

Trabajo de
fin de grado

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DEL EPITELIO ORAL DE PACIENTES CON ENFERMEDAD LIQUENOIDE ORAL CON O SIN DISPLASIA FRENTE A LA DISPLASIA EPITELIAL CANÓNICA.

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DO EPITELIO ORAL DE PACIENTES CON ENFERMIDADE LIQUENOIDE ORAL CON OU SEN DISPLASIA FRONTE A DISPLASIA EPITELIAL CANÓNICA.

PROTEOMIC CHARACTERIZATION OF THE ORAL EPITHELIUM IN PATIENTS WITH ORAL LICHENOID DISEASE WITH OR WITHOUT DYSPLASIA COMPARED TO CANONICAL EPITHELIAL DYSPLASIA.

Elina Pérez García

Tutor: Dr. Mario Pérez-Sayáns García

Cotutor: Alejandro I. Lorenzo Pouso

Curso 2022/23, 3ª Convocatoria, Julio

Índice

RESUMEN	- 3 -
1. RESUMO	- 4 -
2. ABSTRACT	- 5 -
INTRODUCCIÓN	- 6 -
1. LIQUEN PLANO ORAL	- 7 -
1.1. <i>EPIDEMIOLOGÍA:</i>	- 7 -
1.2. <i>ETIOLOGÍA Y PATOGENIA:</i>	- 8 -
1.3. <i>DIAGNÓSTICO</i>	- 11 -
1.4. <i>CLASIFICACIÓN LIQUEN PLANO:</i>	- 13 -
1.5. <i>TRATAMIENTO:</i>	- 14 -
1.6. <i>FACTORES DE RIESGO DE MALIGNIZACIÓN</i>	- 15 -
2. DISPLASIA EPITELIAL ORAL	- 16 -
2.1. <i>CLASIFICACIÓN DE LA DISPLASIA</i>	- 18 -
3. DISPLASIA EPITELIAL ORAL CON CARACTERÍSTICAS LIQUENOIDES	- 22 -
OBJETIVO DEL ESTUDIO	- 26 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 27 -
1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	- 28 -
2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	- 28 -
2.1. <i>PROCESAMIENTO INICIAL DE MUESTRAS</i>	- 28 -
2.2. <i>CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</i>	- 29 -
2.3. <i>DIGESTIÓN EN-GEL: PRECONCENTRACIÓN EN GELES MONODIMENSIONALES</i>	- 30 -
2.4. <i>LC-MS/MS</i>	- 31 -
2.5. <i>CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA</i>	- 31 -
2.6. <i>MÉTODO CUALITATIVO (ANÁLISIS DDA)</i>	- 32 -
2.7. <i>MÉTODO CUANTITATIVO SWATH™ (ANÁLISIS DIA)</i>	- 32 -
3. ANÁLISIS	- 33 -
3.1. <i>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO</i>	- 33 -
3.2. <i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	- 34 -
3.3. <i>ANÁLISIS FUNCIONAL</i>	- 35 -
RESULTADOS	- 36 -

1. PARTICIPANTES DEL ESTUDIO.....	- 36 -
2. ANÁLISIS PROTEÓMICO	- 37 -
3. ANÁLISIS PCA.....	- 45 -
4. VÍAS BIOLÓGICAS Y FUNCIONES MOLECULARES DE LAS PROTEÍNAS DESREGULADAS.....	- 46 -
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>- 48 -</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>- 52 -</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>- 53 -</u>

Resumen

El liquen plano oral (LPO) afecta a aproximadamente al 1% de la población mundial y se considera un trastorno oral potencialmente maligno (TOPM). Sin embargo, cuando se valoran los criterios histopatológicos se denota una controversia entre los investigadores, especialmente en relación a la presencia de displasia epitelial como criterio diagnóstico de exclusión para el LPO. Muchos patólogos consideran actualmente la presencia de displasia epitelial como un criterio de exclusión. En este estudio, se examinaron los perfiles moleculares de la displasia epitelial oral con características liquenoides (OLD), LPO y DEO para determinar si OLD representa una entidad separada. Se utilizaron muestras parafinadas para el análisis proteómico con LC-MS/MS y posteriormente el SWATH-MS para la identificación y cuantificación de proteínas. Se analizaron y perfilaron los proteomas de tejido de los tres grupos.

Se identificaron un total de 366 proteínas. Se realizaron tres comparaciones: DEO frente LPO, OLD frente DEO y DEO frente OLD. El análisis de expresión diferencial reveló siete proteínas con diferencias significativas ($p < 0.05$) en DEO en comparación con LPO. En la segunda comparación se identificaron 15 proteínas, y en la tercera se identificaron 12 proteínas.

Los resultados del análisis proteómico revelaron que OLD no es una entidad patológica distinta, aunque se asemeja mucho a DEO. Sin embargo, se destacó que la displasia epitelial no debe considerarse un criterio de exclusión para el LPO desde una perspectiva proteómica. Además, se observó una alta expresión de genes relacionados con funciones biológicas en OLD y DEO, y baja expresión en LPO. El enriquecimiento funcional reveló vías y ontologías significativas relacionadas con la señalización inflamatoria y la respuesta inmunológica en todos los subgrupos.

En conclusión, los datos proteómicos obtenidos en este estudio indican que OLD no representa una entidad patológica independiente, aunque se encuentra estrechamente relacionada con DEO. Asimismo, se resalta la importancia de reconsiderar la presencia de displasia epitelial como criterio de exclusión para el diagnóstico de LPO desde una perspectiva proteómica.

Palabras clave: Liquen plano oral, proteómica, displasia liquenoide, displasia epitelial, liquen plano displásico.

1. Resumo

O liquen plano oral (LPO) afecta aproximadamente ao 1% da poboación mundial e agora considérase un trastorno oral potencialmente maligno (TOPM). Con todo, cando se valoran os criterios histopatolóxicos denótase unha controversia entre os investigadores, especialmente en relación coa presenza de displasia epitelial como criterio diagnóstico de exclusión para o LPO. Moitos patólogos consideran actualmente a presenza de displasia epitelial como un criterio de exclusión. Neste estudo, examináronse os perfís moleculares da displasia epitelial oral con características liquenoides (OLD), LPO e DEO para determinar se OLD representa unha entidade separada. Utilizáronse mostras parafinadas para o análise proteómico con LC-MS/MS e posteriormente co SWATH-MS para a identificación e cuantificación de proteínas. Analizáronse e perfiláronse os proteomas de tecido dos tres grupos.

Identificáronse un total de 366 proteínas. Realizáronse tres comparacións: DEO fronte a LPO, OLD fronte a DEO e DEO fronte a OLD. A análise de expresión diferencial revelou sete proteínas con diferenzas significativas ($p < 0.05$) en DEO en comparación con LPO. Na segunda comparación identificáronse 15 proteínas e na terceira identificáronse 12 proteínas.

Os resultados da análise proteómica revelaron que OLD non é unha entidade patolóxica distinta, aínda que se asemella moito a DEO. Con todo, sinalouse que a displasia epitelial non debe considerarse un criterio de exclusión para o LPO desde unha perspectiva proteómica. Ademais, observouse unha alta expresión de xenes relacionados con funcións biolóxicas en OLD e DEO e baixa expresión en LPO. O enriquecemento funcional revelou vías e ontoloxías significativas relacionadas coa sinalización inflamatoria e a resposta inmunolóxica en todos os subgrupos.

En conclusión, os datos proteómicos obtidos neste estudo indican que OLD non representa unha entidade patolóxica independente, aínda que está estreitamente relacionada con DEO. Resáltase tamén a importancia de reconsiderar a presenza de displasia epitelial como criterio de exclusión para o diagnóstico de LPO desde unha perspectiva proteómica.

Palabras clave: Liquen plano oral, proteómica, displasia liquenoide, displasia epitelial, liquen plano displásico.

2. Abstract

The oral lichen planus (OLP) affects approximately 1% of the world's population and is considered a potentially malignant oral disorder (PMOD). However, there is controversy among researchers, particularly regarding the presence of epithelial dysplasia as a diagnostic criterion for exclusion in OLP. Many pathologists currently consider the presence of epithelial dysplasia as an exclusion criterion. In this study, we examined the molecular profiles of Oral Epithelial Dysplasia with Lichenoid Features (OLD), OLP, and OED to determine if OLD represents a separate entity. Paraffin-embedded samples were used for proteomic analysis with LC-MS/MS, and subsequently SWATH-MS was employed for protein identification and quantification. The tissue proteomes of the three groups were analyzed and profiled.

A total of 366 proteins were identified. Three comparisons were conducted: OED versus OLP, OLD versus OED, and OED versus OLD. Differential expression analysis revealed seven proteins with significant differences ($p < 0.05$) in OED compared to OLP. Fifteen proteins were identified in the second comparison, and twelve proteins in the third comparison. The results of the proteomic analysis revealed that OLD is not a distinct pathological entity, although it closely resembles OED. However, it was highlighted that epithelial dysplasia should not be considered an exclusion criterion for OLP from a proteomic perspective. Additionally, a high expression of genes related to biological functions was observed in OLD and OED, while low expression was observed in OLP. Functional enrichment analysis revealed significant pathways and ontologies related to inflammatory signaling and immune response in all subgroups. I

In conclusion, the proteomic data obtained in this study indicates that OLD does not represent an independent pathological entity, although it is closely related to OED. Furthermore, the importance of reconsidering the presence of epithelial dysplasia as an exclusion criterion for the diagnosis of OLP from a proteomic perspective is emphasized.

Keywords: Oral lichen planus, proteomics, lichenoid dysplasia, epithelial dysplasia, dysplastic lichen planus.

Introducción

Las lesiones liquenoides o dermatitis de interfase son una serie de enfermedades cutáneas inflamatorias que comparten características clínicas e histopatológicas comunes, como son los cambios licuefactivos de los queratinocitos basales y la presencia de un infiltrado linfocítico en banda de linfocitos T, macrófagos, células mononucleares inflamatorias y células dendríticas [1].

Ante la presencia de tan gran diversidad características recogemos en la *Tabla 1* las principales diferencias entre las principales lesiones liquenoides [1, 2].

	Clínica	Histología	Malignidad
Liquen Plano Oral LPO	Lesiones reticulares blancas bilaterales no siempre simétricas. Pueden presentar áreas atróficas. Raramente se observan lesiones cicatriciales	Hiperqueratosis, degeneración vacuolar de queratinocitos basales, infiltrado inflamatorio linfocítico, destrucción focal de la membrana basal.	Potencialmente maligno que puede cursar con lesiones extraorales (piel, genitales, cuero cabelludo...)
Lesión liquenoide oral por contacto	Uni o bilateral. No son simétricos y más frecuentes unilaterales. Localizadas en relación con empastes de amalgama. Inusual en encía, suele localizarse en mucosa bucal posterior y borde de la lengua.	Igual a LPO pero en ocasiones el infiltrado liquenoide presenta células plasmáticas y neutrófilos por una reacción de hipersensibilidad retardada. Infiltrado inflamatorio que se extiende más allá de la interfase epitelial-tejido conectivo	Potencial maligno dudoso.
Reacción liquenoide por fármacos	Similar a LPO. Provocada por consumo de un nuevo fármaco. Es más común que se observe de forma unilateral.	Igual a LPO pero el infiltrado liquenoide presenta células plasmáticas y neutrófilos. En ocasiones este infiltrado se extiende al estroma profundo y de forma perivascular.	Potencial maligno dudoso. Puede presentar lesiones extraorales.
Enfermedad injerto contra huésped	Similar a LPO. Provocada tras un trasplante de células hematopoyéticas. Aparecen principalmente en la enfermedad crónica. Lesiones cicatriciales	Similar a LPO. En ocasiones presenta escasa infiltración linfocítica.	Potencialmente maligno. Considerar el posible desarrollo de displasia o malignidad, especialmente en pacientes con enfermedad crónica de larga evolución.

Tabla 1. Principales diferencias entre las distintas lesiones liquenoides

Las características clínicas e histopatológicas de las lesiones liquenoides se superponen con características de otras patologías como son: la variante de pénfigo de tipo liquen plano, las lesiones liquenoides presentes en el lupus eritematoso sistémico y discoide (en caso de características mixtas se le denomina superposición de lupus eritematoso/ liquen plano, con una prevalencia del 15-20% en pacientes con lupus), estomatitis ulcerativa crónica, liquen plano penfigoide (variante clínica poco común, concurrencia de liquen plano y penfigoide ampuloso) y liquen esclerótico. Todas estas patologías tienen en común la reacción a uno o más antígenos [1,3,4,5].

Muchos autores afirman que uno de los criterios de exclusión de liquen plano oral es la presencia de displasia esto es una afirmación controvertida hoy en día, la OMS define el término liquen plano como un trastorno oral potencialmente maligno (TOPM) con posibilidad de malignización a largo plazo [2,6].

Dada la falta de consenso en relación con la displasia del LPO como criterio de exclusión hipotetizamos que el estudio molecular entre lesiones de este espectro podría arrojar luz en estas discrepancias. Este estudio trata de elucidar en base a evidencias proteómicas si la firma propia de un liquen plano con displasia epitelial se asemeja a una lesión de tipo leucoplasia con displasia epitelial o a un liquen plano sin anomalías citológicas.

1. Liquen plano oral

El liquen plano oral (LPO) es una enfermedad inflamatoria mucocutánea crónica de origen desconocido que cursa con lesiones multidisciplinarias, principalmente en piel y mucosas. Está considerada un TOPM.

1.1. Epidemiología:

Esta patología está presente en el 1-2% de la población considerándose bastante común. Es más frecuente en mucosa oral, sin predominancia por ningún sexo [1,7].

La prevalencia de esta patología varía según distintos factores como la edad. Se observa que la prevalencia es más baja en adolescentes con respecto a ancianos situándose los 40 años como la edad en la que el riesgo de desarrollar LPO aumenta significativamente con un riesgo 3,4 veces

mayor. Este riesgo aumenta de manera significativa y progresiva con la edad, los individuos de 50 tienen 2,2 veces más riesgo que los menores de 50 y los de 60 2,2 veces más [8,9].

La prevalencia también varía entre las distintas regiones geográficas, siendo la de mayor prevalencia Sudamérica, después África, Europa, Asia, Norteamérica y la de menor India; aunque esto podría estar asociado a la enmascarización de las lesiones por queratosis por mascar betel. En cuanto a la prevalencia entre fumadores y no fumadores es menor en los no fumadores, pero esto no es significativamente relevante [4,9].

Aunque esta patología no tiene predilección por ningún sexo, algunos estudios determinan que la prevalencia en mujeres es ligeramente mayor con respecto a los hombres. En cambio, con los fumadores y alcohólicos, existe una controversia a la hora de diferenciar si hay una prevalencia significativamente mayor o no [4, 9].

Las localizaciones más comunes a nivel oral son la mucosa bucal bilateralmente, el dorso de la lengua y la encía. Mientras que el paladar duro o blando, los labios y el suelo de la boca son los menos prevalentes [1,9]. Las lesiones eritematosas que afectan a la encía causan gingivitis descamativa [10]. En cuanto a su presentación clínica, el LPO exclusivamente reticular es el más frecuente, representado el 46% de los casos, mientras que las lesiones erosivas y atróficas presentan una prevalencia del 44% [9].

En resumen, es importante destacar que la frecuencia del liquen plano oral puede subestimarse debido a las variaciones clínicas e histológicas que presenta la enfermedad [4].

1.2. Etiología y patogenia:

La patogénesis del LPO sigue sin estar clara, se considera una enfermedad autoinmune por las muchas características similares con otras enfermedades de etiología inmunológica, como son: la cronicidad, el inicio en la edad adulta, asociación con otras enfermedades autoinmunes, asociaciones con tipos de tejidos, actividad inmunológica deprimida y la presencia de células T citotóxicas [8].

Uno de los principales factores que causan exacerbaciones agudas en pacientes con LPO es la presencia de niveles elevados de ansiedad, depresión, estrés y trastornos psicológicos en

comparación con un grupo de control. Estos síntomas psicológicos son más comunes en personas con LPO y pueden contribuir significativamente a empeorar la condición de los pacientes [3]. Las lesiones crónicas rara vez presentan una remisión espontánea, son lesiones que causan dolor y morbilidad significativos [1].

En el LPO se presenta una interfase epitelio-tejido conjuntivo débil, lo que provoca una hendidura histológica y en raras ocasiones ampollas clínicas en la boca. Microscópicamente se pueden observar la presencia de cuerpos coloides o cuerpos de Civatte, glóbulos eosinofílicos homogéneos, los cuales son queratinocitos basales degenerados por los linfocitos TCD8+ citotóxicos ante la presencia de un antígeno desconocido [8]. Estos linfocitos son el componente principal del denso infiltrado inflamatorio linfocitario en banda en la lámina propia superficial que discurre paralelo al epitelio. Este “infiltrado liquenoide” provoca una degeneración hidrópica de la porción basal epitelial y la ruptura de la membrana basal [1,9]. En las lesiones de LPO también se pueden observar signos de paraqueratosis, acantosis y formación papilar en forma de dientes en sierra. La mayoría de los linfocitos presentes en la lámina propia profunda son células T auxiliares CD4+, también se pueden observar algunos cerca de queratinocitos basales. Por otra parte, los CD8+ forman la mayoría de las células subepiteliales e intraepiteliales en LPO, siendo las intraepiteliales adyacentes a los queratinocitos en degeneración [8,11].

La patogenia del LPO está mediada por mecanismos específicos e inespecíficos. Dentro de los mecanismos específicos se incluye la presentación del antígeno mediante los queratinocitos y la eliminación de éste mediante los linfocitos TCD8+ y células T citotóxicas; y mecanismos no específicos como la desgranulación de mastocitos y activación de las metaloproteinasas de la matriz [8].

Las células B y plasmáticas son infrecuentes en LPO en cambio sí es frecuente presenciar depósitos de inmunoglobulina, complemento y algunos de fibrinógeno y fibrina de manera lineal en la zona de la membrana basal [1].

En el LPO las respuestas inmunitarias están reguladas por citocinas y sus receptores, para determinar su expresión se realizan pruebas de inmunohistoquímica y test ELISA. Se produce un aumento en la producción de citoquinas por los Th1, particularmente interferón-gamma (IFN- γ) que aparece presente en todo el infiltrado subepitelial en la lámina propia superficial y factores de necrosis tumoral alfa (TNF- α) presentes en todo el infiltrado epitelial y adyacentes a queratinocitos

basales en forma de banda continua. Ambos son citoquinas proinflamatorias [1,11]. Estas células Th1 pueden promover la actividad de las células citotóxicas CD8+ al producir las citoquinas proinflamatorias IFN- γ , IL-2 y TNF- α . [10].

Durante el inicio del desarrollo de la lesión en el LPO, se produce la expresión del antígeno de los queratinocitos y la liberación de quimioquinas [8,11]. Los cuerpos de Civatte, por su parte, se forman tras la activación de la cascada de caspasa de los queratinocitos, lo que desencadena su apoptosis, o bien a través de la acción de las células T citotóxicas que secretan TNF- α y provocan la apoptosis a través de TNF R1, el cual es expresado por células mononucleares y queratinocitos basales y suprabasales [8,11]. Las células intraepiteliales del LPO son TGF- β 1 positivas, con expresión variable en el infiltrado subepitelial, y pueden actuar como factor de crecimiento o inhibidor de la división celular. Por otro lado, los queratinocitos presentan una débil tinción para TGF- β 1 [8,11]. En cuanto a los linfocitos CD8+, estos pueden ingresar al epitelio oral a través de la vigilancia rutinaria o ser atraídos por quimiocinas producidas por los queratinocitos. Las células T pueden migrar a través de las roturas en la membrana basal para ingresar al epitelio [8].

El LPO puede llevar al desarrollo del carcinoma oral de células escamosas (COCE), ya que presenta una respuesta inflamatoria crónica que aumenta las probabilidades de mutaciones genéticas [8]. La proteína MIF bloquea la función del gen supresor tumoral p53 en los queratinocitos, lo que permite que las mutaciones genéticas que promueven el crecimiento no se controlen, lo que puede preparar el escenario para el desarrollo del cáncer en LPO, incluyendo COCE. Por lo tanto, la función normal del gen supresor tumoral p53 es fundamental para prevenir el cáncer, incluido el COCE oral, y la actividad de proteínas como MIF puede tener un papel importante en la carcinogénesis del LPO [8]. La señal integrada de varios inhibidores tumorales (TGF- β 1, TNF- α , IFN- γ , IL-12) y promotores (MIF, MMP-9) pueden regular la carcinogénesis del LPO ya que regulan el crecimiento tumoral y la metástasis y determinan el nivel de actividad inmunológica en las lesiones de LPO y el comportamiento clínico de la enfermedad [8,11].

Las células T se unen a los queratinocitos e inducen la secreción de IFN- γ , y la posterior regulación al alza de p53, metaloproteinasa de matriz 1 (MMP1) y MMP38 conduce a la muerte celular programada (apoptosis) que destruye las células epiteliales basales [10].

La cronicidad del LPO puede deberse a varios factores, en parte, a una interrupción de la membrana basal donde los queratinocitos apoptóticos son incapaces de reparar la membrana basal dañada o a una inmunosupresión mediada por TGF- β 1 específico de antígeno deficiente [8].

1.3. Diagnóstico

El Liqueen plano oral es una enfermedad mediada por células T. Esta patología cursa con un aumento de citoquinas genéticamente inducido, dependiendo del polimorfismo genético que presenten estas citoquinas se determinará si las lesiones se desarrollan exclusivamente en la boca o en la boca y la piel [10].

El LPO puede cursar con lesiones blancas reticulares simétricas en formas de estrías (Estrías de Wickham), pápulas, placas, lesiones eritematosas o erosiones. El LPO puede presentar lesiones extraorales, en un estudio reciente de pacientes el 16% presentaban lesiones previas o actuales cutáneas y el 19% en áreas genitales. Por lo que en pacientes con LPO se deberá realizar un examen completo de piel, cuero cabelludo, uñas, área genital, anal y ocular para detectar posibles lesiones extraorales [7]. Las lesiones genitales se encuentran en el 20% de las mujeres con LPO denominándose entonces “síndrome vulvovaginal-gingival”, rara vez afecta a la mucosa ocular, ótica, laríngea, anal, gástrica o nasal [1, 11].

En relación a las lesiones extraorales en piel: el 15% son pápulas violáceas de superficie plana que afectan a superficies flexoras de antebrazos y también a muñecas, tobillos y genitales. También puede afectar a las uñas, cuero cabelludo [8,10].

Se debe diferenciar el LPO de las reacciones liquenoides, que se asemejan clínica e histopatológicamente, pero estas presentan: una etiología identificable, tendencia a ser unilaterales y erosivas, con un infiltrado linfocitario más difuso con eosinófilos y células plasmáticas y con más cuerpos coloides que en el LPO. Algunas de estas reacciones liquenoides son producidas por fármacos principalmente por AINES e inhibidores de la ECA [10].

Dependiendo de cómo se presente clínicamente el LPO, puede confundirse con otras enfermedades. Por ejemplo, las lesiones en placa pueden parecerse a la leucoplasia, especialmente a la leucoplasia verrugosa proliferativa o proliferativa multifocal. Las lesiones estriadas blancas pueden simular el lupus eritematoso, mientras que las lesiones erosivas y ulceradas que no

presentan lesiones blancas pueden confundirse con enfermedades vesículo-erosivas como el pénfigo y el penfigoide [10].

El diagnóstico de esta condición requiere la combinación de criterios clínicos e histopatológicos, tales como la presencia de degeneración licuefactiva de la capa basal y la existencia de un infiltrado inflamatorio. No obstante, se recomienda complementar el examen clínico con una biopsia y estudio histopatológico si las lesiones persisten tras el tratamiento, con el fin de confirmar el diagnóstico clínico y descartar la posible presencia de displasia o cáncer [4,7,9].

La inmunofluorescencia directa (IID), aunque no es específica para el LPO, nos puede ayudar con el diagnóstico diferencial en pacientes con liquen plano erosivo o ulcerativo para descartar enfermedades autoinmunes de naturaleza ulcerosa como el pénfigo vulgar, lupus eritematoso, estomatitis ulcerosa crónica, liquen plano penfigoide, penfigoide de membranas mucosas y el eritema multiforme. La IID acostumbra a ser negativa en LPO, pero se puede observar en algunas ocasiones un patrón lineal de depósitos de fibrina y fibrinógeno lanoso en la membrana basal epitelial o se observan los cuerpos de Civatte en la zona de la membrana basal, o ambos [1, 4, 10]. Los hallazgos mediante inmunofluorescencia no son diagnósticos [8].

La presencia de displasia en el LPO ha sido un tema controversial en la comunidad médica. La OMS en su último consenso no incluye la displasia como un criterio de exclusión para el diagnóstico de LPO [12]. Mientras que algunos expertos, como Farah et al., y Van der Meji et al. argumentan que la displasia puede estar presente en algunos casos de LPO y que debería ser un criterio de exclusión [2, 13]. En cambio, González Moles et al. sostienen que la displasia no es un criterio de exclusión para el diagnóstico de LPO y que esta implica una atipia celular característica dentro de la histopatología de esta entidad clínica y que su presencia en cierto modo aumenta el riesgo de transformación maligna en pacientes con LPO [14]. En definitiva, la displasia puede ser una respuesta inflamatoria crónica en el epitelio oral y no necesariamente una indicación de malignidad [15].

La Asociación Americana de Patología Oral y Maxilofacial (AAOPM) también ha tomado una postura sobre este tema. En su último consenso, la AAOPM afirma que la presencia de displasia debe ser un criterio de exclusión para el diagnóstico de LPO. Además, la AAOPM sugiere que la evaluación histopatológica de las lesiones de LPO debe incluir la búsqueda de displasia y otras características histopatológicas [5].

El LPO puede estar asociado con ciertas enfermedades sistémicas, incluyendo la infección por el virus de la hepatitis C, que tiene una asociación significativa con el LPO. La patogenia provocada por las células T específicas del VHC puede causar síntomas extrahepáticos como el LPO, pacientes con LPO presentan unas 5 veces más probabilidades de ser seropositivos para VHC [7, 10]. Además, el LPO también puede estar relacionado con otras enfermedades como la hipertensión, la diabetes, la enfermedad injerto contra huésped y la disfunción tiroidea [9]. En muchos casos, el LPO puede presentar una sobreinfección por *Cándida* que debe ser tratada con antifúngicos, esta sobreinfección contribuirá a la hiperplasia y a una cierta inflamación adicional que puede distorsionar el grado de displasia real [8, 16].

1.4. *Clasificación liquen plano:*

Existen diferentes criterios para clasificar las lesiones del LPO, lo que puede generar cierta confusión en la interpretación y diagnóstico de la enfermedad.

De las formas de clasificar las lesiones del LPO es mediante la distinción entre dos formas: LPO blanco y LPO rojo. El LPO blanco se caracteriza por presentar lesiones reticulares o en placa, mientras que el LPO rojo se refiere a lesiones atróficas o erosivas. Esta clasificación fue propuesta por Bagán et al. en 1992 [17].

Por otro lado, Eisen et al. identificaron tres variantes del LPO: reticular, eritematosa o atrófica y erosiva, que incluye a su vez las subvariantes ulcerativa y ampollosa. Esta clasificación permite una mayor especificidad en la identificación de las lesiones del LPO y una mejor comprensión de la evolución de la enfermedad [18].

Finalmente, Farhi & Dupin detectaron seis variantes clínicas que pueden ocurrir individualmente o en combinación: papular, reticular, en placa, atrófica, erosiva y ampollosa. Esta clasificación permite una mayor precisión en la descripción de las lesiones y una mejor comprensión de la variedad clínica del LPO [19].

En conclusión, aunque existen diferentes criterios para clasificar las lesiones del LPO, todos ellos permiten una mejor comprensión de la enfermedad y una mayor precisión en su diagnóstico y tratamiento. Es importante que los profesionales de la salud estén familiarizados con estas clasificaciones para poder identificar correctamente las lesiones del LPO y brindar un tratamiento adecuado a los pacientes afectados.

LPO	Clínica	Sintomatología	Tratamiento	Malignidad
Reticular	Lesiones blancas en forma de estrías “Estrías de Wickham”	Asintomático	No necesita tratamiento	Bajo grado
Papular	Similar a la leucoplasia. Diagnóstico diferencial			
Erosivo	Áreas eritematosas, atróficas, con bordes irregulares y rodeadas de estrías blanquecinas.	Malestar, dolor o ardor. espontáneas o durante la masticación o el cepillado. Limita actividades diarias como comer, beber o hablar	Tratar las lesiones y disminuir el dolor. Glucocorticoides tópicos.	Alto grado
Ulcerativo	Erosiones, úlceras y ampollas			

Tabla 2. Principales diferencias entre las distintas variantes clínicas del LPO [1]

1.5. Tratamiento:

El tratamiento del LPO se basa principalmente en la administración de corticoesteroides, ya sea de manera tópica, sistémica o en una combinación de ambos. Aunque dependerá de la sintomatología, la extensión, la historia clínica y otros factores.

Los corticoesteroides tópicos pueden llegar a tener una efectividad local igual a los sistémicos. Se prescriben en diferentes presentaciones como en enjuague, aerosol o pomada (chitosán u orobase). Los más utilizados son: el valerato de betametasona, el propionato de clobetasol, fosfato de

betametasona y el acetónido de fluicinolona o triamciolona. Los corticoesteroides tópicos presentan menos efectos secundarios, siendo el más común la candidiasis aguda pseudomembranosa que puede exacerbar la sintomatología. Para su tratamiento se administra gel de miconazol o solución acuosa de nistatina como terapia complementaria [20,21].

Los sistémicos, la metilprednisolona o prednisolona se usan principalmente en pacientes que no responden a los tópicos y sobre todo en LPO erosivo difuso, eritematoso, recalcitrante o en enfermedad multifocal [3,10].

En ocasiones también se usan corticoides intralesionales como las inyecciones de hidrocortisona, dexametasona, acetónido de triamcinolona y metilprednisona u otros tratamientos alternativos como son las ciclosporinas, retinoides, tacrolimus, irradiación ultravioleta, antibióticos como aureomicina al 2%, antimaláricos, azatioprina, dapsona, glicirrina (pacientes con VHC), interferón, levamisol, mesalazina, fentoína, reflexoterapia o cirugía/criciología [3, 10].

Para evaluar la efectividad de cualquier forma de tratamiento en pacientes con LPO, es necesario considerar la historia clínica del paciente, su estado psicológico y si está cumpliendo con el tratamiento, además de la posible interacción de los medicamentos, dado que se trata de una enfermedad crónica [3].

1.6. Factores de riesgo de malignización

El LPO está incluido en la clasificación de lesiones premalignas por la OMS, el riesgo de malignización es controvertido, es una lesión potencialmente maligna con carácter claramente benigno. Las lesiones rojas, atróficas, erosivas y con localización lingual son la que presentan mayor riesgo de malignización.

La tasa de transformación maligna de la LPO ha sido objeto de controversia debido a los criterios restrictivos utilizados en su diagnóstico. Los criterios modificados propuestos por Van der Meij & Van der Waal, que se basan en la aparición clínica de lesiones reticulares blancas bilaterales simétricas y en la presencia de signos histopatológicos de degeneración por licuefacción de la capa celular epitelial basal, así como en una zona de infiltración linfocítica en banda bien definida limitada al corion superficial y la ausencia de displasia epitelial. [22]

Sin embargo, la adopción de la displasia como criterio de exclusión probablemente selecciona casos con menor riesgo de transformación maligna, lo que puede llevar a una subestimación del potencial maligno de la enfermedad.

En el artículo publicado en 2019 por González Moles et al. se valora a través de una revisión sistemática el riesgo de transformación maligna de LPO, reacciones liquenoides y lesiones liquenoides orales. Siendo 1.14%, 1.71 y 1.88% respectivamente la tasa de malignización [6].

La mayor tasa de malignización se observó en estudios que basaron el diagnóstico en criterios clínicos e histopatológicos estrictos y con un periodo de seguimiento más largo. En cuanto a los factores de riesgo específicos, se aprecia un leve mayor riesgo significativo en desarrollar cáncer en varones frente a las mujeres, ninguna asociación entre la edad y la región geográfica y sí un riesgo significativamente mayor en fumadores, pacientes que consumen alcohol, que presentan VHC, con lesiones en lengua y con lesiones atrófico-erosivas [3,23].

2. Displasia epitelial oral.

El término de displasia se utiliza para describir el crecimiento anormal o la alteración en la forma o estructura de las células de un tejido u órgano. La displasia es un término que se utiliza para describir cambios precancerosos en los tejidos, aunque también puede ser un hallazgo en enfermedades inflamatorias crónicas u otras afecciones [15].

Se produce cuando las células sufren algún tipo de alteración, y esto puede ocurrir por varias razones, incluyendo infecciones virales, exposición a sustancias químicas, deficiencias nutricionales y factores genéticos [15].

Aunque los procesos displásicos pueden permanecer estables durante muchos años sin mostrar progresión clínica o genética, existe el riesgo de una transformación aleatoria repentina en cualquier momento. Es importante destacar que la displasia proporciona un entorno propicio para la inestabilidad cromosómica, lo que aumenta la probabilidad de desarrollar carcinoma [15].

La displasia epitelial oral se caracteriza por cambios específicos en el patrón de queratinización y queratinización prematura. Por otro lado, la presencia frecuente de apoptosis a todos los niveles es una característica distintiva de la displasia asociada al VPH [15].

La displasia se puede detectar mediante pruebas de diagnóstico, como la biopsia, y el tratamiento dependerá de la gravedad de la displasia y del tipo de tejido afectado [15]. Se ha llegado a un consenso generalizado de que a medida que aumenta el grado de displasia en una lesión individual, también aumenta la probabilidad de su progresión hacia la malignidad [16].

En el 2017 la OMS definió lesión premaligna como “presentaciones clínicas que conllevan un riesgo de desarrollo de cáncer en la cavidad oral, ya sea una lesión precursora clínicamente definible o en mucosa clínicamente normal” [24].

Las lesiones premalignas tienen características clínicas e histológicas superpuestas dificultando el diagnóstico [2]. Por otra parte, la presencia de displasia conlleva un mayor riesgo de transformación maligna independientemente de la presencia o ausencia de características liquenoides [25].

Se han identificado características específicas como indicadores de displasia epitelial oral auténtica que tienen una relación directa con los procesos patológicos subyacentes conocidos, pero no determinan su transformación [6]. Entre ellas se encuentran los cresta epitelial en forma de gota y agrupación de células basales y brotación hacia el corion, margen lateral afilado, múltiples patrones distintos de displasia en diferentes zonas de la misma lesión, mitosis en la capa de células espinosas, apoptosis espontánea y mitosis apoptóticas, núcleos hipercromáticos agrandados de forma irregular, perlas de queratina profundas o grupos de células queratinizadas en capas basales o en la cresta epitelial, aumento generalizado del espacio intercelular en las células basales y suprabasales, pérdida de polaridad y organización celular basal, arquitectura verrugosa y extensión a lo largo de los conductos glandulares menores para reemplazar tejido normal [6,16].

Criterios histopatológicos para la displasia epitelial oral en función de características organizacionales y citológicas	
Cambios arquitectónicos	Perlas de queratina dentro de las crestas de la red
Estratificación epitelial irregular	Pérdida de la cohesión de las células epiteliales
Pérdida de polaridad en las células basales	Cambios citológicos
Crestas reticulares en forma de gota	Valoración anormal en el tamaño nuclear
Aumento del número de figuras mitóticas	Valoración anormal en el tamaño de las células
Mitosis anormalmente superficiales	Valoración anormal en la forma de la célula

Queratinización prematura en células individuales	Aumento de la relación núcleo-citoplasma
Cambios organizativos	Figuras mitóticas atípicas
Aumento de número y tamaño de los nucleolos	Hiperplasia de células basales
Hipercromasia	Pleomorfismo celular y nuclear
Arquitectura verrugosa o papilar	Disqueratosis/queratinización prematura
Hiperplasia exofítica o endofítica voluminosa	Células con citoplasma vítreo
Hiperqueratosis con atrofia epitelial	

Tabla 3. Características organizacionales y citológicas de la DEO [16, 24]

No se debe confundir el concepto de displasia oral epitelial (DEO) de la atipia epitelial reactiva, pudiendo ser un LPO con atipia reactiva o un DEO que presenta una respuesta linfocítica. La presencia de papilomatosis y atipia citológica puede indicar que la lesión no es un LPO [24].

El liquen plano es un grupo heterogéneo de lesiones con un fenotipo clínico reconocible, pero cuya histopatología puede ser similar a otras patologías como la DEO por lo que hace que sea difícil determinarlo como lesión potencialmente maligna. Las queratosis friccionales y facticias pueden mostrar atipia epitelial reactiva que puede llegar a confundirse con DEO [24].

2.1. Clasificación de la displasia:

Existen varios sistemas de clasificación para la displasia oral, aunque los más comunes son el sistema de la OMS y el sistema de Ljubljana. El sistema de la OMS se basa en la gravedad de la displasia, que se divide en tres categorías: leve, moderada y severa. Esta clasificación se basa en la presencia de anormalidades citológicas, alteraciones de la arquitectura y/o la diferenciación celular, y la presencia o ausencia de mitosis atípicas. También se utiliza la categoría "indeterminada" para las lesiones que no se pueden evaluar claramente [12].

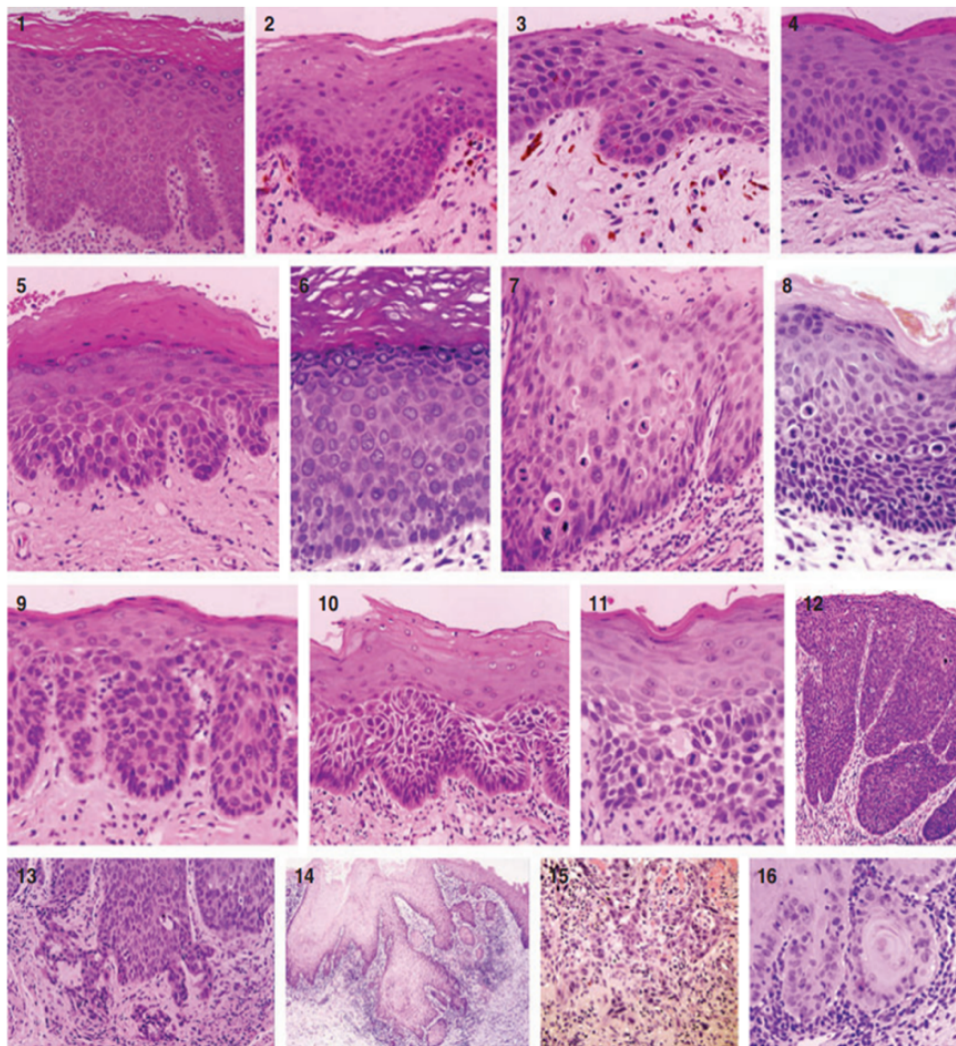


Imagen 1: Clasificación de la displasia en relación con la OMS en 2005. Tomada con permiso de: Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. [16]

Figura 1: Epitelio escamoso mostrando queratosis, hiperplasia del estrato espinoso y aumento del compartimento de maduración sin cambios en la arquitectura. No se observa atipia celular. Grado: sin displasia.

Figura 2: Epitelio escamoso mostrando aumento de células basales (hiperplasia de células basales) como único cambio en la arquitectura. No se observa atipia celular. Grado: sin displasia.

Figura 3: Se observan cambios arquitecturales en el tercio inferior del epitelio. Se presenta una leve atipia celular. Grado: displasia leve.

Figura 4: Los cambios arquitecturales se extienden aproximadamente hasta el tercio inferior del epitelio escamoso. La atipia celular es leve. Grado: displasia leve.

Figura 5: Los cambios arquitecturales se extienden hasta el tercio medio. La atipia celular es moderada. Grado: displasia moderada.

Figura 6: Los cambios arquitecturales se extienden hasta el tercio medio del epitelio. La atipia celular es moderada. Grado: displasia moderada.

Figura 7: Los cambios arquitecturales se extienden hasta el tercio superior del epitelio. La atipia celular es marcada. Grado: displasia severa.

Figura 8: Los cambios arquitecturales se extienden hasta el tercio superior del epitelio. La atipia celular es marcada. Grado: displasia severa.

Figura 9: Los cambios arquitecturales son graves y se extienden hasta el tercio superior del epitelio. Sin embargo, la atipia celular es moderada. Grado: displasia moderada.

Figura 10: Los cambios arquitecturales se extienden hasta el tercio medio del epitelio y constituirían una displasia moderada, pero debido a la marcada atipia se actualiza a displasia severa. Grado: displasia severa.

Figura 11: La arquitectura se extiende hasta el tercio medio del epitelio, pero debido a la marcada atipia celular, se actualiza a displasia severa. Grado: displasia severa.

Figura 12: Los cambios arquitecturales se extienden hasta casi el grosor completo del epitelio y se observa una marcada atipia celular. Grado: carcinoma in situ.

Figura 13: La interfaz irregular entre el epitelio y el tejido conectivo con proyecciones puntiagudas del epitelio indica una invasión temprana.

Figuras 14-16: Islotes epiteliales posiblemente separados del epitelio de superficie indican un carcinoma invasor temprano. Puede ser necesario realizar secciones seriadas para confirmar la invasión

Por otro lado, el sistema de Ljubljana se basa en la presencia o ausencia de características citológicas y morfológicas específicas. Este sistema identifica cuatro categorías: hiperplasia sin atipia, displasia leve, moderada y severa. Además, el sistema de Ljubljana también incluye una categoría adicional de "sospechoso de malignidad" para lesiones que tienen características de carcinoma in situ pero que no cumplen con todos los criterios diagnósticos [26].

La clasificación de la displasia ha pasado a un sistema binario, lo que significa que se ha restringido el diagnóstico a displasia de alto y bajo grado. El uso de dos grados resulta atractivo para los clínicos, ya que facilita la interpretación de la patología y aumenta la probabilidad de acuerdo entre patólogos. Kujan et al. (2006) proponen un sistema binario que segrega la displasia oral en grupos de alto y bajo grado, dividiendo el grado moderado entre ellos basándose en el número de cambios arquitectónicos y citológicos observados. El alto grado muestra al menos cuatro características arquitectónicas y cinco citológicas, y los de bajo grado tienen menos cambios microscópicos [27].

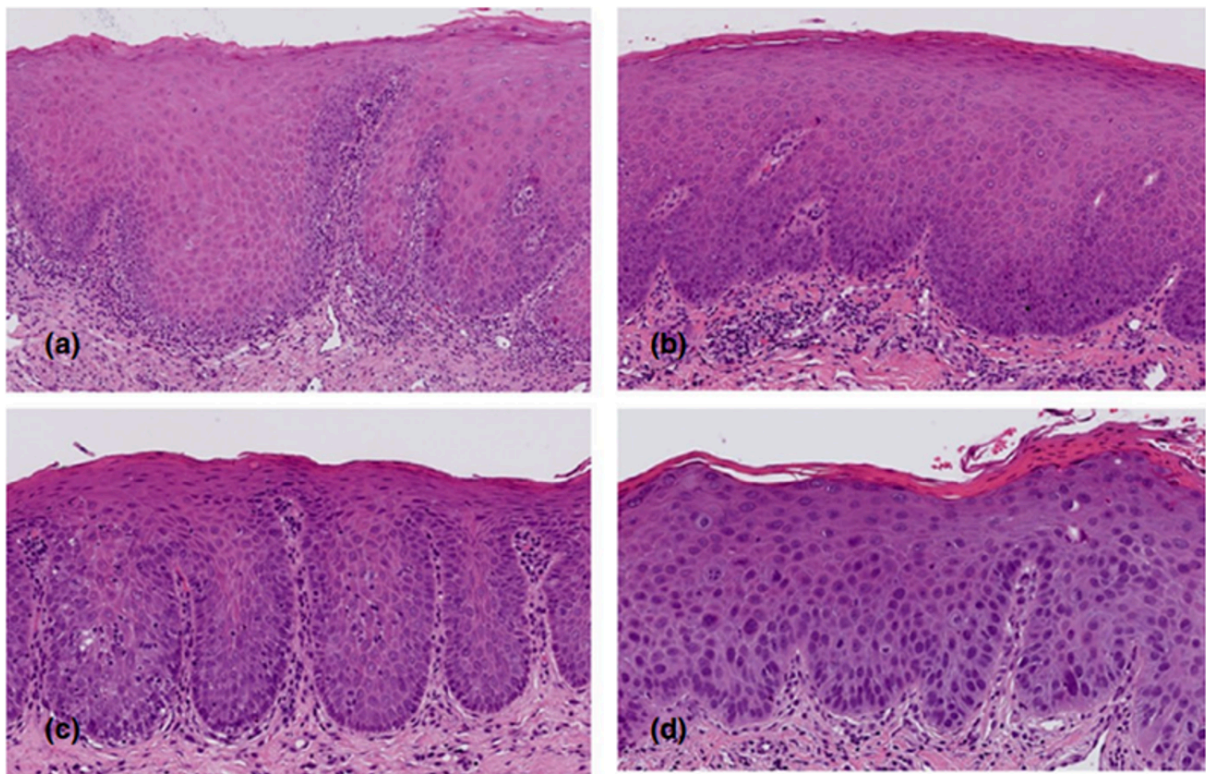


Imagen 2: Casos representativos entre la clasificación de displasia epitelial de OMS del 2005 versus la propuesta de clasificación binaria propuesta por Kujan et al. 2006. Tomada con permiso de: Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. [15]

(a) *Displasia epitelial leve (grado bajo) en la mucosa bucal. Se observan pequeñas células basales que dan lugar a células con citoplasma eosinofílico abundante, sin atipia, lo que produce principalmente un patrón arquitectónico o diferenciado de displasia. Hay una respuesta inmune liquenoide presente.*

(b) *Biopsia de la mucosa bucal mostrando acantosis, leve atipia citológica y respuesta inmune liquenoide, clasificado como displasia moderada (grado bajo), un patrón principalmente arquitectónico, pero con alguna leve atipia adicional.*

(c) *Mucosa bucal mostrando procesos de rete bulbosos alargados y atrofia suprapapilar, con moderada atipia citológica y paraqueratosis, pero en general, una maduración razonablemente conservada, clasificado como displasia moderada (grado alto).*

(d) *Biopsia de la mucosa del suelo de la boca mostrando marcada atipia citológica, alta cantidad de figuras mitóticas y paraqueratosis, clasificado como displasia epitelial grave (grado alto).*

A pesar de que el uso de dos grados resulta atractivo para los clínicos, proporciona menos información y se pierde información importante. En 2017, la OMS incluyó el sistema binario con la advertencia de que se recomendaba una mayor validación [15, 22].

3. Displasia epitelial oral con características liquenoides

La displasia oral liquenoide es un término introducido por Krutchkoff y Eisenberg en el 1985. Estos autores proponen una displasia con características liquenoides que presentan un bajo riesgo de malignización sobre un 1%. Una de las características displásicas son las células basales prominentes con características liquenoides [2,3, 28].

CRITERIOS DE KRUTCHKOFF Y EISENBER	
Diagnóstico verificado con pruebas histopatológicas que presenten al menos dos de las 4 características	Hiperqueratosis o paraqueratosis
	Clavijas de rete con dientes de sierra
	Infiltrado superficial de linfocitos
	Licuación de células basales

Historia y seguimiento	Características clínicas de la transformación debidamente descritas. Datos como edad, sexo localización y descripción clínica de la lesión.
	Seguimiento adecuado de la transformación de mínimo dos años con los cambios de las características clínicas debidamente registrados.
Exposición al tabaco	Documentar hábitos tabáquicos para ayudar a distinguir entre transformaciones malignas y un carcinoma que aparece de manera casual en un paciente con LPO.

Tabla 4. Criterios de la displasia oral liquenoide, Krutchkoff y Eisenberg 1985 [3, 28].

En este tipo de displasia se presenta una pérdida de heterocigosidad que se asocia a un riesgo aumentado de cáncer. En un estudio de Rock et al. de 2018 se compara la tasa de progresión maligna en 10 años entre mucositis liquenoide de bajo grado, mucositis liquenoides sin displasia y displasia sin lesiones liquenoides. Los resultados no difirieron significativamente en ninguno de los grupos [29].

Las principales diferencias surgieron de los factores de riesgo, la localización de las lesiones y las características de la displasia, si eran de alto o bajo riesgo. Pero no en si presentaban características liquenoides. Se observó que las células basales prominentes podía ser una característica asociada a la carcinogénesis. Sin embargo, era importante reconocer que la displasia epitelial con características liquenoides o el liquen plano presentaban una mayor probabilidad de desarrollar displasia en comparación con la mucosa normal [29].

La inflamación presente en las lesiones del LPO pueden provocar características histológicas similares a la displasia, provocando que sea más difícil su distinción. Además, existen otras patologías con las que se solapan las características histológicas liquenoides, como son el lupus eritematoso, la leucoplasia, la eritroleucoplasia y la leucoplasia verrugosa proliferativa [3].

Los factores de riesgo para desarrollar cáncer son variados dependiendo de los estudios analizados, y se determina que pacientes con Liquen plano cutáneo tienen 1,2 veces mayor riesgo de desarrollar cáncer, al igual que las pacientes con enfermedad injerto contra huésped tienen mayores probabilidades de desarrollar cáncer oral [3]. Además de los factores mencionados, el consumo de ciclosporinas o azatioprinas, el consumo de alcohol y tabaco, la presentación clínica de la lesión,

así como el contenido de ADN y la pérdida de heterocigosidad, también se han asociado con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad [3].

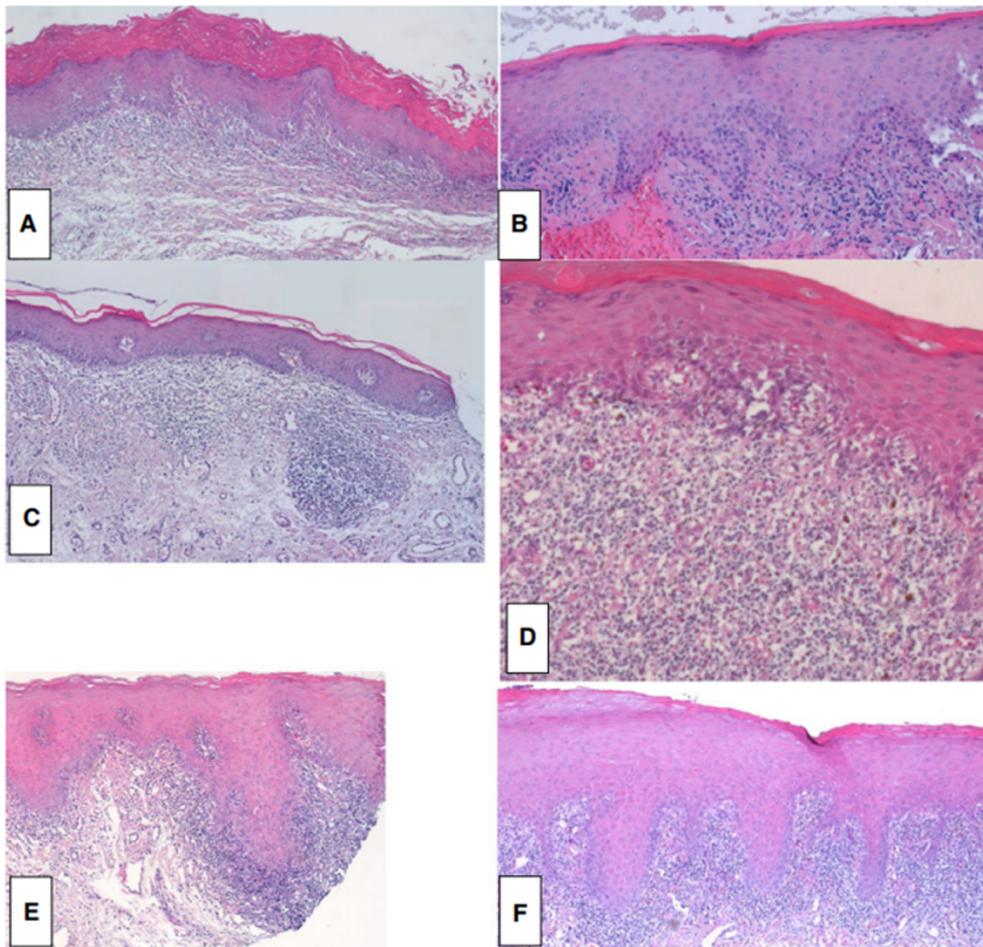


Imagen 3: Características liquenoides o displásicas en el liquen plano oral (LPO). Tomada con permiso de: Patil S, Rao RS, Sanketh DS, Warnakulasuriya S. Lichenoid dysplasia revisited - evidence from a review of Indian archives. [30]

(A) LPO con un infiltrado linfocítico en el corium superior, en forma de banda; (B) Características "atípicas" en el liquen plano oral con acantosis del epitelio e infiltrado menos densamente compacto; (C) Centro germinal en el LPO con apariencia liquenoide; (D) Infiltrado linfocítico que se extiende a la parte más profunda del corium, una característica de la lesión liquenoide oral; (E &F) Displasia epitelial en el LPO.

Actualmente no hay suficiente evidencia científica como para determinar si la displasia oral liquenoide es una entidad histológica distinta o un continuo por el cual las lesiones inflamatorias liquenoides como LPO acaban desarrollando características displásicas. En un estudio donde se examinaron los genes mediante secuenciación de ARN, expresión génica diferencial, enriquecimiento funcional y estimación fenotípica de células inmunitarias se determinó que hay una expresión mayor de genes relacionados con procesos inflamatorios en displasia oral liquenoide y liquen plano oral que en displasia epitelial oral (DEO), demostrando que la displasia oral liquenoide no es una entidad patológica distinta, ya que su perfil transcriptómico e inmunofenotípico es similar a LPO y distinto a DEO. Según este estudio, la displasia oral liquenoide representa una lesión liquenoide oral con atipia epitelial histológica derivada del infiltrado inflamatorio asociado [2].

Objetivo del estudio

El objetivo principal de este estudio es el de esclarecer las proteínas desreguladas en muestras de en I) pacientes con leucoplasias displásicas, II) liquen plano oral y III) displasia epitelial con características liquenoides utilizando la adquisición de ventana secuencial de todos los espectros de masas teóricos (SWATH-MS) para cuantificar proteínas del perfil proteómico de las muestras. El objetivo es obtener una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de la displasia y determinar si la displasia es un factor de exclusión del liquen plano oral.

Por otra parte, los objetivos secundarios de este estudio son los siguientes: en primer lugar, realizar un análisis cualitativo del perfil proteómico de las muestras con el fin de obtener una comprensión detallada de la composición proteica presente en estas lesiones. En segundo lugar, llevar a cabo un análisis cuantitativo para identificar las proteínas específicas que se expresan de manera significativa y cuantificar su abundancia relativa en cada muestra, lo que permitirá establecer diferencias y patrones proteómicos entre los diferentes tipos de lesiones. Además, se busca evaluar la correlación molecular predominante entre las lesiones liquenoides con displasia, el liquen plano oral y la displasia epitelial oral. Por último, se pretende resaltar la importancia de identificar la displasia epitelial en las lesiones del espectro liquenoide debido a su relación con lesiones displásicas con potencial maligno, lo que permitirá guiar de manera más precisa el seguimiento y control del potencial carcinogénico de estas lesiones.

Material y métodos

Las biopsias utilizadas en este estudio fueron obtenidas de: el Biobanco del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), España (PT17/0015/0002), el cual forma parte de la Red Nacional de Biobancos de España, y también de la Unidad de Medicina Bucal del Servicio de Clínica Dental de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). El estudio se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki y fue aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEIC) de Galicia (España) con el número de aprobación 2019/271. Todos los participantes (España) dieron su consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio.

Este estudio se realizó como un estudio de casos y controles que incluyó 16 muestras de tejido oral. El Grupo 1 consistió en 5 biopsias de tejido oral con diagnóstico de liquen plano. El Grupo 2 estuvo conformado por 5 biopsias de individuos con lesiones de leucoplasia con displasia. Finalmente, el Grupo 3 estuvo compuesto por 6 biopsias de pacientes con enfermedad liquenoide oral con displasia. Todas las muestras de tejido oral fueron previamente fijados en formol y embebidos en parafina (FFPE), siguiendo los procedimientos habituales del laboratorio del Departamento de Patología del CHUS. Las muestras permanecieron en el biorepositorio de proteómica del IDIS. En cuanto al análisis de histopatología. Los patólogos estaban ciegos ante los resultados clínicos de cada caso cuando se realizó el examen histológico. Dos patólogos expertos en patología oral (J.M.A.U y M.S.P.) realizaron sus evaluaciones de manera independiente el uno del otro. Se realizó una evaluación histológica basada en los cambios arquitectónicos y citológicos que se describieron en el sistema binario [27]. El diagnóstico definitivo de los casos se alcanzó mediante una evaluación de consenso. Para comparar la concordancia entre los patólogos individuales, se calcularon los valores de K no ponderados y ponderados para cada par de observadores. Los valores de kappa estadísticos sin ponderar y ponderados para el sistema de dos resultaron idénticos. Se observó una variabilidad en el acuerdo porcentual entre los examinadores, que osciló entre el 75.2.7% y el 90.2%.

Se siguieron las pautas de STROBE en este estudio (von Elm et al., 2008). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1964 y sus enmiendas posteriores.

Todos los pacientes se sometieron a una anamnesis, evaluación clínica y a una biopsia incisional de la lesión. Los datos recogidos incluían: sexo, edad, consumo de tabaco y alcohol, edad en el momento de la biopsia, presentación clínica de la lesión, diagnóstico histológico y localización de la lesión.

1. Criterios de inclusión y exclusión

La selección de las biopsias se realizó en función de: pacientes que presentaban lesiones con liquen plano oral con confirmación histopatológica, pacientes que presentaban leucoplasias con presencia de displasia confirmada histológicamente independientemente del grado de esta, y, pacientes que presentaban liquen plano oral ya sea clínico o histológico y además presentaban displasia confirmada histológicamente independientemente del grado de esta.

2. Recolección de muestras

2.1. *Procesamiento inicial de muestras*

Todas las muestras se encontraban fijadas e incluidas en parafina de acuerdo con procedimiento estándar, que consta de los siguientes pasos: fijación en formol tamponado al 10%, generalmente por un máximo de 24 horas, seguida de deshidratación mediante inmersión en una serie gradual creciente de alcohol etílico (EtOH), e inclusión en un bloque de parafina. Tras el procesamiento de la muestra para la realización del diagnóstico clínico pertinente, el bloque de parafina restante se almacena en su correspondiente biorepositorio.

Previo al análisis proteómico es necesario extraer las proteínas de las muestras parafinadas. Para ello se empleó una técnica previamente optimizada por el grupo, basada en la utilización de agua como agente desparafinante [31]. Brevemente, la manipulación de la muestra se realizó dentro de microtubos Eppendorf de 1,5 mL en los que se introducen las 3-5 secciones de 10 µm de espesor de bloques de parafina, previamente pesadas en una balanza de precisión. La secuencia de seguida para el desparafinado con agua es la que sigue:

- 1) Se les añade a las muestras parafinadas 400 µl de agua milli-Q precalentada a una temperatura de 90-95 °C, y se deben incubar durante un período de 2-3 minutos a una

temperatura constante de 95°C. Durante este proceso, es importante mantener una agitación constante de 500-600 rpm utilizando un Thermomixer (Eppendorf, Alemania). Este proceso de incubación se repite tres veces.

- 2) Se elimina esta agua y se añaden nuevamente 400 µl de agua milli-Q esta vez a temperatura ambiente
- 3) Las muestras se congelan a -20°C para ayudar a romper el tejido.

2.1.1. Extracción de proteínas

El protocolo se desarrolló de la siguiente manera [32, 33]:

- 1) Se descongela la muestra desparafinada y se elimina el agua con la micropipeta.
- 2) Se incuba la muestra con 150 µL de buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS (Serva, Alemania), 200 mM DTT (Sigma-Aldrich, USA), 200 mM glicina (Sigma-Aldrich, USA), 1% de CHAPS (Sigma-Aldrich, USA) y un cóctel inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics, Suiza)) a 100°C durante 20 minutos, seguida de 2 horas a 60°C.
- 3) La muestra se sónica durante 30 minutos (Branson Ultrasonics, CT, USA).
- 4) Se vuelve a congelar a -20°C durante 12 horas.
- 5) Al día siguiente se vuelve a descongelar y se procede a la disgregación del tejido en ayuda de un TissueLyser (Qiagen, Alemania) mediante agitación en frío a alta velocidad durante 3 minutos en microtubos Eppendorf de 2 mL conteniendo bolas de acero inoxidable.
- 6) Por último, se centrifugan durante 20 minutos a 14.000 rpm a 4°C, y se recoge el sobrenadante (proteínas) conservándolo a -20°C hasta su utilización.

2.2. Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en disolución obtenida tras la aplicación de los protocolos de desparafinado y extracción de proteínas, se utilizó el kit comercial Bio-Rad RCDC Protein Assay (Bio-Rad, USA), esta prueba colorimétrica es muy similar a la clásica prueba de Lowry [34].

2.3. Digestión en-gel: Preconcentración en geles monodimensionales

Se usaron geles SDS-PAGE, para concentrar las muestras en una única banda de unos 3-4 mm de espesor, justo después del “stacking”. Concretamente se usaron geles al 10% de acrilamida con 1.5M de Tris-Base pH 8.8, SDS (Sigma-Aldrich, USA) al 10%, APS (Sigma-Aldrich, USA) al 10% y 1% TEMED (Bio-Rad, USA). Se cargó el volumen necesario de muestra en cada caso para tener una concentración de 100 µg de proteína. Las proteínas se diluyeron en tampón de carga “loading-buffer” (25% de Tris-Base a 0.5 M, 0.4% de SDS con pH 6.8, 20% de glicerol, 0.2% de 2-β-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol (Merck, Alemania), tras haberlas hervido previamente durante 5 minutos. La electroforesis se realizó a una intensidad constante de 40 A en tampón de electroforesis “running buffer” (3 g/L de Tris-Base, 14.4 g/L de glicina y 0.96 g/L de SDS), utilizando el sistema Mini-PROTEAN® Precast Gels (Bio-Rad, USA). Una vez que el frente de migración penetra aproximadamente 3-4 mm en el “resolving”, se detiene la electroforesis y se tiñen los geles con el reactivo QC-Colloidal Coomassie (Bio-Rad, USA) siguiendo las indicaciones del protocolo de máxima sensibilidad del propio fabricante. A continuación, se cortan con un bisturí las bandas concentradas de las distintas muestras para su posterior digestión “in-gel”. [35]

El protocolo de digestión seguido consta de los siguientes pasos: los fragmentos de gel se lavaron 3 veces con una disolución 50 mM de NH₄HCO₃ (Sigma-Aldrich, USA) y 50% de MeOH (Scharlau, España) y se mantuvieron en agitación (400-500 rpm) durante 10 minutos. Las proteínas se deshidrataron mediante la adición de ACN durante 10 minutos en agitación y, posteriormente, se secaron a vacío usando el equipo de secado al vacío SpeedVac (Thermo Scientific, USA). A continuación, se llevó a cabo la reducción de las proteínas con DTT 50 mM en 10 mM en NH₄HCO₃, durante 30 minutos a 56 °C y manteniéndolas en agitación. Se repitieron los 3 primeros pasos, (lavados, deshidratación y secado de la muestra) y se realizó la alquilación de los grupos tiol (SH) libres con IAA 55 mM en 50 mM NH₄HCO₃ durante 20 minutos en oscuridad. Por último, tras realizar nuevamente los lavados y llevar las muestras a sequedad, se añadió una disolución de tripsina a 20 ng/µL en 20 mM de NH₄HCO₃ (Promega, USA). Las muestras se cubrieron con el doble de solución de 20 mM de NH₄HCO₃ y se incubaron toda la noche a 37 °C y en agitación. Al día siguiente, se realizó la extracción de los péptidos mediante 3 incubaciones de 20 minutos con 60% ACN y 0.5% de HCOOH en agitación (600 rpm). Tras cada incubación,

se recogió el sobrenadante (péptidos) y se depositó en un tubo limpio donde se secó a vacío durante 2 horas. Se mantuvo en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización [36].

2.4. *LC-MS/MS*

Los análisis de espectrometría de masas fueron realizados empleando un equipo Triple TOF 6600 (Sciex, USA), que permite realizar tanto un análisis cualitativo (en modo DDA-Data-dependent acquisition) como cuantitativo, a través del método de adquisición recientemente desarrollado SWATH™ (En modo DIA-data-independent acquisition) (Sciex, USA). Acoplado al equipo de masas se usó un nanoHPLC, Eksigent Technologies nanoLC 400 (Sciex, USA). Los péptidos se separan según su hidrofobicidad, en función de su interacción entre el recubrimiento químico de la denominada fase estacionaria (la columna) y el solvente orgánico (fase móvil) que pasa a través de la columna. La muestra en disolución es inyectada y transportada en la fase móvil acuosa a través del sistema, una vez en la columna el sistema realiza un gradiente donde se va reduciendo la fase móvil acuosa y se va incrementando la fase móvil orgánica, lo que permite que los péptidos avancen con distinta velocidad en función de su afinidad por cada una de las fases.

2.5. *Cromatografía líquida*

Las mezclas peptídicas se suspendieron en $20\text{ }\mu\text{L}$ de una disolución compuesta por 0.1% (v/v) HCOOH en agua con ayuda de sonicación. En este caso, se usó la pre-columna YMC-TRIART C18 (YMC Technologies, Teknokroma, España) $5 \times 0.5\text{ mm}$, 3 mm de tamaño de partícula y $120\text{ }\text{\AA}$ de tamaño de poro, que está conectada en línea con la columna analítica, que es una columna de fase reversa, de sílica, Eksigent C18CL $150 \times 0.30\text{ mm}$, 3 mm de tamaño de partícula y $120\text{ }\text{\AA}$ de tamaño de poro (Eksigent, ABSciex). La bomba de carga “loading pump” suministró una disolución de HCOOH al 0.1% en agua a $10\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$. La microbomba “micro-pump”, que es la que permite que podamos realizar un gradiente entre la fase A y B, proporcionó una velocidad de flujo de $5\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$, en condiciones de elución en gradiente, utilizando HCOOH al 0.1% (v/v) en agua como fase móvil A, y ácido fórmico al 0.1% en ACN como fase móvil B. Los péptidos se separaron usando un gradiente de 90 minutos en el caso de los análisis cualitativos y un gradiente de 40 minutos en caso de los análisis cuantitativos. Estos gradientes se realizan incrementando, en ambos casos, el % de fase móvil B desde un 2% a un 98%, para favorecer la elución de todos los

péptidos, desde los más hidrofílicos a los más hidrofóbicos. El volumen de inyección fue en todos los casos de 4 μL (aprox 4 μg).

2.6. *Método cualitativo (Análisis DDA)*

La adquisición de datos se realizó en un sistema Triple-TOF 6600 (Sciex, USA) usando un flujo de trabajo dependiente de datos (DDA). Usando el software Analyst TF 1.7.1 (Sciex, USA). Las condiciones de las fuentes e interfaces que se usaron son las siguientes: voltaje flotante del spray de iones (ISVF) de 5500V, cortina de gas (CUR) de 25, energía de colisión (CES) de 10 y gas de la fuente de iones 1 (GS1) de 25. Los criterios de selección de iones se establecieron en aquellos que presentaban un cociente masa/carga (m/z) mayor que 350 y menor que 1400 con estados de carga de entre +2 y +5, una tolerancia de masa de 250 ppm y un umbral de abundancia de más de 200 cps. Los iones diana del análisis anterior se eliminan cada 15 segundos.

2.7. *Método Cuantitativo SWATH™ (Análisis DIA)*

Para realizar un SWATH es necesaria la construcción previa de una librería espectral de MS/MS; este proceso se realiza generalmente a partir de mezclas peptídicas para cada grupo de muestras experimentales (tipo de trastorno oral potencial maligno), y procesando estas muestras mediante un método de adquisición dependiente de datos (DDA) usando la tecnología micro-LC-MS/MS.

Una vez que los pools e proteínas de cada TOPM se analizan con el método DDA, este método es igual en características al descrito para el análisis cualitativo, salvo que el tiempo en el que se realiza la elución de los péptidos es inferior 40 minutos, se puede usar uno de los archivos para generar el método SWATH™.

Es proceso implica los siguientes pasos. En primer lugar, es necesario abrir los archivos obtenidos previamente (pools) con el programa PeakView™ (Sciex, USA), en formato MS/MS, para valorar el número y la calidad de los MS/MS (fragmentos de los péptidos) que tenemos en cada uno de ellos y seleccionar aquel en el que haya mayor número y sean de mejor calidad, para poder crear el método a partir del mismo. Una vez seleccionado el archivo con mayor número de MS/MS, éste se abre en modo TIC (“Total ion Chromatogram” o modo cromatograma de iones) y se selecciona el cromatograma completo entre 350 y 1400 Da. El programa PeakView™, genera una tabla con cada uno de los valores de masa/carga y la intensidad de los picos del archivo

seleccionado para crear el método; por lo tanto, se seleccionan estos datos y se exportan como un archivo de texto (txt.). A continuación, se abre el archivo “SWATH™ Variable Window Calculator” (Sciex, USA) para generar las ventanas necesarias con el objetivo de crear el método de búsqueda SWATH™. Una vez calculadas las ventanas, para finalizar con la creación del método, es necesario ir al programa Analyst TF 1.7.1 (Sciex, USA). Una vez que el método está creado, se procesaron las muestras individualmente para realizar la cuantificación mediante una búsqueda masiva de las proteínas identificadas en la biblioteca.

El método creado para el análisis cuantitativo de las muestras en el “SWATH™ Variable Window Calculator” consta de las siguientes características: el número de ventanas (“Target Number Windows”) es de 100 (todas ellas son ventanas cruzadas); el límite mínimo de m/z (“Lower m/z limit”) es 400, mientras que el máximo (“Upper m/z limit”) es 1250; el número de veces que se repite cada ventana (“Round bin edges to X figures”) es 1; el tamaño de ventana (“Minimum Window Width”) es de 3 Da; por último, el CES es de 5.

3. Análisis

3.1. Análisis bioinformático

3.1.1. Método cualitativo

Después de la adquisición de los MS/MS, los archivos se procesaron con el software ProteinPilot™ 5.0.1 (Sciex, USA) usando los algoritmos: Paragon™, para la búsqueda en la base de datos, y Progroup™, para la agrupación de los datos. Como fuente de búsqueda se empleó la base de datos Uniprot específica de humano (Human Reviewed (Swiss-Prot) Database, con 49980 entradas). La tasa de falsos positivos (FDR, False Discovery Rate) se obtuvo mediante un ajuste no lineal que considera correctamente identificadas aquellas proteínas que presentan una tasa de FDR < 1%.

3.1.2. Método cuantitativo relativo vía SWATH™

Una vez que las muestras han sido analizadas con el método SWATH™ en el espectrómetro de masas, el análisis cuantitativo se realizó con dos programas: PeakView™ y MarkerView™. Las muestras se analizaron utilizando el enfoque DIA para llegar a una cuantificación relativa. Se procesaron 4 µl de cada muestra usando el gradiente LC-MS y LC para construir la biblioteca

espectral. El método para obtener una cuantificación relativa consistió en repetir ciclos. Cada ciclo se realizó mediante la adquisición de 65 escaneos TOF MS/MS (400 a 1500 m/z, modo de alta sensibilidad, tiempo de adquisición de 50 ms) de ventanas de aislamiento de precursores secuenciales que se cruzan de ancho variable (superposición de 1 m/z) que cubren los 400 a un rango de masas de 1250 m/z con un escaneo TOF MS previo para cada ciclo. El tiempo de ciclo total para cada ejecución duró 6,3 s. La variabilidad en términos de ancho se optimizó de acuerdo con la densidad de iones determinada por las ejecuciones de DDA.

3.2. *Análisis estadístico*

Las variables continuas con distribución normal certificadas con la prueba de Kolmogórov-Smirnov se expresaron como media \pm desviación estándar. Mientras que las variables categóricas se reportaron con porcentajes. Es decir, las variables cuantitativas en múltiples muestras independientes se estudiaron mediante la prueba t de Student o la U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis sobre la base de las distribuciones gaussianas o no gaussianas. El método elegido para la selección del modelo fue el criterio de información de Akaike (AIC) para evitar efectos de colinealidad. El procedimiento de selección se repitió utilizando el criterio de información bayesiano para certificar que las covariables seleccionadas fueron las mismas del método AIC.

La extracción de picos se realizó con SWATH Acquisition2.0 MicroApp (Sciex, Framingham, MA, EE. UU.). Los péptidos con una puntuación de confianza superior al 99% se incluyeron en la biblioteca espectral DDA. Se calculó la tasa de descubrimiento falso para cada péptido y se usó el 1% como punto de corte para la inclusión. Los cambios de pliegue (FC) en la expresión de proteínas se definieron como proporciones medianas de espectros significativamente coincidentes con cada proteína con señales informadas en todas las muestras. Se consideraron para el análisis aquellas proteínas que en la cuantificación presentaban una $p < .05$ y con un FC ratio > 2 . En la cuantificación de proteínas, se usaron técnicas de análisis de componentes principales y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales.

Para el análisis exploratorio de la relación entre las muestras, se realizó un agrupamiento jerárquico. Antes del agrupamiento, las lecturas se transformaron en \log_2 , se normalizaron por cuantiles y se filtraron a las 100 proteínas principales mediante su dispersión ajustada a la mediana.

El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando el paquete R Bioconductor EdgeR con la función de filtrado independiente habilitada para filtrar proteínas con recuentos normalizados medios bajos. También se usó el programa de análisis estadístico GraphPad Prism 8.0 Software (La Jolla, CA, USA) para obtener los gráficos denominados volcano plots que representan las proteínas significativas de cada grupo analizado, así como diagramas de Venn.

3.3. *Análisis funcional*

Para llevar a cabo el análisis funcional, utilizamos el programa STRING (<https://string-db.org>), el cual nos permitió investigar las interacciones entre las proteínas identificadas.

Resultados

1. Participantes del estudio

BIOPSIAS					
LIQUEN PLANO					
N° Biopsia	1	2	3	4	5
Sexo	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Mujer
Fecha nacimiento	16.10.57	08.09.59	19.12.72	26.09.50	01.05.50
Tabaco	No	Sí	No	No	No
Alcohol	No	No	No	No	No
Edad en el momento de la biopsia	60	57	43	66	65
Presentación clínica	LPO erosivo	LPO atrófico	LPO reticular	LPO reticular	LPO erosivo
Diagnóstico histológico	Liquen plano erosivo con presencia de estructuras fúngicas	Estomatitis liquenoide compatible con liquen plano	Estomatitis liquenoide compatible con liquen plano	Estomatitis liquenoide compatible con liquen plano	Estomatitis liquenoide compatible con liquen plano
Localización	Lateral de la lengua	Mucosa yugal izquierda	Encía tercer cuadrante	Mucosa yugal izquierda	Mucosa yugal derecha

Tabla 5. Características de las biopsias de liquen plano oral

BIOPSIAS					
DISPLASIA					
N° Biopsia	1	2	3	4	5
Sexo	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
Fecha nacimiento	14.06.43	16.12.58	30.06.30	17.10.48	02.09.59
Tabaco	-	Sí	Sí	Exfumador	No
Alcohol	-	No	No	-	-
Edad en el momento de la biopsia	73	59	85	67	58
Presentación clínica	Leucoplasia verrugosa proliferativa	Leucoplasia	Leucoplasia	Leucoplasia	Leucoplasia
Diagnóstico histológico	Displasia epitelial de bajo grado	Displasia epitelial de alto grado	Displasia epitelial de bajo grado	Displasia epitelial de bajo grado	Displasia epitelial de alto grado

Localización	Lesión gingivo-labial	Borde lateral derecho de lengua	Borde lateral derecho de lengua	Borde lateral derecho de lengua	Borde lateral de la lengua de región anterior
---------------------	-----------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---

Tabla 6. Características de las biopsias que presentan displasia epitelial oral.

BIOPSIAS						
ENFERMEDAD LIQUENOIDE ORAL CON DISPLASIA						
Nº Biopsia	1	2	3	4	5	6
Sexo	Mujer	Mujer	Mujer	Mujer	Mujer	Mujer
Fecha nacimiento	29.07.65	08.02.47	01.10.47	03.01.44	05.03.51	19.06.65
Tabaco	No	No	No	No	No	No
Alcohol	No	Sí	No	No	No	Sí
Edad en el momento de la biopsia	54	74	72	71	69	57
Presentación clínica	Liquen plano oral	Liquen plano oral erosivo	Liquen plano oral reticular	Liquen plano oral reticular	Reacción liquenoide.	Liquen plano oral erosivo
Diagnóstico histológico	Displasia epitelial de bajo grado	Displasia epitelial de bajo grado	Displasia epitelial de bajo grado	Displasia epitelial de bajo grado	Displasia epitelial de bajo grado	Displasia epitelial de alto grado
Localización	Encía vestibular	Mucosa yugal derecha, encía vestibular y mucosa palatina.	Mucosa yugal izquierda	Borde lateral izquierdo de lengua	Mucosa yugal	Borde lateral izquierdo de lengua

Tabla 7. Características de las biopsias con enfermedad liquenoide oral con displasia

2. Análisis proteómico

El análisis SWATH permitió la identificación de 366 proteínas. La información recopilada en esta biblioteca, incluyendo el tiempo de retención, MS y MSMS de todos los péptidos en cada proteína, fue utilizada para llevar a cabo el análisis SWATH. Además, se realizaron análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante parcial por mínimos cuadrados (OPLS-DA) para normalizar los datos, como se mencionó anteriormente.

Se realizaron un total de tres comparaciones entre: (I) displasia frente el liquen plano oral, (II) enfermedad liquenoide con displasia frente la displasia y (III) enfermedad liquenoide oral con displasia frente el liquen plano oral. En la comparación I, se encontraron 7 proteínas expresadas de manera diferencial ($p < 0,05$) en displasia en comparación con el liquen plano, estos datos se muestran en la Tabla 8. En la comparación II, 15 proteínas (Tabla 9) y en la III comparación 12 (Tabla 10).

La comparativa se representa mediante un diagrama de Venn de las proteínas obtenidas mediante el análisis del SWATH para los distintos grupos de estudio. Los resultados revelaron un total de 460 proteínas comunes en los tres grupos. Además, se identificaron 63 proteínas comunes entre el LPO y la enfermedad liquenoide oral con displasia, 22 proteínas comunes entre el LPO y la displasia, y 38 proteínas comunes entre la displasia y la enfermedad liquenoide oral con displasia.

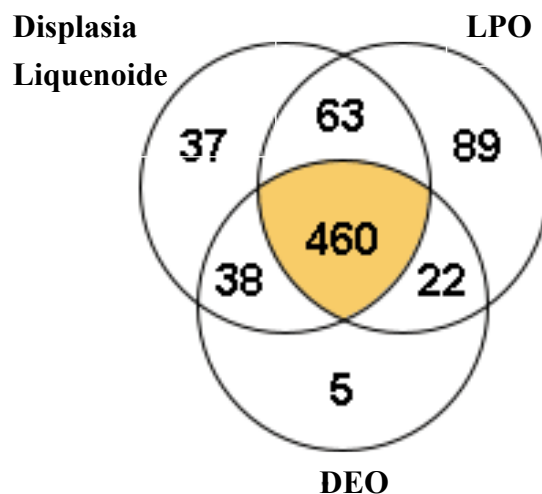


Imagen 2. Representación mediante un diagrama de Venn de las proteínas comunes y diferenciales para los distintos grupos.

Displasia versus Liquen plano oral				
Nº Identificación	Nombre	Grupo	Fold Change	p-Value
Q9NZT1	CALL5	Calmodulin-like protein 5	↑3,67147217	0,04209727
P59666	DEF3	Neutrophil defensin 3	↑3,09105131	0,00842083
P25398	RS12	40S ribosomal protein S12	↑2,93569729	0,02597155
P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	↑2,32144942	0,04992188

P11142	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	↑1,28830496	0,01192167
P84085	ARF5	ADP-ribosylation factor 5	↓0,3495862	0,00075849
P00326	ADH1G	Alcohol dehydrogenase 1C	↓0,26437046	0,04394936

Tabla 8. Proteínas desreguladas con diferencia significativa presentes en la displasia epitelial oral frente al liquen plano oral.

Después del análisis estadístico, se realizó un análisis de agrupamiento mediante un Heat Map.

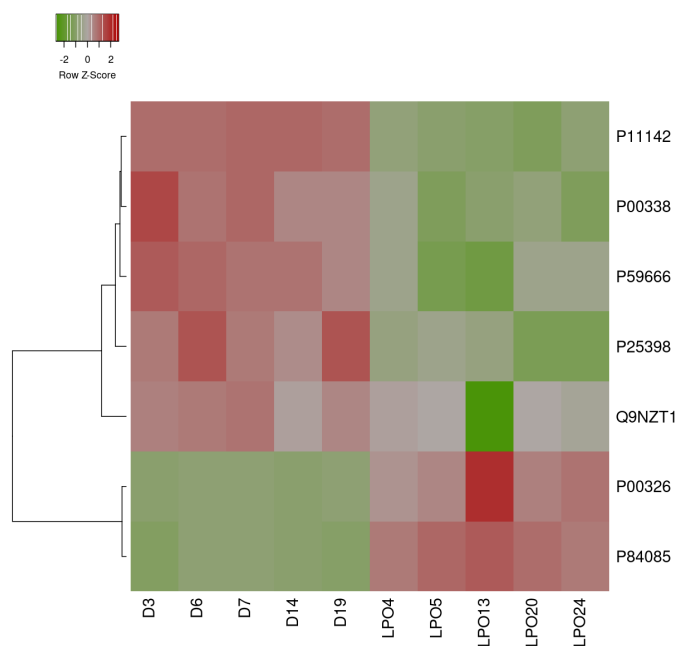


Imagen 3. Representación de las proteínas desreguladas mediante un HeatMap entre la displasia y el liquen plano oral. Solo se representan las proteínas expresadas de manera significativamente diferente (≥ 2 fold y $p < 0.05$). Las columnas representan cada biopsia y las filas representan las proteínas individuales. Las intensidades de expresión de las proteínas se transformaron mediante logaritmo en base 10 y se muestran como colores desde rojo hasta verde.

DISPLASIA to LPO

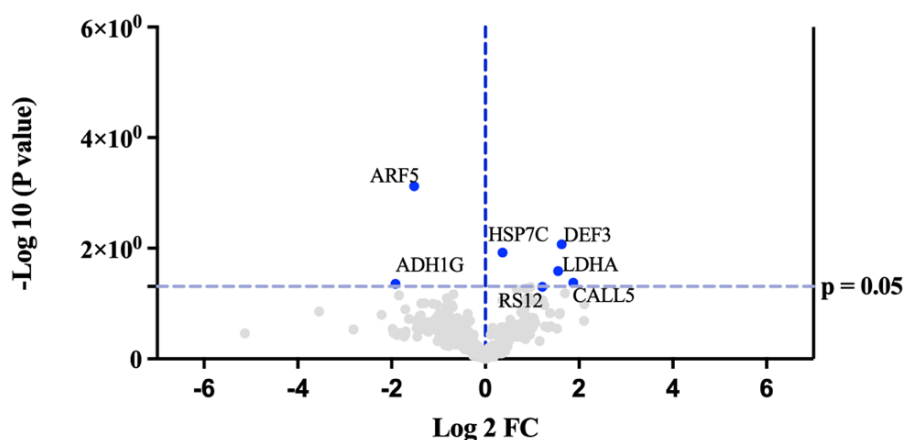


Imagen 4. Gráfico de tipo volcano plot para representar las proteínas expresadas con una diferencia significativa entre la displasia y el liquen plano oral. Las proteínas que muestran una expresión significativa se sitúan por encima de la línea de puntos y se destacan en color azul. Aquellas proteínas que están sobreexpresadas se encuentran en el lado derecho del gráfico, mientras que las proteínas subexpresadas se localizan en el lado izquierdo

Enfermedad liquenoide con displasia versus Displasia

Nº Identificación	Nombre	Grupo	Fold Change	p-Value
P61626	LYSC	Lysozyme C	↑2,23616748	0,02995364
P00326	ADH1G	Alcohol dehydrogenase 1C	↑2,07432141	0,04838922
P05141	ADT2	ADP/ATP translocase 2	↓0,74633286	0,04118929
P10809	CH60	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	↓0,64354415	0,03738072
P38117	ETFB	Electron transfer flavoprotein subunit beta	↓0,54923214	0,04157306
P12109	CO6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	↓0,46216011	0,01475636
P62241	RS8	40S ribosomal protein S8	↓0,42185334	0,03000387
P02452	CO1A1	Collagen alpha-1(I) chain	↓0,38784874	0,02816793
P08123	CO1A2	Collagen alpha-2(I) chain	↓0,38653382	0,01888723
P12111-4	CO6A3	Isoform 4 of Collagen alpha-3(VI) chain	↓0,38347873	0,03240337

P02461	CO3A1	Collagen alpha-1(III) chain	↓0,34185937	0,03449829
O95154	ARK73	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	↓0,29973751	0,00665579
P11177	ODPB	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	↓0,27361952	0,03263667
P13646	K1C13	Keratin, type I cytoskeletal 13	↓0,25060011	0,04208985
Q9UBG3	CRNN	Cornulin	↓0,23320355	0,04169095

Tabla 9. Proteínas desreguladas con diferencia significativa presentes en la enfermedad liquenoide oral con displasia frente a la displasia.

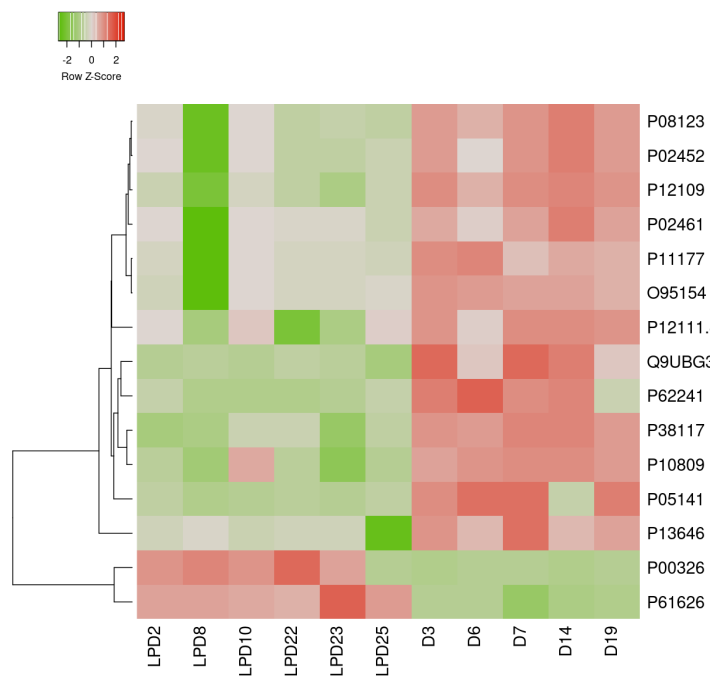


Imagen 5. Representación de las proteínas desreguladas mediante un HeatMap entre la enfermedad liquenoide oral con displasia y la displasia. Solo se representan las proteínas expresadas de manera significativamente diferente (≥ 2 fold y $p < 0.05$). Las columnas representan cada biopsia y las filas representan las proteínas individuales. Las intensidades de expresión de las proteínas se transformaron mediante logaritmo en base 10 y se muestran como colores desde rojo hasta verde.

Enfermedad liquenoide con displasia to Displasia

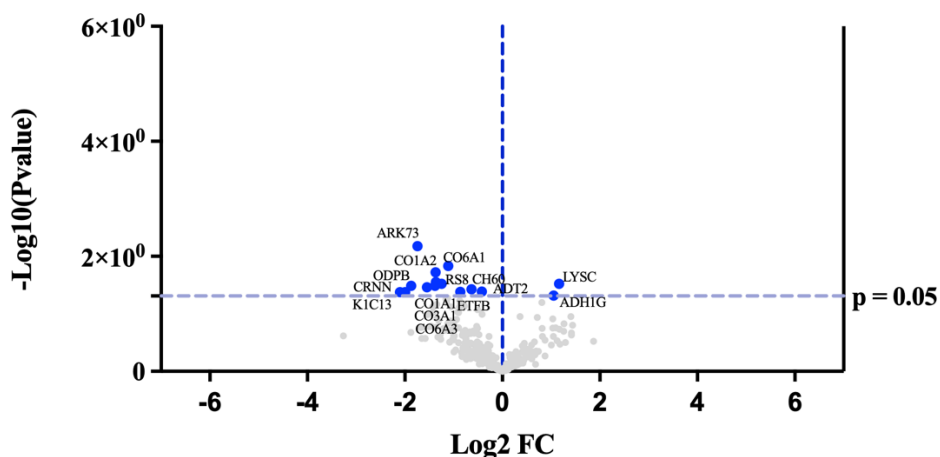


Imagen 6. Gráfico de tipo volcano plot para representar las proteínas expresadas con una diferencia significativa entre la enfermedad liquenoide con displasia y la displasia. Las proteínas que muestran una expresión significativa se sitúan por encima de la línea de puntos y se destacan en color azul. Aquellas proteínas que están sobreexpresadas se encuentran en el lado derecho del gráfico, mientras que las proteínas subexpresadas se localizan en el lado izquierdo

Enfermedad liquenoide con displasia versus Liquen plano oral				
Nº	Nombre	Grupo	Fold Change	p-Value
<i>Identificación</i>				
Q04695	K1C17	Keratin, type I cytoskeletal 17	↑4,12849854	0,04412299
Q15181	IPYR	Inorganic pyrophosphatase	↑1,69227691	0,04495249
P07305	H10	Histone H1.0	↓0,39785195	0,04483651
Q9P0M6	H2AW	Core histone macro-H2A.2	↓0,33362575	0,01433688
P05062	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B	↓0,31700307	0,01734892
Q01082	SPTB2	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	↓0,24513964	0,00284372
Q13423	NNTM	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	↓0,2431749	0,02073683
P30838	AL3A1	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	↓0,24294871	0,0489639
Q9UBG3	CRNN	Cornulin	↓0,13685878	0,01632886

Q9UBC9	SPRR3	Small proline-rich protein 3	↓0,11421431	0,03458425
P13646	K1C13	Keratin, type I cytoskeletal 13	↓0,0966017	0,02680421
P19013	K2C4	Keratin, type II cytoskeletal 4	↓0,04528017	0,03048403

Tabla 10. Proteínas desreguladas con diferencia significativa presentes en la enfermedad liquenoide oral con displasia frente al liquen plano oral.

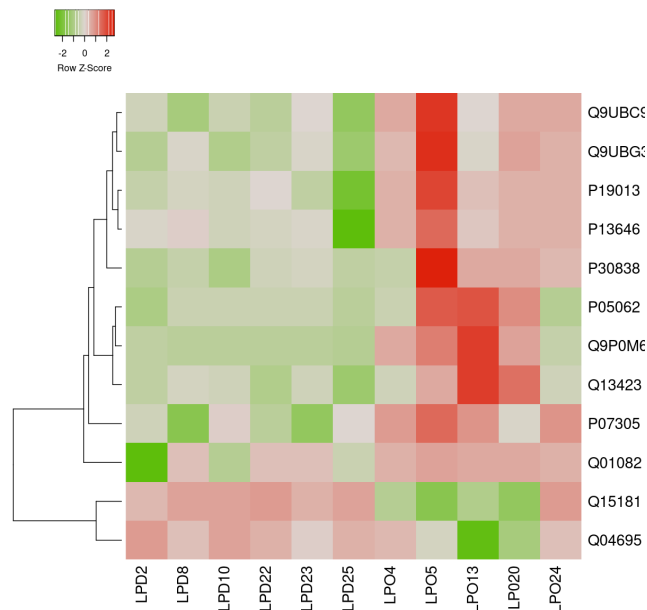


Imagen 7. Representación de las proteínas desreguladas mediante un HeatMap entre la enfermedad liquenoide oral con displasia y el liquen plano oral. Solo se representan las proteínas expresadas de manera significativamente diferente (≥ 2 fold y $p < 0.05$). Las columnas representan cada biopsia y las filas representan las proteínas individuales. Las intensidades de expresión de las proteínas se transformaron mediante logaritmo en base 10 y se muestran como colores desde rojo hasta verde.

Enfermedad liquenoide con displasia to Liquen plano

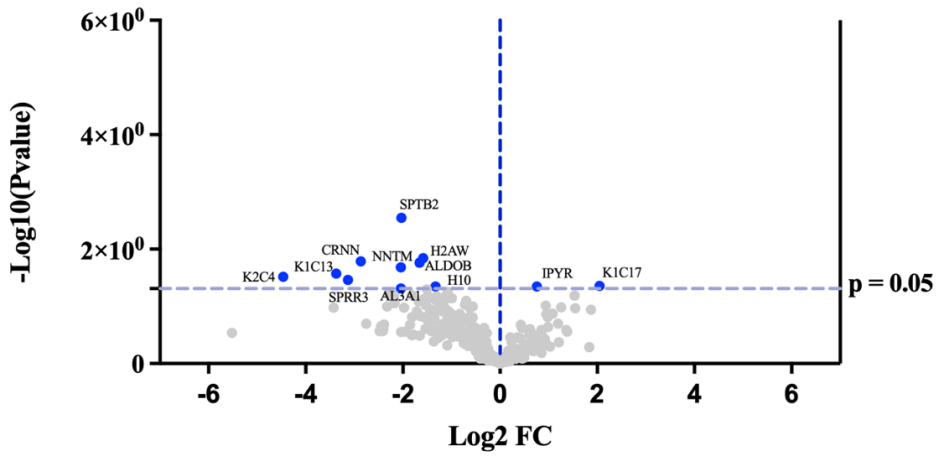


Imagen 8. Gráfico de tipo volcano plot para representar las proteínas expresadas con una diferencia significativa entre la enfermedad liquenoide oral con displasia y el liquen plano oral. Las proteínas que muestran una expresión significativa se sitúan por encima de la línea de puntos y se destacan en color azul. Aquellas proteínas que están sobreexpresadas se encuentran en el lado derecho del gráfico, mientras que las proteínas subexpresadas se localizan en el lado izquierdo

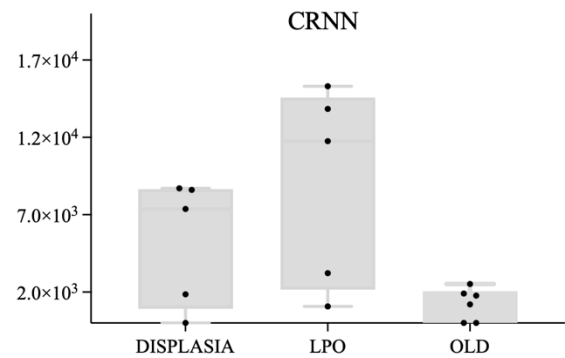
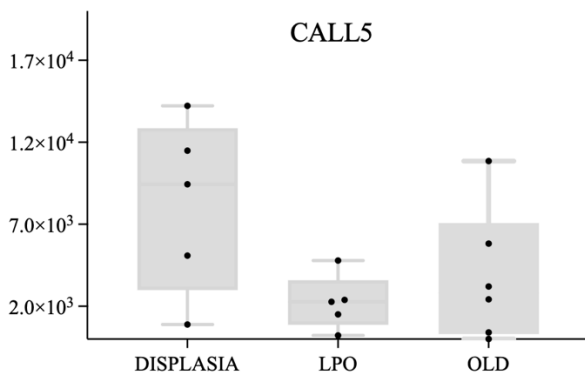
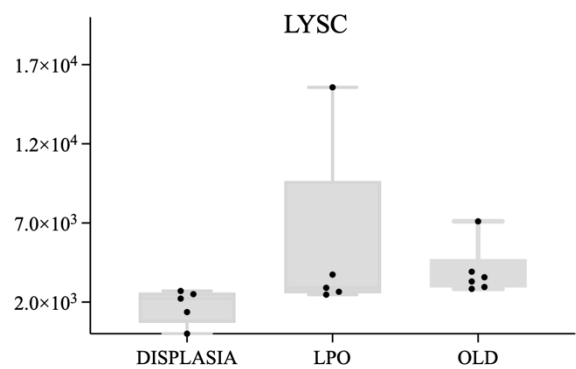
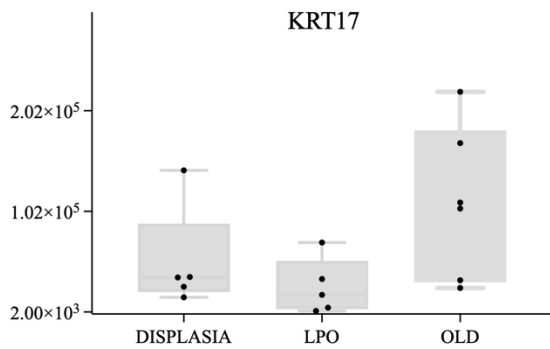


Imagen 9. Whisker plot del cambio porcentual basado en la cuantificación DIA. Las cajas muestran los cambios en la concentración de KRT17, LYSC, CALL5 y CRNN en cada uno de los tres grupos. Las barras de error superiores indican el percentil 90, y las barras de error inferiores representan el percentil 10, mientras que la línea central representa la mediana.

3. Análisis PCA

Los resultados obtenidos fueron además confirmados por el análisis PCA (imagen). En el PCA, los dos primeros componentes principales (PC) explicaron el 93,3% de la variación total, siendo el componente principal 1 (PC1) el 83.1% y el componente principal 2 (PC2) el 10.2%.

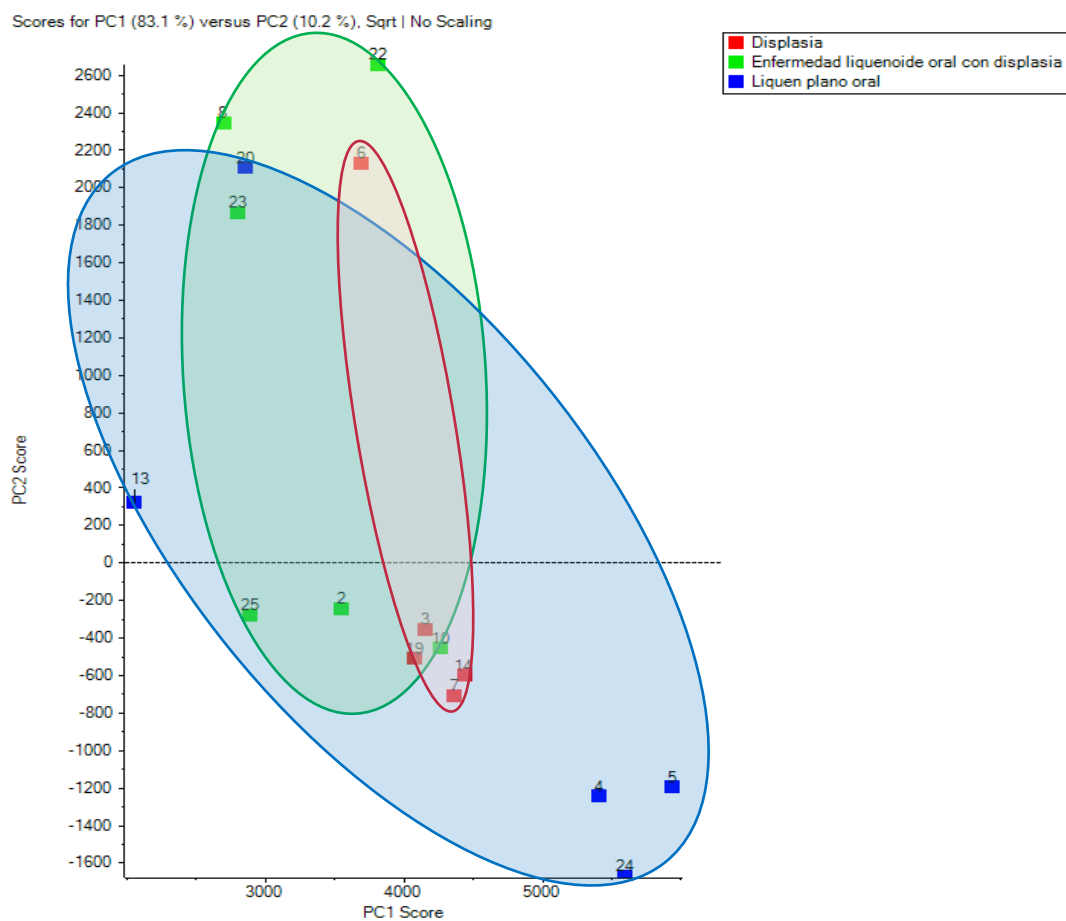


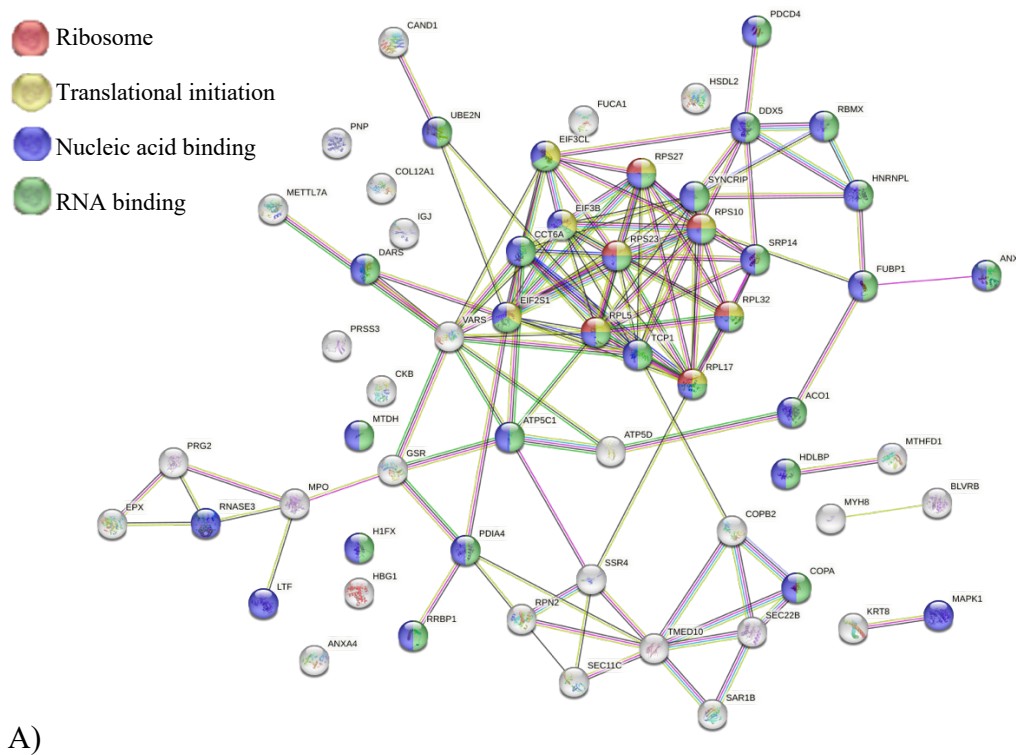
Imagen 1. Análisis de Componentes Principales en biopsias de tejido oral humano de diferentes tipos de lesiones (Displasia, LPO y Enfermedad liquenoide oral con displasia)

4. Vías biológicas y funciones moleculares de las proteínas desreguladas

Analizamos las funciones moleculares y las implicaciones biológicas para poder comprender la importancia de estas proteínas diferenciales y su posible implicación en la fisiopatología de la enfermedad.

A través del STRING, llevamos a cabo un análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas expresadas de manera diferencial en las diferentes comparaciones del estudio. En el análisis entre LPO y enfermedad liquenoide oral con displasia, se observó un mayor porcentaje de proteínas relacionadas con la unión a ácidos nucleicos, la unión a nucleótidos, los ribosomas y la iniciación de la traducción.

En cambio, en el análisis entre la enfermedad liquenoide oral con displasia y la displasia epitelial canónica se observó un mayor porcentaje de proteínas relacionadas con la estructura y función del tejido muscular, especialmente en el contexto del músculo estriado.



Discusión

En la actualidad, existe una falta de consenso significativa entre los investigadores sobre si la presencia de displasia en el liquen plano debe considerarse un criterio de exclusión en el diagnóstico y clasificación de esta enfermedad. Esta discrepancia plantea interrogantes y destaca la necesidad de abordar y debatir esta cuestión para lograr una mayor claridad en la evaluación clínica y el manejo del liquen plano con displasia. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su último consenso, ha decidido no incluir la displasia como un criterio de exclusión para el diagnóstico de LPO [12]. Esta posición sugiere que la presencia de displasia no necesariamente está relacionada con un mayor riesgo de transformación maligna en pacientes con LPO. Krutchkoff y Eisenberg, establecen una nueva entidad para definir las lesiones con patología liquenoide que también presentan características displásicas acuñando el término de displasia liquenoide oral para justificar la baja tasa de malignización del LPO [28]. La evidencia histológica de características liquenoides en biopsias de DEO y COCE es relativamente común, con un 20-30% de las lesiones mostrando características inflamatorias [37]. Para estos autores la presencia de características liquenoides no descarta un diagnóstico final de DEO. Esto está de acuerdo con la definición original de Krutchkoff, a pesar de que el desafortunado término "displasia liquenoide" para describirlo, enfatizando que *"el determinante crucial que permite separar la DEO del LPO es la presencia aditiva en la primera de características displásicas dentro del epitelio que la recubre"*[28].

Por otro lado, algunos expertos, como Farah et al. y Van der Meji et al., argumentan que la displasia puede estar presente en algunos casos de LPO y que debería considerarse como un criterio de exclusión [2, 13]. Estos expertos sostienen que la identificación de displasia en las lesiones de LPO es fundamental, ya que podría indicar un mayor riesgo de transformación maligna.

Sin embargo, González Moles et al. proponen una perspectiva diferente, afirmando que la displasia no debe ser considerada como un criterio de exclusión para el diagnóstico de LPO y que su presencia no aumenta el riesgo de transformación maligna [14]. Estos autores sugieren que la displasia podría ser una respuesta inflamatoria crónica en el epitelio oral y no necesariamente indicativa de malignidad.

Además, la Asociación Americana de Patología Oral y Maxilofacial (AAOPM) en su último consenso establece que la presencia de displasia debe ser un criterio de exclusión para el diagnóstico de LPO, y recomienda la evaluación histopatológica de las lesiones de LPO en busca de displasia y otras características histopatológicas [5]. Esta postura respalda la idea de que la displasia puede ser un indicador importante en la evaluación y el manejo de los pacientes con LPO.

La principal pregunta que se plantea en este estudio es si la presencia de displasia es un factor de exclusión del LPO o si, por el contrario, la displasia puede estar involucrada en los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de esta condición.

Para el mejor de nuestros conocimientos, este es el primer estudio que evalúa el perfil molecular proteómico comparativo y las vías moleculares asociadas del LPO, enfermedad liquenoide con displasia y DEO, junto con una rigurosa evaluación clínica y patológica de las lesiones, centrándose en la entidad controvertida de la enfermedad liquenoide con displasia. En este estudio de proteómica en tejidos orales, se investigó la similitud entre tres tipos de lesiones: leucoplasia displásica, liquen plano sin displasia y displasia oral con características liquenoides. El enfoque proteómico utilizado en este estudio proporciona una oportunidad para obtener información detallada sobre las proteínas desreguladas en las muestras. La cuantificación de estas proteínas podría arrojar luz sobre los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la displasia y contribuir a una mejor comprensión de esta condición.

En primer lugar, observamos similitudes significativas en los perfiles proteómicos de las leucoplasias displásicas y las lesiones de displasia oral con características liquenoides. Estos resultados respaldan la noción de que estas lesiones comparten mecanismos moleculares subyacentes y podrían representar una manifestación clínica y patológica similar en el espectro de las enfermedades orales potencialmente malignas. Estos hallazgos proporcionan una nueva perspectiva sobre las relaciones entre los diferentes tipos de lesiones orales y resaltan la importancia de considerar la displasia en el diagnóstico y manejo clínico del liquen plano oral.

Los resultados obtenidos en el análisis de enriquecimiento funcional entre el LPO y la enfermedad liquenoide oral con displasia se pueden observar proteínas relacionadas con distintos procesos biológicos principalmente relacionados con la síntesis de proteínas y la regulación de la expresión génica. Estas vías pueden conllevar a la alteración de la traducción de proteínas, la regulación anómala de genes específicos y la desregulación de la síntesis y procesamiento del ARN [38].

Cambios en la actividad de los ribosomas y en los procesos de iniciación de la traducción pueden influir en la producción de proteínas relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis celular, el control del crecimiento y diferenciación de los tejidos. Cambios en la unión de los ácidos nucleicos o del ARN pueden afectar la estabilidad y función de los ARN mensajeros. Esto puede provocar cambios en la expresión de los genes y en la forma en que las células responden a las señales del entorno y a la respuesta celular [38].

Por otra parte, al observar los resultados obtenidos con el análisis de enriquecimiento funcional entre la displasia y la enfermedad liquenoide oral con displasia son proteínas relacionadas con el tejido muscular, más concretamente, con tejido muscular estriado. También destacan proteínas relacionadas con el estrato córneo que hacen referencia a la capa de proteínas que se forma en la superficie de ciertos tejidos como la piel, podría indicar posibles alteraciones en la diferenciación y maduración de las células epiteliales. Estudios previos donde se analizaron los genes presentes en mucosa oral normal, liquen sin displasia y lesiones liquenoides con displasia revelan que existen genes sobreexpresados en lesiones liquenoides con displasia relacionados con la contracción muscular y con el citoesqueleto de actina [39].

De acuerdo con la información previamente expuesta, y habiendo observado un número significativamente mayor de proteínas comunes entre LPO y la enfermedad liquenoide oral, existe una fuerte indicación de que el liquen plano podría tener la capacidad de desarrollar displasia, por lo que se sugiere no considerar esta como un criterio de exclusión. Encontramos también que algunas lesiones de displasia oral exhibían características típicas de liquen plano, lo que indica que la presencia de displasia no debe descartar la posibilidad de un diagnóstico concurrente de liquen plano oral. Estos hallazgos tienen implicaciones clínicas importantes, ya que destacan la necesidad de considerar tanto la presencia de displasia como las características clínicas y patológicas del liquen plano al evaluar y diagnosticar las lesiones orales. Estos hallazgos están respaldados por estudios previos que han demostrado que tanto el liquen plano oral como la displasia oral comparten cambios moleculares similares, como la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias y la activación de vías de señalización inflamatorias, incluida la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B) [40].

Además, nuestros resultados respaldan la interpretación de la displasia oral con características liquenoides como una entidad distinta. La similitud en los perfiles proteómicos entre las leucoplasias displásicas y las lesiones de displasia oral con características liquenoides, en contraste

con las características proteómicas del liquen plano sin displasia, sugiere que estas lesiones representan subgrupos diferenciados dentro del espectro de las enfermedades orales. Esta distinción es importante para un enfoque de tratamiento y seguimiento más adecuado, ya que la presencia de características liquenoides en la displasia oral puede tener implicaciones clínicas y pronósticas diferentes a las lesiones de liquen plano sin displasia. El uso de estas designaciones indicaría hallazgos histológicos importantes para el clínico, quien a su vez debe correlacionarlos con la presentación clínica y tomar decisiones de manejo terapéutico apropiadas. La clasificación de Krutchkoff de las lesiones liquenoides por desgracia tuvo en cuenta consideraciones clínicas, a pesar de reconocer que "*si los diagnósticos no son confiables, las conclusiones posteriores sobre el comportamiento, tratamiento o pronóstico de las lesiones en cuestión tienen poco o ningún valor*"[28].

Estudios anteriores han identificado cambios en la expresión de diversas proteínas en las leucoplasias displásicas, como p53, ciclina D1 y Bcl-2, que están involucradas en la regulación del ciclo celular y la apoptosis [39]. Además, se ha informado sobre la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la inflamación y la respuesta inmune en las lesiones de displasia oral con características liquenoides, como interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) [8]. Estas similitudes en los perfiles proteómicos respaldan la hipótesis de que la displasia oral con características liquenoides puede ser una variante dentro del espectro de las leucoplasias displásicas. Por otro lado, existe evidencia de que la pérdida de heterocigosidad (LOH) en 9p21, 3p o 17p en lesiones premalignas puede estratificar las lesiones en aquellas de bajo riesgo y alto riesgo de transformación maligna. Cuando se investigó la LOH en condiciones liquenoides, solo el 6% de LPO mostró LOH en comparación con la displasia leve (40%) y la hiperplasia (14%). Sin embargo, OLD (identificado por Zhang et al. como lesiones con displasia epitelial, así como características liquenoides destacadas) mostró una tasa aún más alta de LOH que la OED clásica (54%) [41].

Sin embargo, es importante destacar que este estudio tiene limitaciones y desafíos inherentes. La complejidad de los perfiles proteómicos, la variabilidad interindividual y la necesidad de validar los hallazgos en cohortes más grandes son aspectos que deben abordarse. Los resultados obtenidos podrían tener implicaciones clínicas significativas al proporcionar una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes y permitir una evaluación más precisa del riesgo de transformación maligna en pacientes con LPO.

En conclusión, este estudio de proteómica en tejidos proporciona una evidencia sólida de una relación más estrecha entre las leucoplasias con displasia y la displasia oral con características liquenoides. Nuestros hallazgos respaldan la idea de que la displasia no debe ser un criterio de exclusión para el diagnóstico del liquen plano oral y destacan la importancia de interpretar la displasia oral con características liquenoides como una entidad clínica y patológica distinta. Estos resultados tienen implicaciones significativas para la práctica clínica, al subrayar la necesidad de una evaluación integral de las características clínicas, patológicas y moleculares al diagnosticar y abordar las lesiones orales.

Conclusiones

1. El estudio proteómico cualitativo nos permite obtener información detallada sobre la composición proteica de las biopsias analizadas.
2. El estudio proteómico cuantitativo nos permite obtener además de la identificación de las proteínas, cuantificar su abundancia relativa en cada muestra.
3. El conjunto de datos obtenidos en el presente estudio permite asociar la displasia oral con características liquenoides a la displasia epitelial oral canónica en mayor medida que al liquen plano con ausencia de displasia a nivel histopatológico.
4. Los resultados resaltan la relevancia de la identificación de la displasia epitelial en las lesiones del espectro liquenoide por su relación molecular con las lesiones displásicas con potencial maligno. Esta caracterización permitirá guiar su seguimiento en aras de controlar su potencial carcinogénico de una manera más precisa.
5. Desde un punto de vista molecular proteómico no se debería tomar la existencia de displasia epitelial como un criterio de exclusión para el diagnóstico histopatológico del liquen plano

Bibliografía

- [1]. Carrozzo M, Porter S, Mercadante V, Fedele S. Oral lichen planus: A disease or a spectrum of tissue reactions? Types, causes, diagnostic algorithms, prognosis, management strategies. *Periodontol* 2000. 2019 Jun;80(1):105-125. doi: 10.1111/prd.12260. PMID: 31090143.
- [2]. Farah CS, Fox S, Shearston K, Newman L, Babic S, Vacher M. Lichenoid dysplasia is not a distinct pathological entity. *Oral Oncol.* 2021 Jul;119:105362. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105362. Epub 2021 May 6. PMID: 33965895
- [3]. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Aug;100(2):164-78. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.06.076. PMID: 16037774.
- [4]. Li C, Tang X, Zheng X, Ge S, Wen H, Lin X, Chen Z, Lu L. Global Prevalence and Incidence Estimates of Oral Lichen Planus: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol.* 2020 Feb 1;156(2):172-181. doi: 10.1001/jamadermatol.2019.3797. PMID: 31895418; PMCID: PMC6990670.
- [5]. Cheng YSL, Gould A, Kurago Z, Fantasia J, Muller S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016 Sep;122(3):332-354. doi: 10.1016/j.oooo.2016.05.004. PMID: 27422525.
- [6]. González-Moles MÁ, Ruiz-Ávila I, González-Ruiz L, Ayén Á, Gil-Montoya JA, Ramos-García P. Malignant transformation risk of oral lichen planus: A systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncol.* 2019 Sep;96:121-130. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.07.012. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31422203.
- [7]. Le Cleach L, Chosidow O. Clinical practice. Lichen planus. *N Engl J Med.* 2012 Feb 23;366(8):723-32. doi: 10.1056/NEJMcp1103641. PMID: 22356325.
- [8]. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, et al. The Pathogenesis of Oral Lichen Planus. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 2002;13(4):350-365. doi:10.1177/154411130201300405

- [9]. González-Moles MÁ, Warnakulasuriya S, González-Ruiz I, González-Ruiz L, Ayén Á, Lenouvel D, Ruiz-Ávila I, Ramos-García P. Worldwide prevalence of oral lichen planus: A systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2021 May;27(4):813-828. doi: 10.1111/odi.13323. Epub 2020 Apr 2. PMID: 32144836.
- [10]. Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Jan;46(1):15-21. doi: 10.1016/j.bjoms.2007.07.199. Epub 2007 Sep 5. PMID: 17822813.
- [11]. Khan A, Farah CS, Savage NW, Walsh LJ, Harbrow DJ, Sugerman PB. Th1 cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2003 Feb;32(2):77-83. doi: 10.1034/j.1600-0714.2003.00077.x. PMID: 12542829.
- [12]. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, Lodi G, Mello FW, Monteiro L, Ogden GR, Sloan P, Johnson NW. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis.* 2021 Nov;27(8):1862-1880. doi: 10.1111/odi.13704. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33128420.
- [13]. Van Der Meij EH, Van Der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med.* 2003 Oct;32(9):507-12. doi: 10.1034/j.1600-0714.2003.00125.x. PMID: 12919181
- [14]. González-Moles MA, Ramos-García P. Oral lichen planus and related lesions. What should we accept based on the available evidence? *Oral Dis.* 2022 Nov 12;doi: 10.1111/odi.14438. Epub ahead of print. PMID: 36371653.
- [15]. Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis.* 2021 Nov;27(8):1947-1976. doi: 10.1111/odi.13993. Epub 2021 Sep 14. PMID: 34418233.
- [16]. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med.* 2008 Mar;37(3):127-33. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00584.x. PMID: 18251935.

- [17]. Bagán-Sebastián JV, Milián-Masanet MA, Peñarrocha-Diago M, Jiménez Y. A clinical study of 205 patients with oral lichen planus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992;50:116-8. doi:10.1016/0278-2391(92)90354-3
- [18]. Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian JV, Thongprasom K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis.* 2005;11:338-49. doi:10.1111/j.1601-0825.2005.01142.x PMID:16269024
- [19]. Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010;28:100-8.
- [20]. González-Moles MA, Scully C. Vesiculo-erosive oral mucosal disease--management with topical corticosteroids: (1) Fundamental principles and specific agents available. *J Dent Res.* 2005 Apr;84(4):294-301. doi: 10.1177/154405910508400401. PMID: 15790732.
- [21]. González-Moles MA, Scully C. Vesiculo-erosive oral mucosal disease--management with topical corticosteroids: (2) Protocols, monitoring of effects and adverse reactions, and the future. *J Dent Res.* 2005 Apr;84(4):302-8. doi: 10.1177/154405910508400402. PMID: 15790733.
- [22]. Van Der Meij EH, Van Der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med.* 2003 Oct;32(9):507-12. doi: 10.1034/j.1600-0714.2003.00125.x. PMID: 12919181
- [23]. González-Moles MÁ, Ramos-García P, Warnakulasuriya S. An appraisal of highest quality studies reporting malignant transformation of oral lichen planus based on a systematic review. *Oral Dis.* 2021 Nov;27(8):1908-1918. doi: 10.1111/odi.13741. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33274561.
- [24]. Woo SB. Oral Epithelial Dysplasia and Premalignancy. *Head Neck Pathol.* 2019 Sep;13(3):423-439. doi: 10.1007/s12105-019-01020-6. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30887394; PMCID: PMC6684678.
- [25]. Idrees M, Shearston K, Farah CS, Kujan O. Immunoexpression of oral brush biopsy enhances the accuracy of diagnosis for oral lichen planus and lichenoid lesions. *J Oral Pathol Med.* 2022

Jul;51(6):563-572. doi: 10.1111/jop.13301. Epub 2022 May 11. PMID: 35460123; PMCID: PMC9542982.

[26]. Hellquist H, Cardesa A, Gale N, Kambic V, Michaels L. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathology*. 1999 Mar;34(3):226-33. doi: 10.1046/j.1365-2559.1999.00581.x. PMID: 10217563.

[27]. 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 Nov;42(10):987-93. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.12.014. Epub 2006 May 30. PMID: 16731030.

[28]. Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985 Sep;60(3):308-15. doi: 10.1016/0030-4220(85)90315-9. PMID: 3862044.

[29]. Rock LD, Laronde DM, Lin I, Rosin MP, Chan B, Shariati B, Zhang L. Dysplasia Should Not Be Ignored in Lichenoid Mucositis. *J Dent Res*. 2018 Jul;97(7):767-772. doi: 10.1177/0022034517748639. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29328891; PMCID: PMC6728589.

[30]. Patil S, Rao RS, Sanketh DS, Warnakulasuriya S. Lichenoid dysplasia revisited - evidence from a review of Indian archives. *J Oral Pathol Med*. 2015 Aug;44(7):507-14. doi: 10.1111/jop.12258. Epub 2014 Sep 15. PMID: 25224597.

[31]. García-Vence M, Chantada-Vázquez MDP, Cameselle-Teijeiro JM, Bravo SB, Núñez C. A Novel Nanoproteomic Approach for the Identification of Molecular Targets Associated with Thyroid Tumors. *Nanomaterials (Basel)*. 2020 Nov 28;10(12):2370. doi: 10.3390/nano10122370. PMID: 33260544; PMCID: PMC7761166.

[32]. Azimzadeh O, Barjaktarovic Z, Aubele M, Calzada-Wack J, Sarioglu H, Atkinson MJ, Tapio S. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) proteome analysis using gel-free and gel-based proteomics. *J Proteome Res*. 2010 Sep 3;9(9):4710-20. doi: 10.1021/pr1004168. PMID: 20604508.

- [33]. Giusti L, Lucacchini A. Proteomic studies of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Expert Rev Proteomics*. 2013 Apr;10(2):165-77. doi: 10.1586/epr.13.3. PMID: 23573783.
- [34]. Waterborg JH, Matthews HR. The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:1-4. doi: 10.1385/0-89603-268-X:1. PMID: 7951715.
- [35]. Chantada-Vázquez MDP, García Vence M, Serna A, Núñez C, Bravo SB. SWATH-MS Protocols in Human Diseases. *Methods Mol Biol*. 2021;2259:105-141. doi: 10.1007/978-1-0716-1178-4_7. PMID: 33687711.
- [36]. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996 Mar 1;68(5):850-8. doi: 10.1021/ac950914h. PMID: 8779443.
- [37]. Dost F, Le Cao KA, Ford PJ, et al. A retrospective analysis of clinical features of oral malignant and potentially malignant disorders with and without oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;116(6):725–33.)
- [38]. de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*. 2009 Dec;5(12):1512-26. doi: 10.1039/b908315d. Epub 2009 Oct 1. PMID: 20023718; PMCID: PMC4089977.
- [39]. Xie F, Gleue CA, Deschaine M, Dasari S, Sartori-Valinotti JC, Charlesworth MC, Meves A, Lehman JS. Differential proteomic expression in indolent versus transforming oral lichen planus. *Exp Dermatol*. 2023 Apr;32(4):502-510. doi: 10.1111/exd.14738. Epub 2023 Jan 10. PMID: 36587284.
- [40]. González-Moles MÁ, Warnakulasuriya S, González-Ruiz I, Ayén Á, González-Ruiz L, Ruiz-Ávila I, Ramos-García P. Dysplasia in oral lichen planus: relevance, controversies and challenges. A position paper. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2021 Jul 1;26(4):e541-e548. doi: 10.4317/medoral.24610. PMID: 34162824; PMCID: PMC8254877.
- [41]. Zhang L, Cheng X, Li Y, Poh C, Zeng T, Priddy R, Lovas J, Freedman P, Daley T, Rosin MP. High frequency of allelic loss in dysplastic lichenoid lesions. *Lab Invest*. 2000 Feb;80(2):233-7. doi: 10.1038/labinvest.3780026. PMID: 10701692.