo	OE	IC 95% (p)	Heterogeneidad (I <sup>2</sup> , p)
IL-8	OSCC/OPML	912.622	-108.248-1933.492 (p=0.08)	Extrema (I <sup>2</sup> =97.69, p<0.001)
	OPML/HCG	45.967	-24.473-116.407 (p=0.201)	Baja (I <sup>2</sup> =39.30, p=0.193)

Asimismo, no encontramos relación entre estas citocinas proinflamatorias y los marcadores previamente descritos (CEA y CYFRA21). Sin embargo, como se puede observar en la Figura 15, las citocinas proinflamatorias formarían por sí mismas un fuerte cúmulo de señalización. El análisis funcional se realizó con el programa DAVID, que corresponde a la vía de señalización de la respuesta inmune y la inflamación (Figura 17).

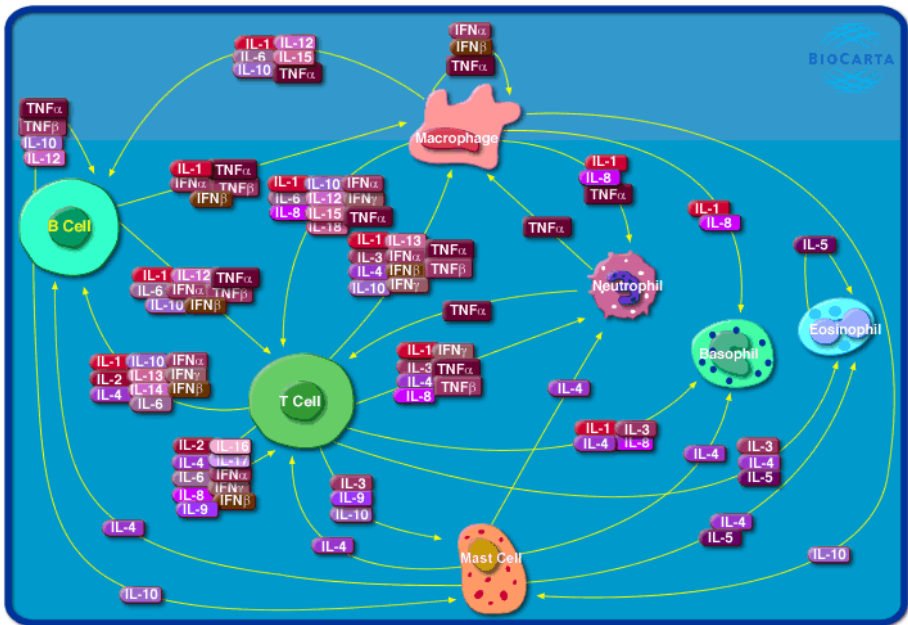


Figura 17 (Anexo 2 - Suplementario 4) - Vías de señalización de la respuesta inmune y la inflamación, analizadas mediante el programa DAVID.

En el análisis de IL-8, los estudios incluidos mostraron unos valores de heterogeneidad dispares, siendo extrema en la comparativa entre COCE y TOPM (*Figura 18*) y baja entre TOPM y HCG (*Figura 19*).

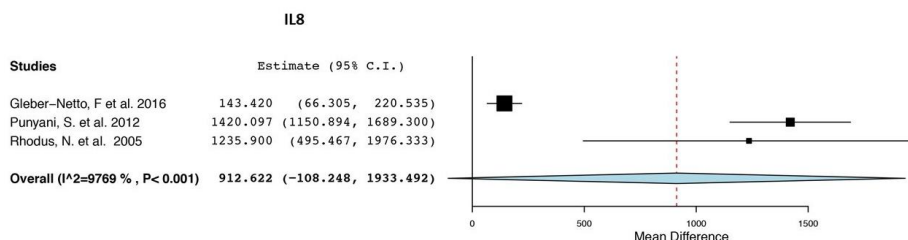


Figura 18 (Anexo 2 - Figura 2C) - IL-8 entre COCE vs TOPM

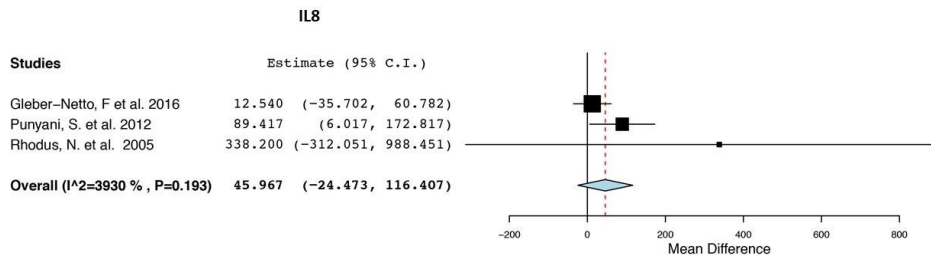


Figura 19 (Anexo 2 - Figura 3C) - IL-8 en TOPM vs HCG

El estudio de Gleber-Netto y colaboradores<sup>127</sup> de una población de Taiwán era casi exclusivamente masculino y tenía un porcentaje de fumadores que excedía el 80% en todos los grupos (Tabla 11). En el grupo TOPM no se informaron los diagnósticos clínicos correspondientes, solo se incluyeron aquellas lesiones con diferentes grados de displasia.

Por otro lado, el estudio realizado por Punyani y colaboradores<sup>128</sup> en India informó que el grupo TOPM estaba compuesto por 13 fibrosis submucosa oral y 12 LO, presentando 5 de estas lesiones displasia leve (Tabla 11). La identificación de IL-8 fue significativamente mayor en COCE en comparación con TOPM ( $p < 0,0001$ ) y HCG ( $p < 0,0001$ ). El grupo TOPM presentó niveles más altos de IL-8 en comparación con HCG, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ( $p = 0,738$ ).

Tabla 11 (Anexo 2 - Tabla 1D). Datos descriptivos de los estudios incluidos en el metaanálisis.

First Author	Year	Country	Study Subgroup	Proteomic Biomarker	N	Age	Male (%)	Smokers (%)	Mean Expression	Method	Dysplasia
Rhodus	2005	USA	OSCC	IL-8	13	59.46	76.92	61.53	3154	ELISA pg/ml	-
			OPML	IL-8	13	56.76	30.76	53.84	1918	ELISA pg/ml	Moderate (38.46%) Severe (61.54)
Gleber-Netto	2016	Taiwan	HCG	IL-8	13	58.7	53.84	0	1580	ELISA pg/ml	-
			OSCC	IL8	60	51.4	95	83.3	283.75	ELISA pg/ml	-
			OPML	IL8	60	50.8	95	96.7	140.35	ELISA pg/ml	-
Punyani	2012	India	HCG	IL8	60	50.5	91.7	81.7	127.79	ELISA pg/ml	-
			OSCC	IL8	25	53.2	64	-	1718.610	ELISA pg/mL	-
			OPML	IL8	25	32.16	76	-	299.513	ELISA pg/mL	Mild (20 %)
			HCG	IL8	25	45.12	76	-	210.096	ELISA pg/mL	-

En el estudio de Rhodus y colaboradores<sup>125</sup>, no se determinaron los diagnósticos clínicos en el grupo de TOPM, solo se mencionó la existencia de lesiones con diferentes grados de displasia. La concentración de IL-8 fue significativamente mayor en COCE en comparación con HCG (p <0,001), y también fue significativamente mayor en TOPM en comparación con HCG (p <0,05).

En este metaanálisis hemos encontrado limitaciones entre las que se incluyeron la falta de información clínico-patológica sobre las lesiones que se mencionan como displásicas en el grupo TOPM, así como tampoco se caracteriza el grado de displasia. Además, hubo discrepancias considerables entre el número de casos analizados de LO y TOPM, en comparación con los casos de COCE. Muy pocos estudios han analizado grupos LO puros, independientes de otros TOPM, por lo que es difícil sacar conclusiones específicas. Otro aspecto que debe tenerse en cuenta es que el género y la edad de los individuos en el metaanálisis fue bastante heterogéneo, sin que existiera una selección estrictamente emparejada en términos de género o intervalos de edad similares entre todos sus grupos de estudio. Además, no todos los estudios informaron de la presencia de factores de riesgo como el

tabaquismo (factor clave en la carcinogénesis oral) y otros incluyeron hábitos propios de la región geográfica en estudio, como masticar nuez de betel, lo que significa que la extrapolación a un nivel global no fue posible. En cuanto a las fortalezas de este estudio, es importante destacar los criterios de inclusión claros y estrictos que permitieron limitar los sesgos de análisis. Además, aunque existían diferentes técnicas como las proteómicas que permitían realizar análisis cuantitativos masivos en la literatura, esta revisión sistemática solo incluyó estudios en los que los valores cuantitativos eran representativos, reproducibles y comparables.

Otro aspecto que decidimos evaluar en nuestro estudio fue determinar la presencia que tienen los genes de reparación en las lesiones de leucoplasia oral y qué impacto pueden tener en el pronóstico hacia cáncer oral. El ADN puede sufrir alteraciones en su estructura debido a factores exógenos o endógenos. Sin embargo, en ocasiones la cadena de ADN produce errores en su propia replicación natural, lo que da lugar a la formación de nucleótidos mal emparejados que pueden promover el desarrollo de patologías<sup>129</sup>.

Cuando se originan estos errores en la asociación entre nucleótidos, el ADN tiene un mecanismo que permite detectar estas alteraciones mediante el sistema *mismatch repair (MMR)*<sup>130</sup>. El sistema MMR es un grupo importante de proteínas que reparan y mantienen el ADN para la estabilidad del genoma y es responsable de la vigilancia y corrección de errores introducidos dentro de las secuencias de microsatélites por la ADN polimerasa.

El sistema MMR se descubrió originalmente en bacterias de *Escherichia coli*<sup>131</sup>. Los primeros estudios mostraron que los desajustes en las moléculas de ADN inducen una reacción de reparación tras la transformación en la célula de *E. coli*. Más tarde, se descubrieron genes implicados en la *E. coli*, a saber: MutS, MutL,

MutH y uvrD (proteína de reparación ultravioleta D)<sup>132</sup>. Se ha demostrado que la inactivación de cualquiera de los cuatro genes de *E. coli* implicados en la reparación aumenta las tasas de mutación en las bacterias entre 50 y 100 veces.

Este sistema está dividido principalmente en dos grupos homólogos: hMutS y hMutL. Los homólogos de los genes MutS de *E. coli* en humanos son hMSH2, hMSH3, hMSH5 y hMSH6, mientras que los homólogos de MutL son hMLH1, hPMS1, hMLH2, hMLH3, hPMS2 y hMLH4<sup>133</sup>.

Aunque los grupos MutS y MutL bacterianos están formados por homodímeros, en las células eucariotas estos grupos están formados por heterodímeros compuestos en dos subunidades de proteínas relacionadas pero distintas. hMutS contiene los heterodímeros hMSH2-hMSH6 (llamados hMutS $\alpha$ ) y hMSH2-hMSH3 (llamados hMutS $\beta$ ), mientras que hMutL contiene los heterodímeros hMLH1-hPMS2 (hMutL $\alpha$ ), hMLH1-hPMS1 (hMutL $\beta$ ), y hMLH1 - hMLH3 (hMutLY)<sup>134</sup>.

El dímero MutS $\alpha$  está formado por el producto de los genes MSH2 y MSH6, y es capaz de reconocer los errores de apareamiento. MutL $\alpha$ , constituido por las proteínas codificadas por los genes MLH1 y PMS2, se une entonces al dímero MutS y recluta al resto de proteínas necesarias para la corrección del error: exonucleasa, DNA polimerasa y pinza replicativa, entre otras. El complejo es capaz de reconocer la hebra de DNA de nueva síntesis, eliminar varios nucleótidos consecutivos en torno al error y resintetizar de nuevo esta hebra, evitando de esta forma que se consolide la mutación<sup>135</sup>.

Existe evidencia que demuestra que la interrupción de este sistema se relaciona como parte del proceso carcinogénico oral<sup>65,75,136</sup> y que la pérdida de proteínas en el sistema MMR es importante para el desarrollo de lesiones bucales como LO y COCE<sup>137</sup>.

Los principales resultados de nuestro estudio han mostrado una alta positividad en la expresión de las proteínas analizadas, especialmente en aquellos pacientes que presentaban comorbilidades. Curiosamente, el valor de MSH2 fue positivo en todas las muestras de LO con displasia y COCE. Es importante destacar que los casos negativos de MSH2 solo correspondieron a muestras de LO sin displasia ( $P = 0,020$ ) (Tabla 12).

Tabla 12 (Anexo 3 - Tabla 3): Datos descriptivos de la evaluación inmunohistoquímica.

Valoración inmunohistoquímica		LO sin displasia n(%)	LO con displasia n(%)	COCE n(%)	p-value
<i>MLH1</i>	Negativo	2 (66.7)	0 (0)	1 (33.3)	0.218
	Débil	1 (33.3)	0 (0)	2 (66.7)	
	Positivo	13 (33.3)	14 (35.9)	12 (30.8)	
<i>MSH2</i>	Negativo	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0.020*
	Positivo	12 (29.3)	14 (34.1)	15 (36.6)	
<i>XRCC1</i>	Negativo	0 (0)	2 (28.6)	5 (71.4)	0.136
	Débil	3 (42.9)	2 (28.6)	2 (28.6)	
	Positivo	13 (41.9)	10 (32.3)	8 (25.8)	
<i>MRE11</i>	Negativo	4 (23.5)	5 (29.4)	8 (47.1)	0.234
	Débil	6 (50)	2 (16.7)	4 (33.3)	
	Positivo	6 (37.5)	7 (43.8)	3 (18.8)	
Positividad de 4 marcadores	Negativo	6 (30)	5 (25)	9 (45)	0.221
	Positivo	10 (40)	9 (36)	6 (24)	

Los datos se encuentran en n (número de muestras) y porcentaje (%). \*Representa la diferencia significativa según a el test Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.05$ ).

En cuanto a las posibles implicaciones clínicas de los marcadores a nivel de diagnóstico diferencial y progresión, se observó que la expresión de estas proteínas podría estar relacionada con el grado de malignidad y diferenciación tumoral. La expresión de estos genes puede verse alterada por la inestabilidad genómica, pudiendo presentar una sobreexpresión causada por la activación de oncogenes o bien una expresión reducida por una inactivación de genes supresores<sup>138</sup>.

Fernandes y colaboradores observaron una relación entre la inmunoexpresión de hMLH1 y el grado histológico de malignidad, destacando la inmunoexpresión habitualmente normal de hMSH2, y la sobreexpresión de hMLH1 en lesiones bien diferenciadas y su reducción en lesiones pobremente diferenciadas. Los autores señalaron que esta variación puede reflejar el alto rendimiento de estas proteínas en los casos en lesiones más diferenciadas y el agotamiento del sistema en las lesiones menos diferenciadas<sup>139</sup>. Esta idea apoya nuestros hallazgos, dado que la mayoría de los casos con carcinoma estaban bien diferenciados y la expresión también fue positiva en la mayoría de los casos.

En un estudio previo realizado por el grupo, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa<sup>136</sup> detectó una expresión reducida de los genes de reparación del ADN: MLH1, MSH2, MLH3, ATM, MRE11A, XRCC1 y PMS2 en COCE. Además, otros estudios previos encontraron una expresión alterada de estos genes en fumadores, grupo que está en riesgo de desarrollar carcinogénesis, así como también se observó metilación y reducción de la expresión génica<sup>75</sup>.

Wagner y colaboradores<sup>140</sup> observaron una alta expresión de hMSH2 y sugirieron que esto puede indicar una mayor activación de la inestabilidad genómica inducida. Por lo tanto, consideramos que la sobreexpresión de MSH2 en LO con displasia y COCE observada en nuestros casos representa una inestabilidad genómica que indujo la activación de oncogenes.

Por otra parte, otros estudios mostraron resultados diferentes. Jessri y colaboradores<sup>134</sup> evaluaron la inmunoexpresión proteica de las 4 subunidades que constituyen las 2 proteínas principales del sistema MMR, MutSa y MutLa, en lesiones que van desde displasia leve, moderada y severa hasta COCE. Utilizando un modelo matemático, estos autores observaron una clara tendencia entre la gravedad de la

enfermedad oral y una expresión reducida de hMLH1 y hMSH2, apoyando la hipótesis de que las vías de reparación defectuosas juegan un papel funcional en el cáncer oral.

Caldeira y colaboradores<sup>141</sup> demostraron que hMLH1 en leucoplasia mostraba tasas decrecientes de expresión inmunohistoquímica, desde un grado más bajo de displasia a uno más alto. Estos autores sugirieron que la expresión alterada de hMLH1 podría estar asociada a eventos tempranos en el proceso carcinogénico<sup>141</sup>. En un estudio complementario, los autores mencionados sugirieron que los procesos biológicos que se vinculan al deterioro de la proteína hMLH1 están asociados con la evolución de bajo riesgo de transformación maligna a lesiones de alto riesgo<sup>142</sup>.

Asimismo, Chaudhari y colaboradores<sup>143</sup> observaron una menor expresión de hMLH1 en leucoplasia, y esta disminuyó aún más en los COCE en comparación con la mucosa oral normal.

La expresión de XRCC1 y MRE11, que fue evaluada por reacción cuantitativa en cadena de polimerasa, se redujo en COCE<sup>136</sup>. Sin embargo, en la literatura no hay estudios que asocien la expresión del gen XRCC1 con el desarrollo o progresión de lesiones hacia la transformación maligna. Algunos estudios han relacionado los polimorfismos con la susceptibilidad a COCE<sup>73</sup> y con un mayor riesgo de transformación maligna en las lesiones de LO<sup>71,72</sup>.

En nuestro estudio es novedosa la asociación significativa entre la positividad de los 4 marcadores estudiados (MSH2, MRE11, MLH1 y XRCC1) y la presencia de patologías asociadas y en los pacientes con 2 o más patologías. Hasta donde sabemos, este resultado no se había informado previamente y podría resultar de relevancia clínica (Tabla 13).

Tabla 13 (Anexo 3 - Tabla 4): Asociación comorbilidad-positividad de los marcadores.

Variables		Positividad 4 marcadores N (%)		p
		Negativo	Positivo	
Comorbilidad	No	11 (73.3)	4 (26.7)	0.006*
	Sí	9 (30)	21 (70)	
Comorbilidad específica	No	11 (73.3)	4 (26.7)	0.008*
	Cardiovascular	5 (55.6)	4 (44.4)	
	Psiquiátrico	1 (50)	1 (50)	
	Dos o más patologías	3 (15.8)	16 (84.2)	

\* Representa la diferencia significativa según a el test  $\chi^2$  ( $p \leq 0.05$ ).

Schupp y colaboradores<sup>144</sup> estudiaron la carga del daño genético en pacientes con enfermedad renal crónica y encontraron anomalías cromosómicas, una reducción en la reparación del ADN y lesiones del ADN. No encontramos ningún estudio que pudiera vincular la expresión de estas proteínas en LO y COCE con comorbilidades sistémicas. A pesar de esto, creemos que esta expresión podría explicarse a través de la conexión entre la inflamación crónica y la inestabilidad del ADN.

El microambiente de los tejidos afectados por enfermedades inflamatorias crónicas tiene acumulaciones de citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno<sup>145</sup>. Estos factores tienen el potencial de inducir inestabilidad genética a través de la estimulación de la proliferación celular, la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores<sup>138</sup>.

A pesar de las limitaciones de esta parte de nuestro estudio, como el tamaño reducido de la muestra, el hecho de que solo se utilizaron métodos de evaluación inmunohistoquímica y la evaluación compleja de los anticuerpos utilizados, nuestros hallazgos apoyan la evidencia de la posible participación de la sobreexpresión de proteínas MSH2 en LO con displasia y COCE.

Además, cabe mencionar la asociación significativa entre la positividad de los 4 marcadores estudiados con la presencia de comorbilidades, algo que hasta donde conocemos no ha sido abordado en la literatura hasta la fecha.

# CONCLUSIONES

---



## CONCLUSIONES

- 1) Nuestros hallazgos apoyan la evidencia de la posible implicación de la sobreexpresión de proteínas MSH2 en el desarrollo de leucoplasia oral con displasia y carcinoma oral de células escamosas.
- 2) Las proteínas de reparación MSH2, MRE11, MLH1 y XRCC1 se asociaron significativamente con la presencia de comorbilidades.
- 3) Los marcadores salivales CEA y CYFRA21 mostraron ser particularmente útiles para diferenciar los carcinomas orales de células de los trastornos orales potencialmente malignos.
- 4) El marcador salival CYFRA21 se mostró como la única proteína capaz de distinguir entre los trastornos orales potencialmente malignos y los controles sanos.
- 5) La recurrencia de la leucoplasia oral en nuestro estudio aparece con mayor frecuencia en pacientes con lesiones sin displasia y con formas clínicas nodulares.



# BIBLIOGRAFÍA

---



## BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization Collaborating Centre for Oral Precancerous lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;46:518–39.
2. Axéll T, Holmstrup P, Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1984;12:145–54.
3. Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: Conclusions of an international symposium held in uppsala, sweden, may 18-21 1994. international collaborative group on oral white lesions. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(2):49-54. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.1996.tb00191.x.
4. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, Van der Waal I. World Health Organization. International histological classification of tumours. histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. . 1997.
5. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, et al. 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. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1111/odi.13704.

6. A.K. El-Naggar, J.K. Chan, J.R. Grandis, T. Takata and P.J. Slootweg. *WHO classif. head neck tumours*. Fourth edition ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2017:112-115.
7. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):317-323. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.016.
8. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010;46(6):423-425. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.02.016.
9. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):575-580. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x.
10. Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: Evidence and critique. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(2):63-69. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00575.x.
11. Vázquez-Álvarez R, Fernández-González F, Gándara-Vila P, Reboiras-López D, García-García A, Gándara-Rey J. Correlation between clinical and pathologic diagnosis in oral leukoplakia in 54 patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(6):832. Accessed Sep 11, 2021.
12. Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: Does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(6):1270-1275. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.joms.2009.11.016.

13. B.W. Neville, D.D. Damm, C.M. Allen and A.C. Chi. *Oral maxillofac. pathol.* St. Louis, MO: Saunders/Elsevier; 2016:355–363.
14. van der Waal I. Oral potentially malignant disorders: Is malignant transformation predictable and preventable? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014;19(4):386. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.4317/medoral.20205.
15. Mogedas-Vegara A, Hueto-Madrid J, Chimenos-Küstner E, Bescós-Atín C. The treatment of oral leukoplakia with the CO2 laser: A retrospective study of 65 patients. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(5):677-681. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.jcms.2015.03.011.
16. Yang S, Tsai C, Lee Y, Chen T. Treatment outcome of dysplastic oral leukoplakia with carbon dioxide laser--emphasis on the factors affecting recurrence. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69(6):78. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.joms.2010.11.029.
17. Saito T, Sugiura C, Hirai A, et al. Development of squamous cell carcinoma from pre-existent oral leukoplakia: With respect to treatment modality. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30(1):49-53. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1054/ijom.2000.0012.
18. Kuribayashi Y, Tsushima F, Sato M, Morita K, Omura K. Recurrence patterns of oral leukoplakia after curative surgical resection: Important factors that predict the risk of recurrence and malignancy. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(9):682-688. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01167.x.
19. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: A systematic review. *Oral Oncol.* 2003;39(8):770-780. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/s1368-8375(03)00102-7.

20. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: Risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018;125(6):612-627. Accessed Sep 12, 2021. doi: 10.1016/j.oooo.2017.12.011.
21. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):301-308. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.01.004.
22. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1002/ijc.31937.
23. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*. 2006;42(10):987-993. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.12.014.
24. Fleskens, Stijn A. J. H. M., Bergshoeff VE, Voogd AC, et al. Interobserver variability of laryngeal mucosal premalignant lesions: A histopathological evaluation. *Mod Pathol*. 2011;24(7):892-898. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1038/modpathol.2011.50.
25. Sperandio M, Brown AL, Lock C, et al. Predictive value of dysplasia grading and DNA ploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013;6(8):822-831. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0001.
26. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-212. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1177/154411130201300209.

27. Gröschl M. Saliva: A reliable sample matrix in bioanalytics. *Bioanalysis*. 2017;9(8):655-668. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.4155/bio-2017-0010.
28. Aro K, Wei F, Wong DT, Tu M. Saliva liquid biopsy for point-of-care applications. *Front Public Health*. 2017;5:77. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.3389/fpubh.2017.00077.
29. Lorenzo-Pouso AI, Pérez-Sayáns M, Bravo SB, et al. Protein-based salivary profiles as novel biomarkers for oral diseases. *Dis Markers*. 2018;2018:6141845. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1155/2018/6141845.
30. Amado F, Lobo MJC, Domingues P, Duarte JA, Vitorino R. Salivary peptidomics. *Expert Rev Proteomics*. 2010;7(5):709-721. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1586/epr.10.48.
31. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(9):531-548. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.14.
32. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016;13(9):731-740. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1038/nmeth.3901.
33. Tyanova S, Cox J. Perseus: A bioinformatics platform for integrative analysis of proteomics data in cancer research. *Methods Mol Biol*. 2018;1711:133-148. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1007/978-1-4939-7493-1\_7.
34. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D649-D655. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1093/nar/gkx1132.

35. Kuhn M, Szklarczyk D, Pletscher-Frankild S, et al. STITCH 4: Integration of protein-chemical interactions with user data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):401. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1093/nar/gkt1207.
36. Szklarczyk D, Santos A, von Mering C, Jensen LJ, Bork P, Kuhn M. STITCH 5: Augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):380. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1093/nar/gkv1277.
37. Muetze T, Goenawan IH, Wiencko HL, Bernal-Llinares M, Bryan K, Lynn DJ. Contextual hub analysis tool (CHAT): A cytoscape app for identifying contextually relevant hubs in biological networks. *F1000Res.* 2016;5:1745. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.12688/f1000research.9118.2.
38. Gurevich VV. Protein multi-functionality: Introduction. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(22):4405-4406. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1007/s00018-019-03271-6.
39. Harfe BD, Jinks-Robertson S. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet.* 2000;34:359-399. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1146/annurev.genet.34.1.359.
40. Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(4):297-308. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1038/nrm2351.
41. Ioana M, Angelescu C, Burada F, et al. MMR gene expression pattern in sporadic colorectal cancer. *J Gastrointest Liver Dis.* 2010;19(2):155-159. Accessed Sep 11, 2021.
42. Kenney B, Deng Y, Mitchell K. Expression of p27, COX-2, MLH1, and MSH2 in young patients with colon carcinoma and correlation with morphologic findings. *Hum Pathol.*

- 2013;44(4):591-597. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.humpath.2012.07.003.
43. Buermeyer AB, Deschênes SM, Baker SM, Liskay RM. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet.* 1999;33:533-564. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1146/annurev.genet.33.1.533.
44. Cooper WA, Kohonen-Corish MRJ, Chan C, et al. Prognostic significance of DNA repair proteins MLH1, MSH2 and MGMT expression in non-small-cell lung cancer and precursor lesions. *Histopathology.* 2008;52(5):613-622. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.02999.x.
45. Giaginis C, Michailidi C, Stolakis V, et al. Expression of DNA repair proteins MSH2, MLH1 and MGMT in human benign and malignant thyroid lesions: An immunohistochemical study. *Med Sci Monit.* 2011;17(3):BR81-90. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.12659/msm.881444.
46. Bajpai D, Banerjee A, Pathak S, Jain SK, Singh N. Decreased expression of DNA repair genes (XRCC1, ERCC1, ERCC2, and ERCC4) in squamous intraepithelial lesion and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Mol Cell Biochem.* 2013;377(1-2):45-53. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1007/s11010-013-1569-y.
47. Brandt S, Samartzis EP, Zimmermann A, et al. Lack of MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex detection occurs frequently in low-grade epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2017;17(1):44. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1186/s12885-016-3026-2.
48. Koppensteiner R, Samartzis EP, Noske A, et al. Effect of MRE11 loss on PARP-inhibitor sensitivity in endometrial cancer in vitro.

- PLoS One*. 2014;9(6):e100041. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0100041.
49. Gong H, Shi Y, Shi Y, et al. Reduced expression of mutS homolog 2 and mutL homolog 1 affects overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma patients: Investigation into a potential cause. *Oncol Rep*. 2013;30(3):1371-1379. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.3892/or.2013.2559.
50. Liu R, Yin L, Pu Y. Reduced expression of human DNA repair genes in esophageal squamous-cell carcinoma in china. *J Toxicol Environ Health A*. 2007;70(11):956-963. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1080/15287390701290725.
51. Young LC, Listgarten J, Trotter MJ, Andrew SE, Tron VA. Evidence that dysregulated DNA mismatch repair characterizes human nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2008;158(1):59-69. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08249.x.
52. Farnebo L, Stjernström A, Fredrikson M, Ansell A, Garvin S, Thunell LK. DNA repair genes XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 are associated with risk and survival of squamous cell carcinoma of the head and neck. *DNA Repair (Amst)*. 2015;31:64-72. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.05.003.
53. Stur E, Agostini LP, Garcia FM, et al. Prognostic significance of head and neck squamous cell carcinoma repair gene polymorphism. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):12446-12454. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.4238/2015.October.16.11.
54. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*. 1999;20(11):2125-2129. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1093/carcin/20.11.2125.

55. Zuo C, Zhang H, Spencer HJ, et al. Increased microsatellite instability and epigenetic inactivation of the hMLH1 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;141(4):484-490. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.otohns.2009.07.007.
56. Koutsimpelas D, Pongsapich W, Heinrich U, Mann S, Mann WJ, Brieger J. Promoter methylation of MGMT, MLH1 and RASSF1A tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: Pharmacological genome demethylation reduces proliferation of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2012;27(4):1135-1141. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.3892/or.2012.1624.
57. Tawfik HM, El-Maqsoud, Nehad M. R. Abd, Hak, Balegh H. A. Abdel, El-Sherbiny YM. Head and neck squamous cell carcinoma: Mismatch repair immunohistochemistry and promoter hypermethylation of hMLH1 gene. *Am J Otolaryngol.* 2011;32(6):528-536. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.amjoto.2010.11.005.
58. Nunn J, Nagini S, Risk JM, et al. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2003;39(2):115-129. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/s1368-8375(02)00028-3.
59. Pereira CS, Oliveira, Marcos Vinícius Macedo de, Barros LO, et al. Low expression of MSH2 DNA repair protein is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(5):416-421. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1590/1679-775720130206.
60. Ziółkowska-Suchanek I, Mosor M, Wierzbicka M, Rydzanicz M, Baranowska M, Nowak J. The MRN protein complex genes:

- MRE11 and RAD50 and susceptibility to head and neck cancers. *Mol Cancer*. 2013;12(1):113. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1186/1476-4598-12-113.
61. Ai L, Vo QN, Zuo C, et al. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) gene in head and neck squamous cell carcinoma: Promoter hypermethylation with clinical correlation in 100 cases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(1):150-156. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1158/1055-9965.epi-082-3.
62. Bau D, Chang C, Tsai M, et al. Association between DNA repair gene ATM polymorphisms and oral cancer susceptibility. *Laryngoscope*. 2010;120(12):2417-2422. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1002/lary.21009.
63. Rigi-Ladiz MA, Kordi-Tamandani DM, Torkamanzehi A. Analysis of hypermethylation and expression profiles of APC and ATM genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Epigenetics*. 2011;3:6. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1186/1868-7083-3-6.
64. Shiloh Y, Kastan MB. ATM: Genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res*. 2001;83:209-254. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/s0065-230x(01)83007-4.
65. Alves MGO, Carta CFL, de Barros PP, Issa JS, Nunes FD, Almeida JD. Repair genes expression profile of MLH1, MSH2 and ATM in the normal oral mucosa of chronic smokers. *Arch Oral Biol*. 2017;73:60-65. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.09.006.
66. Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma.

- Oral Dis.* 2009;15(3):206-213. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1111/j.1601-0825.2008.01510.x.
67. González-Ramírez I, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, et al. hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer. *Oral Oncol.* 2011;47(1):22-26. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.10.002.
68. Theocharis S, Klijanienko J, Giaginis C, et al. Expression of DNA repair proteins, MSH2, MLH1 and MGMT in mobile tongue squamous cell carcinoma: Associations with clinicopathological parameters and patients' survival. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(3):218-226. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00945.x.
69. Dos Reis MB, Losi-Guembarovski R, de Souza Fonseca Ribeiro, Enilze Maria, et al. Allelic variants of XRCC1 and XRCC3 repair genes and susceptibility of oral cancer in brazilian patients. *J Oral Pathol Med.* 2013;42(2):180-185. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01192.x.
70. Kietthubthew S, Sriplung H, Au WW, Ishida T. Polymorphism in DNA repair genes and oral squamous cell carcinoma in thailand. *Int J Hyg Environ Health.* 2006;209(1):21-29. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.ijheh.2005.06.002.
71. Majumder M, Sikdar N, Paul RR, Roy B. Increased risk of oral leukoplakia and cancer among mixed tobacco users carrying XRCC1 variant haplotypes and cancer among smokers carrying two risk genotypes: One on each of two loci, GSTM3 and XRCC1 (codon 280). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(9):2106-2112. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0108.
72. Yadav BK, Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Effect of polymorphisms in XRCC1, CCND1 and GSTM1 and tobacco

- exposure as risk modifier for oral leukoplakia. *Int J Biol Markers*. 2009;24(2):90-98. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.5301/jbm.2009.5376.
73. Williams GJ, Lees-Miller SP, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2010;9(12):1299-1306. Accessed Jul 18, 2021. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.10.001.
74. Dzikiewicz-Krawczyk A. The importance of making ends meet: Mutations in genes and altered expression of proteins of the MRN complex and cancer. *Mutat Res*. 2008;659(3):262-273. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.05.005.
75. Carta CFL, Oliveira Alves MG, de Barros PP, et al. Screening methylation of DNA repair genes in the oral mucosa of chronic smokers. *Arch Oral Biol*. 2018;92:83-87. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.04.017.
76. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: Guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg*. 2014;12(12):1495-1499. Accessed Sep 11, 2021. doi: 10.1016/j.ijsu.2014.07.013.
77. J.P. Higgins and S. Green. Cochrane handbook for Systematic reviews of interventions version 5.1.0. [www.cochrane-handbook.org](http://www.cochrane-handbook.org). Updated 2011.
78. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: Explanation and elaboration. *BMJ*. 2009;339:b2700. Accessed Sep 12, 2021. doi: 10.1136/bmj.b2700.

79. Shamseer L, Moher D, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: Elaboration and explanation. *BMJ*. 2015;350:g7647. Accessed Sep 12, 2021. doi: 10.1136/bmj.g7647.
80. El-Naggar AK, JKC C, Grandis JR, Takata T, Grandis J, Slootweg P. *WHO classification of head and neck tumours*. 4th ed. Lyon, IARC: ; 2017.
81. 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(6):577-581. Accessed Sep 12, 2021. doi: 10.1016/j.oooo.2017.11.023.
82. Leeflang MMG, Deeks JJ, Takwoingi Y, Macaskill P. Cochrane diagnostic test accuracy reviews. *Syst Rev*. 2013;2:82. Accessed Sep 12, 2021. doi: 10.1186/2046-4053-2-82.
83. Ciapponi A. QUADAS-2: Instrumento para la evaluación de la calidad de estudios de precisión diagnóstica. *Evid Act Pract Ambul*. 2015;18(1):22-30.
84. Mi H, Muruganujan A, Huang X, et al. Protocol update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat Protoc*. 2019;14(3):703-721. Accessed Sep 12, 2021. doi: 10.1038/s41596-019-0128-8.
85. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D362-D368. Accessed Sep 12, 2021. doi: 10.1093/nar/gkw937.

86. Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol.* 2003;4(5):P3. Accessed Sep 12, 2021.
87. Higgins JPT, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med.* 2002;21(11):1539-1558. Accessed Sep 12, 2021. doi: 10.1002/sim.1186.
88. Wetzel SL, Wollenberg J. Oral potentially malignant disorders. *Dent Clin North Am.* 2020;64(1):25-37. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.cden.2019.08.004.
89. Sundberg J, Korytowska M, Holmberg E, et al. Recurrence rates after surgical removal of oral leukoplakia-A prospective longitudinal multi-centre study. *PLoS One.* 2019;14(12):e0225682. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0225682.
90. Capella DL, Gonçalves JM, Abrantes AAA, Grando LJ, Daniel FI. Proliferative verrucous leukoplakia: Diagnosis, management and current advances. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2017;83(5):585-593. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.bjorl.2016.12.005.
91. Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, et al. Proliferative verrucous vs conventional leukoplakia: No significantly increased risk of HPV infection. *Oral Oncol.* 2004;40(8):835-840. Accessed Nov 6, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2004.02.007.
92. Hansen LS, Olson JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;60(3):285-298. Accessed Nov 6, 2021. doi: 10.1016/0030-4220(85)90313-5.
93. Silverman S, Gorsky M. Proliferative verrucous leukoplakia: A follow-up study of 54 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*

- Oral Radiol Endod.* 1997;84(2):154-157. Accessed Nov 6, 2021. doi: 10.1016/s1079-2104(97)90062-7.
94. Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, et al. Proliferative verrucous leukoplakia: High incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003;32(7):379-382. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1034/j.1600-0714.2003.00167.x.
95. Gandolfo S, Castellani R, Pentenero M. Proliferative verrucous leukoplakia: A potentially malignant disorder involving periodontal sites. *J Periodontol.* 2009;80(2):274-281. Accessed Nov 6, 2021. doi: 10.1902/jop.2009.080329.
96. Bagan JV, Jiménez-Soriano Y, Diaz-Fernandez JM, et al. Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: A series of 55 cases. *Oral Oncol.* 2011;47(8):732-735. Accessed Nov 6, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.05.008.
97. Monteiro L, Barbieri C, Warnakulasuriya S, et al. Type of surgical treatment and recurrence of oral leukoplakia: A retrospective clinical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22(5):e520-e526. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.4317/medoral.21645.
98. Chandu A, Smith ACH. The use of CO2 laser in the treatment of oral white patches: Outcomes and factors affecting recurrence. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(4):396-400. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.ijom.2004.10.003.
99. Diajil A, Robinson CM, Sloan P, Thomson PJ. Clinical outcome following oral potentially malignant disorder treatment: A 100 patient cohort study. *Int J Dent.* 2013;2013:809248. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1155/2013/809248.
100. Gandara-Vila P, Perez-Sayans M, Suarez-Penaranda J-, et al. Survival study of leukoplakia malignant transformation in a

- region of northern Spain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018;23(4):e413-e420. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.4317/medoral.22326.
101. Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, et al. CO2 laser of oral dysplasia: Clinicopathological features of recurrence and malignant transformation. *Lasers Med Sci*. 2012;27(1):169-179. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1007/s10103-011-0916-z.
102. Chainani-Wu N, Lee D, Madden E, Sim C, Collins K, Silverman S. Clinical predictors of oral leukoplakia recurrence following CO<sub>2</sub> laser vaporization. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015;43(9):1875-1879. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.jcms.2015.07.033.
103. Yang S, Wu C, Lee Y, Chen T, Tsai C. Postoperative recurrence as an associated factor of malignant transformation of oral dysplastic leukoplakia. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2010;72(5):280-290. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1159/000318874.
104. Mogedas-Vegara A, Hueto-Madrid J, Chimenos-Küstner E, Bescós-Atín C. Oral leukoplakia treatment with the carbon dioxide laser: A systematic review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44(4):331-336. Accessed Aug 1, 2021. doi: 10.1016/j.jcms.2016.01.026.
105. de Pauli Paglioni M, Migliorati CA, Schausltz Pereira Faustino I, et al. Laser excision of oral leukoplakia: Does it affect recurrence and malignant transformation? A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2020;109:104850. Accessed Jul 25, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104850.
106. Romeo U, Mohsen M, Palaia G, Bellisario A, Del Vecchio A, Tenore G. CO2 laser ablation of oral leukoplakia: With or

- without extension of margins? *Clin Ter.* 2020;171(3):e209-e215. Accessed Jul 30, 2021. doi: 10.7417/CT.2020.2215.
107. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: A systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(3):155-166. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/jop.12339.
  108. Chen YK, Huang HC, Lin LM, Lin CC. Primary oral squamous cell carcinoma: An analysis of 703 cases in southern taiwan. *Oral Oncol.* 1999;35(2):173-179. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/s1368-8375(98)00101-8.
  109. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.3322/caac.21332.
  110. Lee Y, Wong DT. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent.* 2009;22(4):241-248. Accessed Jul 14, 2021.
  111. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and their applications. *J Chromatogr Sci.* 2017;55(2):182-196. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1093/chromsci/bmw167.
  112. Wang N, Wang Q, Chi J, et al. Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 inhibits the antitumor effect of neutrophils in tongue squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2019;110(2):519-529. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/cas.13909.
  113. Zheng J, Sun L, Yuan W, et al. Clinical value of Naa10p and CEA levels in saliva and serum for diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(9):830-835. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/jop.12767.

114. Airoidi M, Piantino P, Pacchioni D, Mastromatteo V, Pedani F, Gandolfo S. Gastrointestinal cancer-associated antigen (GICA) in oral carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986;61(3):263-267. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/0030-4220(86)90372-5.
115. Molina R, Agusti C, Filella X, et al. Study of a new tumor marker, CYFRA 21-1, in malignant and nonmalignant diseases. *Tumour Biol.* 1994;15(6):318-325. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1159/000217908.
116. Camisasca DR, da Rós Gonçalves L, Soares MR, et al. A proteomic approach to compare saliva from individuals with and without oral leukoplakia. *J Proteomics.* 2017;151:43-52. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.jprot.2016.07.029.
117. AlAli AM, Walsh T, Maranzano M. CYFRA 21-1 and MMP-9 as salivary biomarkers for the detection of oral squamous cell carcinoma: A systematic review of diagnostic test accuracy. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2020;49(8):973-983. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.ijom.2020.01.020.
118. Awasthi N. Role of salivary biomarkers in early detection of oral squamous cell carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol.* 2017;60(4):464-468. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.4103/IJPM.IJPM\_140\_16.
119. Rajkumar K, Ramya R, Nandhini G, Rajashree P, Ramesh Kumar A, Nirmala Anandan S. Salivary and serum level of CYFRA 21-1 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2015;21(1):90-96. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/odi.12216.
120. Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: Review. *J Oral*

- Pathol Med.* 2009;38(10):737-752. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00804.x.
121. Okamura K, Takayama K, Izumi M, Harada T, Furuyama K, Nakanishi Y. Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer. *Lung Cancer.* 2013;80(1):45-49. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.01.002.
  122. Barak V, Meirovitz A, Leibovici V, et al. The diagnostic and prognostic value of tumor markers (CEA, SCC, CYFRA 21-1, TPS) in head and neck cancer patients. *Anticancer Res.* 2015;35(10):5519-5524. Accessed Jul 14, 2021.
  123. Márton IJ, Horváth J, Lábiscsák P, et al. Salivary IL-6 mRNA is a robust biomarker in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Med.* 2019;8(11). Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.3390/jcm8111958.
  124. Sharma M, Bairy I, Pai K, et al. Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2011;15(5):705-714. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1007/s00784-010-0435-5.
  125. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(1):42-45. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.cdp.2004.10.003.
  126. Ralli M, Grasso M, Gilardi A, et al. The role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma: A review. *Clin Ter.* 2020;171(3):e268-e274. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.7417/CT.2020.2225.
  127. Gleber-Netto FO, Yakob M, Li F, et al. Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma in a taiwanese

- population. *Clin Cancer Res.* 2016;22(13):3340-3347. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1761.
128. Punyani SR, Sathawane RS. Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig.* 2013;17(2):517-524. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1007/s00784-012-0723-3.
129. Preston BD, Albertson TM, Herr AJ. DNA replication fidelity and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2010;20(5):281-293. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.10.009.
130. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2008;129(7-8):391-407. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.mad.2008.02.012.
131. Su SS, Modrich P. Escherichia coli mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(14):5057-5061. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1073/pnas.83.14.5057.
132. Modrich P. Mechanisms in E. coli and human mismatch repair (nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(30):8490-8501. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1002/anie.201601412.
133. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):335-346. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1038/nrm1907.
134. Jessri M, Dalley AJ, Farah CS. MutS $\alpha$  and MutL $\alpha$  immunoexpression analysis in diagnostic grading of oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;119(1):74-82. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.oooo.2014.06.017.

135. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: Microsatellite instability in colorectal cancer: Prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012;18(6):1506-1512. Accessed Jul 18, 2021. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1469.
136. Oliveira Alves MG, da Silva Miguel N, Ferreira CCP, et al. Expression of DNA repair genes in oral squamous cell carcinoma using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020;130(3):298-305. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.oooo.2020.06.003.
137. Amaral-Silva GKd, Martins MD, Pontes HAR, et al. Mismatch repair system proteins in oral benign and malignant lesions. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(4):241-245. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/jop.12484.
138. Contaldo M, Boccellino M, Zannini G, et al. Sex hormones and inflammation role in oral cancer progression: A molecular and biological point of view. *J Oncol.* 2020;2020:9587971. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1155/2020/9587971.
139. Fernandes AM, Ramos-Jorge ML, Cardoso SV, Loyola AM, Mesquita RA, Aguiar MCF. Immunoexpression of hMSH2 and hMLH1 in oral squamous cell carcinoma and its relationship to histological grades of malignancy. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(9):543-548. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00658.x.
140. Wagner VP, Webber LP, Salvadori G, et al. Overexpression of MutS $\alpha$  complex proteins predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(22):e3725. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1097/MD.00000000000003725.

141. Caldeira PC, Abreu, Mauro Henrique Nogueira Guimarães, Batista AC, do Carmo, Maria Auxiliadora Vieira. hMLH1 immunoexpression is related to the degree of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(2):153-159. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00963.x.
142. Caldeira PC, Abreu, Mauro Henrique Nogueira Guimarães, do Carmo, Maria Auxiliadora Vieira. Binary system of grading oral epithelial dysplasia: Evidence of a bearing to the scores of an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(6):452-453. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01128.x.
143. Chaudhari NT, Tupkari JV, Joy T, Ahire MS. Human MutL homolog 1 immunoexpression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: A prospective study in indian population. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016;20(3):453-461. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.4103/0973-029X.190948.
144. Schupp N, Stopper H, Heidland A. DNA damage in chronic kidney disease: Evaluation of clinical biomarkers. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3592042. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1155/2016/3592042.
145. Feller L, Altini M, Lemmer J. Inflammation in the context of oral cancer. *Oral Oncol.* 2013;49(9):887-892. Accessed Jul 14, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.07.003.

# **ANEXO. RELACIÓN DE PUBLICACIONES**

---



**ARTÍCULO 1.** Pineiro-Donis S, Torres-López M, García-García A, Marichalar-Mendía X, Gándara-Vila P, Lorenzo-Pouso AI, Blanco-Carrión A, Pérez-Sáyans M. *The impact of clinicopathological aspects on the recurrence of oral leukoplakia: A retrospective study in a cohort of 83 patients from the north of Spain.* Indian J Cancer. 2019 Oct-Dec;56(4):375-378. doi: 10.4103/ijc.IJC\_230\_18. PMID: 31607714.

Revista: Indian Journal of Cancer  
Factor de Impacto (JCR 2019): 0.765  
Cuartil: Q4  
Categoría: ONCOLOGY  
Posición: 237/244  
Otros: Open Access

Link del artículo:

<https://www.indianjcancer.com/text.asp?2019/56/4/375/268955>

**ARTÍCULO 2.** Arroyo EA, Donís SP, Petronacci CMC, Alves MGO, Mendía XM, Fernandes D, Pouso AIL, Bufalino A, Bravo López S, Sayáns MP. *Usefulness of protein-based salivary markers in the diagnosis of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis.* Cancer Biomark. 2021 Jul 20. doi: 10.3233/CBM-203043. Epub ahead of print. PMID: 34334380.

Revista: Cancer Biomarkers

Factor de Impacto (JCR 2020): 4.388

Cuartil: Q2

Categoría: ONCOLOGY

Posición: 113/242

Link del artículo:

<https://content.iospress.com/articles/cancer-biomarkers/cbm203043>

**ARTÍCULO 3.** Donís SP, González AP, Alves MGO, do Carmo Carvalho BF, Ferreira CCP, Almeida JD, Iruegas EP, Petronacci CMC, Peñaranda JMS, Sayáns MP. *MLH1, MSH2, MRE11, and XRCC1 in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2021 Sep 1;29(8):613-618. doi: 10.1097/PAL.0000000000000929. PMID: 33734109.

Revista: Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology

Factor de Impacto (JCR 2020): 2.085

Cuartil: Q2

Categoría: ANATOMY & MORPHOLOGY

Posición: 10/21

Link del artículo:

[https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Abstract/2021/09000/MLH1, MSH2, MRE11, and XRCC1 in Oral Leukoplakia.9.aspx](https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Abstract/2021/09000/MLH1,_MSH2,_MRE11,_and_XRCC1_in_Oral_Leukoplakia.9.aspx)





La leucoplasia oral es la lesión premaligna más común de la cavidad oral. La recurrencia es un fenómeno habitual de esta patología y puede verse alterada en función de la forma clínica y el grado de displasia de la lesión. Debido a su potencial de malignización, la prevención secundaria es esencial, teniendo en cuenta la baja supervivencia de los pacientes diagnosticados con cáncer oral en estadios avanzados. Poco se sabe sobre los mecanismos moleculares que subyacen en esta entidad y menos aún los marcadores que pueden predecir el progreso hacia su malignización. Nuestro objetivo es analizar el impacto de factores clinico-patológicos en la recurrencia y evaluar los genes de reparación que pueden estar implicados en su malignización.