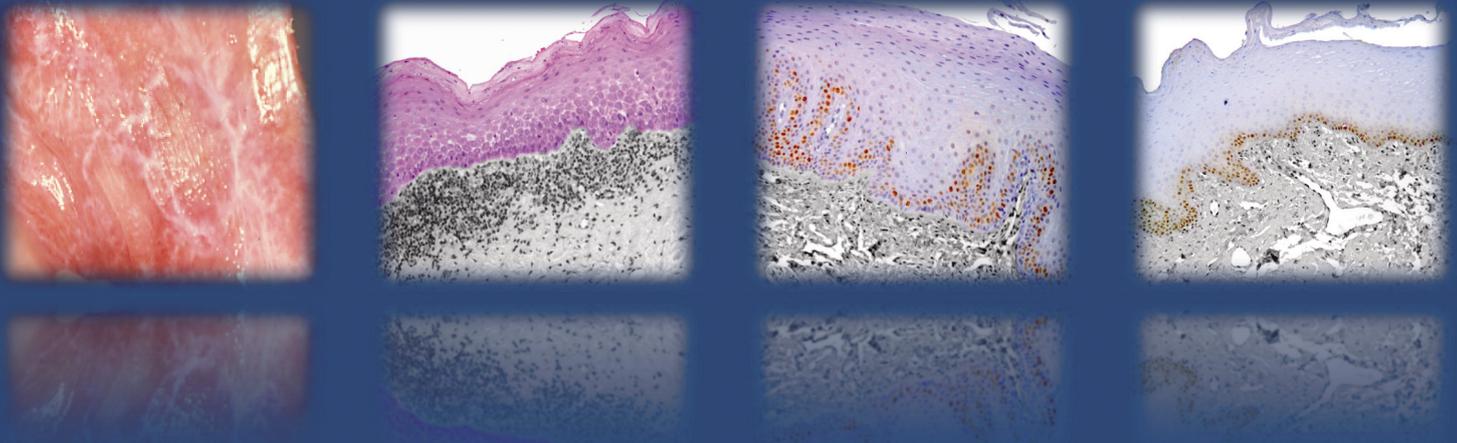




Universidad Euskal Herriko  
del País Vasco Unibersitatea

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Immunología, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila



# Análisis Histológico e Inmunohistoquímico de los Subtipos de Enfermedad Liquenoide Oral

Dionisio Alejandro Cortés Ramírez

Tesis Doctoral

2012





Universidad del País Vasco      Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología**  
**Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila**

# **Análisis Histológico e Inmunohistoquímico de los Subtipos de Enfermedad Liquenoide Oral**

Trabajo dirigido por:

***José Manuel Aguirre Urizar***

***María José Rodríguez Tojo***

Para optar por el Grado de Doctor de:

**Dionisio Alejandro Cortés Ramírez**

2012



***A mi esposa y mi hija...***



## **Agradecimientos**

*A mi familia,*

*A mi mujer Coralia, mi mayor apoyo personal e incondicional, y motivación en todo el camino recorrido durante este proyecto, el cual algunas veces a sido difícil de afrontar por múltiples circunstancias, pero has sabido hacerlo llevadero tanto para mí como para ti, lo mínimo que puedo decir es que estoy inmensa e infinitamente agradecido, sin ti y nuestra hija Ximena en camino, este momento no tendría el mismo significado.*

*A mis Padres, gracias por todo el apoyo en todos los sentidos... Jamás se los podré agradecer lo suficiente, desde el inicio de mi formación universitaria hasta el día de hoy. Ahora aunque lejos, ustedes han estado presentes siempre en este proyecto... Este trabajo forma parte de su esfuerzo.*

*A los que han contribuido directamente en mi formación en este fascinante campo de la Patología y Medicina Oral,*

*Al Prof. José Manuel Aguirre Urizar, siempre le estaré inmensamente agradecido por todas sus enseñanzas, su interés, confianza, paciencia e implicación, y por servir de guía en este proyecto, el cual algunas veces parecía no tener final... Por su gran dedicación en nuestra enseñanza, de la que espero seguir aprendiendo por mucho tiempo. Agradecerle sus consejos personales que en muchas ocasiones me han ayudado a tomar decisiones que han repercutido positivamente en muchos aspectos..., solo puedo decirle muchas gracias!!*

*A María José Rodríguez Tojo, agradecerle toda su ayuda tanto en la formación de laboratorio como en la metodología, y sobretodo su paciencia, cuando entré en este proyecto, la realización de inmunohistoquímica me parecía todo un mundo... Gracias a ella he aprendido; y por supuesto por participar en la co-tutoría de este trabajo. Muchas gracias por todo!!*

*A todos mis profesores del Master de Patología Oral, del departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Ocuparía toda una página al mencionar a cada uno de ellos. Sin excepción de alguno, agradecerles inmensamente toda su colaboración y ayuda en este trabajo*

*y, sobretodo por el apoyo brindado en la toma de muestras, asesoría y en muchas otras cosas del día a día durante mi formación...*

*A mis compañeros del departamento de genética, Ameli, Xabi, Natalia. En especial a Ameli.. Muchas gracias por toda tu ayuda en mi formación, en la estadística, en la informática... sobretodo en esto último!!. Muchas gracias!!*

*A mis compañeros de promoción María Luisa y Juan Carlos, qué les puedo decir..., siempre les estaré inmensamente agradecido por su amistad y la ayuda brindada en este trabajo, tanto cuando estuve como cuando no estuve ahí..., siempre estaré agradecido por todo ello!!. A Marcelo Ortega, muchas gracias por toda tu ayuda en la parte artística y creativa de este estudio!!*

*A los que han participado indirectamente en mi formación en esta especialidad,*

*Al Prof. Ricardo Fierro Murga, quien ha contribuido enormemente en mi formación universitaria, impulsándome y motivándome a que seguir este camino para continuar mi formación en la Patología y Medicina Oral.*

*Al Prof. Miguel Ángel González Moles, por haber sido la persona que me diera a conocer de manera interesante este campo de la odontología durante mi estancia en Granada hace ya algún tiempo... Y sobre todo, que gracias a ello tomé la decisión de dedicarme a esta fascinante especialidad.*

*Al Prof. Alejandro Ceballos Salobreña, por toda su ayuda para involucrarme en la Medicina Oral, así como por su motivación, apoyo profesional y muchas más veces personal. Simplemente gracias!!.*

## ABREVIATURAS

- ADN.-** Ácido desóxirribonucleico
- AINE´s.-** Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
- AMPc.-** Adenosín monofosfato cíclico
- A-T.-** Adenina-Timina
- C1.-** Lesiones clínicas solo papulares reticulares
- C2.-** Lesiones clínicas papulares reticulares con otro tipo de lesiones
- CCC.-** Carcinoma escamoso de cabeza y cuello
- CD31 y PCAM-1.-** Molécula de adhesión plaquetaria endotelial
- COCE.-** Carcinoma oral de células escamosas
- COX-2.-** Enzima ciclooxigenasa-2
- DAB.-** 3,3´diaminobenzidina-hidroclorídico
- DH.-** Dermatitis herpetiforme
- EGF.-** Factor de crecimiento epidérmico
- EGFR.-** Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- EGFRvIII.-** Receptor del factor de crecimiento epidérmico mutado
- EICH.-** enfermedad injerto contra huésped
- ELIgA.-** Enfermedad por depósito lineal de IgA
- ELO.-** Enfermedad liquenoide oral
- eNOS.-** Óxido nítrico sintetasa endotelial
- EUC.-** Estomatitis ulcerativa crónica
- G-C.-** Guanina-Timina
- GDC.-** Gingivitis descamativa crónica
- HC.-** Histológicamente compatible con liquen plano
- HT.-** Histológicamente típico de liquen plano
- IL.-** Interleucinas
- iNOS.-** Óxido nítrico sintetasa inducible
- LE.-** Lupus eritematoso
- LLO.-** Lesión liquenoides oral
- LLOR.-** Lesiones liquenoides oral reactiva
- LPM.-** Liquen plano mucoso
- LPO.-** Liquen plano oral

**LPOMC.**- Liquefación oral mucocutánea  
**LTCD4.**- Linfocitos T CD4  
**LTCD8.**- Linfocitos T CD8  
**MDV.**- Microdensidad vascular  
**MGMT.**- O<sup>6</sup>-Metilguanina-ADN Metiltransferasa  
**MMP-9.**- Metaloproteínasa-9  
**MY.**- Mucosa yugal  
**NF-κB.**- factor nuclear kappa Beta  
**nNOS.**- Óxido nítrico sintetasa neural  
**NO.**- Óxido nítrico  
**O<sup>6</sup>MetG.**- O<sup>6</sup>-Metilguanina  
**PAS.**- Ácido periódico de Schiff  
**PG.**- Prostaglandina  
**PGE2.**- Prostaglandina-E2  
**PM.**- Pénfigoide benigno mucoso  
**PMN.**- Polimorfonucleares  
**PV.**- Pénfigo vulgar  
**RNA<sub>m</sub>.**- Ácido ribonucleico mensajero  
**RANTES.**- Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted  
**TGF-α.**- Tumor de necrosis tumoral alfa  
**TIMP's.**- Inhibidores tisulares de metaloproteínasa  
**VEGF.**- Factor de crecimiento endotelial vascular  
**VnF.**- Vasos de neoformación

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Hipótesis.....	7
1.2. Objetivos.....	8
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
2.1. Liqueen Plano Oral (LPO).....	11
2.2. Lesiones Liquenoides Orales (LLO).....	13
2.3. Inflamación crónica y carcinogénesis.....	15
2.4. Ciclooxygenasa-2 (COX-2).....	17
2.5. Óxido Nítrico Sintetasa inducible (iNOS).....	19
2.6. Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR).....	21
2.7. Enzima O <sup>6</sup> -Metilguanina-ADN Metiltransferasa (MGMT).....	23
2.8. Metaloproteinasa-9 (MMP-9).....	25
2.9. CD31 (PCAM-1).....	26
2.10. Gen Supresor de tumor p53.....	28
2.11. Marcador de proliferación celular Ki-67 (MIB-1).....	30
<b>3. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1. Pacientes.....	33
3.1.1. Controles.....	33
3.1.2. Criterios de selección de pacientes.....	34
3.1.3. Grupos de estudio.....	37
3.2. Materiales.....	37
3.3. Métodos.....	38
3.3.1. Procedimiento histológico.....	38
3.3.2. Procedimiento inmunohistoquímico.....	39
3.3.3. Valoración.....	40
3.3.3.1. Valoración histológica.....	40
3.3.3.2. Valoración inmunohistoquímica.....	41
3.4. Análisis estadístico.....	44
3.5. Búsqueda bibliográfica.....	45

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1. Aspectos clínicos generales.....	47
4.2. Aspectos histológicos generales.....	47
4.3. Grupos clínicos.....	49
4.4. Grupos histológicos.....	54
4.5. Expresión de COX-2.....	60
4.6. Expresión de iNOS.....	69
4.7. Expresión de EGFR.....	74
4.8. Expresión de MGMT.....	79
4.9. Expresión de MMP-9.....	85
4.10. Expresión de CD31.....	90
4.11. Expresión de p53.....	94
4.12. Expresión de Ki-67.....	98
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
5.1. En relación con los aspectos clínico-patológicos.....	103
5.2. En relación con la expresión de COX-2.....	106
5.3. En relación con la expresión de iNOS.....	111
5.4. En relación con la expresión de EGFR.....	116
5.5. En relación con la expresión de MGMT.....	121
5.6. En relación con la expresión de MMP-9.....	125
5.7. En relación con la expresión de CD31.....	128
5.8. En relación con la expresión de p53.....	131
5.9. En relación con la expresión de Ki-67.....	135
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>141</b>

**“Para el logro del triunfo, siempre ha sido indispensable pasar por la senda de los sacrificios...”**

**Simón Bolívar**



## 1. INTRODUCCIÓN

Clásicamente se considera al “Liquen Plano Oral” (LPO) como un desorden potencialmente maligno de la mucosa oral de carácter inflamatorio, curso crónico y probable origen autoinmune; que aparece hasta en el 2% de la población, y afecta principalmente a mujeres perimenopáusicas <sup>1-4</sup>.

En 2008 el Profesor José Manuel Aguirre <sup>5</sup> propuso una nueva nomenclatura y clasificación para los procesos orales que muestran característicamente “pápulas blancas reticulares en la mucosa oral”, a los que agrupó bajo la denominación de “Enfermedad Liquenoide Oral” (ELO). La ELO incluye a distintos procesos de base inmunológica que muestran características clínicas e histopatológicas similares pero tiene una distinta etiología y, lo que es más importante un variable riesgo de transformación maligna <sup>5,6</sup>. Los distintos procesos o subtipos incluidos en la ELO son: el liquen plano mucocutáneo (LPOMC), el liquen plano mucoso (LPM), el liquen plano oral (LPO), las lesiones liquenoides orales reactivas (LLOR) y las lesiones liquenoides orales idiopáticas (LLO) <sup>5</sup>.

La “pápula blanca lineal”, como lesión mucosa, es el nexo fundamental entre los distintos subtipos de la ELO, mostrando un patrón clásico lineal reticular. Generalmente estas lesiones son asintomáticas, aunque cuando se acompañan de lesiones atróficas, erosivas y ulcerativas, suele existir dolor y escozor siendo generalmente el motivo de consulta <sup>3,7</sup>.

Las localizaciones más frecuentes de estos procesos son la mucosa yugal, la lengua (dorso y bordes laterales), la encía (en forma de gingivitis descamativa crónica) y la mucosa de los labios (en ocasiones se extiende al bermellón) <sup>3</sup>. Las lesiones clínicas suelen presentar un patrón bilateral y simétrico característico en los casos típicos de liquen plano oral <sup>2,3,8</sup>.

La etiología de estos procesos es todavía desconocida, aunque existe un acuerdo general en considerarlos “procesos autoinmunes” en los que participan de manera importante los linfocitos T. Se ha reconocido un acumulo

de linfocitos TCD8 citotóxicos (LTCD8) y linfocitos TCD4 colaboradores (LTCD4) en la lámina propia y en la submucosa superficial. Estos linfocitos son activados por diferentes mecanismos antigénicos y producen degeneración de la capa basal con apoptosis de los queratinocitos, y destrucción de la membrana basal, promoviendo las lesiones clínicas<sup>3,9-11</sup>.

La imagen histológica clásica, más no patognomónica del LPO, es la de un epitelio mucoso en general adelgazado y con hiperqueratosis, que muestra un infiltrado inflamatorio crónico predominantemente linfocitario en el corion con disposición “en banda”, unido a la presencia de degeneración de células basales y siempre en ausencia de displasia epitelial<sup>8,12,13</sup>. Aunque no existe un aspecto histológico típico para las LLO, pudiendo no ser distinta de la imagen clásica descrita para el LPO, se ha descrito que la presencia de un infiltrado inflamatorio crónico más profundo, así como la presencia de células plasmáticas, o inflamación perivascular serían datos sugestivos de LLO y no de LPO<sup>13-16</sup>.

Sin lugar a dudas, la complicación más importante de cualquiera de los procesos agrupados en la ELO, es su posible transformación maligna<sup>3,6,17-24</sup>. Existen varios procesos orales similares al LPO, la mayoría de las veces indistinguibles, pero que no cumplen todos los requisitos clinicopatológicos típicos de esta enfermedad y a los que genéricamente se debe denominar como “Lesión Liquenoide Oral” (LLO)<sup>8,15</sup>.

Clínicamente las LLO suelen adoptar con frecuencia un patrón de afectación unilateral y/o asimétrico<sup>8</sup>. Se ha reconocido que las LLO pueden ser reactivas cuando existe una causa reconocida (p.e. la amalgama de plata, determinados fármacos o enfermedad injerto contra huésped), o bien, idiopáticas cuando no se logra identificar ningún factor causante<sup>5</sup>.

En muchas ocasiones los procesos inicialmente denominados como LPO por su aspecto clínico, no cumplen los criterios histopatológicos considerados típicos, es decir, no muestran un infiltrado inflamatorio linfocitario

en banda ni degeneración de las células basales del epitelio. Por el contrario, existen lesiones que clínicamente no cumplirían los criterios de LPO, pero histológicamente muestran una imagen típica de este proceso. Estos casos deben ser considerados como “histológicamente compatibles” y deben ser incluidos en las LLO <sup>8,15</sup>.

El tratamiento de la ELO, además de la eliminación de las posibles causas, es sintomático y está indicado principalmente en los pacientes que presentan sintomatología que suele estar asociada a la presencia de lesiones atróficas, erosivas y/o ulcerativas. Los fármacos más utilizados en la ELO son los agentes inmunosupresores e inmunomoduladores locales y sistémicos, preferentemente los corticosteroides tópicos <sup>1,7,25,26</sup>.

Desde hace poco tiempo las LLO han sido objeto de un interés especial al haberseles asociado un mayor riesgo de transformación maligna, si los comparamos con el LPO clásico o “típico” <sup>6,24</sup>. No obstante, este hallazgo no ha sido reconocido en otros estudios que utilizaron otros criterios diagnósticos <sup>19,23,27</sup>, por lo que es un tema aún controvertido que ha motivado estudios con series de pacientes intentando determinar el potencial maligno de estos procesos <sup>28,29</sup>.

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados en pacientes con LPO, el verdadero potencial de transformación maligna de este proceso aun se desconoce <sup>30</sup>. A partir de los estudios de van der Meij y cols. <sup>6,24</sup>, consideramos que los diferentes subtipos de la ELO (LPO y LLO), son procesos que muestran una etiología y pronóstico distintos <sup>13</sup>. Incluso utilizando criterios clínico-patológicos diagnósticos estrictos resulta difícil diferenciar el LPO y las LLO por su similitud clínica e histopatológica, y por ello, en muchos casos no podemos determinar el verdadero potencial maligno de cada proceso basándonos solo en los datos clínico-patológicos <sup>4,8,13,30</sup>.

La gran frecuencia de la ELO en nuestra población y la dificultad de conocer el potencial maligno en cada caso, nos señala la necesidad de encontrar marcadores biológicos que nos permitan diferenciar el LPO y las

LLO. La obtención de resultados nos permitiría instaurar medidas terapéuticas y preventivas, así como de vigilancia adecuada en cada caso. En este sentido se enmarca el análisis inmunohistoquímico para la detección de marcadores moleculares asociados a la carcinogénesis presentes en los procesos agrupados bajo la denominación de “Enfermedad Liquenoide Oral” (ELO).

La inflamación desempeña un papel importante en la carcinogénesis de algunos procesos inflamatorios crónicos <sup>31-33</sup>. Algunos estudios <sup>34,35</sup>, han demostrado compuestos carcinogénicos derivados de la inflamación crónica en lesiones orales potencialmente malignas e inflamatorias crónicas como el LPO. También se ha señalado la gran similitud clínica y en los porcentajes de transformación maligna entre el LPO y algunos de los procesos inflamatorios crónicos clásicamente asociados al desarrollo de carcinomas como la gastritis crónica, la esofagitis crónica, la colecistitis crónica, y la enfermedad inflamatoria intestinal crónica, entre otros <sup>10,36</sup>.

Considerando que la inflamación crónica es el rasgo más característico de la ELO, conocer la expresión de algunos marcadores inflamatorios, puede tener gran interés para valorar el potencial maligno en estos procesos. Entre estos marcadores estarían la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la enzima metaloproteinasa-9 (MMP-9), que han sido ampliamente relacionadas con la carcinogénesis oral <sup>14,37-41</sup>.

La enzima COX-2 sintetiza prostaglandinas (PG) y se expresa casi exclusivamente en procesos patológicos, principalmente inflamatorios y neoplásicos malignos <sup>42-45</sup>. Las PG producidas por COX-2 actuarían estimulando múltiples factores de crecimiento, promoviendo la angiogénesis, disminuyendo la apoptosis y provocando inmunosupresión local, entre otros efectos favorecedores de la carcinogénesis <sup>46</sup>.

La enzima iNOS se encarga de sintetizar óxido nítrico (NO), el cual ejerce múltiples y diferentes efectos benéficos y dañinos, que dependerán de la cantidad y del tejido en el que ejerza su efecto <sup>47</sup>. Varios estudios <sup>31,37,47-49</sup>, han demostrado la expresión de metabolitos derivados de NO-iNOS dependientes

como son el 8oxoG y la 8-nitroguanina en lesiones potencialmente malignas orales, ambos reconocidos marcadores de daño oxidativo y nítrico, y por consecuencia altamente carcinogénicos.

La enzima MMP-9 es una gelatinasa que degrada el colágeno tipo IV de la membrana basal del epitelio oral <sup>40,41</sup>. La MMP-9 ha sido ampliamente estudiada por su relación con distintos procesos neoplásicos malignos en cabeza y cuello, esófago, colon, piel, entre otros <sup>40,50-54</sup>.

Existen otros marcadores que aunque no están directamente relacionados con la inflamación crónica, si lo están con los efectos secundarios derivados de ésta, como la transformación maligna y el pronóstico de las lesiones orales, y por ello nos podrían ofrecer datos importantes en los subtipos de la ELO. Entre éstos se encuentran el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la enzima reparadora del ADN O<sup>6</sup>-Metilguanina-ADN Metiltransferasa (MGMT), los marcadores de angiogénesis como la molécula de adhesión endotelial PCAM-1 (CD31), los marcadores de proliferación celular como la proteína Ki-67 y la proteína supresora de tumor p53.

El EGFR es un receptor de acción tirosina-quinasa dependiente encargado de poner en marcha diferentes vías de estimulación y/o modulación celular (Ras/Raf/MAPK; P13K/AKT; PCLgamma; STATs) a través de la proliferación y diferenciación celular, la inhibición de la apoptosis, la promoción de la angiogénesis y la migración e invasión celular; eventos que favorecerían la carcinogénesis en los procesos potencialmente malignos como la ELO <sup>55-57</sup>.

La enzima reparadora del ADN O<sup>6</sup>-Metilguanina-ADN Metiltransferasa (MGMT) desempeña un papel crucial en la eliminación de grupos alquilantes del ADN derivados de la inflamación crónica <sup>58</sup>. Numerosos estudios <sup>59-61</sup> han demostrado la hipermetilación del promotor del gen MGMT en el carcinoma oral escamoso y los tejidos adyacentes de apariencia normal. También se ha descrito disminución en la expresión de la proteína, y un aumento de hipermetilación del promotor en lesiones potencialmente malignas y malignas orales <sup>62-65</sup>.

La angiogénesis también juega un papel fundamental y decisivo en la génesis de distintos cánceres, incluyendo el cáncer oral, principalmente en las etapas tempranas de las lesiones premalignas orales, donde los cambios fenotípicos malignos aún no han ocurrido<sup>66-69</sup>. En este sentido, la valoración de la expresión de CD31 (PCAM-1), puede ser útil para identificar estadios iniciales de angiogénesis, sugestivo de cambios asociados a la carcinogénesis.

El marcador de proliferación celular Ki-67, es una proteína que se expresa en el núcleo durante las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), excepto en la fase reposo celular G0<sup>70-73</sup>. Algunos autores<sup>71,74</sup> han demostrado la asociación entre una localización suprabasal de Ki-67 y un mayor grado de displasia epitelial en lesiones potencialmente malignas orales, y en la mucosa adyacente a carcinomas orales con el posterior desarrollo de múltiples tumores.

El gen supresor de tumor TP53, codifica una proteína nuclear (p53) que actúa como un factor de transcripción ante diferentes situaciones de estrés celular como los daños en el ADN, la hipoxia, el choque térmico, los cambios metabólicos y también como respuesta a múltiples citoquinas<sup>75,76</sup>. Algunos estudios<sup>77-80</sup>, han demostrado que la localización suprabasal de la proteína p53 se asocia a un mayor grado de displasia epitelial en las lesiones y a un mayor riesgo de transformación maligna.

Consideramos que el análisis inmunohistoquímico de la expresión de las proteínas COX-2, iNOS, EGFR, MGMT, MMP-9, CD31, Ki-67 y p53, en las lesiones orales de pacientes con ELO, puede ser de gran ayuda en la diferenciación de los diferentes procesos, y puede proporcionarnos datos importantes sobre su comportamiento biológico.

## 1.1. Hipótesis

Aunque en la actualidad la ELO es considerada un desorden oral potencialmente maligno, existen numerosas controversias respecto a este potencial. La gran similitud clínica e histopatológica de los diferentes procesos englobados como ELO, así como la ausencia de unos criterios diagnósticos clínicos e histopatológicos definidos y universales, hace más difícil reconocer la realidad biológica de estos procesos, motivo principal por el que el verdadero potencial maligno aún es controvertido.

El conocimiento de la expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos implicados en las fases tempranas de la carcinogénesis oral, junto a la aplicación de unos criterios diagnósticos clínicos e histopatológicos estrictos, pueden ser de gran ayuda en la diferenciación de los procesos englobados en la ELO.

En base a lo señalado anteriormente establecemos las siguientes hipótesis:

- 1 Los diferentes subtipos de la enfermedad liquenoide oral como son el LPO y las LLO, pueden ser diferenciados en base a criterios diagnósticos clínicos e histopatológicos.
- 2 Las alteraciones celulares asociadas al proceso inflamatorio crónico presente en la enfermedad liquenoide oral, condicionan la expresión inmunohistoquímica de ciertas proteínas que nos pueden permitir diferenciar las lesiones de LPO y de LLO.
- 3 Las diferencias en la expresión de ciertos marcadores inmunohistoquímicos asociados a la carcinogénesis oral pueden ayudarnos a establecer el verdadero potencial maligno de cada subtipo de enfermedad liquenoide oral.

## 1.2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es conocer la expresión inmunohistoquímica diferencial de ciertas proteínas celulares relacionadas con la carcinogénesis oral en las lesiones de la ELO.

### Los objetivos específicos serían:

- 1 Determinar la expresión inmunohistoquímica de las proteínas COX-2, iNOS, EGFR, MGMT, MMP-9, CD31, Ki67 y p53 en las lesiones de pacientes diagnosticados clínica e histopatológicamente de ELO.
- 2 Encontrar diferencias en el patrón de expresión inmunohistoquímica en relación con los subtipos de ELO.
- 3 Relacionar los datos clínicos e histopatológicos de las lesiones de ELO con los patrones de expresión inmunohistoquímica de cada proteína

## 2. ANTECEDENTES

Desde hace años, el liquen plano oral (LPO) ha sido considerado como un proceso potencialmente maligno, habiéndose señalado porcentajes de transformación maligna muy variables entre el 0 y 5,3% de los casos <sup>2,9,17,20,21,23,28,29,81</sup>. Actualmente se considera que este porcentaje de malignización de esta enfermedad no supera el 1% de los casos <sup>4,13,28,30</sup>.

Existe cierta controversia en si realmente este proceso posee un potencial maligno intrínseco, o bien, si los casos reportados de malignización responden a otros factores <sup>6,24</sup>. Entre estos factores estarían los errores en el diagnóstico de estos procesos ante la falta de unos criterios diagnósticos uniformes en los distintos estudios, donde se incluirían casos de todo tipo <sup>8,13,30</sup>. Hace algunos años, van der Meij y cols. <sup>82,83</sup> demostraron la variabilidad interobservador e intraobservador, tanto clínica como histopatológica en el momento del diagnóstico del LPO cuando no existen criterios diagnósticos estrictos.

Hace algunos años van der Meij y van der Waal <sup>8</sup>, señalaban que la ausencia de parámetros o criterios diagnósticos clínicos e histopatológicos estrictos en el LPO, había provocado la inclusión de casos que no se correspondían con este diagnóstico, ya que dichas lesiones podrían ser otros procesos con un reconocido potencial maligno intrínseco como las leucoplasias y lesiones displásicas con rasgos histológicos liquenoides, dando como resultado un sesgo importante en los porcentajes reales de transformación maligna de este proceso.

Anteriormente, van der Meij y van der Waal <sup>84</sup>, al realizar una revisión exhaustiva de la literatura publicada en relación a los casos de LPO con transformación maligna, encontraron que solo un 34% de los casos cumplían los requisitos clínicos e histopatológicos que sustentaban una verdadera transformación maligna.

En el año 2003 van der Meij y van der Waal <sup>8</sup>, propusieron unos criterios clínicos e histopatológicos estrictos para el diagnóstico del LPO y de las LLO. Al aplicar estos criterios observaron que los pacientes diagnosticados de LLO presentaban un mayor riesgo de transformación maligna que los diagnosticados de LPO <sup>6</sup>. Estos resultados fueron reproducidos en un estudio posterior realizado por este mismo grupo y siguiendo los mismos criterios <sup>24</sup>. De manera similar, otros autores <sup>85</sup> señalan una mejor correlación clínica e histopatológica en el diagnóstico de esta enfermedad siguiendo los criterios propuestos por el grupo holandés <sup>8</sup>. Estos datos son los que motivaron la clasificación y la denominación como “Enfermedad Liquenoide Oral” realizada por Aguirre en el año 2008 <sup>5</sup>, tratando de separar estos procesos.

La enfermedad liquenoide oral (ELO) agrupa a distintos procesos patológicos de la mucosa oral de base inmunológica, que muestra características clínicas e histopatológicas similares pero que presentan una distinta etiología y un variable riesgo de transformación maligna <sup>5,6</sup>. Los distintos procesos o subtipos incluidos dentro de la ELO, son el liquen plano mucocutáneo (LPOMC), el liquen plano mucoso (LPOM), el liquen plano oral (LPO), las lesiones liquenoides orales reactivas (LLOR) y las lesiones liquenoides orales idiopáticas (LLOI) <sup>5</sup>. No obstante, siguiendo a lo señalado al grupo holandés <sup>6,13,24</sup>, actualmente consideramos dos grandes grupos: el liquen plano oral (LPO) y las lesiones liquenoides orales (LLO).

El nexo fundamental o la lesión elemental básica que une a todos los procesos incluidos en la ELO es la pápula blanca, por lo regular lineal y con disposición en forma de retícula <sup>5</sup>. Ésta imagen clínica no es patognomónica de la ELO, y debe ser considerada una expresión clínica inespecífica de la mucosa oral frente a múltiples agentes etiopatogénicos, en la mayoría de los casos desconocidos, que además puede mostrar diferentes patrones histológicos lo que dificulta su diferenciación con otros procesos mucosos, algunos incluso ya cancerosos <sup>5,13,86</sup>.

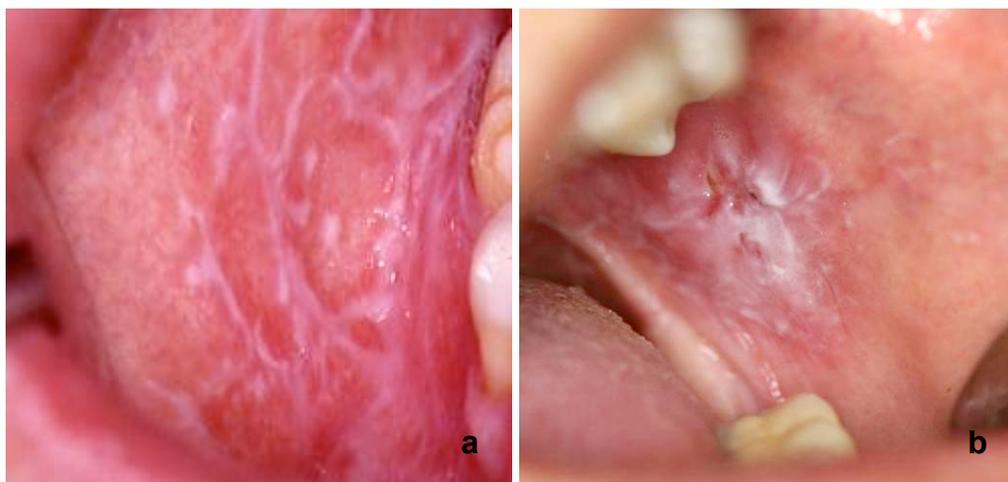
## 2.1. Liquen Plano Oral (LPO)

El LPO es un proceso inflamatorio crónico de la mucosa oral de base inmunológica y de etiología desconocida, en la cual uno o varios antígenos activan la inmunidad celular, dando como resultado una reacción inflamatoria que provoca daño y apoptosis de los queratinocitos basales del epitelio oral <sup>9,11,12,26,87</sup>.

El LPO afecta preferentemente a las mujeres, de una edad comprendida entre la 5ta y 6ta década de vida, aunque puede aparecer en otras edades, incluso en niños <sup>1-3,7,13,88</sup>.

Se considera el LPO tiene una prevalencia que oscila entre 0,5 y el 4%, no obstante la mayoría de los estudios coinciden en que puede afectar a alrededor del 2% de la población <sup>1,3,9,26</sup>, lo que la convierte en una de las enfermedades no infecciosas más comunes de la mucosa oral <sup>87</sup>.

La presentación clínica clásica del LPO es la presencia de pápulas blancas dispuestas en línea que al entrecruzarse forman una retícula (estrías de Wickham). Estas lesiones diagnósticas frecuentemente se acompañan de otras lesiones: atróficas, erosivas y/o ulcerativas, así como lesiones en placa <sup>3,7,12</sup> (**Figura 2.1**). Un hallazgo frecuente en el LPO es la presencia de lesiones erosivas en la mucosa gingival constituyendo la “gingivitis descamativa crónica” (GDC) <sup>17,89,90</sup>.

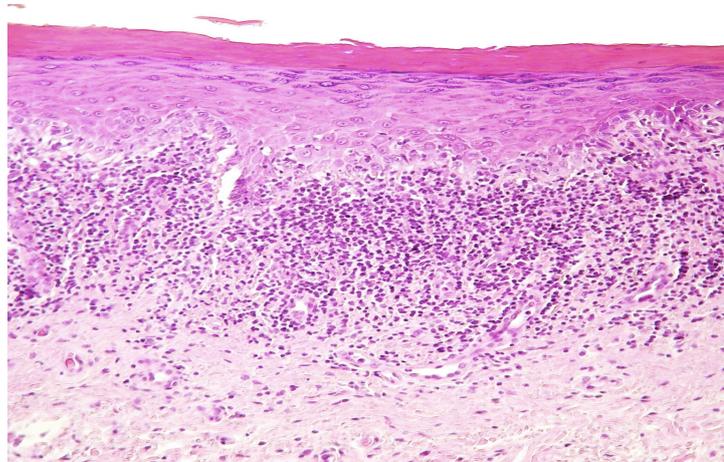


**Figura 2.1.** Lesiones papulares blanquecinas reticulares (a), y asociadas a lesión atrófica y ulcerativa (b).

Los lugares mas frecuentemente afectados por el LPO son las mucosas yugales, la lengua y la encía, siendo infrecuente la afectación del paladar, del suelo de boca y de la mucosa labial superior, no obstante pueden aparecer lesiones en cualquier zona de la cavidad oral <sup>3,12-14</sup>. Según distintos estudios <sup>17,90</sup>, entre un 7,4% y un 8,6% de los casos de LPO se encuentra confinado solo a las encías en forma de gingivitis descamativa crónica (GDC).

La GDC es un diagnóstico semiológico y no es exclusiva o patognomónica del LPO, pudiendo aparecer en otros procesos mucosos como son las LLO, el lupus eritematoso (LE), el pénfigo vulgar (PV), el penfigoide mucoso (PM), la estomatitis ulcerativa crónica (EUC), la enfermedad linear de IgA (ELIgA), la dermatitis herpetiforme (DH), entre otros <sup>3,89</sup>.

Característicamente las lesiones clínicas en el LPO son bilaterales y mas o menos simétricas, lo que constituye un dato diferenciador respecto a las LLO <sup>5,8,13</sup>. Los rasgos histológicos del LPO son característicos pero no exclusivos o patognomónicos, e incluyen un epitelio por lo general adelgazado, con hiperqueratosis (orto y/o paraqueratosis) y degeneración de los queratinocitos basales, provocada por un intenso infiltrado inflamatorio crónico, preferentemente linfocitario y dispuesto “en banda” en el conectivo superficial (corion), además de la ausencia de displasia epitelial <sup>8,15</sup> (**Figura 2.2**).



**Figura 2.2.** Aspecto histopatológico típico en LPO, mostrando hiperqueratosis, degeneración de queratinocitos basales y un infiltrado crónico linfocitario “en banda” en el corion.

Se estima que cerca del 15% de los pacientes con LPO presentan manifestaciones en otras localizaciones como en la piel, uñas u otras mucosas como la genital, la esofágica, la anal y la ocular <sup>3,91-93</sup>. De este modo se conformarían las formas cutáneo-mucosas <sup>5</sup>.

La presencia concomitante de LPO en las encías y lesiones en la vulva y/o la vagina constituye el denominado “síndrome vulvo-vaginal gingival”, y de igual forma, cuando las lesiones se localizan en el pene adquiere el nombre de “síndrome pene-gingival”, que es menos frecuente que su homólogo en la mujer <sup>12,91,94,95</sup>. El diagnóstico de estos síndromes adquiere importancia ya que se ha descrito la transformación maligna del LP en las mucosas genitales <sup>92</sup>.

## **2.2. Lesiones Liquenoides Orales (LLO)**

Las LLO son procesos que aparecen en la mucosa oral mostrando características clínicas e histológicas similares al LPO, pero que en ocasiones responden a factores etiológicos reconocibles <sup>1,5,13,26,96,97</sup>.

Los posibles factores etiológicos pueden ser múltiples: materiales odontológicos como la amalgama de plata, distintos fármacos como algunos antihipertensivos, antimaláricos, antimicrobianos, AINE's, antiglicémicos orales, etc., así como la enfermedad injerto contra huésped, etc. No obstante, en algunos casos estas LLO son idiopáticas o no es posible identificar un factor etiológico <sup>5,13,26,98</sup> **(Figura 2.3)**.

Los características clínicas descritas para las LLO son similares e indistinguibles de las descritas en el LPO <sup>1,8,13,16,26</sup>. No obstante, existen algunos datos clínicos que orientan más hacia el diagnóstico de LLO, tales como que se trate de lesiones aisladas, unilaterales o localizadas en sitios poco frecuentes, estar en estrecho contacto o cercanas a restauraciones de amalgamas de plata o algún otro material, aparición tras vacunaciones o ingesta de algunos fármacos y su total o parcial desaparición tras retirarlo, o aparecer en el contexto de una enfermedad injerto contra huésped (EICH) <sup>13,26,96,97,99,100</sup>.



**Figura 2.3.** Pápulas blancas reticulares cercanas a una restauración de amalgama de plata.

Al igual que las características clínicas, las características histológicas de las LLO no difieren mucho de las descritas para el LPO <sup>1,8,16,26,98,101</sup>. No obstante, se han señalado algunos datos histológicos que pueden ser sugestivos de las LLO, como la presencia de paraqueratosis focal, la interrupción de la capa granulosa, la presencia de cuerpos de Civatte en la capa cornea, el aumento de mastocitos en zonas de degeneración de queratinocitos basales, la presencia de un infiltrado inflamatorio mixto con polimorfonucleares (PMN), la disposición difusa y profunda, una inflamación perivascular, un incremento de la vascularización, así como una disminución del grosor de la membrana basal PAS-positiva a diferencia del LPO <sup>13,16,26,98,101,102</sup>.

Aunque las características clínicas e histopatológicas mencionadas anteriormente suelen asociarse con mayor frecuencia a las LLO, no son siempre infalibles y/o discriminatorias entre los distintos tipos de LLO ni con el LPO, ya que la imagen histológica puede ser modificada por la presencia de ulceraciones, fenómenos traumáticos y sobreinfección por hongos, hallazgos frecuentes en estos pacientes <sup>16</sup>.

Por todos estos motivos, es fundamental realizar, siempre que sea posible, el diagnóstico de la ELO, tanto de LPO como de las LLO basándonos en criterios clínico-patológicos <sup>1,5,8,13,15,16,26,85</sup>.

### **2.3. Inflamación crónica y carcinogénesis**

Desde hace años numerosos estudios <sup>31-33,36,103-109</sup> han demostrado el importante papel que ejerce la inflamación en la carcinogénesis de algunas enfermedades inflamatorias crónicas como el esófago de Barret, la colecistitis crónica, la gastritis crónica, las enfermedades intestinales inflamatorias crónicas y las hepatitis B y C, entre otras. Se estima que la inflamación crónica

contribuye de manera importante en el desarrollo del 25% de los cánceres humanos <sup>104</sup>, y de estos el 15% estaría relacionado con agentes infecciosos <sup>36</sup>.

Algunos autores <sup>10,34,107,110</sup> han señalado la gran similitud existente en los aspectos moleculares, clínicos, histopatológicos así como en la discrepancia en los porcentajes de transformación maligna entre algunas de las enfermedades inflamatorias crónicas clásicamente asociadas al desarrollo de cáncer y la ELO.

Los mecanismos involucrados en la carcinogénesis asociada a la inflamación crónica, independientemente de su etiología son muy similares, destacando la participación de citoquinas y quimiocinas asociadas a la inmunidad celular y humoral, que están presentes y son predominantes en el microambiente de las lesiones premalignas y malignas de dichos procesos <sup>107</sup>. En este sentido, se sabe que en el LPO la expresión de estos factores se encuentra alterada, lo que explica en parte su carácter crónico y sus características clínicas e histopatológicas <sup>9,10,87</sup>.

La inflamación crónica favorece la carcinogénesis mediante la expresión de múltiples citoquinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, FNT-alfa, INF-gamma, etc.) que estimulan y mantienen la expresión de otros factores favorecedores de la carcinogénesis oral. Entre estos factores se encuentran el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y sus respectivos ligandos (EGF, TGF-alfa, Heregulina, Amfiregulina, etc.), la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) produciendo prostaglandinas, la enzima oxido nitroso sintetasa inducible (iNOS) produciendo óxido nítrico, la enzima metaloproteinasa-9 (MMP-9) que degrada la matriz extracelular y la enzima O<sup>6</sup>-Metilguanina-ADN Metiltransferasa (MGMT) encargada de reparar lesiones del ADN, además de ciertos factores angiogénicos <sup>10,31,33,41,55,107,111,112</sup>. Todas estas moléculas inducen y/o favorecen de forma directa o indirecta y de forma autocrina y/o paracrina, la proliferación y diferenciación celular, la inhibición de la apoptosis, la inmunosupresión local, la estimulación de la angiogénesis y el daño de la estructura del ADN, lo que modifica sustancialmente el microambiente celular <sup>10,31,33,105,107</sup>.

Entre los mecanismos más importantes descritos en la carcinogénesis asociada a la inflamación crónica, se podrían separar arbitrariamente dos grupos, los mecanismos químicos ocasionados por la presencia de especies reactivas oxidativas y nítricas producidas por distintos tipos celulares<sup>108,113</sup>, y por otro lado los mecanismos biológicos en los que participarían las citoquinas y quimiocinas sobre la regulación del ciclo celular<sup>106,113,114</sup>.

La inflamación crónica puede estar derivada o desencadenada por distintos mecanismos, ya sea por la persistencia del agente causal o por un trastorno en los mecanismos que regulan el inicio y/o cese de la inflamación<sup>33,36,103</sup>. En la ELO aún se desconoce cuales son los mecanismos exactos que condicionan, desencadenan y mantienen la agresión inflamatoria hacia los queratinocitos del epitelio de la mucosa oral<sup>9-11,26,30,87</sup>.

Teniendo en cuenta el carácter inflamatorio crónico de la ELO y los efectos asociados a esta inflamación, es razonable considerar que pueda desempeñar un papel importante en la malignización de estos procesos.

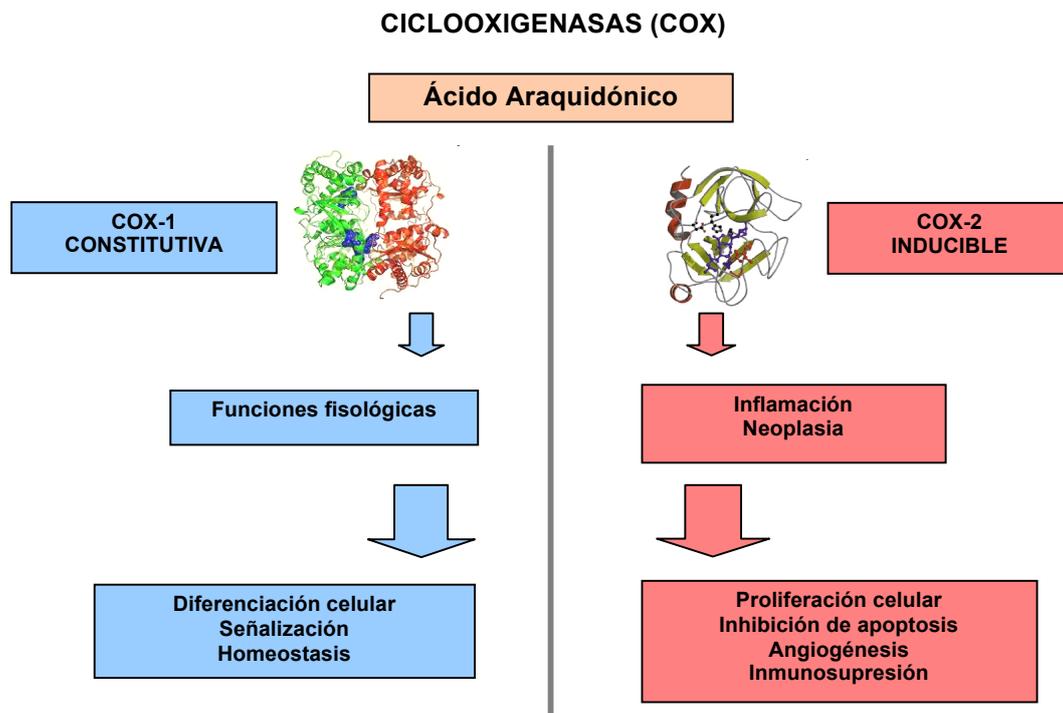
Partiendo de los estudios de van der Meij y van der Waal<sup>6,24</sup>, y considerando la dificultad en el diagnóstico clínico e histopatológico de estos procesos<sup>82,115</sup>, que explicarían la disparidad en los porcentajes de transformación maligna descritos<sup>2,6,18,20,23,24,27-30,81</sup>, consideramos necesaria la búsqueda de datos diferenciales tanto clínico-patológicos como moleculares, que nos permitan identificar aquellos casos que muestran un mayor riesgo de transformación maligna.

## **2.4. Ciclooxygenasa-2 (COX-2)**

Las ciclooxygenasas (COXs) son un grupo de enzimas (COX-1 y COX-2) que se expresan en todos los tejidos del organismo participando en la síntesis de las prostaglandinas-H2 (PGH2) a partir del ácido araquidónico (AA)<sup>45</sup>.

La COX-1 se expresa constitutivamente en distintos tejidos sintetizando PG que desempeñan un papel fisiológico importante como la protección de la mucosa gástrica, la regulación de la función renal, la diferenciación celular y la homeostasis <sup>42,46,116</sup> (**Figura 2.4**).

La enzima COX-2 se expresa casi exclusivamente en procesos patológicos, principalmente inflamatorios y neoplásicos malignos, a excepción de algunos tejidos en los que se expresa constitutivamente y en pequeñas cantidades <sup>43-46,116,117</sup>. Las PGE2 derivadas de COX-2 actuarían favoreciendo la carcinogénesis oral estimulando la expresión de factores de crecimiento, promoviendo la angiogénesis, disminuyendo la apoptosis y provocando inmunosupresión local <sup>46</sup>.



**Figura 2.4.-** Representación esquemática de las distintas funciones de COX-1 y COX-2.

Diversos estudios <sup>118-122</sup> han demostrado que la expresión de COX-2 en lesiones premalignas orales está directamente relacionada con la severidad de la displasia epitelial, y destacan su importante papel en las etapas tempranas

de la carcinogénesis <sup>116</sup>. Del mismo modo, se ha demostrado una asociación entre la expresión de esta enzima y el pronóstico de carcinomas orales de células escamosas (COCE) y de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (CCC) <sup>14,44,45,123</sup>. También se ha demostrado sobreexpresión de COX-2 en lesiones premalignas de otras localizaciones como son el esófago <sup>124</sup>, estómago <sup>125</sup>, vesícula biliar <sup>126</sup>, mama <sup>127</sup> e hígado <sup>128</sup>.

Existen pocos estudios <sup>38,39</sup> que hayan analizado la expresión de COX-2 en la ELO, y solo uno donde además se analizó en las LLO <sup>129</sup>. No obstante, los resultados obtenidos en algunos estudios son controvertidos, y probablemente esto está relacionado con los criterios empleados en el diagnóstico de las pacientes. La expresión de COX-2 podría ser distinta en los diferentes subtipos de ELO, siendo mayor en los casos con un mayor riesgo de transformación maligna.

## 2.5. Óxido Nítrico Sintetasa inducible (iNOS)

La enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), forma parte de una familia de enzimas (neural [nNOS o tipo I], inducible [iNOS o tipo II] y endotelial [eNOS o tipo III]) que se encargan de sintetizar óxido nítrico (NO) <sup>130</sup>. Este producto ejerce múltiples y diferentes efectos tanto beneficiosos como dañinos, dependiendo de la cantidad y del tejido en el que ejerza su efecto <sup>47</sup>. A diferencia de la nNOS y la eNOS que se expresan de manera constitutiva en las membranas de las células nerviosas y endoteliales, la iNOS se expresa tanto en las células inflamatorias como en las epiteliales, y casi exclusivamente en situaciones patológicas, como la inflamación y las neoplasias malignas <sup>37,47,131,132</sup>.

Algunos estudios <sup>133,134</sup> han demostrado una mayor producción de NO en la saliva de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas como el LPO y la aftosis oral recurrente. Además, se observaron efectos negativos sobre cultivos celulares de fibroblastos y queratinocitos en presencia de NO <sup>133</sup>.

A diferencia de la expresión de NO de forma pulsada y de corta duración derivada de la nNOS y la eNOS, el NO derivado de la iNOS es mayor y tiene un tiempo prolongado de acción, lo que supone que los efectos negativos del NO-iNOS dependiente se perpetúen (**Tabla 2.1**).

**Tabla 2.1.** Efectos del óxido nítrico

Efecto en las células	Tipo de efecto del óxido nítrico	
Crecimiento tumoral y mutagenicidad	-	
Angiogénesis	-	+
Metástasis	-	
Citotoxicidad contra células neoplásicas	+	
Inmunosupresión	-	
Daño nítrico y oxidativo del ADN (8oxoG y 8-nitroguanina)	-	

Los efectos benéficos o dañinos del NO en los tejidos sanos, premalignos y malignos dependerán de diversos factores <sup>135</sup>. Se ha descrito por un lado un efecto antitumoral y por otro un efecto carcinogénico, datos que han generado controversia <sup>132</sup>. Sin embargo, diversos estudios <sup>31,37,47-49,136</sup> han demostrado la expresión de metabolitos derivados de NO-iNOS dependiente que se asocian a daño del ADN, como son el 8oxoG y la 8-nitroguanina, reconocidos marcadores de daño oxidativo y nítrico, respectivamente.

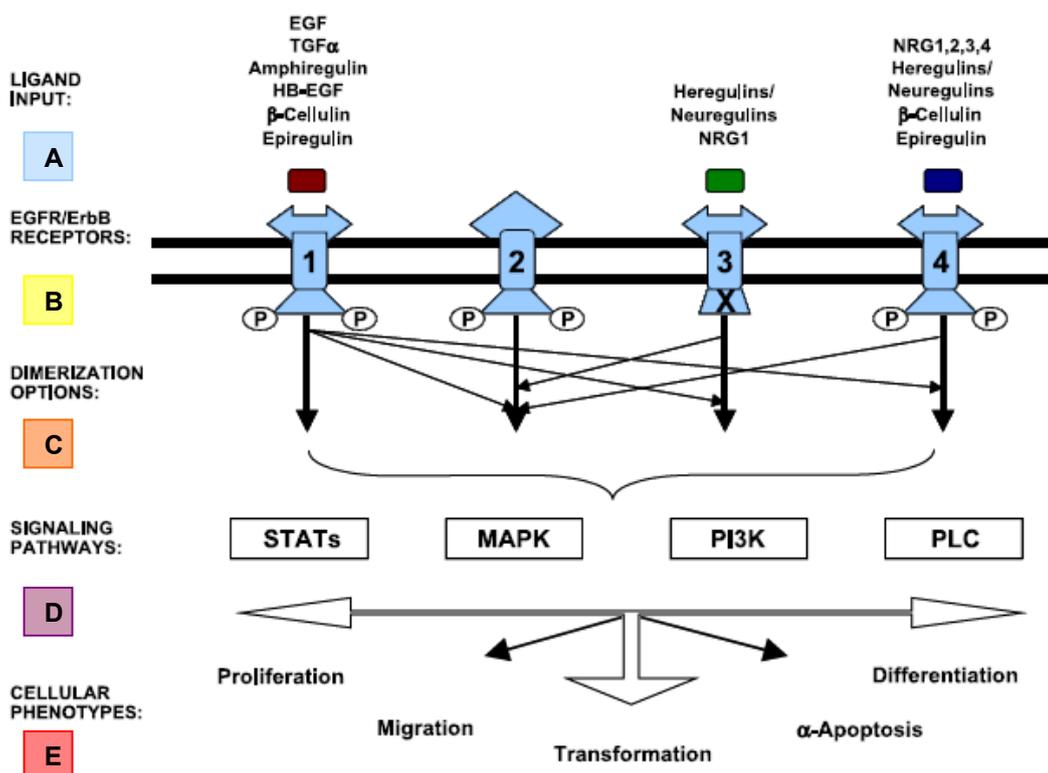
Se ha reconocido en lesiones premalignas orales una asociación entre la expresión de iNOS y la severidad de la displasia epitelial <sup>35,37,48,137,138</sup>. Otros estudios <sup>123,136</sup> señalan sobreexpresión de esta enzima en CCC así como su asociación con la presencia de metástasis extranodales, el estadio TNM y la angiogénesis tumoral.

La expresión de iNOS parece ser un biomarcador prometedor en la detección de etapas tempranas del proceso de carcinogénesis oral asociado a enfermedades inflamatorias crónicas como la ELO. A pesar de esto, pocos estudios la han analizado en estas lesiones <sup>34,137</sup> y ninguno tratando de diferenciar los subtipos.

## 2.6. Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)

El Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) es una glicoproteína transmembrana que forma parte de una familia de receptores de factores de crecimiento (Erb1 o EGFR, Erb2, Erb3 y Erb4) <sup>57</sup>. El EGFR es un receptor de acción tirosina-quinasa dependiente que posee una porción extracelular que actúa como punto de unión con sus respectivos ligandos (EGF [epidermal growth factor], TGF- $\alpha$  [transforming growth factor], betacelulina, amfiregulina, heregulina), una segunda porción transmembrana unida a una tercera porción intracelular encargada de poner en marcha diferentes vías de estimulación y/o modulación celular (Ras/Raf/MAPK; P13K/AKT; PCLgamma; STATs) a través de la proliferación y diferenciación celular, inhibición de la apoptosis, promoción de la angiogénesis, y la migración e invasión celular <sup>55,57</sup> **(Figura 2.5)**.

En condiciones normales la expresión y la función del EGFR, está estrechamente controlada y regulada por mecanismos relacionados el desarrollo epitelial y su respuesta frente a las lesiones <sup>57</sup>. Se ha descrito sobreexpresión de este receptor en neoplasias malignas como el CCC y el COCE, así como en las respectivas lesiones precursoras, hasta en un 90% de los casos <sup>57,139</sup>. Esta sobreexpresión se relaciona proporcionalmente con el grado de displasia epitelial y un mayor riesgo de desarrollar un cáncer oral <sup>14,140-145</sup>, una mayor capacidad de invasión, de presentar metástasis y ganglios linfáticos positivos <sup>146-149</sup>, datos que ensombrecen el pronóstico de los pacientes.



**Figura 2.5.** A) Distintos ligandos extracelulares, B) Receptores EGFR/Erb 1, 2, 3 y 4, C) Dimerización de receptores al ser activados, D) Diferentes vías intracelulares activadas, E) Distintos efectos derivados de la activación de las vías intracelulares (Tomado y modificado de Grandis et al 2004) <sup>150</sup>.

Se ha demostrado <sup>55,57,120,151-153</sup> que la sobreexpresión de EGFR participa de forma sinérgica en la expresión de otros marcadores involucrados en la carcinogénesis oral y en lesiones premalignas del tracto aerodigestivo, como la COX-2 y la iNOS. Esta sinergia se produce a través de la activación de distintas vías intracelulares dependientes e independientes del EGFR <sup>55,57</sup>. Estos hallazgos indicarían que la expresión del EGFR puede ser un marcador importante en los estadios iniciales de la carcinogénesis oral y en los múltiples procesos celulares involucrados.

Hasta el momento existen pocos estudios sobre la expresión de EGFR en el LPO <sup>56,154,155</sup>, y ninguno sobre las LLO. Los resultados obtenidos señalan la existencia de alteraciones en la expresión del EGFR en éstos procesos, y

que podría ser un marcador temprano en la carcinogénesis oral, y que podría servir para conocer el potencial maligno de los diferentes subtipos de la ELO.

## 2.7. Enzima O<sup>6</sup>-Metilguanina-ADN Metiltransferasa (MGMT)

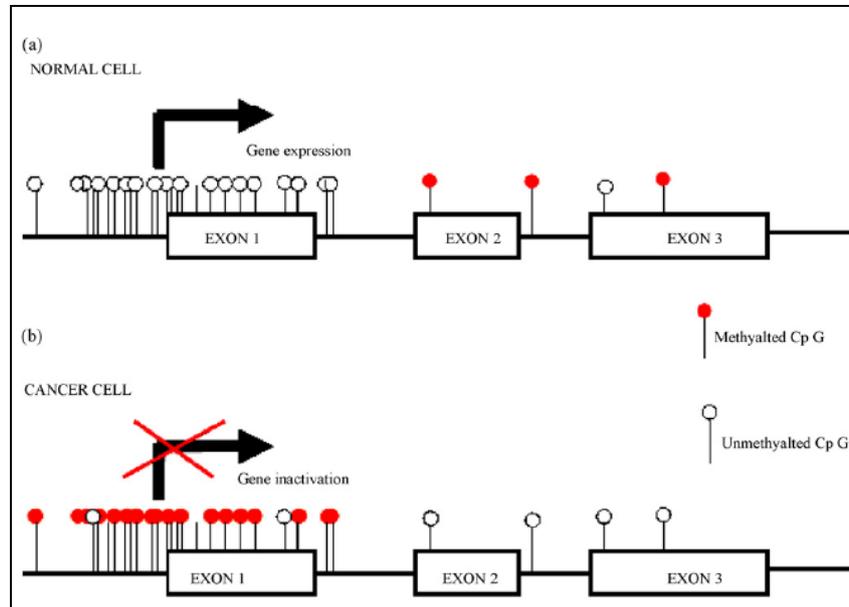
La enzima reparadora del ADN O<sup>6</sup>-Metilguanina-ADN Metiltransferasa (MGMT), forma parte de un amplio sistema reparador del ADN, desempeñando un papel crucial en la eliminación de grupos alquilantes unidos a la posición O<sup>6</sup> de la guanina, para formar O<sup>6</sup>-Metilguanina (O<sup>6</sup>MetG) <sup>58</sup>. Debido a que los compuestos O<sup>6</sup>MetG tienen una tendencia a aparearse con la timina durante la replicación, se provoca una conversión errónea de la guanina-citosina (G-C) en adenina-timina (A-T), generándose una mutación transicional puntual que a su vez puede afectar a genes fundamentales para la estabilidad genómica <sup>58,156</sup>.

Los compuestos O<sup>6</sup>MetG se producen de forma endógena a través de la formación de compuestos nitrosos derivados de aminas y del daño oxidativo generado por la inflamación o la infección <sup>34,157,158</sup>; o de forma exógena por alimentos, productos de combustión, cientos de agentes quimioterapéuticos alquilantes, y por último y quizás el más importante, por la exposición a distintos elementos químicos contenidos en el tabaco <sup>14,58,60,62,65,159-161</sup>.

La enzima MGMT actúa eliminando los grupos premutagénicos O<sup>6</sup>MetG del ADN, transfiriendo el grupo o “aducto” metilo hacia un sitio cisteína localizado en MGMT, restaurando la base original, para posteriormente sufrir degradación y ser resintetizada en una molécula de MGMT nueva <sup>60,156</sup>. Por este motivo, se cree que la cantidad de MGMT expresada en los tejidos, es proporcional a su capacidad para reparar lesiones O<sup>6</sup>MetG del ADN <sup>58,161-163</sup>.

Se sabe que la metilación del gen MGMT es responsable en gran medida de la ausencia de expresión de dicha proteína, impidiendo la reparación de las lesiones del tipo O<sup>6</sup>MetG, y de este modo aumentando el riesgo de que las mutaciones sigan acumulándose a lo largo de las diversas

replicaciones, y con ello el riesgo de desarrollar lesiones neoplásicas malignas<sup>60,156</sup> (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Promotor del gen MGMT no metilado (a) y metilado (b), y sus distintos efectos sobre el gen (Tomado de Jacinto y cols 2007)<sup>58</sup>.

Numerosos estudios<sup>59-61,160</sup> han demostrado la existencia de hipermetilación del promotor del gen MGMT en el CCC y el COCE así como en los tejidos adyacentes de apariencia normal. También se ha demostrado una disminución en la expresión de la proteína e hipermetilación del promotor de MGMT, en lesiones precursoras del cáncer oral<sup>62-65</sup>. Se ha asociado la hipermetilación del promotor de MGMT con la aparición de recurrencias en el CCC<sup>164</sup>, un peor pronóstico, un menor tiempo de supervivencia y la presencia de ganglios positivos<sup>60,64</sup>.

Aunque existe suficiente evidencia del importante papel que juega MGMT en las etapas tempranas de la carcinogénesis oral, no existen estudios que la hayan analizado en la ELO. Por ello y considerando la naturaleza inflamatoria crónica de la ELO y el riesgo de desarrollar lesiones del tipo

O<sup>6</sup>MetG, creemos que puede ser interesante conocer si existen diferencias en su expresión.

## 2.8. Metaloproteinasa-9 (MMP-9)

Las metaloproteinasas (MMPs) son una amplia familia de enzimas dependientes del Zinc, que se encargan de la degradación de varios componentes de la matriz extracelular para su remodelación en distintos procesos fisiológicos como la embriogénesis, la reparación de heridas, los procesos inflamatorios, así como en procesos patológicos como la invasión y producción de metástasis <sup>40,165</sup>. Existen 4 grandes grupos de MMPs basadas en su estructura y su sustrato: las colagenasas, las gelatinasas, las estreptomelisinias y las metaloproteinasas del tipo membrana <sup>40</sup>.

La MMP-9 es una gelatinasa que degrada el colágeno tipo IV de la membrana basal del epitelio oral <sup>40,41</sup>. La MMP-9 ha sido ampliamente estudiada por su relación con distintos procesos neoplásicos malignos de cabeza y cuello, esófago, colon, piel, etc. <sup>36,40,50-54,107</sup>.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de MMP-9 en los queratinocitos y en algunas células estromales en lesiones de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, se relacionan con una mayor capacidad de invasión, un mayor riesgo de metástasis ganglionares y a distancia, así como con un peor control local y regional y un menor periodo libre de enfermedad <sup>40,166-168</sup>.

Distintos trabajos <sup>52,166,167,169</sup> han demostrado en lesiones premalignas orales, así como en líneas celulares derivadas de estas, una asociación entre la sobreexpresión de MMP-9 y un mayor grado de displasia epitelial, observando que se asociaba principalmente con las lesiones que sufrían transformación maligna.

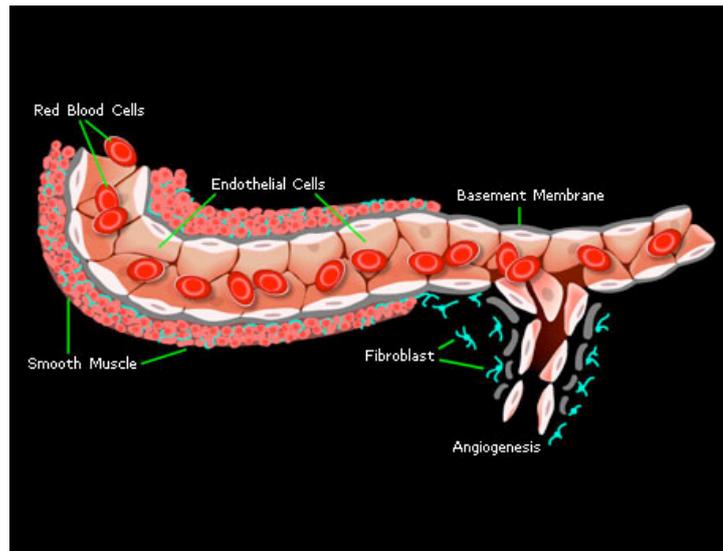
Algunos autores <sup>170</sup>, han encontrado en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, una asociación entre la sobreexpresión de MMP-9 y una mayor expresión de iNOS, p53 y CD31, marcadores indicativos de daño oxidativo a través de la expresión de NO, daño del ADN y promoción de angiogénesis, respectivamente. Estos hallazgos, apoyarían la hipótesis de una participación importante de la MMP-9 en distintas fases de la carcinogénesis oral.

La inflamación parece jugar un papel importante en la activación de las MMPs, ya que el control de su activación o inhibición está regulada por varias citoquinas, factores de crecimiento e inhibidores tisulares de metaloproteinasa (TIMPs), moléculas frecuentemente expresadas en los procesos inflamatorios crónicos como la ELO <sup>3,9,40,87</sup>.

Existen pocos estudios que hayan analizado la expresión de MMP-9 en el LPO <sup>41,169</sup>, y en ninguno de ellos se analiza en las LLO. Los resultados obtenidos por estos autores <sup>41,169</sup> son controvertidos, por un lado Chen y cols. 2008 <sup>169</sup> señala un incremento de MMP-9 dependiendo del tipo clínico de la lesión, y por otro lado, Zhou y cols. <sup>41</sup> encuentra una baja expresión de esta enzima. Creemos que puede ser interesante conocer si existen diferencias en la expresión de esta enzima en los subtipos de ELO.

## **2.9. CD31 (PCAM-1)**

La angiogénesis es un proceso fundamental para numerosos fenómenos fisiológicos en el ser humano para que se produzca un correcto desarrollo, crecimiento y funcionamiento del organismo. La angiogénesis por definición, se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes <sup>68</sup>, y es el resultado del balance de múltiples estímulos angiogénicos y antiangiogénicos generados en el tejido en cuestión <sup>68,171</sup> **(Figura 2.7).**



**Figura 2.7.** Procesos y elementos celulares involucrados en la angiogénesis; Las células endoteliales emergen del vaso existente en forma de “brote primitivo” para posteriormente organizarse para formar la estructura vascular. Tomado de: <http://www.gene.com/gene/research/focusareas/tgr/>.

La angiogénesis juega un papel fundamental y decisivo en la carcinogénesis de distintas localizaciones como el cáncer oral <sup>66-69</sup>. Esto es especialmente importante en las etapas más tempranas de las lesiones potencialmente malignas orales, donde los cambios fenotípicos malignos aun no han ocurrido. Estos trabajos <sup>66-69</sup>, han demostrado una mayor microdensidad vascular (MDV) en lesiones premalignas a través de la expresión de diferentes marcadores moleculares de la angiogénesis como las moléculas de adhesión de células endoteliales CD31 (PCAM-1) y CD34, así como el receptor de factor endotelial vascular (VEGF).

Se ha demostrado que la expresión de los marcadores de angiogénesis y la MDV en las lesiones potencialmente malignas orales, es más frecuente, más intensa e importante en los estadios más tempranos de la hiperplasia y displasia epitelial si lo comparamos con las lesiones malignas <sup>66,67,69</sup>. En este sentido, se situarían los estudios <sup>172,173</sup> que destacan la importancia de la terapia antiangiogénica en distintas lesiones premalignas y malignas originadas en ser humano.

Diversos autores <sup>9,10,32,33,67,68,110</sup> han destacado la importante participación de la angiogénesis en distintos procesos inflamatorios crónicos orales incluidos en la ELO (LPO y las LLO). En este sentido, se ha demostrado una mayor MDV y expresión de marcadores angiogénicos en el LPO <sup>66,123,171</sup>.

Por otro lado, algunos autores como Tao y cols. <sup>174</sup> incluso han encontrado diferencias en la angiogénesis entre los distintos tipos de lesiones clínicas de LPO. Otros autores <sup>175</sup> además de haber demostrado un aumento en la expresión de VEGF y CD34 en biopsias de LPO, han podido confirmar estos hallazgos “*in vivo*” a través de capilaroscopia, observando un aumento no solo de la MDV, sino la presencia de una morfología vascular distinta asociada a una proliferación vascular desorganizada <sup>176,177</sup>.

Aunque los distintos estudios demuestran un aumento tanto de la MDV como de los marcadores moleculares relacionados con la angiogénesis en el LPO, no existen trabajos que evalúen y/o hagan distinción de estos marcadores entre LPO y las LLO.

## **2.10. Gen supresor de tumor p53**

El gen supresor de tumor TP53, codifica una proteína nuclear con el mismo nombre (p53) que actúa como un factor de transcripción ante diferentes situaciones de estrés genético como es el daño al ADN, la hipoxia, el choque térmico, los cambios metabólicos y en respuesta a múltiples citoquinas <sup>75,76</sup>.

Una vez que la proteína p53 es sintetizada se ponen en marcha distintos mecanismos que a su vez promueven la expresión de genes que tienen como objetivo principal detener el ciclo celular para la reparación del material genético dañado, o bien, inducir apoptosis si ésta no puede llevarse a cabo, evitando la replicación de células con mutaciones o daño genético, y con esto

evitar la formación de tumores, motivo por el cual clásicamente se le denomina el “guardián del genoma”<sup>76,178</sup>.

La proteína p53 se expresa en condiciones normales en células con capacidad de “proliferación” como serían las de la capa basal del epitelio de la mucosa oral, considerándose anormal una expresión en capas superiores o de “maduración” como serían la espinosa, la granulosa y la córnea<sup>80</sup>. Se estima que en un importante porcentaje de lesiones potencialmente malignas y sus respectivos carcinomas existe mutación en el gen TP53<sup>78,80,179,180</sup>, dando como resultado alteraciones en la expresión de la proteína p53. No obstante, la expresión de p53 en una lesión potencialmente maligna, no necesariamente es sinónimo de mutación en dicha proteína, ya que este fenómeno puede ocurrir en respuesta a múltiples factores de agresión, o bien, debido a alteraciones en las distintas fases de las vías de activación de p53 que interfieren con la expresión, función y degradación de la proteína salvaje<sup>181</sup>.

Diferentes estudios<sup>117,179,180,182-185</sup> han demostrado tanto sobreexpresión como falta de expresión de p53 en pacientes con CCC como con COCE y sus respectivas lesiones precursoras.

Por otro lado, algunos autores<sup>78-80</sup> han demostrado en estudios realizados sobre lesiones orales potencialmente malignas, que más que la expresión de p53, es más relevante la localización en las capas epiteliales suprabasales. Estos autores<sup>78-80</sup> señalan que la expresión de p53 en capas suprabasales o madurativas se asocia con el grado de displasia epitelial y con un mayor de riesgo de transformación maligna.

Numerosos estudios han demostrado distintos porcentajes de expresión de p53 en muestras de pacientes diagnosticados de LPO<sup>34,70,179,180,186-189</sup> y de LLO<sup>186,190</sup>, demostrando la mayoría la forma salvaje de la proteína, contrariamente a lo que se pensaba anteriormente<sup>189</sup>.

Debido a los pocos trabajos que analizan y diferencian la expresión y la localización de p53 en el LPO y las LLO, sería interesante conocer si existen diferencias en la expresión.

## **2.11. Marcador de proliferación celular Ki-67 (MIB-1)**

El marcador de proliferación celular Ki-67, es una proteína que se expresa en el núcleo durante las distintas fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), excepto en la fase reposo celular G0<sup>70-73</sup>, teniendo un pico de expresión durante la fase de síntesis (S) para disminuir drásticamente inmediatamente después de la fase de mitosis (M)<sup>191</sup>.

En condiciones fisiológicas normales solo las capas basales del epitelio oral, albergan células con capacidad de proliferación para posteriormente madurar en las capas superiores y de esta manera mantener la integridad del epitelio. Por el contrario, la proliferación celular en capas para o suprabasales debe ser considerada un signo anormal indicativo de trastornos en los mecanismos que regulan el ciclo celular<sup>71,192</sup>.

Diversos estudios<sup>73,184,193,194</sup> han demostrado una asociación entre la expresión de Ki-67 y la severidad de las lesiones potencialmente malignas y malignas orales, así como su relación con el pronóstico de estas lesiones<sup>195</sup>.

Algunos autores<sup>71</sup> han demostrado la asociación entre un mayor grado de displasia epitelial de las lesiones potencialmente malignas orales y una localización suprabasal de la expresión de Ki-67. Posteriormente, estos mismos autores<sup>71</sup> demostraron una mayor expresión suprabasal de Ki-67 en la mucosa sin alteraciones fenotípicas que era adyacente al carcinoma.

Existen numerosos estudios<sup>70,72,192,196-198</sup> que han valorado el índice de proliferación celular mediante la expresión epitelial de Ki-67 en el LPO, y uno de ellos también sobre LLO<sup>186</sup>. Los resultados obtenidos por estos estudios

<sup>70,72,192,196-198</sup> coinciden en señalar una alta tasa de proliferación celular en ambos procesos.

De manera similar a lo que ocurre con la proteína p53, no siempre altos índices de proliferación o de expresión de Ki-67, se asocian a la severidad de la lesión o a un mayor riesgo de transformación maligna. En este sentido, algunos autores <sup>70,71,196</sup>, señalan que más que la expresión de Ki-67 por si sola, es más relevante la localización suprabasal de este marcador, ya que puede ser un dato indicativo de un trastorno de la maduración en capas no replicativas, lo que incrementaría el riesgo de transformación maligna de estos procesos.

En el estudio de Acay y cols. <sup>186</sup>, al analizar la expresión de Ki-67 tanto en lesiones de LPO como en LLO, no observaron diferencias en el índice de proliferación celular entre ambos procesos, aunque era mayor que en los controles.

Aunque existen numerosos estudios que han analizado la expresión de Ki-67 en los desórdenes potencialmente malignos como la ELO, pocos lo han hecho buscando diferencias entre los diferentes subtipos de este proceso.



### **3. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Pacientes**

Hemos estudiado las biopsias de la mucosa oral de 44 pacientes diagnosticados clínica e histopatológicamente de Enfermedad Liquenoide Oral en las Unidades de Medicina Bucal, y de Patología Oral y Maxilofacial del Servicio Clínica Odontológica de la Universidad del País Vasco /EHU.

En todos los pacientes se han recogido los principales datos clínicos siguiendo el protocolo clínico para liquen plano oral (LPO) de la Sociedad Española de Medicina Oral (Bilbao 2001), y los datos histopatológicos según un protocolo previamente diseñado basado en estudios previos <sup>8,15,16</sup> **(Tabla 3.1)**.

Este estudio forma parte de la línea de investigación “Precáncer y cáncer oral” del Grupo Consolidado de Investigación de la UPV/EHU dirigido por el Prof. José Manuel Aguirre Urizar y ha sido aprobado por la Comisión Universitaria de Ética de la Investigación y la Docencia (CUEID) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), con número de registro: CEISH/34/2010/CORTES RAMIREZ.

De los 44 pacientes 30 (68,2%) eran mujeres y 14 (31,8%) hombres, con una edad media de 56,4 años, un mínimo de 31 y un máximo de 81 años. En todos los casos los pacientes firmaron un consentimiento informado permitiendo la toma y el análisis de la muestra para el diagnóstico definitivo.

##### **3.1.1. Controles**

Como controles de los análisis inmunohistoquímicos se procesaron 4 muestras de mucosa oral sin alteraciones epiteliales ni inflamatorias, así como 2 muestras de carcinoma oral de células escamosas (COCE). Estas muestras anonimizadas fueron obtenidas de biopsias diagnósticas de las colección de la

Unidad de Patología Oral y Maxilofacial del Servicio Clínica Odontológica de la UPV/EHU.

### **3.1.2. Criterios de selección de pacientes**

Para ser incluidos como casos debieron cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

1. Presentar datos diagnósticos clínico-patológicos de Enfermedad Liquenoide Oral (LPO o LLO).
2. Tener suficiente material para realizar el estudio histopatológico e inmunohistoquímico.

Del mismo modo, los casos fueron eliminados del estudio si presentaban los siguientes criterios de exclusión:

1. Presencia de displasia epitelial o de carcinoma de células escamosas en la biopsia diagnóstica.
2. Presencia de características clínico-patológicas propias de enfermedad o lesión de naturaleza distinta a las incluidas en la enfermedad liquenoide oral (LPO o LLO).

Las 44 biopsias de los casos fueron clasificadas en grupos clínicos en base al tipo clínico de lesión o lesiones presentes en el momento del diagnóstico, y en grupos histológicos según las características microscópicas de la biopsia diagnóstica siguiendo los criterios señalados por van der Meij y van der Waal<sup>8</sup> para el diagnóstico de LPO y LLO (**Tabla 3.2**).

**Tabla 3.1. Protocolo de valoración histopatológica de ELO** <sup>8,15,16</sup>

**PROTOCOLO HISTOPATOLÓGICO**  
 Unidad POMF // Master Patología Oral UPV/EHU  
**Enfermedad Liquenoide Oral (ELO)**

**Número de biopsia:**

**Características clínicas de las lesiones:**

- Reticular 1
- Atrófico 2
- Erosivo – Ulcerativo 3
- Otros 4

**Características epiteliales**

**1. Queratinización epitelial**

- Paraqueratinización 0 1
- Para y ortoqueratinización 0 1

**Alteración en la queratinización**

- Hiperparaqueratosis 0 1 Grado 1 / 2 / 3
- Hiperortoqueratosis 0 1 Grado 1 / 2 / 3
- Granulosis 0 1 Grado 1 / 2 / 3

**2. Grosor y configuración epitelial**

- Atrofia 0 1 Grado 1 / 2 / 3
- Acantosis 0 1 Grado 1 / 2 / 3
- Acantolisis 0 1 Grado 1 / 2 / 3
- Exocitosis linfocitos 0 1 Grado 1 / 2 / 3
- Exocitosis PMN 0 1 Grado 1 / 2 / 3

**3. Cambios celulares y en unión epitelio-conectivo:**

- Células apoptóticas (Civatte) 0 1 Grado 1 / 2 / 3
- Degeneración basal 0 1 Grado 1 / 2 / 3
- Banda eosinofílica basal 0 1 Grado 1 / 2 / 3

**5. Características inflamatorias**

- |  |     |       |  |
|--|-----|-------|--|
| 1.- Infiltrado inflamatorio en banda     | 0 1 | Grado | 1 (focal) / 2 (parcial) / 3 (total)        |
| 2.- Infiltrado inflamatorio difuso       | 0 1 | Grado | 1 (focal) / 2 (parcial) / 3 (total)        |
| 3.- Infiltrado inflamatorio perivascular | 0 1 | Grado | 1 / 2 / 3                                  |
| 4.- Intensidad del infiltrado            |     | Grado | 1 / 2 / 3                                  |
| 5.- Profundidad del infiltrado           |     |       | 1 (superficial) / 2 (profundo [submucosa]) |
| 6.- Linfocitos                           | 0 1 | Grado | 1 / 2 / 3                                  |
| 7.- Células plasmáticas                  | 0 1 | Grado | 1 / 2 / 3                                  |
| 8.- PMN                                  | 0 1 | Grado | 1 / 2 / 3                                  |
| 9.- Histiocitos                          | 0 1 | Grado | 1 / 2 / 3                                  |
| 10.- Mastocitos                          | 0 1 | Grado | 1 / 2 / 3                                  |

**Ausencia= 1, Presencia= 0.**

**Intensidad: 1 = leve, 2 = moderada, 3 = severa.**

**Tabla 3.2.** Criterios diagnósticos clínicos e histopatológicos para el diagnóstico de ELO (LPO y LLO) <sup>8</sup>.

<b>Criterios diagnósticos</b>
<p><b><u>Criterios clínicos</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Lesiones papulares reticulares blanquecino-grisáceas bilaterales simétricas</li><li>• Lesiones ulceradas, erosivas, atróficas, bullosas y en placa (solo consideradas en presencia de lesiones pápulo-reticulares en alguna zona de la mucosa oral).</li></ul>
<p><b><u>Criterios histológicos</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Presencia de un infiltrado inflamatorio crónico en banda en el corion, principalmente linfocitario</li><li>• Signos de degeneración de la capa basal epitelial</li><li>• Ausencia de displasia epitelial</li></ul>
<p><b><u>Diagnostico final de LPO o OLL</u></b></p> <p>Deberá realizarse siempre en base a los criterios clínicos e histopatológicos</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• El diagnóstico será de LPO cuando reúna todos los criterios clínicos e histopatológicos anteriores</li><li>• El diagnóstico de LLO se utilizará en los siguientes casos:<ol style="list-style-type: none"><li>1. Clínicamente típico pero histológicamente solo compatible</li><li>2. Histológicamente típico pero clínicamente compatible</li><li>3. Clínicamente e histológicamente compatible.</li></ol></li></ul>

LPO: Liqueen plano oral, LLO: Lesión liquenoide oral

Modificado de van der Meij y van der Waal 2003 <sup>8</sup>.

### **3.1.3. Grupos de estudio**

#### **Grupo Clínico 1 (C1)**

En este grupo se incluyeron los casos que presentaban única y exclusivamente lesiones clínicas orales en forma de pápulas blanquecino-grisáceas reticulares, en el momento del diagnóstico clínico-patológico de ELO.

#### **Grupo Clínico 2 (C2)**

En este grupo se incluyeron los casos que además de presentar lesiones orales papulares descritas para el grupo C1, mostraban lesiones atróficas, erosivas y/o ulcerativas, en el momento del diagnóstico clínico-patológico de ELO.

#### **Histológicamente típico (HT)**

En este grupo se incluyeron los casos que presentaban características histopatológicas consideradas típicas para el LPO: a) infiltrado inflamatorio crónico en banda en el corion predominantemente linfocitario y b) signos de degeneración de la capa basal del epitelial (**Figura 3.1**).

#### **Histológicamente compatible (HC)**

En este grupo se incluyeron los casos que no presentaban alguno de los criterios histopatológicos descritos anteriormente para el grupo histológicamente típico.

## **3.2. Materiales**

Las biopsias de cada caso fueron orientadas y procesadas siguiendo un protocolo estándar para el análisis histopatológico convencional de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina, y para el análisis inmunohistoquímico para valorar la expresión de los anticuerpos COX-2, iNOS, EGFR, MGMT, MMP-9, CD31, Ki-67 y p53.

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Procedimiento histológico**

Para el análisis histopatológico de las biopsias se ha seguido un procedimiento convencional de fijación, deshidratación, inclusión en parafina y tinción con hematoxilina y eosina.

1. Fijación de las muestras
  - a. Las biopsias obtenidas han sido fijadas en formol tamponado al 10% al menos durante 24 horas.
  
2. Deshidratación de las muestras e inclusión en parafina
  - a. Se realiza la deshidratación de las muestras en alcoholes crecientes, comenzando con 1 baño de alcohol de 96° durante 30 minutos seguido de 3 baños de alcoholes absolutos, los primeros 2 de 30 minutos y el último de 1 hora.
  - b. Se realizan lavados consecutivos en xilol de 15 y 30 minutos que eliminan el alcohol de la muestra y permiten la penetración de la parafina en 2 baños consecutivos de 30 minutos y una hora. Tras la inclusión se realiza el molde orientando adecuadamente la muestra.
  
3. Tinción con Hematoxilina y Eosina.
  - a. Se realizan cortes de 5  $\mu\text{m}$  que son montados en portaobjetos para ser teñidos con hematoxilina y eosina según un procedimiento estandarizado.
  - b. Eliminación de la parafina e hidratación en alcoholes decrecientes terminando con agua.
  - c. Tinción con hematoxilina de Harris durante 5 minutos y posterior lavado con agua caliente durante 1 minuto.
  - d. Eliminación del exceso de hematoxilina con HCl al 0,5% durante 30 segundos y posterior lavado en agua corriente.
  - e. Tinción con eosina al 1% durante 5 minutos. Eliminación del exceso de eosina, en agua corriente.

- f. Deshidratación en alcoholes crecientes.
- g. Montaje en medio permanente (Eukitt®), previa eliminación del exceso de alcohol con xilol.

### **3.3.2. Procedimiento inmunohistoquímico**

Para el análisis inmunohistoquímico de las biopsias con los distintos anticuerpos, se ha seguido un procedimiento convencional general con algunas pequeñas modificaciones dependiendo de cada proteína.

- a. Desparafinización en xilol mediante dos baños de 10 minutos.
- b. Las secciones de parafina de 4µm se colocan sobre portaobjetos para estudio de inmunohistoquímica.
- c. Se hidrata en baños de alcohol decreciente y agua corriente.
- d. Desenmascaramiento antigénico con calor y presión. Tras alcanzar una presión uniforme se contabiliza 1 minuto.
- e. Inhibición de la peroxidasa endógena con 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos.
- f. Incubación con BSA (A-9647, SIGMA ® Steinheim, Alemania) al 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los antígenos inespecíficos.
- g. Incubación del anticuerpo primario en cámaras de humedad. Dilución de los anticuerpos con el diluyente S2022 (DAKO, Carpintería, Ca, EEUU). El tipo de anticuerpo, marca comercial, dilución y tiempo de incubación se reflejan en la **Tabla 3.3**.
- h. Revelado del proceso con el sistema de visualización Polymer Detection Kit (Novocastra®, New Castle Upon Tyne, UK).
- i. La reacción se revela con 3,3´diaminobenzidina-hidroclorídico (DAB) produciendo un precipitado de color marrón.
- j. Contraste de las secciones con hematoxilina de Harris durante 40 segundos y montaje en un medio permanente (Eukitt®).
- k. Entre los distintos pasos se realizaron lavados con PBS1X durante 5 minutos.

**Tabla 3.3.** Características de los anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpo	Clon	Marca Comercial	Dilución	Tiempo de incubación
<b>COX-2</b>	Monoclonal SP21	Novocastra®	1:100	1 hora
<b>iNOS</b>	Policlonal RB-9242-R7	Thermo Scientific®	1:100	1 hora
<b>EGFR</b>	Monoclonal 31G7	Novocastra®	Prediluido	1 hora
<b>MGMT</b>	Monoclonal MT3.1	Thermo Scientific®	1:100	1 hora
<b>MMP-9</b>	Monoclonal 15W2	Thermo Scientific®	1:100	1 hora
<b>CD31</b>	Monoclonal (PCAM-1) 1A10	Novocastra®	1:100	1 hora
<b>Ki-67</b>	Monoclonal Mib-1	Dako®	1:100	1 hora
<b>p53</b>	Monoclonal DO-7	Dako®	1:200	1 hora

### 3.3.3. Valoración

Hemos realizado una valoración cualitativa y semicuantitativa de los aspectos histológicos e inmunohistoquímicos con un microscopio Olympus® (BX41), analizando un mínimo de 5 campos en cada caso.

La totalidad de las muestras fueron analizadas por tres observadores independientes utilizando el protocolo mencionado anteriormente y discutiendo posteriormente para alcanzar un consenso en la valoración final de cada caso.

#### 3.3.3.1. Valoración histológica

Se valoraron las características epiteliales e inflamatorias de cada muestra en un mínimo de 5 campos representativos de la lesión. Se tomo en cuenta la presencia, ausencia y grado de cada característica epitelial e inflamatoria siguiendo un protocolo establecido previamente (**Tabla 3.1**). Para facilitar el análisis estadístico, las variables inicialmente valoradas como nada

leve, moderada y severa, fueron finalmente dicotomizadas en dos: nada-leve y moderado-severo.

### **3.3.3.2. Valoración inmunohistoquímica**

En todos los casos se realizó una valoración semicuantitativa de la expresión de cada marcador en 5 campos representativos de la lesión, utilizando el software Soft Imagen System Cell A Olympus® (Munster, Germany). Para facilitar el análisis estadístico, las variables inicialmente valoradas como expresión leve, moderada y severa, fueron finalmente dicotomizadas en dos: expresión leve y sobreexpresión en relación con los porcentajes medios de expresión de cada caso.

#### **a. Valoración inmunohistoquímica de COX-2**

Basados en estudios previos <sup>44,118,121</sup>, se realizó un análisis semicuantitativo del porcentaje y patrón de expresión epitelial de COX-2. La presencia de una tinción marronácea citoplasmática y/o nuclear clara era un requisito para ser considerada en el contaje celular. Se consideró expresión epitelial leve cuando COX-2 se encontraba en <30% de las células y sobreexpresión cuando se encontraba en  $\geq 30\%$ .

Del mismo modo en relación con la expresión inflamatoria se consideró expresión leve cuando COX-2 se mostraba en <40% de las células inflamatorias, y sobreexpresión cuando aparecía en  $\geq 40\%$  de las células

#### **b. Valoración inmunohistoquímica de iNOS**

Partiendo de estudios anteriores con este anticuerpo <sup>137</sup>, se realizó un análisis semicuantitativo del porcentaje y patrón de la expresión celular epitelial de iNOS. La presencia de una tinción marronácea citoplasmática y/o nuclear clara era un requisito para ser considerada en el contaje celular. Se consideró expresión epitelial leve cuando iNOS se encontraba en <30% de células epiteliales, y sobreexpresión cuando se encontraba en  $\geq 30\%$  de las células. El

patrón de tinción epitelial fue valorado en citoplasmático (C), nuclear (N) y citoplasmático-nuclear (CN).

En el infiltrado inflamatorio, se valoró únicamente la localización de las células inflamatorias que expresaban iNOS, ya fuera en el conectivo superficial (Cs) y/o conectivo profundo (Cp).

### **c. Valoración inmunohistoquímica de EGFR**

Basándonos en estudios precedentes <sup>199</sup>, realizamos un análisis semicuantitativo del porcentaje y del patrón de expresión celular epitelial de EGFR. La presencia de una tinción marronácea membranosa y/o citoplasmática clara era un requisito para ser considerada en el conteo celular. Se consideró expresión epitelial leve cuando se reconocía en <40% de las células, y sobreexpresión cuando se encontraba en ≥40% de las células. El patrón de expresión celular se valoró según se observó solo en la membrana (M) y/o en el citoplasma (MC).

### **d. Valoración inmunohistoquímica de MGMT**

Nuestro grupo ha realizado estudios previos con este anticuerpo que nos han servido de guía para realizar la valoración <sup>64</sup>. Se realizó un análisis semicuantitativo del porcentaje celular, del patrón y la localización de la expresión epitelial de MGMT. La presencia de una tinción marronácea citoplasmática y/o nuclear clara era un requisito para ser considerada en el conteo celular. Se consideró expresión leve cuando MGMT se encontraba en <10% de las células, y sobreexpresión cuando se encontraba en ≥10% de las células epiteliales. El patrón de expresión celular epitelial fue valorado en expresión nuclear (N) y citoplasmática (C).

La intensidad de la expresión epitelial, así como la expresión en las células inflamatorias de este marcador no fue valorada.

### **e. Valoración inmunohistoquímica de MMP-9**

Basados en estudios previos <sup>41,166</sup>, hemos realizado una leve modificación para el análisis semicuantitativo del porcentaje y patrón de expresión celular epitelial de MMP-9. La presencia de una tinción marronácea citoplasmática y/o nuclear clara era un requisito para ser considerada en el conteo celular. Se considero expresión epitelial leve cuando MMP-9 se reconocía en <15% de las células, y sobreexpresión cuando se encontraba  $\geq 15\%$  de las células. El patrón de expresión fue valorado en citoplasmático (C) o citoplasmático y nuclear (CN). No se valoro la expresión en el infiltrado inflamatorio

### **f. Valoración inmunohistoquímica de CD31**

Siguiendo estudios anteriores <sup>67,174</sup>, se realizó un conteo de vasos positivos para CD31 en 5 campos representativos de la muestra a un aumento de 200x (objetivo 20x y ocular 10x), para posteriormente obtener la media de vasos positivos. Se consideró como expresión positiva la existencia de cualquier estructura vascular y/o conjunto de células endoteliales con expresión, sin importar la intensidad. No obstante, una tinción marronácea clara era requisito para ser considerada en el conteo celular. La microdensidad vascular (MDV) se expresó como la media de vasos positivos para cada caso. Se consideró una MDV leve cuando las estructuras vasculares positivas eran <5 y alta cuando eran  $\geq 5$  (**Tabla 3.9**). Se valoró además la presencia o ausencia de grupos de células endoteliales CD31 positivas, que fueron interpretadas como vasos en neoformación aunque la luz vascular no fuera reconocida todavía.

### **g. Valoración inmunohistoquímica de p53**

Basándonos en diferentes estudios <sup>78,80,186,189</sup>, se realizó un análisis del porcentaje celular y de la localización de la expresión epitelial de p53, sin tomar en consideración la intensidad. No obstante, una tinción marronácea clara era requisito para ser considerada en el conteo celular. Se considero expresión

leve cuando existía expresión en menos del 10% de las células y sobreexpresión cuando aparecía en  $\geq 10\%$  de las células.

La localización de la expresión se evaluó como: basal cuando estaba confinada al núcleo de las células de las capas basales (1ª a 3ª capas), y suprasabal cuando la expresión se encontraba en células de capas superiores a la 3ª capa epitelial.

#### **h. Valoración inmunohistoquímica de Ki-67**

Siguiendo estudios precedentes <sup>70,71,186</sup>, se realizó el análisis de la localización de la expresión epitelial de Ki-67, sin tomar en consideración la intensidad. No obstante, una tinción marronácea clara era requisito para ser considerada en el conteo celular. Se considero expresión leve cuando existía expresión en menos del 10% de las células y positiva cuando era en  $\geq 10\%$  de las células.

La localización se evaluó como: basal cuando la expresión estaba confinada a las células de la capa basal (1ª a 3ª capas), y suprasabal cuando la expresión se encontraba en las células capas superiores de la 3ª capa epitelial.

#### **3.3.4. Análisis estadístico**

Con todos los datos obtenidos, se realizó un análisis estadístico descriptivo y comparativo, utilizando la aplicación informática SPSS® versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL, EEUU).

Las variables continuas se describen como medias, porcentajes y rangos. Las variables categóricas se describen en números absolutos y porcentajes.

El contraste de asociación de las variables categóricas se efectuó mediante la prueba de  $\chi^2$  de Pearson, y cuando las frecuencias esperadas eran inferiores a 5 se utilizó el test exacto de Fischer.

### **3.3.5. Búsqueda bibliográfica**

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las principales bases bibliográficas y bibliotecas virtuales disponibles en Internet, como Medline, National Library of Medicine (Pubmed) o Scielo con las palabras claves: enfermedad liquenoide oral, líquen plano, lesión liquenoide, carcinogénesis oral, COX-2, iNOS, EGFR, MGMT, MMP-9, CD31, p53 y Ki-67.

A partir de estas búsquedas se obtuvieron más de 1500 referencias bibliográficas recientes, de las cuales se seleccionaron las directamente relacionadas con este trabajo. Para la ordenación de la bibliografía en este trabajo hemos utilizado el sistema Reference Manager Professional Edition Version 11© 2000, empleando el formato Vancouver.

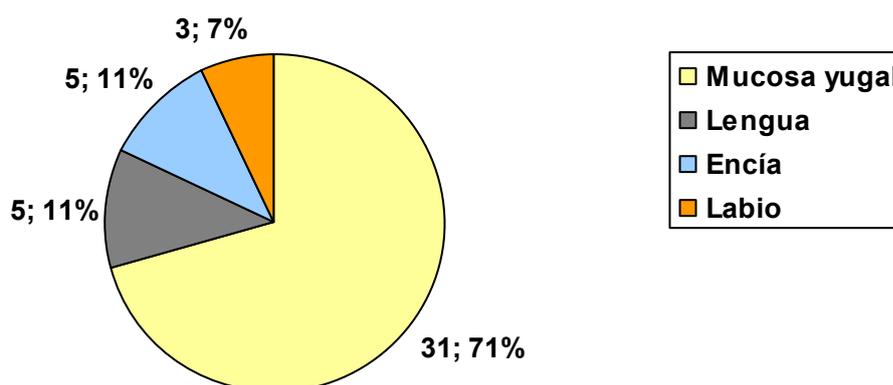


## 4. RESULTADOS

### 4.1. Aspectos Clínicos Generales

Se han estudiado las biopsias de 44 pacientes con ELO, de los cuales 30 (68,2%) eran mujeres y 14 (31,2%) hombres, con una media de edad de 56,4 años, en un rango entre 31 y 81 años.

La localización de las muestras fue de 31 casos en la mucosa yugal (MY) (70,5%), 5 en la lengua (11,4%), 5 en la encía (11,4%) y 3 en el labio (6,8%). Estas tres últimas localizaciones fueron agrupadas en un único grupo denominado "otras localizaciones" (OL) con 13 casos (29,5%) (**Figura 4.1**).



**Figura 4.1.** Localización de las muestras de ELO sometidas a biopsia

### 4.2. Aspectos histopatológicos generales

En relación con las características epiteliales se reconoció paraqueratosis en 20 casos (45,5%) y para y ortoqueratosis en 24 (54,5%).

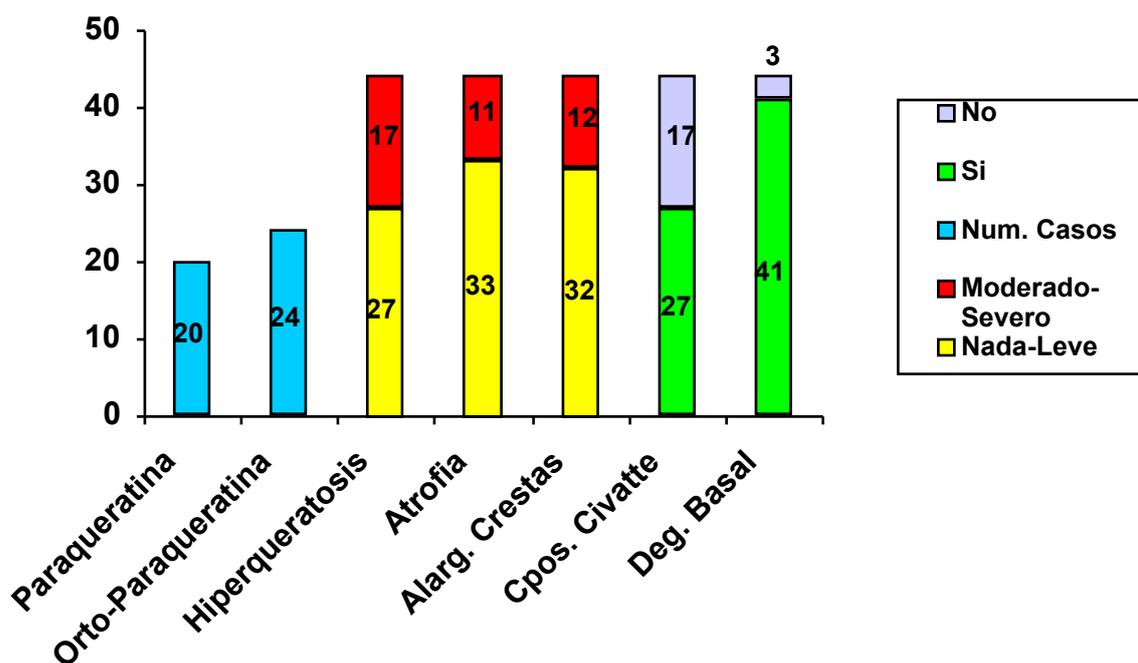
No existía hiperqueratosis o fue leve en 27 casos (61,4%) y era moderada-severa en 17 (38,6%).

No se reconocía atrofia o fue leve en 33 casos (75%) y era moderada-severa en 11 (25%).

No constatamos alargamiento de las crestas epiteliales o era leve en 32 casos (72,7%) y moderada-severa en 12 (27,3%).

Se apreciaron disqueratinocitos (Civatte) en el epitelio en 17 casos (38,6%).

Se reconoció degeneración de queratinocitos de la capa basal en 41 casos (93,2%) (**Figura 4.2**).

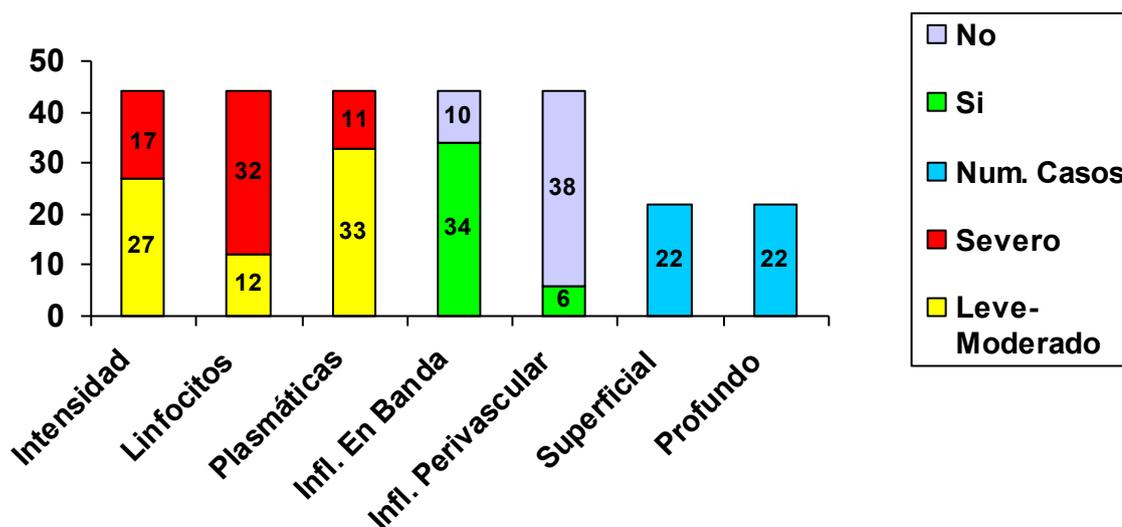


**Figura 4.2.** Frecuencias de las principales características epiteliales de las biopsias de ELO

En relación a las características del componente inflamatorio, se reconoció un infiltrado inflamatorio leve en 27 casos (61,4%) y moderado-severo en 17 (38,6%). Se observó presencia leve de linfocitos y plasmáticas en 12 (27,3%) y 33 (75%) casos respectivamente, y fue moderada-severa en 32 (72,7%) y 11 (25%) casos respectivamente.

Se constato la existencia de un infiltrado inflamatorio en banda en 34 casos (77,3%), y un infiltrado perivascular en 6 casos (13,6%).

La localización del infiltrado fue superficial en 22 casos (50%) y profundo en los 22 restantes (50%) (**Figura 4.4**).



**Figura 4.3.** Frecuencias de las principales características del infiltrado inflamatorio en las biopsias de ELO

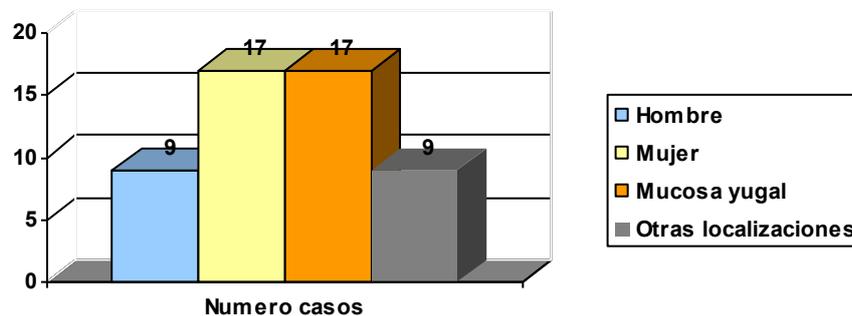
### 4.3. Grupos clínicos

#### Grupo Clínico C1

Este grupo, constituido por los casos que presentaban únicamente lesiones pápulo-reticulares blanquecinas (**Figura 4.4**), estaba compuesto por 26 pacientes (59,1%), con una media de edad de 55,6 años en un rango de 31 a 82 años. De los 26 pacientes 17 eran mujeres (65,4%) y 9 hombres (34,6%). La localización de las biopsias en estos pacientes fue de 17 casos en MY (65,4%) y 9 en OL (34,6%) (**Figura 4.5**).



**Figura 4.4.** Lesiones pápulo-reticulares blancas un caso correspondiente al grupo C1



**Figura 4.5.** Frecuencias en función del sexo y la localización de la biopsia en el grupo C1

### Características epiteliales

Se reconoció paraqueratosis en 10 casos (38,5%) y para-ortoqueratosis en 16 (61,5%). No encontramos hiperqueratosis o fue leve en 12 casos (46,2%) y moderada-severa en 14 (53,8%), sin atrofia o leve en 18 casos (69,2%) y moderada-severa en 8 (30,8%).

No existía alargamiento de las crestas epiteliales o era leve en 18 casos (69,2%) y moderado-severo en 8 (30,8%).

Se constató la presencia de disqueratinocitos (cuerpos de Civatte) en 17 casos (65,4%) y degeneración de la capa basal en 9 (34,6%).

### **Características inflamatorias**

Se reconoció un infiltrado inflamatorio leve en 17 casos (65,4%) y moderado-severo en 9 (34,6%). Se reconoció una presencia de linfocitos leve en 8 casos (30,8%) y moderada-severa en 18 (69,2%). Se apreció presencia plasmocitaria leve en 20 casos (76,9%) y moderada-severa en 6 (23,1%).

En 22 casos (84,6%) se observó un infiltrado inflamatorio con disposición en banda. Solo en 2 casos (7,7%) se observó inflamación perivascular. En 14 casos (53,8%) el infiltrado era superficial, mientras que en los 12 restantes (46,2%) era profundo.

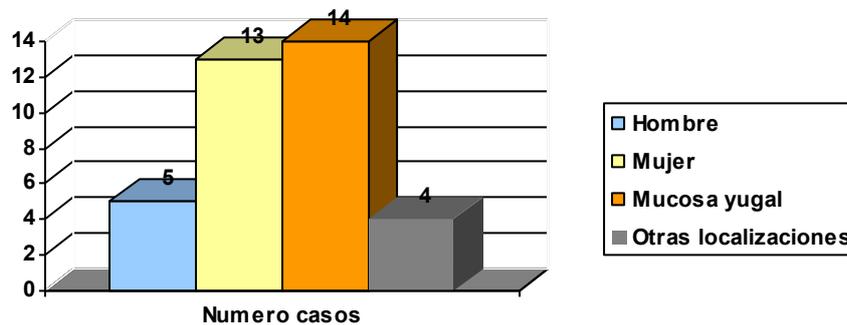
### **Grupo Clínico C2**

Este grupo, constituido por los casos que presentaban lesiones pápulo-reticulares blancas junto a otras lesiones atróficas, erosivas y/o ulcerativas (**Figura 4.6**), estaba compuesto por 18 pacientes (40,9%), con una media de edad de 57,6 años en un rango de 32 a 81 años. De los 18 pacientes 13 eran mujeres (72,2%) y 5 hombres (27,8%).

La localización de las biopsias en estos pacientes fue de 14 casos en MY (77,8%) y 4 en OL (22,2%) (**Figura 4.7**).



**Figura 4.6.** Lesiones atróficas y erosivas en un caso correspondiente al grupo C2



**Figura 4.7.** Frecuencias en función del sexo y la localización de la biopsia en el grupo C2

### Características epiteliales

Se reconoció paraqueratosis en 10 casos (55,6%) y para-ortoqueratosis en 8 (44,4%), nada o leve hiperqueratosis en 15 casos (83,3%) y moderada-severa en 3 (16,7%), sin atrofia o leve en 15 casos (83,3%) y moderada-severa en 3 (16,7%). No existía alargamiento de crestas epiteliales o era leve en 14 casos (77,8%) y moderado-severo en 4 (22,2%). Se constató la presencia de

disqueratinocitos (cuerpos de Civatte) en 10 (55,6%) casos y de degeneración celular en la capa basal en 16 (88,9%).

### **Características inflamatorias**

Se reconoció un infiltrado inflamatorio leve en 10 casos (55,6%) y moderado-severo en 8 (44,4%). Se reconoció una presencia de linfocitos leve en 4 casos (22,2%) y moderada-severa en 14 (77,2%). Se apreció una presencia plasmocitaria leve en 13 casos (72,2%) y moderada-severa en 5 (27,8%).

En 12 casos (66,7%) se observó un infiltrado inflamatorio con disposición en banda y en 4 casos (22,2%) se reconoció inflamación perivascular. En 8 casos (44,4%) el infiltrado inflamatorio era superficial mientras que en los 10 restantes (55,6%) era profundo.

### **Análisis histopatológico comparativo entre los grupos C1 y C2**

Al comparar las características epiteliales entre los grupos clínicos solo se reconocieron diferencias significativas en relación con la intensidad de la hiperqueratosis. Se observó un mayor número de casos con hiperqueratosis moderada-severa en el grupo C1 (53,8%) comparado con el grupo C2 (16,7%) ( $p=0.013$ ).

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de las características epiteliales ni en las del infiltrado inflamatorio ( $p>0.05$ ) **(Tabla 4.1)**

**Tabla 4.1.** Características histológicas en los diferentes grupos clínicos

	Grupos clínicos de ELO		
	C1 (%)	C2 (%)	p
Paraqueratosis	10 (38,5)	10 (55,6)	>0,05
Para-Ortoqueratosis	16 (61,5)	8 (44,4)	
Hiperqueratosis	14 (53,8)	3 (16,7)	0.013
Atrofia	8 (30,8)	3 (16,7)	>0,05
Alargamiento crestas	8 (30,8)	4 (22,2)	
Disqueratosis (Civatte)	17 (65,4)	10 (55,6)	
Degeneración de capa basal	25 (96,2)	16 (88,9)	
Inflamación	9 (34,6)	8 (44,4)	
Linfocitos	18 (69,2)	14 (77,8)	
Células plasmáticas	6 (23,1)	5 (27,8)	
Inflamación en banda	22 (84,6)	12 (66,7)	
Inflamación perivascular	2 (7,7)	4 (22,2)	
Inflamación superficial	14 (53,8)	8 (44,4)	
Inflamación profunda	12 (46,2)	10 (55,6)	

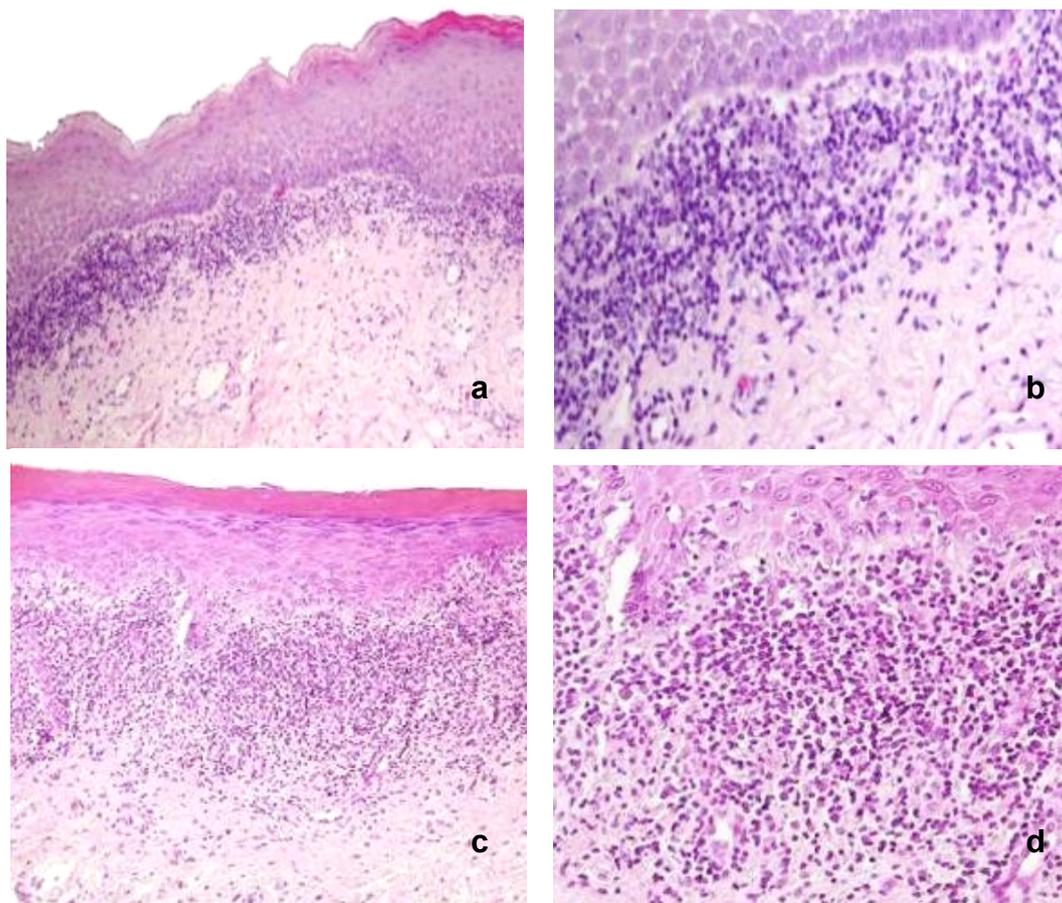
C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

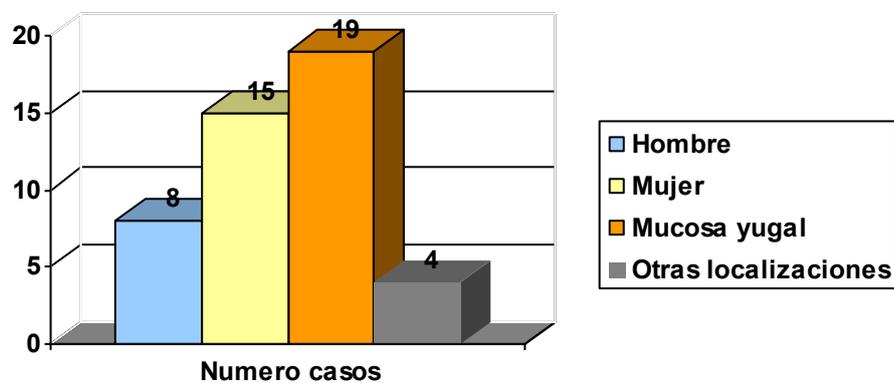
#### 4.4. Grupos histológicos

##### Grupo HT

Este grupo estaba constituido por los casos que mostraban en la biopsia un infiltrado inflamatorio crónico principalmente linfocitario en el corion con una disposición en banda y signos de degeneración de la capa basal epitelial (**figura 4.8**). Este grupo estaba compuesto por 23 pacientes (52,3%), con una media de edad de 56,1 años en un rango de 31 a 82 años. En relación con el género, 15 eran mujeres (65,2%) y 8 hombres (34,8%). La localización de las biopsias en estos pacientes fue de 19 casos en MY (82,6%) y 4 en OL (17,4%) (**Figura 4.9**).



**Figura 4.8.** Casos del grupo HT donde se reconoce la presencia de un infiltrado crónico linfocitario “en banda” (a) (20x) y (b) (40x) y la degeneración de capa basal de queratinocitos (c) (20x) y (d) (40x).



**Figura 4.9.** Frecuencias en función del sexo y de la localización de la biopsia en el grupo HT

## Características epiteliales

Se reconoció paraqueratosis en 6 casos (26,1%) y para-ortoqueratosis en 17 (73,9%). No existía hiperqueratosis o era leve en 13 casos (56,5%) y moderada-severa en 10 (43,5%). No había atrofia o era leve en 16 casos (69,6%) y moderada-severa en 7 (30,74%). No se existía o había leve alargamiento de las crestas epiteliales en 19 casos (82,6%) y moderado-severo en 4 (17,4%).

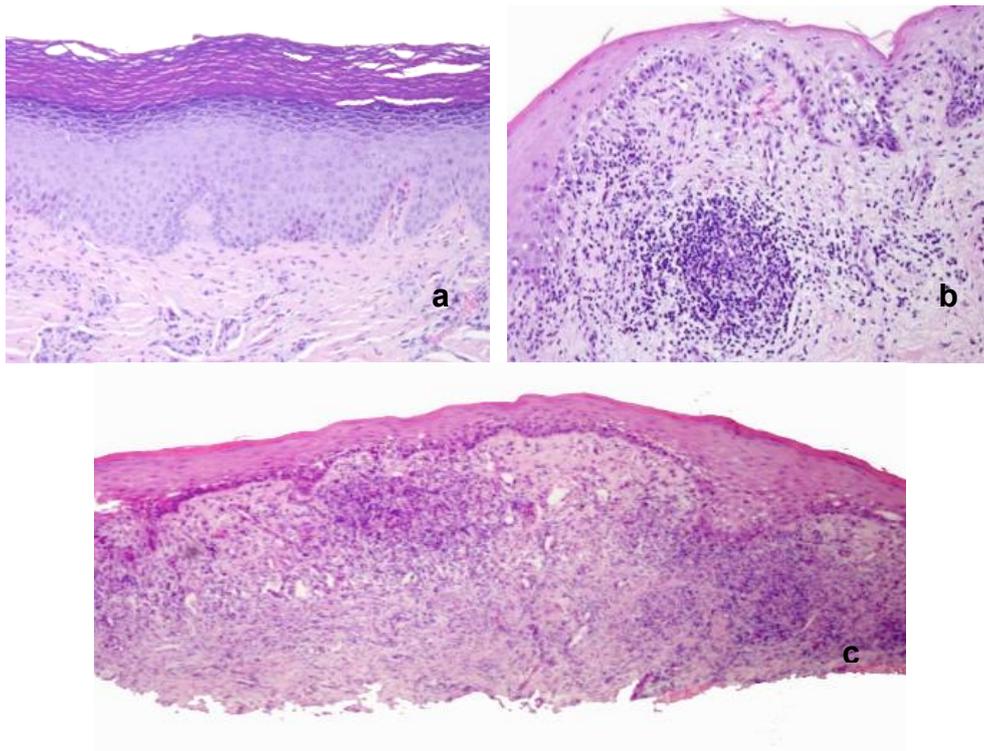
Se constató la presencia de disqueratinocitos (cuerpos de Civatte) en 13 casos (56,5%) y degeneración de la capa basal en los 23 casos (100%) ya que era una característica definitoria de este grupo.

## Características inflamatorias

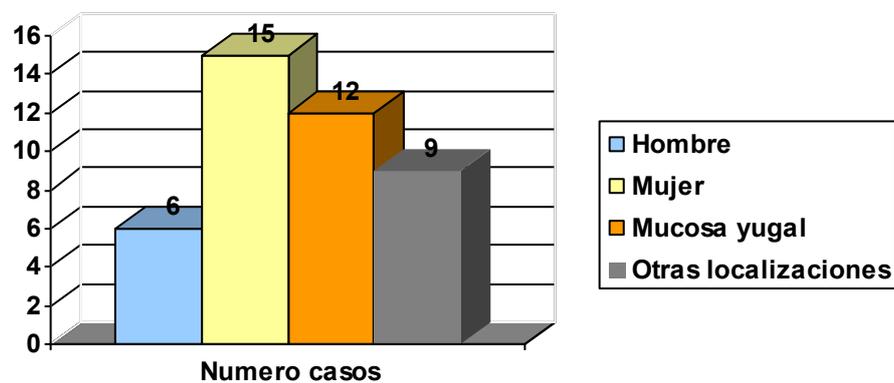
Se observó un infiltrado inflamatorio leve en 12 casos (52,2%) y moderado-severo en 11 (47,8%). Se reconoció una presencia linfocitaria leve en 2 casos (8,7%) y moderada-severa en 21 (91,3%), y presencia plasmocitaria leve en 17 casos (73,9%) y moderada-severa en 6 (27,1%). En los 23 casos (100%) se constató la presencia de un infiltrado inflamatorio en banda y en ningún caso se observó inflamación perivascular. En 14 casos (60,9%) el infiltrado era superficial, en los 9 restantes (39,1%) era profundo.

## Grupo HC

Este grupo estaba constituido por los casos que en la biopsia no presentaban al menos una de las características definidas para el grupo HT (**figura 4.10**), y estaba compuesto por 21 pacientes (47,7%), con una media de edad de 56,8 años en un rango de 32 a 76 años. En relación con el género, 15 eran mujeres (71,4%) y 6 hombres (28,6%). La localización de las biopsias en estos pacientes fue de 12 casos en MY (57,1%) y 9 en OL (42,9%) (**Figura 4.11**).



**Figura 4.10.** Casos correspondientes al grupo HC con ausencia tanto de infiltrado inflamatorio en banda como de signos de degeneración de la capa basal (a) (20x). Presencia de folículos germinales linfocitarios (b) (20x) e infiltrado inflamatorio profundo, discontinuo y difuso (c) (4x).



**Figura 4.11.** Frecuencias en función del sexo y de la localización de la biopsia en el grupo HC

## **Características epiteliales**

Se reconoció paraqueratosis en 14 casos (66,7%) y para-ortoqueratosis en 7 (33,3%). No existía hiperqueratosis o era leve en 14 casos (66,7%) y moderada-severa en 7 (33,3%). No había atrofia o era leve en 17 casos (81%) y moderada-severa en 4 (19%). No existía o había leve alargamiento de las crestas epiteliales en 13 casos (61,9%) y moderado-severo en 8 (38,1%).

Se constató la presencia de disqueratinocitos (cuerpos de Civatte) en 14 casos (66,7%) y degeneración de la capa basal en 18 casos (85,7%).

## **Características inflamatorias**

Se observó un infiltrado inflamatorio leve en 15 casos (71,4%) y moderado-severo en 6 (28,6%). Se reconoció una presencia linfocitaria leve en 10 casos (47,6%) y moderada-severa en 11 (52,4%), y presencia plasmocitaria leve en 16 casos (76,2%) y moderada-severa en 5 (23,8%).

En 11 casos (52,4%) se observó infiltrado inflamatorio en banda y en 6 casos (28,6%) se observó inflamación perivascular. En 8 casos (38,1%) el infiltrado era superficial, en los 13 restantes (61,9%) alcanzaba la submucosa.

## **Análisis histológico comparativo entre los grupos HT y HC**

Al comparar las características epiteliales entre los grupos histológicos, solo encontramos diferencias significativas en relación al tipo de queratinización presente en el epitelio. Ambos tipos de queratinización para y ortoqueratina fueron más frecuentes en el grupo HC (73,9%) comparado con el grupo HT (33,3%) ( $p=0,007$ ). Aunque la presencia de degeneración basal no fue considerada en el análisis comparativo por ser una característica de inclusión en el grupo HT, ésta característica estuvo presente en el 85,7% de los casos del grupo HC.

El resto de características epiteliales no mostraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) (**Tabla 4.2**).

Al comparar las características del infiltrado inflamatorio de ambos grupos histológicos observamos diferencias significativas en relación con la presencia de linfocitos y de inflamación perivascular. En el grupo HT la presencia de linfocitos era mayor (91,3%) comparado con del HC (52,4%) ( $p=0,004$ ). La inflamación perivascular solo estuvo presente en un 28,6% de los casos, todos pertenecientes al grupo HC ( $p=0,008$ ) (**Tabla 4.2**).

En relación con la presencia de una inflamación en banda, aunque no fue considerada en el estudio comparativo por ser un criterio de inclusión para el grupo HT, en el grupo HC solo estuvo presente en 52,4% de los casos. El resto de características del infiltrado inflamatorio no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos histológicos ( $p>0,05$ ). (**Tabla 4.2**).

**Tabla 4.1.** Características histológicas en los diferentes grupos clínicos

	Grupos histológicos de ELO		
	HT (%)	HC (%)	p
Paraqueratosis	6 (26,1)	14 (66,7)	0,007
Para-Ortoqueratosis	17 (73,9)	7 (33,3)	
Hiperqueratosis	10 (43,5)	7 (33,3)	>0,05
Atrofia	7 (30,4)	4 (19)	
Alargamiento crestas	4 (17,4)	8 (38,1)	
Disqueratosis (Civatte)	13 (56,5)	14 (66,7)	
Degeneración de capa basal	23 (100)	18 (85,7)	
Inflamación	11 (47,)	6 (28,6)	
Linfocitos	21 (91,3)	11 (52,4)	0,004
Células plasmáticas	6 (26,1)	5 (23,8)	>0,05
Inflamación en banda	23 (100)	11 (52,4)	<0,000*
Inflamación perivascular	0 (0)	6 (28,6)	0,008
Inflamación superficial	14 (60,9)	8 (38,1)	>0,05
Inflamación profunda	9 (39,1)	13 (61,9)	

\* Criterio característico del grupo HT.

## 4.5. Expresión de COX-2

### Expresión epitelial

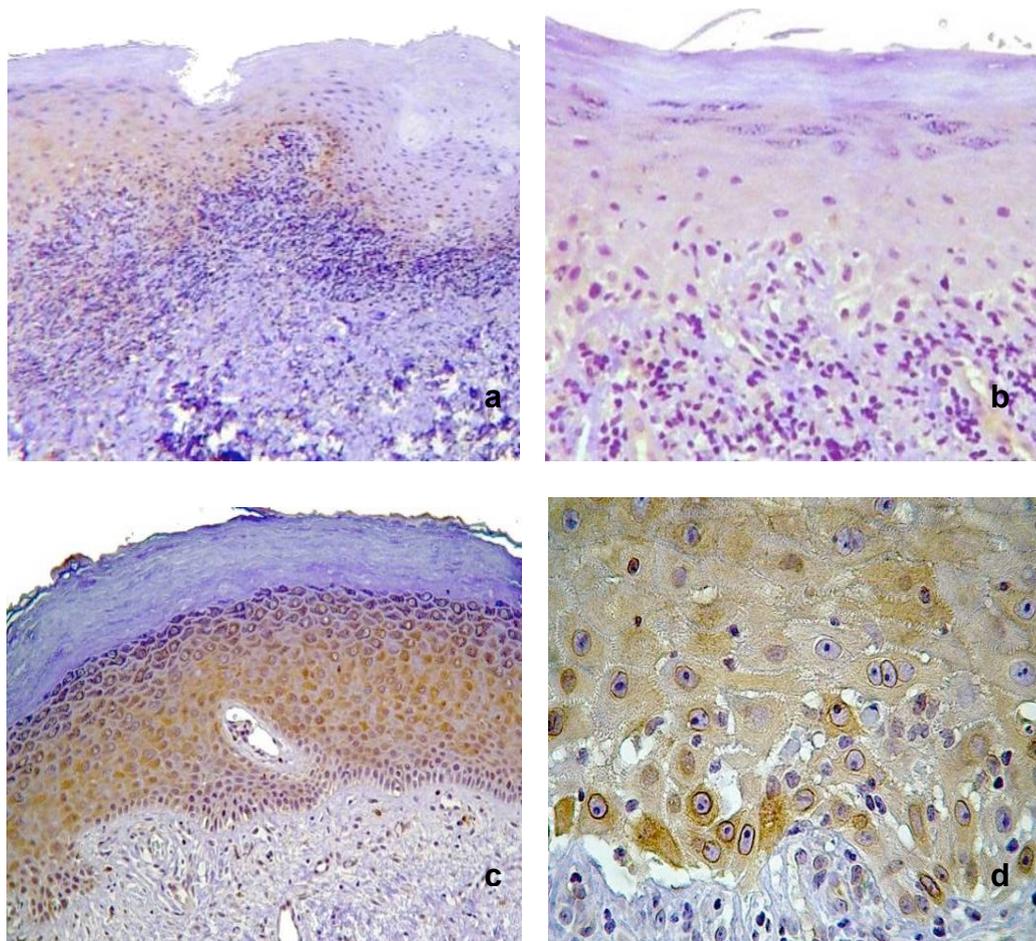
#### Controles

Los controles de mucosa sin alteraciones no mostraron expresión epitelial de COX-2. Por el contrario, los controles positivos correspondientes a COCE, mostraban una expresión citoplasmática granular difusa y perinuclear intensa en las células neoplásicas.

#### Casos

En todos los casos de ELO se reconoció expresión de COX-2 en las células de las capas basales, parabasales y espinosa del epitelio mucoso, mostrando un patrón citoplasmático granular difuso en todos los casos, y perinuclear intenso en 17 (38,6%).

Se reconoció sobreexpresión epitelial ( $\geq 30\%$  células) en 24 casos (54,5%), y expresión leve ( $< 30\%$  células) en 20 (45,5%). Todos los casos con sobreexpresión epitelial involucraban las capas basales y suprabasales, y en 17 de estos casos (70,8%), la expresión se extendía hasta la capa espinosa y granulosa (**Figura 4.6.1**).



**Figura 4.6.1.** Expresión epitelial de COX-2 en casos de ELO. Caso HT con expresión leve mostrando un patrón citoplasmático difuso (a y b) (20x y 40x). Caso HC con sobreexpresión mostrando expresión citoplasmática granular y perinuclear intensa (c y d) (20x y 40x).

### **Análisis comparativo**

De los 24 casos que mostraban sobreexpresión epitelial de COX-2, 13 casos (54,2%) correspondían al grupo C1 y 11 al grupo C2 (45,8%). No se encontraron diferencias significativas en relación con los grupos clínicos ( $p > 0,05$ ).

En relación con los grupos histológicos, 9 casos (37,5%) correspondían al grupo HT y 15 al grupo HC (62,5%) ( $p = 0,032$ ) (**Tabla 4.6.1**).

**Tabla 4.6.1.** Sobreexpresión epitelial de COX-2 en relación a los grupos clínicos e histológicos de ELO

	Sobreexpresión epitelial de COX-2 (%)	P
Grupo C1	13 (54,2)	>0,05
Grupo C2	11 (45,8)	
Grupo HT	9 (37,5)	0,032
Grupo HC	15 (62,5)	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

Al comparar las características histológicas de los casos con y sin sobreexpresión de COX-2, no se reconocieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 4.6.2).

**Tabla 4.6.2.** Características histológicas de los casos con y sin sobreexpresión epitelial de COX-2

	Sobreexpresión epitelial de COX-2		p
	NO (%)	SI (%)	
Paraqueratosis	7 (35)	13 (54,2)	>0,05
Para-Ortoqueratosis	13 (65)	11 (45,8)	
Hiperqueratosis	10 (50)	7 (29,2)	
Atrofia	7 (35)	4 (16,7)	
Alargamiento crestas	5 (25)	7 (29,2)	
Disqueratosis (Civatte)	11 (55)	16 (66,7)	
Degeneración de capa basal	20 (100)	21 (87,5)	
Inflamación	8 (40)	9 (37,5)	
Linfocitos	16 (80)	16 (66,7)	
Células plasmáticas	6 (30)	5 (20,8)	
Inflamación en banda	17 (85)	17 (70,8)	
Inflamación perivascular	1 (5)	5 (20,8)	
Inflamación superficial	9 (45)	13 (54,2)	
Inflamación profunda	11 (55)	11 (45,8)	

Al analizar las características histológicas de los casos que presentaban sobreexpresión en relación a los distintos grupos clínicos e histológicos, se observó que de los 13 casos con paraqueratinización, 11 (73,3%) pertenecían al grupo HC ( $p=0,03$ ) (**Tabla 4.6.3**). Aunque en el grado de hiperqueratosis existía una notoria diferencia en los porcentajes, no era estadísticamente significativa, probablemente debido al bajo número de casos.

En 5 de los casos (83,3%) que mostraron inflamación perivascular, se reconoció sobreexpresión epitelial de COX-2, y todos ellos pertenecían al grupo HC. No obstante, debido al bajo número de casos no lo consideramos estadísticamente representativo.

En el resto de características histológicas no se apreciaron diferencias significativas en relación a los diferentes grupos clínicos y/o histológicos ( $p>0,05$ ) (**Tabla 4.6.3**).

**Tabla 4.6.3.** Características histológicas de los casos de ELO con sobreexpresión de COX-2 en relación a los diferentes grupos clínicos e histológicos

	Sobreexpresión epitelial de COX-2					
	C1 (%)	C2 (%)	p	HT (%)	HC (%)	p
<b>Paraqueratosis</b>	6 (46,2)	7 (53,8)	>0,05	2 (22,2)	11 (73,3)	0,03
<b>Para-Ortoqueratosis</b>	7 (63,6)	4 (36,4)		7 (77,8)	4 (26,6)	
<b>Hiperqueratosis</b>	6 (46,2)	1 (9,1)	0,07	3 (33,3)	4 (26,7)	>0,05
<b>Atrofia</b>	2 (15,4)	2 (18,2)		1 (11,1)	3 (20)	
<b>Alargamiento crestas</b>	5 (38,5)	2 (18,2)		1 (11,1)	6 (40)	
<b>Disqueratosis (Civatte)</b>	10 (76,9)	6 (54,5)		5 (55,6)	11 (73,3)	
<b>Degeneración de capa basal</b>	12 (92,3)	9 (81,8)		9 (100)	12 (80)	
<b>Inflamación</b>	5 (38,5)	4 (36,4)		5 (55,6)	4 (22,7)	
<b>Linfocitos</b>	9 (69,2)	7 (63,6)	>0,05	8 (88,9)	8 (53,3)	>0,05
<b>Células plasmáticas</b>	3 (23,1)	2 (18,2)		2 (22,2)	3 (20)	
<b>Inflamación en banda</b>	10 (76,9)	7 (63,3)		9 (100)	8 (53,3)	
<b>Inflamación perivascular</b>	2 (15,4)	3 (27,3)		0 (0)	5 (33,3)	
<b>Inflamación superficial</b>	7 (53,8)	6 (54,5)		6 (66,7)	7 (43,7)	
<b>Inflamación profunda</b>	6 (46,2)	5 (45,5)		3 (33,3)	8 (53,3)	

\* Criterio característico del grupo HT

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

## Expresión inflamatoria

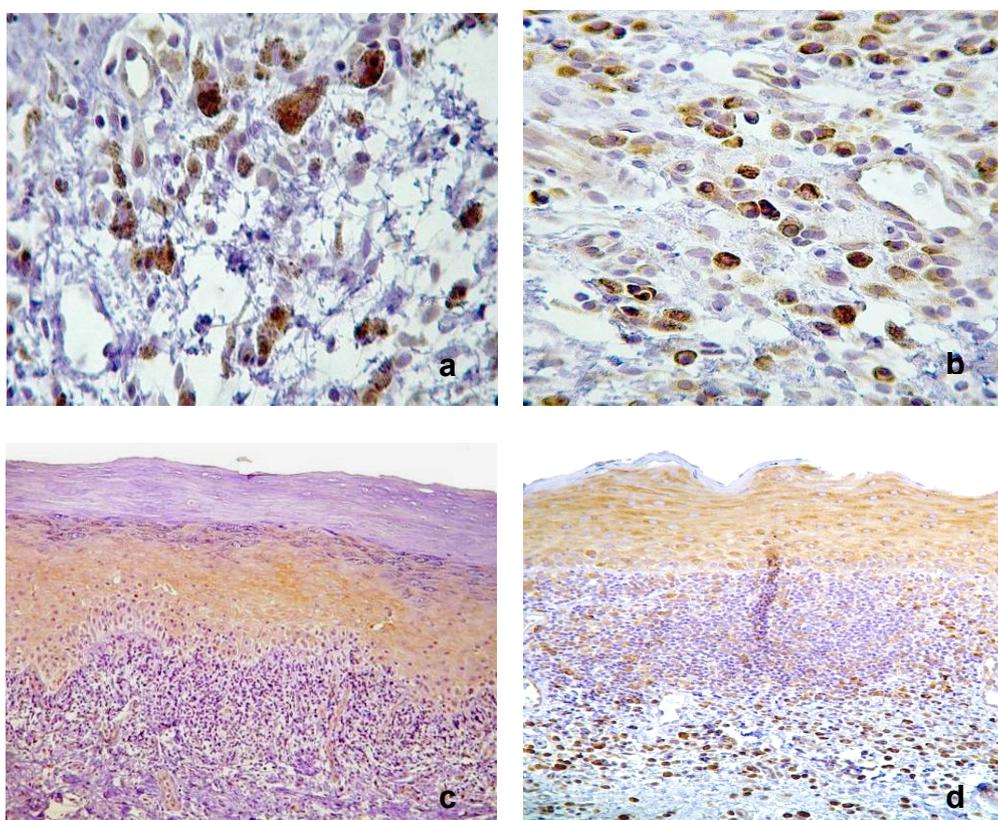
### Controles

Dado que en los controles de mucosa sin alteraciones el infiltrado inflamatorio era inexistente, no se observó expresión de COX-2. Por el contrario, las células del infiltrado inflamatorio asociado al COCE mostraron un patrón de expresión citoplasmático granular.

## Casos

Se reconoció expresión de COX-2 en las células inflamatorias mononucleares en los 44 casos de ELO, mostrando un patrón citoplasmático granular difuso (**Figura 4.6.3**).

Se reconoció sobreexpresión inflamatoria ( $\geq 40\%$  células) en 14 casos (31,8%), y expresión leve ( $< 40\%$  células) en 30 casos (68,2%) (**Figura 4.6.3**).



**Figura 4.6.3.** Expresión de COX-2 en células mononucleares del infiltrado inflamatorio mostrando un patrón citoplasmático granular intenso (a y b) (40x); Expresión inflamatoria leve en un caso HT (c) y sobreexpresión en un caso HC (d) (20x).

## Análisis comparativo

De los 24 casos que mostraban sobreexpresión de COX-2 en el infiltrado inflamatorio, 6 casos (42,9%) correspondían al grupo C1 y 8 al grupo C2 (57,1%). No se encontraron diferencias significativas en relación con los grupos clínicos ( $p > 0,05$ ). En relación con los grupos histológicos, 4 casos (28,6%) correspondían al grupo HT y 10 al grupo HC (71,4%) ( $p = 0,032$ ) (**Tabla 4.6.4**).

**Tabla 4.6.4.** Sobreexpresión epitelial de COX-2 en relación a los grupos clínicos e histológicos de ELO

	Sobreexpresión inflamatoria de COX-2 (%)	P
<b>Grupo C1</b>	<b>6 (42,9)</b>	<b>&gt;0,05</b>
<b>Grupo C2</b>	<b>8 (57,1)</b>	
<b>Grupo HT</b>	<b>4 (28,6)</b>	<b>0,032</b>
<b>Grupo HC</b>	<b>10 (71,4)</b>	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

Al comparar las características histológicas de los casos que mostraron sobreexpresión inflamatoria de COX-2 observamos diferencias significativas en relación al tipo de queratinización y la presencia de hiperqueratosis. Se reconoció paraqueratosis en 10 casos (71,4%) con sobreexpresión y en 10 sin sobreexpresión (33,3%) ( $p = 0,018$ ). Se reconoció hiperqueratosis sólo en 1 caso (7,1%) que mostraba sobreexpresión inflamatoria frente a 16 casos sin sobreexpresión (53,3%) ( $p = 0,03$ ) (**Tabla 4.6.5**).

**Tabla 4.6.5.** Características histológicas de los casos que mostraban sobreexpresión inflamatoria de COX-2

	Sobreexpresión inflamatoria de COX-2 en ELO		
	NO (%)	SI (%)	p
Paraqueratosis	10 (33,3)	10 (71,4)	0,018
Para-Ortoqueratosis	20 (66,7)	4 (28,6)	
Hiperqueratosis	16 (53,3)	1 (7,1)	0,003
Atrofia	10 (33,3)	1 (7,1)	>0,05
Alargamiento crestas	6 (20)	6 (42,9)	
Disqueratosis (Civatte)	17 (56,7)	10 (71,4)	
Degeneración de capa basal	29 (96,7)	12 (85,7)	
Inflamación	9 (30)	8 (57,1)	
Linfocitos	23 (76,7)	9 (64,3)	
Células plasmáticas	6 (20)	5 (35,7)	
Inflamación en banda	23 (76,7)	11 (78,6)	
Inflamación perivascular	3 (10)	3 (21,4)	
Inflamación superficial	17 (56,7)	5 (35,7)	
Inflamación profunda	13 (43,3)	9 (64,3)	

Al analizar las características histológicas de los casos que presentaban sobreexpresión inflamatoria y su relación con los distintos grupos clínicos e histológicos, hemos observado diferencias significativas en relación con la profundidad del infiltrado inflamatorio. De los 9 casos que mostraron sobreexpresión inflamatoria e inflamación profunda, 6 correspondían al grupo C1 (66,6%) y 3 al grupo C2 (33,4%) ( $p=0,03$ ) (**Tabla 4.6.6**).

En algunas de las características histológicas restantes, aunque si se observaron diferencias en los porcentajes, no fueron estadísticamente significativos en relación con los grupos clínicos ni histológicos de ELO ( $p>0,05$ ), probablemente debido al bajo números de casos en cada apartado (**Tabla 4.6.6**).

**Tabla 4.6.3.** Características histológicas de los casos de ELO con sobreexpresión de COX-2 en relación a los diferentes grupos clínicos e histológicos

	Sobreexpresión inflamatorio de COX-2 en ELO						
	C1 (%)	C2 (%)	p	HT (%)	HC (%)	p	
<b>Paraqueratosis</b>	4 (66,7)	6 (75)	>0,05	2 (50)	8 (80)	>0,05	
<b>Para-Ortoqueratosis</b>	2 (33,3)	2 (25)		2 (50)	2 (20)		
<b>Hiperqueratosis</b>	1 (16,7)	0 (0)		0 (0)	1 (10)		
<b>Atrofia</b>	1 (16,7)	0 (0)		0 (0)	1 (10)		
<b>Alargamiento crestas</b>	4 (66,7)	2 (25,5)		2 (50)	4 (40)		
<b>Disqueratosis (Civatte)</b>	4 (66,7)	6 (75)		3 (75)	7 (70)		
<b>Degeneración de capa basal</b>	6 (100)	6 (75)		4 (100)	8 (80)		
<b>Inflamación</b>	4 (66,7)	4 (50)		4 (100)	4 (40)		0,08
<b>Linfocitos</b>	4 (66,7)	5 (62,5)		4 (100)	5 (50)		0,07
<b>Células plasmáticas</b>	3 (50)	2 (25)		2 (50)	3 (30)		>0,05
<b>Inflamación en banda</b>	5 (83,3)	6 (75)	4 (100)	7 (70)			
<b>Inflamación perivascular</b>	1 (16,7)	2 (25)	0 (0)	3 (30)			
<b>Inflamación superficial</b>	0 (0)	5 (62,5)	2 (50)	3 (30)			
<b>Inflamación profunda</b>	6 (100)	3 (37,5)	0,03	2 (50)	7 (70)		

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

## 4.6. Expresión de iNOS

### Expresión epitelial

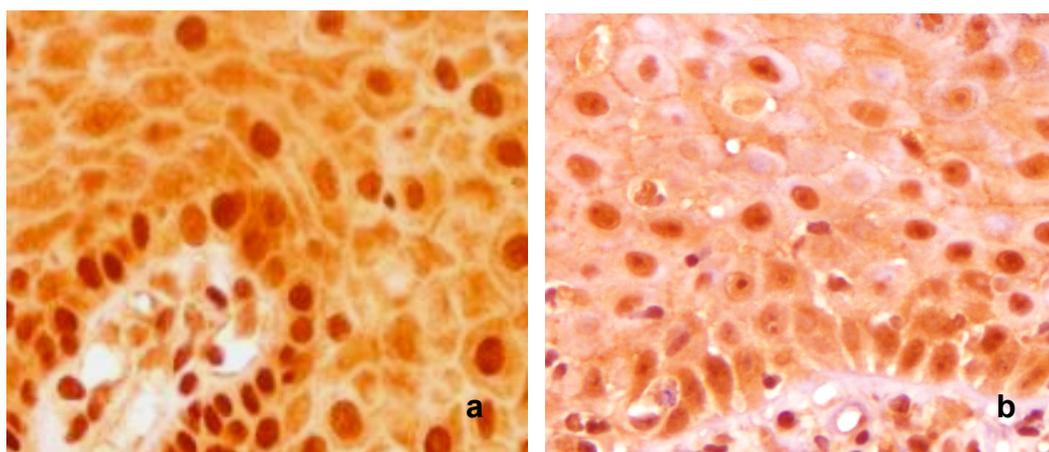
#### Controles

Los controles de mucosa sin alteraciones no mostraron expresión epitelial de iNOS. Por el contrario, los controles de COCE, mostraban expresión epitelial con un patrón membranoso, citoplasmático y nuclear.

#### Casos

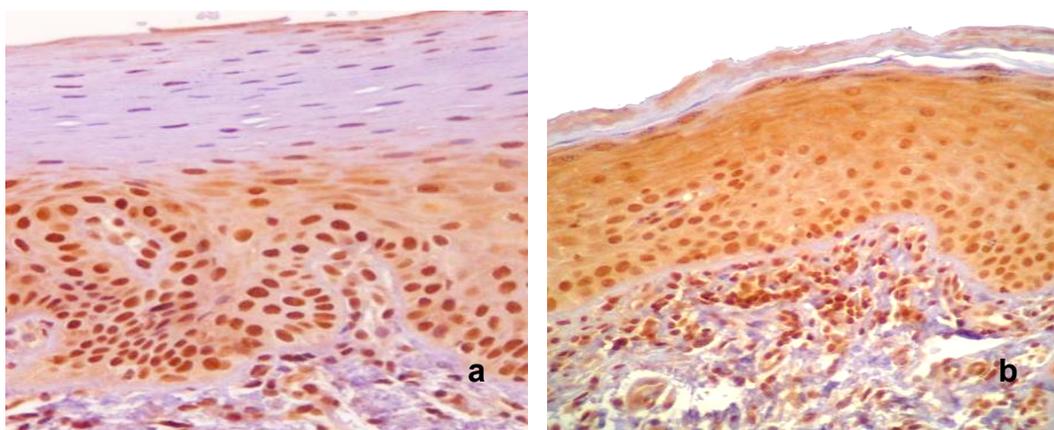
Se reconoció expresión epitelial de iNOS en 42 casos (95,5%) y en 2 (4,5%) la expresión fue negativa.

La expresión en el epitelio mucoso se observó en las células epiteliales de las capas basal, parabasal y espinosa, con un patrón de expresión citoplasmático y nuclear en 20 casos (47,6%) y en 22 casos (52,4%) también membranoso (**Figura 4.7.1**).



**Figura 4.7.1.** Expresión epitelial de iNOS mostrando un patrón citoplasmático-nuclear (a) y citoplasmático-nuclear y membranoso (b) (40x).

Se reconoció sobreexpresión epitelial de iNOS ( $\geq 30\%$  células) en 30 casos (71.4%), y expresión leve ( $< 30\%$  células) en los 12 restantes (28,6%) (Figura 4.7.2).



**Figura 4.7.2.-** Expresión epitelial de iNOS. Expresión epitelial leve en caso HT (a) y sobreexpresión en un caso HC (b) (20x).

### **Análisis comparativo**

De los 30 casos que presentaban sobreexpresión epitelial de iNOS, 16 correspondían al grupo C1 (53,3%) y 14 al grupo C2 (46,7%) ( $p > 0,05$ ). Respecto a los grupos histológicos, 11 casos (36,7%) correspondían al grupo HT y 19 al grupo HC (63,3%) ( $p = 0,002$ ) (Tabla 4.7.1).

Al comparar las características histológicas de los casos que mostraron sobreexpresión epitelial de iNOS, sólo hemos encontrado diferencias significativas en relación a la profundidad del infiltrado inflamatorio. Se observó que 19 casos (63,3%) con sobreexpresión epitelial de iNOS presentaban un infiltrado inflamatorio profundo, a diferencia de solo 3 casos (21,4%) en el grupo con expresión leve ( $p = 0,010$ ) (Tabla 4.7.2).

**Tabla 4.7.1.** Sobreexpresión epitelial de iNOS en función de los grupos clínicos e histológicos de ELO

	Sobreexpresión epitelial de iNOS	P
<b>Grupo C1</b>	<b>16 (53,3%)</b>	<b>&gt;0,05</b>
<b>Grupo C2</b>	<b>14 (46,7%)</b>	
<b>Grupo HT</b>	<b>11 (36,7%)</b>	<b>0,002</b>
<b>Grupo HC</b>	<b>19 (63,3%)</b>	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

**Tabla 4.7.2.** Características histológicas de los casos que mostraban sobreexpresión epitelial de iNOS

	Sobreexpresión epitelial de iNOS		p
	NO (%)	SI (%)	
<b>Paraqueratosis</b>	6 (42,9)	14 (46,7)	<b>&gt;0,05</b>
<b>Para-Ortoqueratosis</b>	8 (57,1)	16 (53,3)	
<b>Hiperqueratosis</b>	5 (35,7)	12 (40)	
<b>Atrofia</b>	4 (28,6)	7 (23,3)	
<b>Alargamiento crestas</b>	1 (7,1)	11 (36,7)	
<b>Disqueratosis (Civatte)</b>	8 (57,1)	19 (63,3)	
<b>Degeneración de capa basal</b>	14 (100)	27 (90)	
<b>Inflamación</b>	6 (42,9)	11 (36,7)	
<b>Linfocitos</b>	11 (78,6)	21 (70)	
<b>Células plasmáticas</b>	2 (14,3)	9 (30)	
<b>Inflamación en banda</b>	13 (92,9)	21 (70)	
<b>Inflamación perivascular</b>	1 (7,1)	5 (16,7)	
<b>Inflamación superficial</b>	11 (78,6)	11 (36,7)	
<b>Inflamación profunda</b>	3 (21,4)	19 (63,3)	

Al analizar las características histológicas en los casos que presentaban sobreexpresión epitelial de iNOS y su relación con los distintos grupos clínicos e histológicos sólo hemos observado diferencias significativas en relación al tipo de queratinización. Se reconoció paraqueratinización en 13 casos (68,4%) con sobreexpresión del grupo HC, frente a solo 1 del grupo HT (9,1%) ( $p=0,002$ ).

No hemos reconocido diferencias significativas en ningún parámetro en relación a los grupos clínicos ( $p>0,05$ ).

## **Expresión inflamatoria**

### **Controles**

Los controles de mucosa sin alteraciones no mostraron expresión inflamatoria de iNOS. Por el contrario, los controles de COCE, mostraban expresión epitelial con un patrón citoplasmático granular y nuclear.

### **Casos**

Se reconoció expresión intensa de iNOS en células mononucleares del infiltrado inflamatorio en los 44 casos de ELO, tanto en el infiltrado superficial como en el infiltrado profundo, mostrando un patrón citoplasmático y nuclear (**Figura 4.7.3**).

No se observaron diferencias significativas en relación a la localización de células inflamatorias con expresión de iNOS en el infiltrado inflamatorio respecto a los distintos grupos clínicos y/o histológicos de ELO ( $p>0,05$ ) (**Tabla 4.7.3**).

**Tabla 4.7.3.** Expresión inflamatoria de iNOS en relación a los diferentes grupos clínicos e histológicos ELO

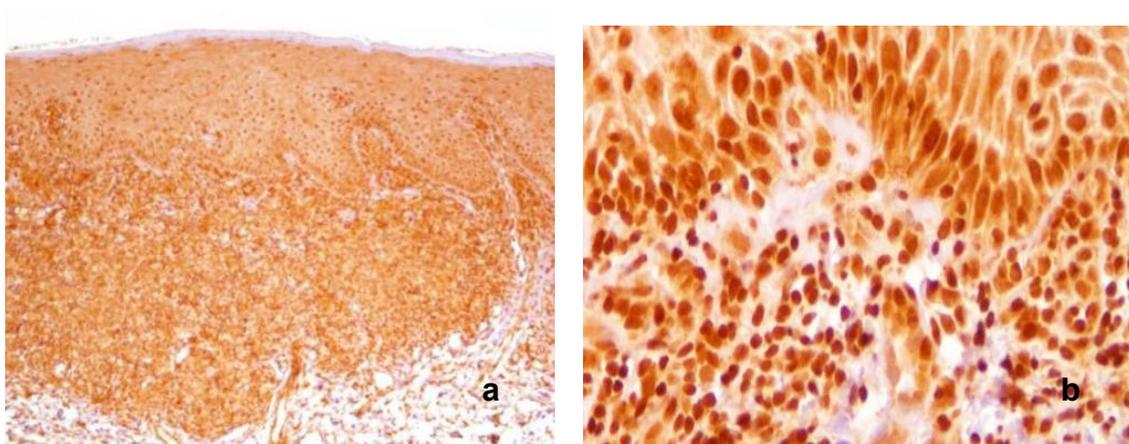
	Sobreexpresión inflamatoria iNOS			
	Superficial	p	Profunda	p
<b>Grupo C1</b>	14 (53,8)	>0,05	12 (46,2)	>0,05
<b>Grupo C2</b>	8 (44,4)		10 (55,6)	
<b>Grupo HT</b>	14 (60,6)		9 (39,1)	
<b>Grupo HC</b>	8 (38,1)		13 (61,9)	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO



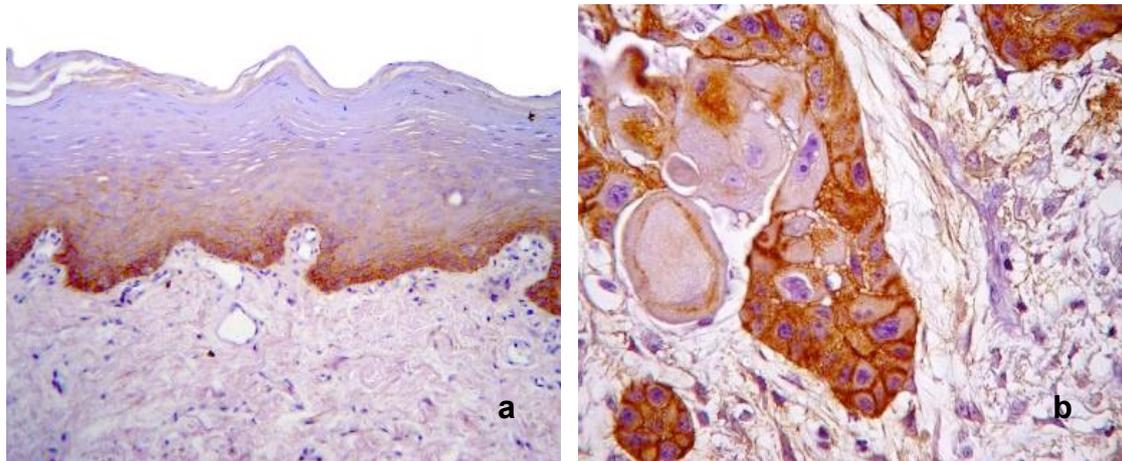
**Figura 4.7.3.** Sobreexpresión inflamatoria de iNOS severa en un caso HC (a) (20x) mostrando un patrón citoplasmático y nuclear intenso (b) (40x).

## 4.7. Expresión de EGFR

### Expresión epitelial

#### Controles

Los controles de mucosa sin alteraciones mostraron una expresión de EGFR limitada a las capas basales y parabasales del epitelio mucoso con un patrón de expresión principalmente en la membrana y con escasa expresión citoplasmática. Por el contrario, en las muestras de COCE la expresión epitelial fue intensa, tanto en la periferia como en el centro de las islas de células neoplásicas, mostrando una evidente expresión membranosa y citoplasmática granular (**Figura 4.5.1**).

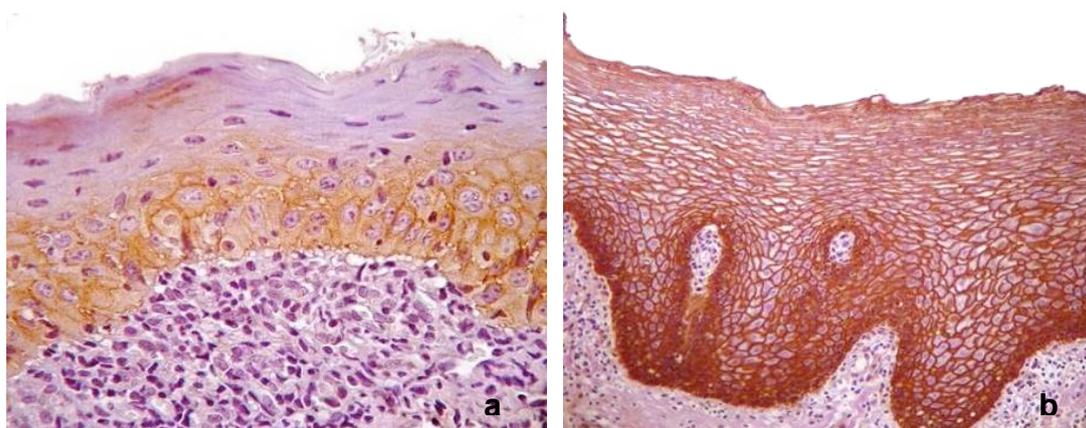


**Figura 4.5.1.** Expresión de EGFR leve en mucosa sin alteraciones epiteliales ni inflamatorias con patrón de membranoso y citoplasmático (a) y sobreexpresión en COCE mostrando un patrón membranoso y citoplasmático granular (b) (20x y 40x) .

## Expresión epitelial

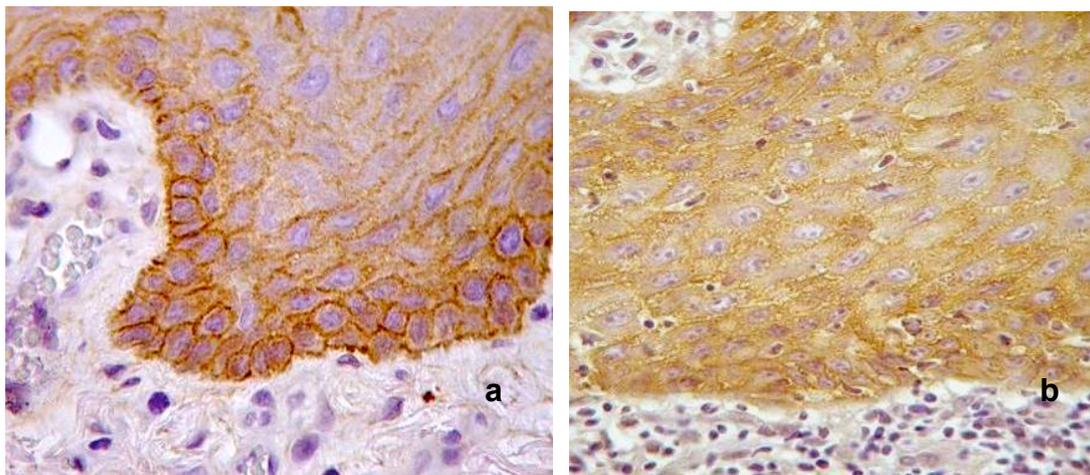
En los 44 casos de ELO se reconoció expresión de EGFR en las capas basales y parabasales del epitelio mucoso. En 39 casos (88,6%) se observó también expresión en la capa espinosa, y solo en 5 casos (11,4%) en las capas superficiales queratinizadas.

Se reconoció sobreexpresión de este marcador ( $\geq 40\%$  células) en 35 casos (79,5%) y expresión leve ( $< 40\%$  células) en 9 casos (20,5%) (**Figura 4.5.2**).



**Figura 4.5.2.** Expresión epitelial de EGFR en el epitelio de casos con ELO. Caso HT con una expresión leve (a) (40x) y caso HC con sobreexpresión (b) (20x).

En todos los casos se observó un patrón membranoso y en 31 casos (70,5%), además un patrón citoplasmático, leve en 13 (41,9%) y moderado-severo en 18 (58,1%) (**Figura 4.5.3**).



**Figura 4.5.3.-** Patrón de expresión de predominio membranoso (a), y membranoso-citoplasmático (b) (40x).

### **Análisis comparativo**

Al comparar la expresión epitelial de EGFR entre los grupos clínicos e histológicos de ELO, no han aparecido diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 4.5.1**).

Al comparar los casos que mostraban sobreexpresión de EGFR, hemos observado un patrón membranoso y citoplasmático moderado-severo en 11 casos del grupo C1 (64,7%) y en 6 del grupo C2 (54,5%) ( $p > 0,05$ ). En relación con los grupos histológicos, mostraron este patrón 6 casos (40%) del grupo HT y 11 (84,6%) del grupo HC ( $p = 0,016$ ) (**Tabla 4.5.2**).

**Tabla 4.5.1.** Sobreexpresión de EGFR en función de los grupos clínicos e histológicos de ELO

	Sobreexpresión EGFR	P
<b>Grupo C1</b>	<b>20 (76,9 %)</b>	<b>&gt;0,05</b>
<b>Grupo C2</b>	<b>15 (83,3 %)</b>	
<b>Grupo HT</b>	<b>18 (78,9 %)</b>	
<b>Grupo HC</b>	<b>17 (81,0 %)</b>	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

**Tabla 4.5.2.** Sobreexpresión de EGFR y patrón de membrana y citoplasmático en función de los grupos clínicos e histológicos de ELO

Sobreexpresión EGFR	Patrón Membranoso-citoplasmático	P
<b>Grupo C1</b>	<b>11 (64,7)</b>	<b>&gt;0,05</b>
<b>Grupo C2</b>	<b>6 (54,5)</b>	
<b>Grupo HT</b>	<b>6 (40)</b>	<b>0,016</b>
<b>Grupo HC</b>	<b>11 (84,6)</b>	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

Al analizar las características histológicas de los casos que mostraban sobreexpresión epitelial de EGFR, observamos diferencias significativas en relación con el tipo de queratinización. De los 35 casos con sobreexpresión, 19 (54,3%) presentaban paraqueratosis, frente a 1 caso (11,1%) en los que no mostraban sobreexpresión ( $p=0,027$ ).

El resto de características histológicas no mostraron diferencias reseñables ( $p>0,05$ ) (**Tabla 4.5.3**)

**Tabla 4.5.3.** Características histológicas de los casos de ELO en relación con la sobreexpresión epitelial de EGFR

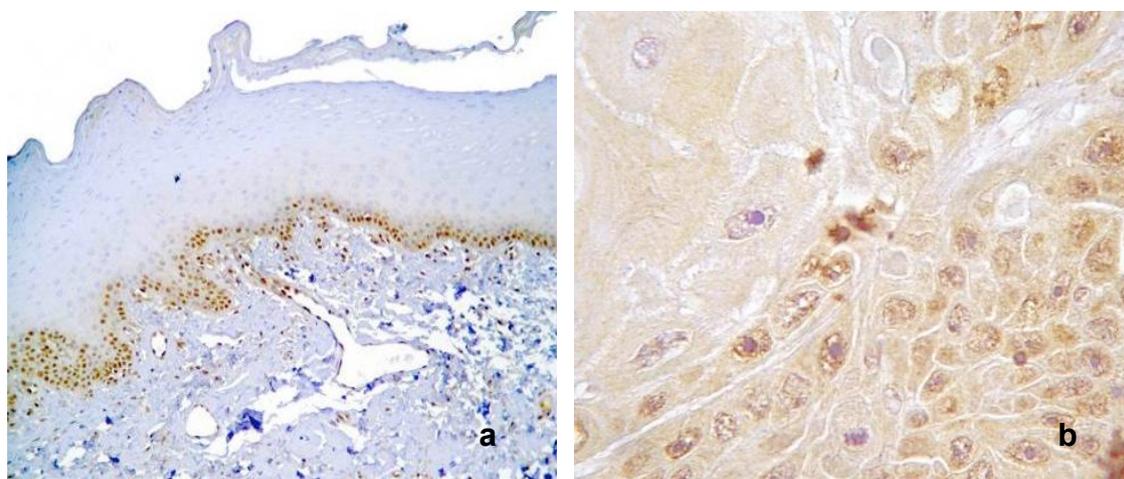
	Sobreexpresión epitelial de EGFR		
	NO (%)	SI (%)	p
<b>Paraqueratosis</b>	1 (11,1)	19 (54,3)	0,027
<b>Para-Ortoqueratosis</b>	8 (88,9)	16 (45,7)	
<b>Hiperqueratosis</b>	5 (55,6)	12 (34,3)	>0,05
<b>Atrofia</b>	2 (22,2)	9 (25,7)	
<b>Alargamiento crestas</b>	1 (11,1)	11 (31,4)	
<b>Disqueratosis (Civatte)</b>	6 (66,7)	21 (60)	
<b>Degeneración de capa basal</b>	9 (100)	32 (91,4)	
<b>Inflamación</b>	2 (22,2)	15 (42,9)	
<b>Linfocitos</b>	8 (88,9)	24 (68,6)	
<b>Células plasmáticas</b>	1 (11,1)	10 (28,6)	
<b>Inflamación en banda</b>	6 (66,7)	28 (80)	
<b>Inflamación perivascular</b>	1 (11,1)	5 (14,3)	
<b>Inflamación superficial</b>	5 (55,6)	17 (48,6)	
<b>Inflamación profunda</b>	4 (44,4)	18 (51,4)	

## 4.8. Expresión de MGMT

### Expresión epitelial

#### Controles

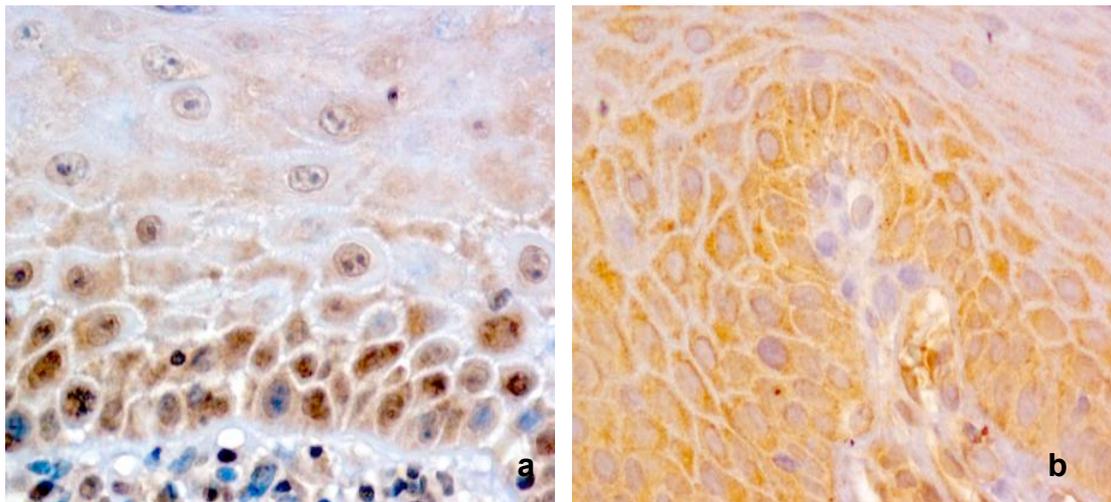
Los controles de mucosa sin alteraciones mostraron una expresión epitelial nuclear de MGMT en las capas basales y parabasales del epitelio mucoso. Por el contrario, los controles de COCE mostraron una expresión escasa nuclear y citoplasmática difusa de MGMT (**Figura 4.7.1**).



**Figura 4.7.1.** Expresión nuclear de MGMT en control de mucosa sin alteraciones (a) (20x). Expresión escasa nuclear y citoplasmática difusa en los nidos de COCE (b) (40x).

#### Casos

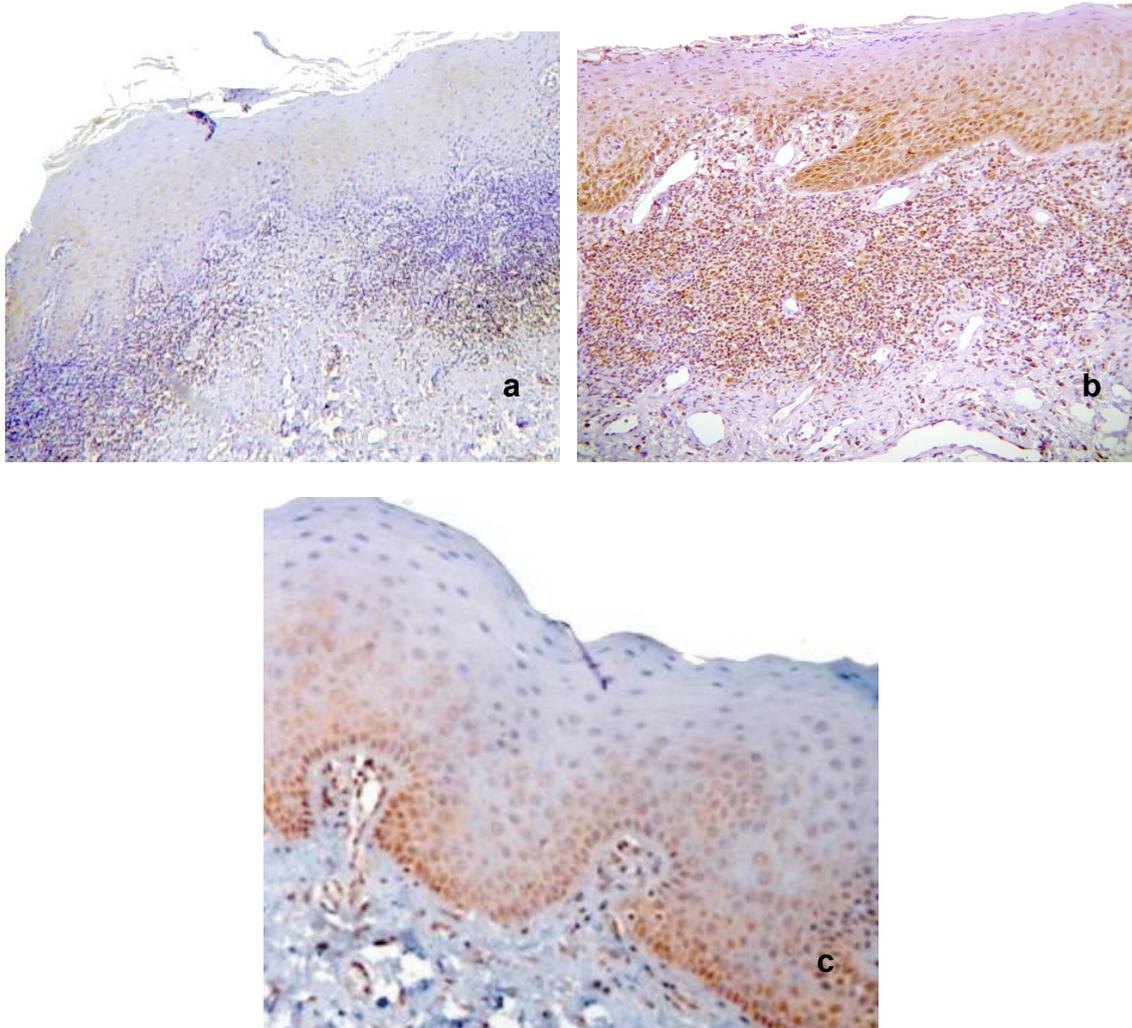
Hemos observado expresión epitelial positiva para MGMT ( $\geq 10\%$  células) en 39 casos (88,6%) y expresión negativa ( $< 10\%$  células) en 5 (11,4%). Se reconoció expresión en las células epiteliales de las capas basales y parabasales en 14 casos (31,8%). En 25 casos (56,8%) la expresión se extendía hasta la capa espinosa. El patrón de expresión era predominantemente nuclear (PN) en 3 casos (6,8%), y en 36 (81,8%) predominantemente citoplasmático (PC) (**Figura 4.7.2**)



**Figura 4.7.2.** Patrón de expresión epitelial de MGMT en casos de ELO. Patrón de expresión predominantemente nuclear y leve citoplasmática (PN) (40x) y predominantemente citoplasmático y leve perinuclear (PC) (40x).

### **Análisis comparativo**

De los 39 casos que mostraron expresión positiva para MGMT, 24 (61,5%) correspondían al grupo C1 y 15 (38,1%) al grupo C2. En relación con los grupos histológicos, 21 casos (53,8%) correspondían al grupo HT y 18 (46,2%) al grupo HC ( $p>0,05$ ) (**Figura 4.7.3**) (**Tabla 4.7.1**).



**Figura 4.7.3.** Expresión epitelial de MGMT en casos de ELO. Caso HT con expresión leve (a) y con sobreexpresión (b) (20x). Caso HC con expresión leve (c) (20x)

**Tabla 4.7.1.** Expresión epitelial de MGMT en los diferentes grupos clínicos e histológicos de ELO

	Expresión epitelial de MGMT (%)	P
Grupo C1	24 (61,5)	>0,05
Grupo C2	15 (38,1)	
Grupo HT	21 (53,8)	
Grupo HC	18 (46,2)	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

Al analizar tanto el patrón de expresión de MGMT como la localización en las diferentes capas del epitelio mucoso en los grupos clínicos e histológicos, no han aparecido diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Esta ausencia de diferencias estadísticamente significativas probablemente se explique por el bajo número de casos en algunos de los diferentes grupos analizados (**Tabla 4.7.2**).

Al analizar el patrón y la localización de la expresión epitelial de MGMT con las características histológicas, solo hemos reconocido diferencias significativas en relación con la presencia de inflamación perivascular y la localización de la expresión. En 4 casos (28,6%) que mostraban expresión basal-parabasal existía inflamación perivascular, frente a 1 caso (4%) en los que mostraban expresión suprabasal ( $p = 0,047$ ) (**Tabla 4.7.3**).

**Tabla 4.7.2.** Expresión epitelial de MGMT en los diferentes grupos clínicos e histológicos de ELO

	Expresión epitelial de MGMT 39 (100%)					
	Localización			Patrón		
	B-Pb	SPb	p	PN	PC	p
<b>Grupo C1</b>	10 (41,7%)	14 (58,3%)	>0,05	3 (12,5%)	21 (87,5%)	>0,05
<b>Grupo C2</b>	4 (26,7%)	11 (73,3%)		0 (0%)	15 (100%)	
<b>Grupo HT</b>	7 (33,3%)	14 (66,7%)		2 (9,2%)	19 (90,5%)	
<b>Grupo HC</b>	7 (38,9%)	11 (61,1%)		1 (5,6%)	17 (94,4%)	

**B-Pb:** Basal y Parabasal, **SPb:** Suprabasal, **PN:** Preferentemente nuclear,

**PC:** Preferentemente citoplasmático.

C1.- Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2.- Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

Un hallazgo interesante fue que en ningún caso que mostraba expresión predominantemente nuclear de MGMT, se reconoció la presencia de un infiltrado inflamatorio moderado-severo, ni alargamiento de las crestas epiteliales así como tampoco inflamación perivascular (**Tabla 4.7.3**).

En el análisis del resto de características las histológicas no hemos encontrado diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 4.7.3**).

**Tabla 4.7.3.** Características histológicas de los casos de ELO en relación con el patrón y localización de la expresión epitelial de MGMT

	Expresión epitelial de MGMT					
	B-Pb (%)	SPb (%)	p	PN (%)	PC (%)	p
Paraqueratosis	6 (42,9)	12 (48)	>0,05	2 (66,7)	16 (44,4)	>0,05
Para-Ortoqueratosis	8 (57,1)	13 (52)		1 (33,3)	20 (55,6)	
Hiperqueratosis	5 (35,7)	10 (40)		1 (33,3)	14 (38,9)	
Atrofia	6 (42,9)	4 (16)		1 (33,3)	9 (25)	
Alargamiento crestas	4 (28,6)	5 (20)		0 (0)	9 (25)	
Disqueratosis (Civatte)	8 (57,1)	15 (60)		1(33,3)	22 (61,1)	
Degeneración de capa basal	13 (92,9)	23 (92)		3 (100)	33 (91,7)	
Inflamación	4 (28,6)	10 (40)		0 (0)	14 (38,9)	
Linfocitos	12 (85,7)	16 (64)		2 (66,7)	26 (72,2)	
Células plasmáticas	4 (28,6)	5 (20)		1 (33,3)	8 (22,2)	
Inflamación en banda	10 (74,4)	21 (84)		2 (66,7)	29 (80,6)	
Inflamación perivascular	4 (28,6)	1 (4)	0,047	0 (0)	5 (13,9)	
Inflamación superficial	6 (42,9)	15 (60)	>0,05	2 (66,7)	19 (52,8)	
Inflamación profunda	8 (57,1)	10 (40)		1 (33,3)	17 (47,2)	

**B-Pb:** Basal y Parabasal

**SPb:** Suprabasal

**PN:** Preferentemente nuclear,

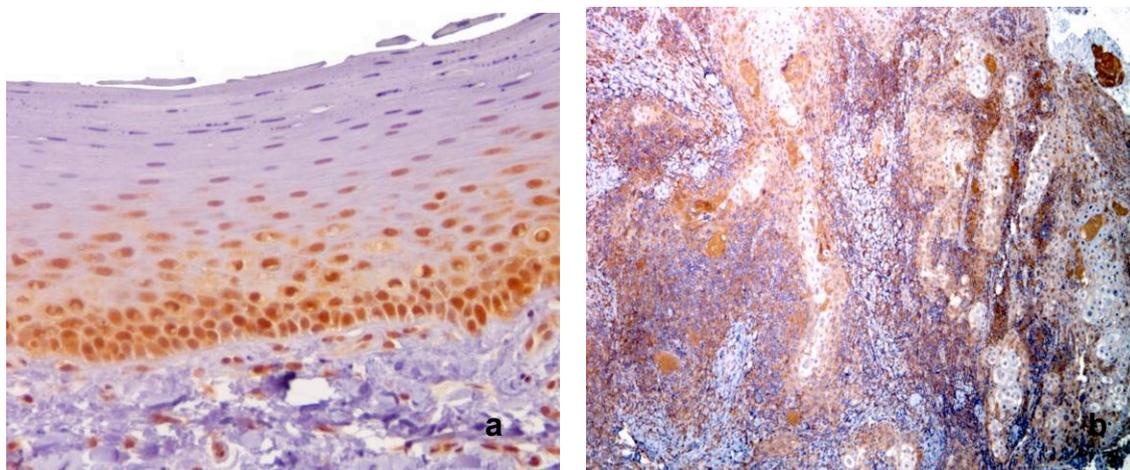
**PC:** Preferentemente citoplasmático.

## 4.9. Expresión de MMP-9

### Expresión epitelial

#### Controles

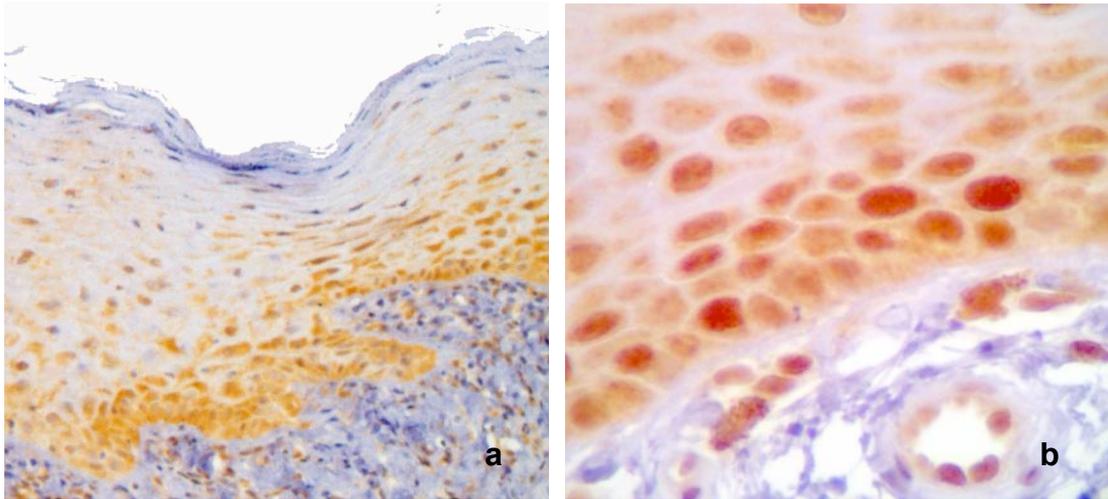
Los controles de mucosa sin alteraciones epiteliales ni inflamatorias mostraron expresión epitelial de MMP-9 citoplasmática y nuclear, principalmente en las capas basales y parabasales. Por el contrario, los casos de COCE mostraron expresión citoplasmática intensa de MMP-9 en las células de los nidos tumorales (**Figura 4.8.1**).



**Figura 4.8.1.** Expresión epitelial de MMP-9 en control de mucosa sin alteraciones epiteliales ni inflamatorias mostrando un patrón de expresión citoplasmático y nuclear en las capas basales y parabasales (a) (40x), y expresión intensa citoplasmática en nidos tumorales (b) (20x).

#### Casos

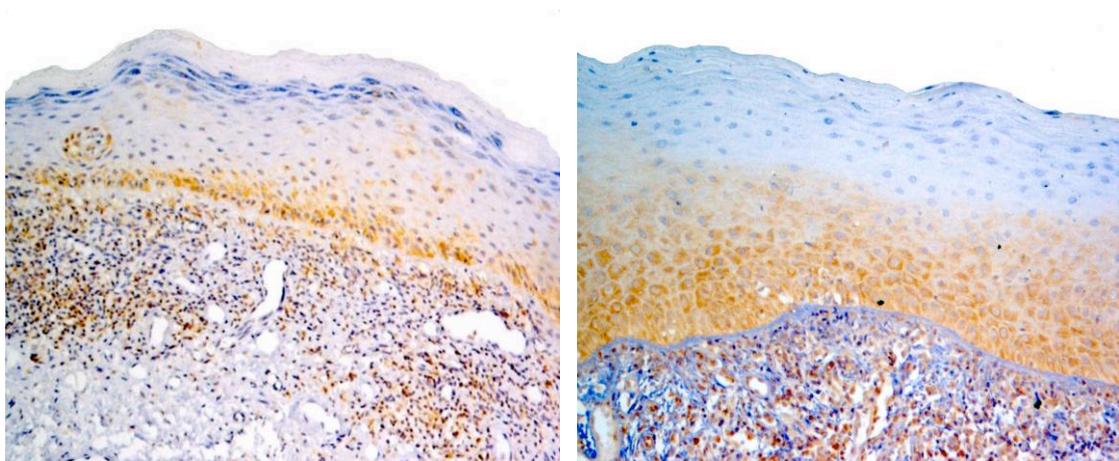
Se reconoció expresión epitelial de MMP-9 en 42 casos (95,5%) casos y fue negativa en 2 (4,5%). En 10 casos (23,8%) el patrón de expresión fue citoplasmático y en 32 (76,2%) fue citoplasmático y nuclear (**Figura 4.8.2**).



**Figura 4.8.2.** Expresión epitelial de MMP-9 en un caso de ELO mostrando patrón principalmente citoplasmático (a), y citoplasmático y nuclear (b) (40x).

La expresión de MMP-9 se localizaba en las capas basales y parabasales en 7 casos (16,7%). En los 35 restantes (83,3%) la expresión se observaba también la capa espinosa.

Se reconoció expresión leve (<15% células) en 8 casos (19%) y sobreexpresión ( $\geq$ 15% células) en 34 (81%) (**Figura 4.8.3 a y b**).



**Figura 4.8.3.** Expresión epitelial de MMP-9 en casos de ELO. Expresión leve (a) y sobreexpresión (b) (20x).

## Análisis comparativo

Al analizar los 34 casos que presentaban sobreexpresión epitelial de MMP-9, se observó que 19 correspondían al grupo C1 (55,9%) y 15 al grupo C2 (44,1%) ( $p>0,05$ ). Respecto a los grupos histológicos, 17 casos (50%) correspondían al grupo HT y 17 (50%) al grupo HC ( $p>0,05$ ) (**Tabla 4.8.1**).

**Tabla 4.8.1.** Sobreexpresión epitelial de MMP-9 en relación con los diferentes grupos clínicos e histológicos de ELO

	Sobreexpresión epitelial de MMP-9 (%)	P
<b>Grupo C1</b>	<b>19 (55,9)</b>	<b>&gt;0,05</b>
<b>Grupo C2</b>	<b>15 (44,1)</b>	
<b>Grupo HT</b>	<b>17 (50)</b>	
<b>Grupo HC</b>	<b>17 (50)</b>	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

Al analizar los casos que presentaban sobreexpresión de MMP-9 con las características histológicas estudiadas no hemos observado diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) (**Tabla 4.8.2**). No obstante, si se encontraron diferencias en los porcentajes en algunas características histológicas del infiltrado inflamatorio como es la presencia linfocitaria y plasmocitaria moderada-severa, así como de inflamación perivascular. Pensamos que esto puede ser debido al bajo número de casos en estas variables (**Tabla 4.8.2**).

**Tabla 4.8.2.** Características histológicas de los casos de ELO que mostraron sobreexpresión epitelial de MMP-9

	Sobreexpresión epitelial de MMP-9 34 (100%)		p
	C (%)	CN (%)	
Paraqueratosis	1 (25)	14 (46,7)	>0,05
Para-Ortoqueratosis	3 (75)	16 (53,3)	
Hiperqueratosis	2 (50)	12 (40)	
Atrofia	1 (25)	7 (23,3)	
Alargamiento crestas	1 (25)	8 (26,7)	
Disqueratosis (Civatte)	2 (50)	19 (63,3)	
Degeneración de capa basal	4 (100)	28 (93,3)	
Inflamación	2 (50)	12 (40)	
Linfocitos	4 (100)	20 (66,7)	
Células plasmáticas	2 (50)	7 (23,3)	
Inflamación en banda	2 (50)	23 (76,7)	
Inflamación perivascular	0 (0)	5 (16,7)	
Inflamación superficial	2 (50)	2 (50)	
Inflamación profunda	15 (50)	15 (50)	

C: Patrón de expresión citoplasmático

CN: Patrón de expresión citoplasmático-nuclear

Al comparar el patrón y la localización de la expresión epitelial de MMP-9 en relación a los grupos clínicos e histológicos no hemos apreciado diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 4.8.3**).

**Tabla 4.8.3.** Patrón y localización de expresión de MMP-9 en los distintos grupos clínicos e histológicos de los casos de ELO

	Sobreexpresión epitelial de MMP-9					
	Patrón			Localización		
	C (%)	CN (%)	p	B (%)	SB (%)	P
<b>Grupo C1</b>	7 (28)	18 (72)	<b>&gt;0,05</b>	6 (24)	19 (76)	<b>&gt;0,05</b>
<b>Grupo C2</b>	3 (17,6)	14 (82,4)		1 (5,9)	16 (94,1)	
<b>Grupo HT</b>	6 (26,1)	17 (73,9)		6 (26,1)	17 (73,9)	
<b>Grupo HC</b>	4 (21,1)	15 (78,9)		1 (5,3)	18 (94,7)	

C: Patrón de expresión citoplasmático

CN: Patrón de expresión citoplasmático-nuclear

B: Expresión basal y parabasal

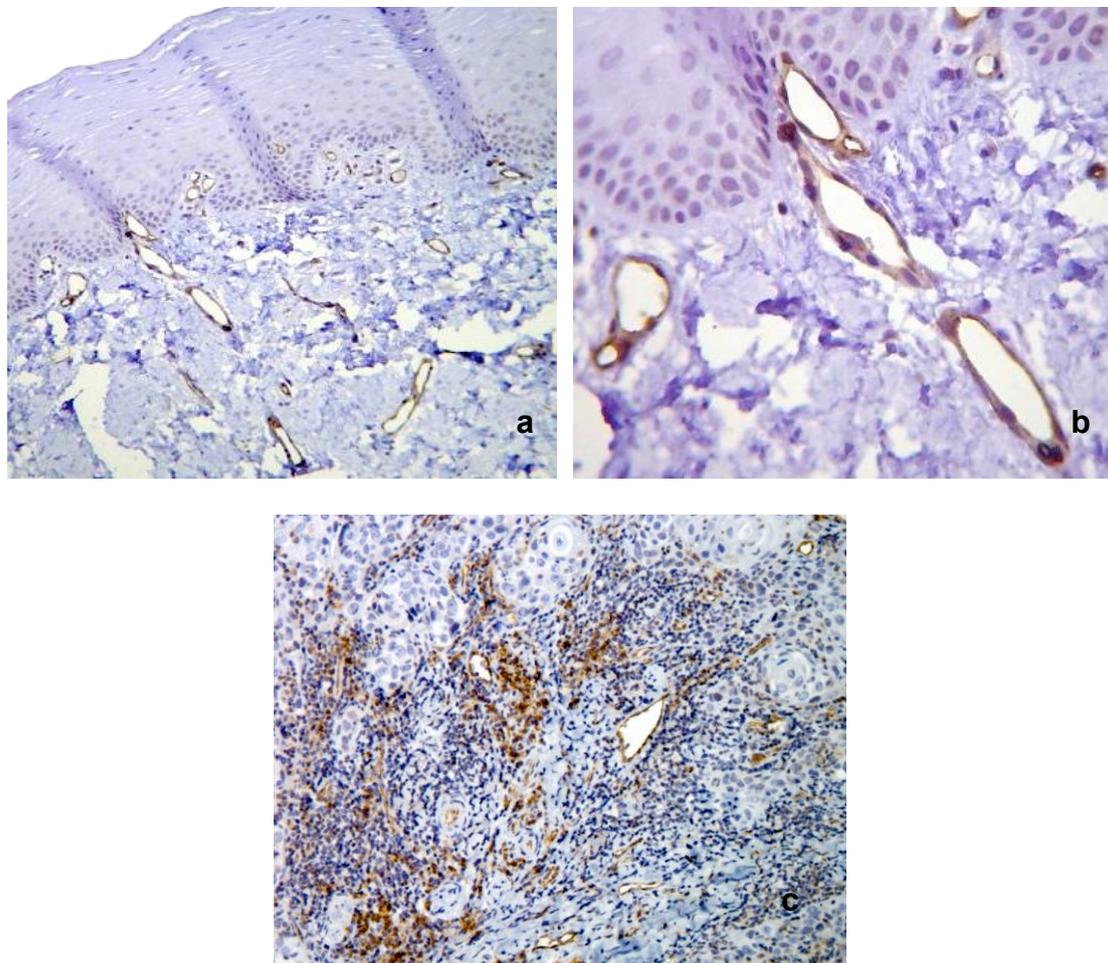
SB: Expresión suprabasal

## 4.10. Expresión de CD31

### Expresión endotelial

#### Controles

Los controles de mucosa sin alteraciones mostraron expresión citoplasmática de CD31 en las células endoteliales de las estructuras vasculares presentes en el tejido conectivo subepitelial, y de estructuras vasculares y vasos en neoformación en el COCE (**Figura 4.9.1**).

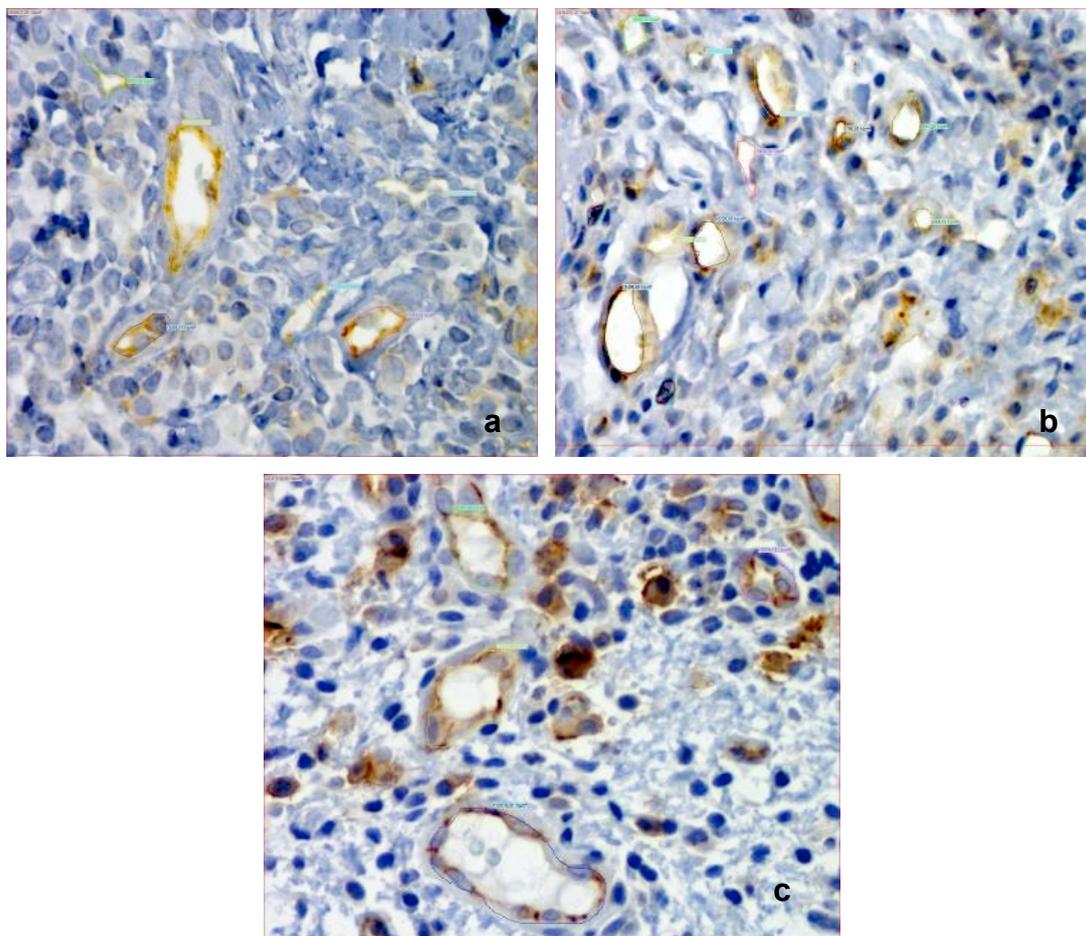


**Figura 4.9.1.** Expresión citoplasmática de CD31 en células endoteliales de las estructuras vasculares subepiteliales de mucosa sin alteraciones (a) 20x), (b) (40x) y así como en el COCE, distinguiéndose conjunto de vasos en neoformación (c) (20x).

## Casos

Se reconoció expresión citoplasmática en las células endoteliales de las estructuras vasculares submucosas en los 44 casos de ELO (**Figura 4.9.2**).

En 20 casos (45,5%) la microdensidad vascular (MDV) fue leve (<5 vasos) y fue alta ( $\geq 5$  vasos) en los 24 restantes (54,5%) (**Figura 4.9.2**). Se reconoció la presencia de grupos de vasos en neoformación (VnF) en 22 casos (50%) (**Figura 4.9.2**).



**Figura 4.9.2.** Expresión positiva de CD31 en las células endoteliales vasculares de casos de ELO. Caso con MDV leve (a). Caso con MDV alta (b). Vasos en neofomación (VnF) y células endoteliales CD31+ que se distinguen de estructuras vasculares bien conformadas (40x).

## Análisis comparativo

Al analizar los 24 casos que mostraban un MDV alto, se observó que 16 casos correspondían al grupo C1 (66,7%) y 8 al grupo C2 (33,3%), mostrando una diferencia en los porcentajes, pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ). En relación a los grupos histológicos, 13 casos (54,2%) correspondían al grupo HT y 11 al grupo HC (45,8%) ( $p>0,05$ ) (**Tabla 4.9.1**)

Al analizar los 22 casos con presencia de VnF en relación a los grupos clínicos se observó que 14 (63,6%) correspondían al grupo C1 y 8 (36,4%) al grupo C2. En relación con los grupos histológicos, 12 casos (54,5%) pertenecían al grupo HT y 10 al grupo HC (45,5%) ( $p>0,05$ ) (**Tabla 4.9.2**).

**Tabla 4.9.1.** Casos con MDV alto en función de los grupos clínicos e histológicos

CD31	MDV alto (%)	P
Grupo C1	16 (61,5)	>0,05
Grupo C2	8 (44,4)	
Grupo HT	13 (56,5)	
Grupo HC	11 (52,4)	

MDV: Microdensidad vascular

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

**Tabla 4.9.2.** Casos con VnF en los diferentes grupos clínicos e histológicos de ELO

CD31	VnF (%)	P
Grupo C1	14 (63,6)	>0,05
Grupo C2	8 (36,4)	
Grupo HT	12 (54,5)	
Grupo HC	10 (45,5)	

VnF: Vasos en neoformación

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

Al analizar las características histológicas en relación al MDV y a la presencia de VnF, no hemos reconocido diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 4.9.3).

**Tabla 4.9.3.** Características histológicas de los casos de ELO en relación con la MDV y la presencia de VnF

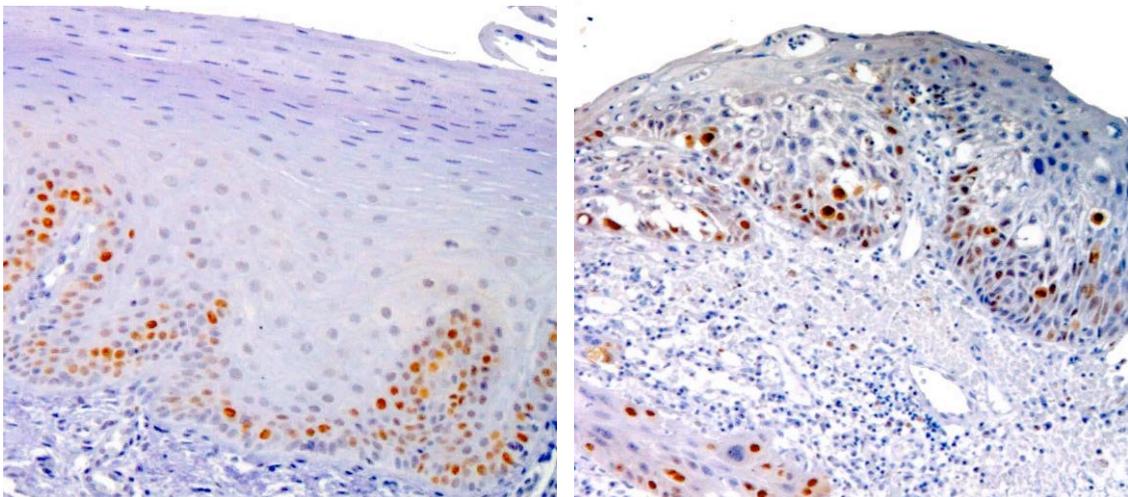
	Expresión endotelial de CD31					
	MDV			VnF		
	Alto (%)	Bajo (%)	p	Si (%)	No (%)	p
Paraqueratosis	11 (45,8)	9 (45)	>0,05	11 (50)	9 (40,9)	>0,05
Para-Ortoqueratosis	13 (54,2)	11 (55)		11 (50)	13 (59,1)	
Hiperqueratosis	9 (37,5)	8 (40)		8 (36,4)	9 (40,9)	
Atrofia	6 (25)	5 (25)		4 (18,2)	7 (31,8)	
Alargamiento crestas	8 (33,3)	4 (20)		6 (27,3)	6 (27,3)	
Disqueratosis (Civatte)	17 (70,8)	10 (50)		11 (50)	17 (72,6)	
Degeneración de capa basal	23 (95,8)	18 (90)		21 (95,5)	20 (90,9)	
Inflamación	10 (41,7)	7 (35)		9 (40,9)	8 (36,4)	
Linfocitos	19 (79,2)	13 (65)		17 (77,3)	15 (68,2)	
Células plasmáticas	8 (33,3)	3 (15)		7 (31,8)	4 (18,2)	
Inflamación en banda	19 (79,2)	15 (75)		17 (77,3)	17 (77,3)	
Inflamación perivascular	4 (16,7)	2 (10)		2 (9,1)	4 (18,2)	
Inflamación superficial	11 (45,8)	11 (55)		11 (50)	11 (50)	
Inflamación profunda	13 (54,2)	9 (45)		11 (50)	11 (50)	

## 4.11. Expresión de p53

### Expresión epitelial

#### Controles

Los controles de mucosa sin alteraciones mostraron expresión epitelial nuclear de p53 en las capas basales y parabasales. Los controles de COCE mostraron expresión intensa nuclear en células neoplásicas de distintas capas espiteliales (**Figura 4.11.1**).



**Figura 4.11.1.** Expresión nuclear basal y parabasal de p53 en mucosa sin alteraciones epiteliales ni inflamatorias (a) y expresión nuclear intensa en distintas capas de células neoplásicas de COCE (b).

#### Casos

Los 44 casos de ELO fueron positivos ( $\geq 10\%$  células) en la expresión nuclear de p53. En 15 casos (34,1%) la expresión fue solo basal y en 29 (65,9%) también suprabasal.

## Análisis comparativo

Al comparar los casos que mostraban expresión suprabasal de p53, observamos que 18 correspondían al grupo C1 (62,1%) y 11 al grupo C2 (37,9%) ( $p>0,05$ ). Respecto a los grupos histológicos, 15 casos (51,7%) pertenecían al grupo HT y 14 (48,3%) al grupo HC ( $p>0,05$ ) (**Figura 4.11.2**). Aunque hemos reconocido diferencias en los porcentajes, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Tabla 4.11.2**).

**Tabla 4.11.2.** Expresión de p53 suprabasal en los diferentes grupos clínicos e histológicos de ELO

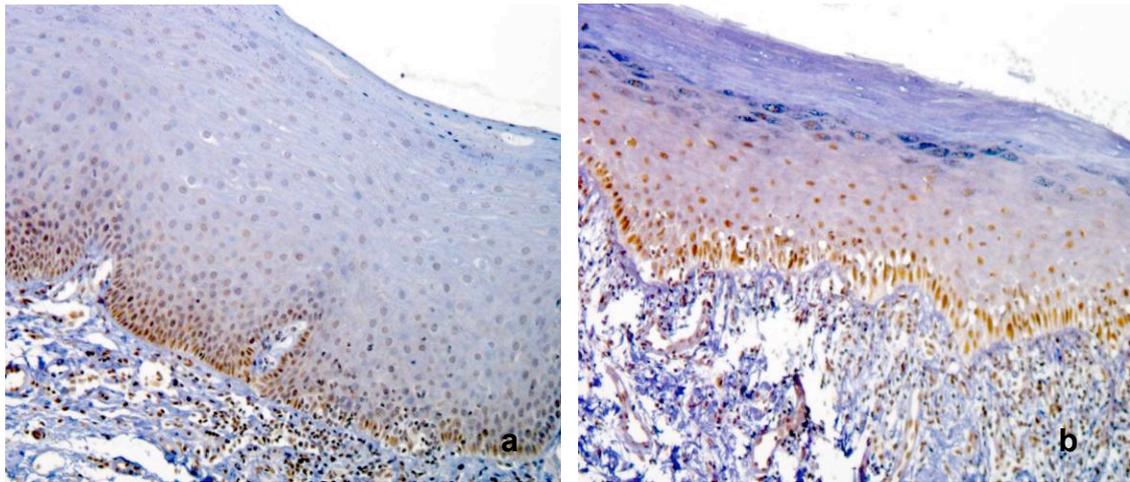
	Expresión de p53 Suprabasal (%)	p
Grupo C1	18 (62,1)	>0,05
Grupo C2	11 (37,9)	
Grupo HT	15 (51,7)	
Grupo HC	14 (48,3)	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO



**Figura 4.11.2.** Expresión epitelial de p53 en casos de ELO. Caso HT con expresión basal-parabasal (a) (20x) y caso HC con expresión suprabasal (b) (20x).

Al analizar las características histológicas en relación con la expresión de p53, solo se observaron diferencias apreciables respecto a la profundidad del infiltrado inflamatorio. El 62,1% de los casos con expresión suprabasal de p53 presentaban inflamación submucosa, frente al 26,7% de los casos con expresión basal ( $p=0,02$ ). No se observaron diferencias significativas en relación con el resto de las características histológicas ( $p>0,05$ ) (**Tabla 4.10.2**).

**Tabla 4.10.2.** Características histológicas de los casos de ELO en relación con el patrón de expresión de p53

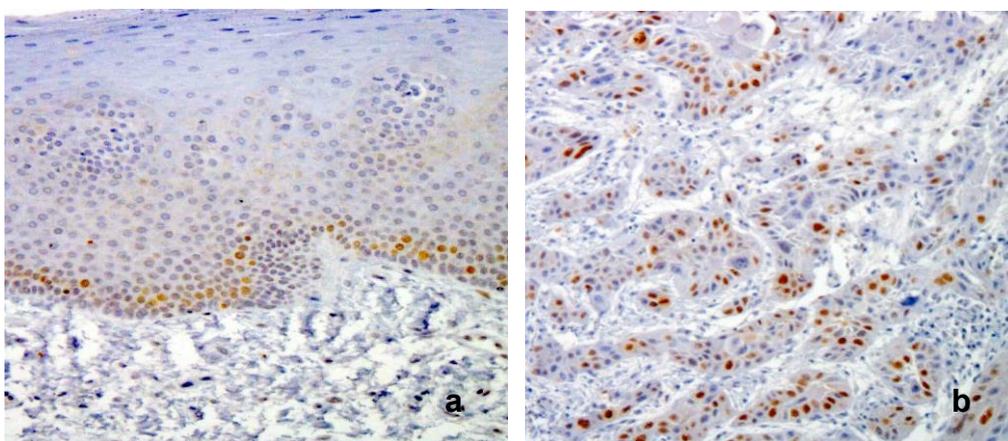
	Patrón de expresión de p53		
	Basal (%)	Suprabasal (%)	p
Paraqueratosis	5 (33,3)	15 (51,7)	>0,05
Para-Ortoqueratosis	10 (66,7)	14 (48,3)	
Hiperqueratosis	4 (26,7)	13 (44,8)	
Atrofia	4 (26,7)	7 (24,1)	
Alargamiento crestas	3 (20)	9 (31)	
Disqueratosis (Civatte)	11 (73,3)	16 (55,2)	
Degeneración de capa basal	14 (93,3)	27 (93,1)	
Inflamación	6 (40)	11 (37,9)	
Linfocitos	11 (73,3)	21 (72,4)	
Células plasmáticas	3 (20)	8 (27,6)	
Inflamación en banda	12 (80)	22 (75,9)	
Inflamación perivascular	4 (26,7)	2 (6,9)	
Inflamación superficial	11 (45,8)	11 (55)	
Inflamación profunda	4 (26,7)	18 (62,1)	

## 4.12. Expresión de Ki-67

### Expresión epitelial

#### Controles

Los controles de mucosa sin alteraciones mostraron expresión epitelial nuclear de Ki-67 en las capas basales y parabasales. Los controles de COCE mostraron expresión un gran número de células neoplásicas y de forma intensa en distintas capas de los nidos tumorales (**Figura 4.12.1**).

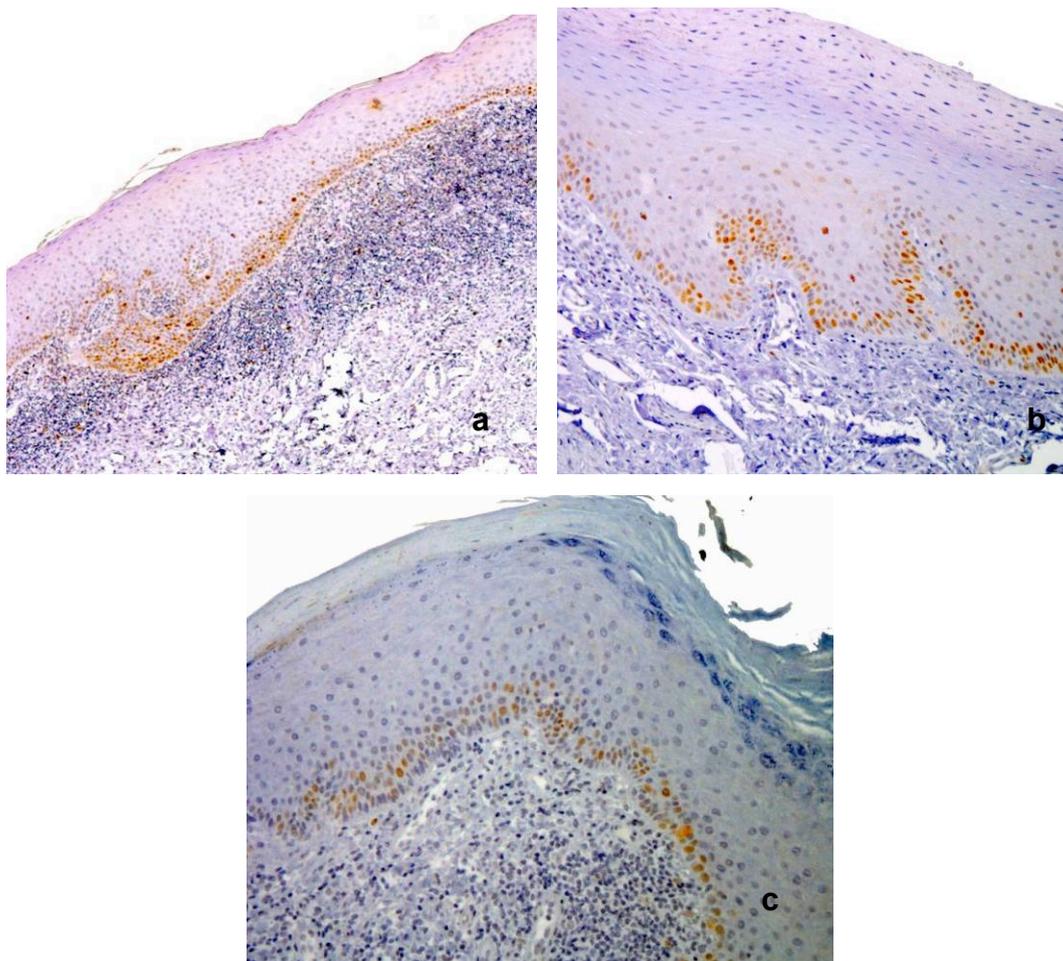


**Figura 4.12.1.** Expresión nuclear basal y parabasal de Ki-67 en mucosa sin alteraciones (a) (20x) y en los nidos de COCE de una forma intensa (b) (20x).

#### Casos

Se reconoció expresión nuclear de Ki-67 en todos los casos y fue positiva ( $\geq 10\%$  células) en el epitelio de 43 casos (97,7%) de ELO, y solo en 1 de los casos (2,3%) fue considerado negativo ( $< 10\%$  células).

En 31 de los casos (72,1%) la expresión fue basal-parabasal y en 12 (27,9%) restantes fue suprabasal (**Figura 4.12.2**).



**Figura 4.12.2.** Expresión epitelial de Ki-67 en casos de ELO. Caso HT con expresión nuclear suprabasal (a) (10x), caso HC con expresión nuclear suprabasal (b) y caso HC con expresión basal (20x).

### Análisis comparativo

Al comparar la expresión epitelial suprabasal de Ki-67 observamos que 7 casos (58,3%) correspondían al grupo C1 y 5 al grupo C2 (41,7%). En relación a los grupos histológicos, 6 casos (50%) correspondían al grupo HT y 6 al grupo HC (50%). No han aparecido diferencias significativas en relación con los grupos clínicos ni histológicos de los casos de ELO ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 4.12.1**).

**Tabla 4.12.1.** Expresión de Ki-67 suprabasal en los diferentes grupos clínicos e histológicos de ELO

	Ki-67 Suprabasal (%)	p
<b>Grupo C1</b>	<b>7 (58,3)</b>	<b>&gt;0,05</b>
<b>Grupo C2</b>	<b>5 (41,7)</b>	
<b>Grupo HT</b>	<b>6 (50)</b>	
<b>Grupo HC</b>	<b>6 (50)</b>	

C1: Lesiones únicamente pápulo-reticulares blancas.

C2: Lesiones pápulo-reticulares blancas asociadas a otras lesiones (atróficas, erosivas y/o ulcerativas).

HT: Histológicamente típicas de LPO

HC: Histológicamente compatibles de LPO

Al comparar las características histológicas de los casos y la expresión de Ki-67, solo encontramos diferencias significativas en relación con la presencia de atrofia epitelial. En ningún caso con atrofia del epitelio se observó expresión suprabasal de Ki-67, por el contrario, todos ellos presentaban expresión basal-parabasal ( $p=0,01$ ) (**Tabla 4.12.2**).

**Tabla 4.12.2.** Características histológicas de los casos de ELO en relación con la expresión de Ki-67

	Expresión de Ki-67		
	Basal (%)	Suprabasal (%)	p
Paraqueratosis	13 (41,9)	6 (50)	>0,05
Para-Ortoqueratosis	18 (58,1)	6 (50)	
Hiperqueratosis	13 (41,9)	4 (33,3)	
Atrofia	11 (35,5)	0 (0)	0,01
Alargamiento crestas	8 (25,8)	4 (33,3)	>0,05
Disqueratosis (Civatte)	19 (61,3)	7 (58,3)	
Degeneración de capa basal	30 (96,8)	10 (83,3)	
Inflamación	12 (38,7)	5 (41,7)	
Linfocitos	23 (74,2)	9 (75)	
Células plasmáticas	6 (19,4)	5 (41,7)	
Inflamación en banda	24 (77,4)	9 (75)	
Inflamación perivascular	3 (9,7)	3 (25)	
Inflamación superficial	15 (48,4)	6 (50)	
Inflamación profunda	16 (51,6)	6 (50)	



## 5. DISCUSION

### 5.1. En relación con los aspectos clínico-patológicos

La ELO es un proceso inflamatorio crónico de base autoinmune y etiología desconocida en el que los linfocitos T condicionan la degeneración de los queratinocitos basales del epitelio mucoso provocando la aparición de lesiones clínicas características<sup>3,12,13,87</sup>. El LPO aparece con mayor frecuencia en las mujeres entre la quinta y sexta década de vida, afectando más frecuentemente la mucosa yugal, la encía y la lengua, aunque pueden aparecer lesiones en cualquier parte de la mucosa oral<sup>3</sup>.

El diagnóstico de la ELO debe realizarse en base a criterios clínicos e histopatológicos, ya que las mismas características pueden aparecer en otros procesos mucosos con una etiología, tratamiento y pronóstico distinto<sup>5,8,13,16,85,96-98,100,101,200</sup>.

En nuestro estudio los resultados concuerdan con las características clínicas generales descritas para éstos procesos, encontrando un 68,2% de los casos en mujeres y un 93,2% de las lesiones estaban localizadas en mucosa yugal, encía y lengua. Estos resultados avalan la representatividad de la muestra estudiada. No obstante, pensamos que la alta frecuencia de presentación de lesiones en la MY en nuestro estudio, responde en parte a que ésta localización es uno de los sitios más frecuentes y de mas fácil acceso para la toma de la biopsia en estos pacientes.

Las lesiones clínicas características que aparecen en la ELO son las pápulas lineales y reticulares por lo regular asintomáticas, que frecuentemente se acompañan de otras lesiones atróficas, erosivas y/o ulcerativas, las cuales si suelen causar sintomatología dolorosa<sup>3,12</sup>. En este estudio hemos separado los casos con lesiones únicamente papulares y/o reticulares (grupo C1), de los que además presentaban lesiones atróficas, erosivas y/o ulcerativas (grupo C2). Esta separación, responde a dos principales razones, la primera es que las lesiones atróficas, erosivas y/o ulcerativas presentarían un mayor componente

inflamatorio <sup>16</sup>, lo que a su vez podría modificar las características histológicas e inmunohistoquímicas; y la segunda, es que algunos autores <sup>17,20</sup> han señalado un mayor riesgo de transformación malignas en los casos con estas lesiones, lo que también podría reflejarse en las características histológicas y en la expresión de los distintos marcadores inmunohistoquímicos.

Actualmente la ELO es considerada como un desorden oral potencialmente maligno <sup>4,5,201</sup>, con un riesgo bajo de transformación maligna de alrededor del 1%. Sin embargo, existe controversia en este sentido <sup>6,7,18,24,28-30</sup>, ya que muchos de los casos que han sufrido transformación maligna reportados anteriormente carecen de unos criterios diagnósticos estrictos, lo que probablemente ha ocasionado la inclusión de otros procesos de distinta etiología y con un potencial maligno mayor <sup>7,8,30,84</sup>.

En relación a los grupos clínicos y a sus características histológicas, hemos encontrado que los casos con lesiones solo papulares-reticulares mostraban una mayor hiperqueratosis, lo que concuerda con lo descrito anteriormente <sup>8,12</sup>. Este hallazgo esperado, reproduce que las áreas pápulo-reticulares muestran un aumento de la capa superficial epitelial o cornea, a diferencia de las formas atróficas, erosivas y ulcerativas que muestran por lo general una disminución del espesor del epitelio.

A diferencia de lo descrito por otros autores <sup>16</sup>, no hemos encontrado diferencias en las características del infiltrado inflamatorio en relación con los distintos tipos de lesiones clínicas. En este sentido, algunos autores <sup>202</sup> han demostrado que en el tejido adyacente a lesiones de LPO que clínicamente no mostraban afectación, aparecían características inflamatorias similares a las encontrados a la zona clínicamente afectada. Esto sugiere que la ausencia o presencia de lesiones en un paciente de LPO, no siempre es indicativa del grado o actividad inflamatoria. Esto también explicaría la migración y aparición de lesiones durante la evolución del LPO en lugares que inicialmente presentaban aspecto normal o sin afectación.

Las características histológicas típicas descritas para los casos de LPO son la degeneración de la capa basal provocada por un infiltrado inflamatorio crónico linfocitario superficial dispuesto en banda <sup>8,12</sup>. Por otro lado, aunque las LLO pueden presentar las mismas características histológicas descritas para el LPO, algunos autores han demostrado que ciertas características ausentes podrían ser sugestivas o asociarse a LLO <sup>12,16</sup>.

Entre las características histopatológicas asociadas a las LLO se encuentran la presencia de paraqueratosis focal, la interrupción focal de la capa granulosa y la presencia de disqueratinocitos (cuerpos de Civatte) en la capa cornea, la presencia y degranulación de mastocitos en zonas de degeneración basal, el infiltrado inflamatorio mixto difuso y profundo, la inflamación perivascular, el incremento de la vascularización y una disminución del grosor de la membrana basal PAS-positiva <sup>13,16,26,98,101,102</sup>.

En nuestro estudio hemos encontrado un mayor número de casos (73,9%) con para-ortoqueratina en el grupo HC que en el grupo HT (33,3%). Además, todos los casos en los que se reconoció inflamación perivascular pertenecían al grupo HC. Estos resultados estarían en concordancia a lo descrito como características asociadas a las LLO por otros autores <sup>13,16,26,98,101,102</sup>.

Por otro lado, hemos encontrado un mayor número de casos con una mayor intensidad en el infiltrado inflamatorio linfocitario en el grupo HT (91,3%) comparado con el grupo HC (52,4%), lo que también estaría en concordancia con otros estudios <sup>8,16,26</sup>. No obstante, aunque este último hallazgo pudiera estar condicionado por los criterios de selección del grupo HT, pensamos que solo sería parcialmente, ya que dentro de los criterios de selección, no hemos tenido en cuenta la intensidad del infiltrado inflamatorio, sino solo el tipo celular que en él se encuentra. Por este motivo, pensamos que la presencia de un intenso infiltrado inflamatorio linfocitario severo, es un hallazgo menos frecuente en los casos HC.

En relación a las características inflamatorias diferenciales entre los caos de LPO y los de LLO, se ha señalado <sup>101</sup> que tanto los patrones del infiltrado inflamatorio como la presencia de determinados elementos celulares, estarían condicionados por diferentes factores como el tipo de antígeno y de respuesta inmunitaria predominante (celular o humoral), el perfil de citoquinas y quimiocinas, así como los factores asociados que perpetúan la inflamación. En este sentido, la diferencia en la intensidad del infiltrado inflamatorio linfocitario en cada grupo histológico podría estar condicionada por los distintos mecanismos etiológicos e inmunitarios asociados a cada proceso, lo que estaría en concordancia con lo que se ha señalado anteriormente por otros autores <sup>12,26,87,98,101,110</sup>.

## **5.2. En relación con la expresión de COX-2**

Las ciclooxigenasas (COXs) son un grupo de enzimas (COX-1 y COX-2) que se expresan en todos los tejidos del organismo participando en la síntesis de prostaglandinas-H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) a partir del ácido araquidónico (AA) <sup>45</sup>. La COX-1 se expresa constitutivamente en distintos tejidos sintetizando PG que desempeñan un papel fisiológico importante como la protección de la mucosa gástrica, la regulación de la función renal, la diferenciación celular y la homeostasis <sup>42,46,116</sup>.

La enzima COX-2 se expresa casi exclusivamente en procesos patológicos, principalmente inflamatorios y neoplásicos malignos, a excepción de algunos tejidos en los que se expresa constitutivamente y en pequeñas cantidades <sup>43-46,116,117</sup>. Por otro lado, en situaciones patológicas como es la inflamación crónica presente en la ELO y en las neoplasias malignas, así como las originadas de la complicación de las lesiones premalignas orales, la expresión de COX-2 favorece la carcinogénesis estimulando la expresión de factores de crecimiento, la angiogénesis, disminuyendo la apoptosis y provocando una inmunosupresión local <sup>42,45,46,119</sup>.

Las prostaglandinas (PG) derivadas tanto de COX-1 o COX-2 desempeñan un papel importante en diversas funciones celulares, actuando como mediadores paracrinos o autocrinos, desencadenando cambios intra y extracelulares inmediatos <sup>46</sup>. En especial, la PGE2 se une a diferentes receptores tanto en la membrana celular como en la nuclear, generando cambios en las concentraciones de AMPc y en los iones de calcio <sup>45,46</sup>. Esta modificación del AMPc y del Ca, pone en marcha distintas vías citoplasmáticas y nucleares que regulan mecanismos inmunológicos, de proliferación, diferenciación y migración celular, angiogénicos, metabólicos óseos, de crecimiento y desarrollo neuronal, entre otros <sup>45,46</sup>.

Existen numerosos estudios <sup>14,42-46,118,119,203,204</sup> que han demostrado la estrecha relación que existe entre la expresión de COX-2 y la carcinogénesis de algunos procesos inflamatorios crónicos como la enfermedad intestinal inflamatoria crónica, el esófago de Barret, la esofagitis crónica, la colecistitis crónica, así como en lesiones premalignas orales.

Algunos estudios <sup>44,45,118,121,205</sup> han encontrado al analizar la expresión epitelial de COX-2 en muestras de mucosa sin alteraciones, hiperplasias epiteliales, lesiones premalignas orales y de COCE, que la expresión aumenta progresivamente en relación con la severidad de la lesión, desde los estadios primarios como la hiperplasia, pasando por la displasia, carcinoma *in situ* hasta el carcinoma invasor. Algunos de estos autores <sup>44,121</sup> señalan que el aumento de la expresión epitelial de COX-2 es más evidente en el paso de displasia epitelial a COCE, y una vez desarrollado el COCE, la expresión aumentaba cuanto mayor era el estadio del tumor <sup>206</sup>.

En el estudio de Segawa y cols. <sup>44</sup>, la sobreexpresión COX-2, además de aumentar desde la hiperplasia epitelial hasta el carcinoma invasor, también se relaciona con el aumento proporcional de la expresión del marcador de proliferación celular Topoisomerasa II alfa. De este modo concluyen que la expresión de COX-2, es un marcador útil en la valoración de las lesiones premalignas orales. Por otro lado, autores como Shibata y cols. <sup>45</sup>, no encuentran asociación entre la sobreexpresión epitelial de COX-2 y la del

marcador de proliferación celular Ki-67, así como tampoco con la expresión de p53 ni con la microdensidad vascular.

Existen pocos estudios<sup>38,39</sup> que hayan analizado la expresión de COX-2 en el LPO, y ninguno en relación con las variantes de esta enfermedad como serían las LLO. La ELO es un proceso inflamatorio crónico que muestra diferentes subtipos<sup>5,15</sup>, que podrían ser equiparados con otros procesos inflamatorios crónicos asociados clásicamente con la posibilidad de transformación maligna<sup>10,33,36,105</sup>.

Siendo previsible, en nuestro estudio hemos encontrado expresión epitelial de COX-2 en todas las muestras de ELO, mostrando un patrón citoplasmático granular, y en algunos casos perinuclear, lo que estaría en concordancia con lo descrito en otros estudios<sup>38,39</sup>.

Hemos encontrado diferencias en la expresión epitelial de COX-2 solo en relación con los grupos histológicos, habiendo observado un mayor número de casos con sobreexpresión de COX-2 en el grupo HC (LLO). Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por Lysitsa y cols.<sup>38</sup> y los de Neppelberg y cols.<sup>39</sup>. Por un lado, Lysitsa et al.<sup>38</sup> no observan diferencias en la expresión epitelial de COX-2 en relación con el grado de actividad de las lesiones, argumentando que la expresión se mantiene durante el curso de la enfermedad, lo que podría aumentar el riesgo de transformación maligna en aquellas lesiones que presentan larga evolución. Tampoco encuentran diferencias en relación al tipo clínico de la lesión, lo que concuerda con nuestros resultados. Estos datos sugieren que el tipo de lesión clínica no parece afectar significativamente la expresión de COX-2.

En el estudio realizado por Neppelberg y cols.<sup>39</sup>, tampoco encuentran diferencias en la expresión de COX-2 entre las lesiones de LPO con menor y mayor tiempo de evolución, así como tampoco al compararlos con la expresión en las displasias epiteliales ni en los carcinomas orales de células escamosas. Por ello, estos autores<sup>39</sup> desaconsejan el uso de COX-2 como marcador

predictivo en estas lesiones, pero no descartan la participación de COX-2 en la carcinogénesis.

Creemos que las diferencias observadas entre nuestros resultados y los obtenidos por Lysitisa y cols.<sup>38</sup> y Neppelberg y cols.<sup>39</sup>, pueden deberse en gran medida a la utilización de distintos criterios diagnósticos clínicos e histopatológicos empleados en estos estudios, así como en la metodología de inmunohistoquímica empleada, como sería el anticuerpo primario empleado en cada estudio. Por otro lado, esto demuestra la difícil comparación de los resultados si los criterios clínicos e histopatológicos no son homogéneos.

En nuestro estudio no hemos observado diferencias significativas en la expresión en relación con las características histopatológicas. Sin embargo, un hallazgo interesante fue que solo un 37,5% de las lesiones con sobreexpresión epitelial mostraban un infiltrado inflamatorio moderado o severo. Esto sugiere que la sobreexpresión epitelial de COX-2 no estaría condicionada, al menos totalmente, por la presencia o intensidad de inflamación.

Algunos autores<sup>119</sup>, han señalado la controversia existente en relación al origen del estímulo que genera la expresión de esta enzima, habiéndose propuesto un origen epitelial, otro inflamatorio y finalmente derivado de las células mesenquimatosas. En este sentido, Abdalla y cols.<sup>14</sup> han demostrado en biopsias de esófago de Barret y adenocarcinoma de esófago, que la sobreexpresión epitelial de COX-2 en estas lesiones no estaba relacionada con la presencia del infiltrado inflamatorio, por el contrario, los lugares de mayor sobreexpresión epitelial de COX-2, se encontraban alejados de las zonas de mayor inflamación, señalando la posible existencia de mecanismos independientes a la inflamación aún desconocidos, los cuales estimularían o mantendrían la expresión epitelial de esta enzima.

Otro hallazgo histológico llamativo en nuestro trabajo ha sido la presencia de inflamación perivascular en 6 casos, todos con sobreexpresión epitelial de COX-2 y pertenecientes al grupo HC. Aunque es muy complicado diferenciar histológicamente la LLO de una lesión de LPO, distintos autores

<sup>13,16,26,98,101,102</sup>, han señalado que la presencia de inflamación perivascular y de un infiltrado inflamatorio profundo con células plasmáticas, entre otros hallazgos, serían características sugestivas de LLO. En nuestro estudio solo la inflamación perivascular se asoció al grupo HC, además de esto, el 83,3% de dichas lesiones presentaban sobreexpresión epitelial de COX-2. Otras características asociadas a OLL como la inflamación submucosa y la presencia de células plasmáticas no mostraban esta asociación.

Otros autores <sup>13,98,101,102</sup>, han señalado que la presencia de paraqueratosis focal, la interrupción focal de la capa granulosa y la presencia de disqueratinocitos (cuerpos de Civatte) en las capas cornea y granular, pueden ser rasgos histológicos sugestivos de LLO's. En concordancia con lo anterior, en nuestro estudio hemos encontrado paraqueratosis en más del 50% de las muestras que presentaban sobreexpresión epitelial de COX-2, la mayoría de las cuales (84,6%) pertenecían al grupo HC (LLO).

La enzima COX-2 está íntimamente relacionada con los procesos inflamatorios y es expresada por las células que participan en este fenómeno <sup>30,36,42,43,119</sup>. En este sentido, hemos encontrado expresión en el infiltrado inflamatorio en la mayoría de los casos de ELO, lo que concuerda con lo descrito en otros estudios <sup>39</sup>. Hemos observado sobreexpresión de COX-2 en el infiltrado inflamatorio en 31,8% de los casos, hallazgo que no ha sido mencionado en otros estudios <sup>38,39</sup>. Creemos que la sobreexpresión inflamatoria de COX-2, además de ser un evento "fisiológico" en la respuesta inflamatoria, contribuiría a potenciar y/o perpetuar los efectos negativos derivados de las PGE2 sintetizadas por esta enzima, creando un ambiente propicio para la carcinogénesis inhibiendo la apoptosis, promoviendo la proliferación y la diferenciación celular, además de provocar la inmunosupresión local y promover la angiogénesis <sup>207</sup>.

Algunos autores <sup>208</sup>, han señalado que la presencia de polimorfismos en el gen de COX-2, podrían disminuir la expresión de dicho gen, modificando positivamente el riesgo de transformación maligna en las lesiones premalignas orales. Aunque lo anterior podría explicar en cierta forma el beneficio asociado

a la inhibición de COX-2 en ciertos cánceres, otros autores <sup>209</sup> no encuentran esta asociación, señalando además que la presencia de dichos polimorfismos no modifica de manera positiva ni negativamente la expresión de COX-2.

Tomando como referencia nuestros hallazgos, creemos que la expresión de COX-2 en las lesiones histológicamente compatibles (HC), pudiera ser distinta a la observada en las histológicamente típicas (HT), probablemente debido a los diferentes factores que desencadenan estos procesos. Estos factores activarían diferentes mecanismos, vías o perfiles de citoquinas que inducirían la expresión de COX-2. Este hecho podría explicar en parte, el mayor riesgo de transformación maligna señalado para las LLO's, tal y como ha sido descrito por otros autores <sup>6,24</sup>. Por otro lado, aunque la expresión epitelial e inflamatoria de COX-2 en los casos HT es menor que en los HC, no significa que estas lesiones no estén bajo los efectos nocivos de la expresión crónica de esta enzima. Por este motivo, no podríamos descartar el riesgo de transformación maligna en las lesiones HT.

### **5.3. En relación con la expresión de iNOS**

Es sabido que la inflamación crónica juega un papel importante en el desarrollo de cáncer en algunos procesos inflamatorios crónicos que ocurren en el ser humano <sup>10,31,33,36,105-107</sup>. Se ha demostrado que la presencia de inflamación crónica desencadena y perpetúa una serie de procesos patológicos que promueven y favorecen a la carcinogénesis, como es la expresión de la enzima iNOS <sup>31,33,49,210</sup>. La iNOS esta íntimamente asociada a los procesos patológicos inflamatorios crónicos y a los carcinomas derivados de ellos <sup>47,130,132,210</sup>.

El NO es el principal producto sintetizado por la iNOS a partir del aminoácido L-arginina <sup>47</sup>. El NO es una pequeña molécula con múltiples efectos benéficos y dañinos para las células, dependiendo de la concentración y el sitio donde ejerza sus efectos <sup>130,135</sup>. Se ha señalado, que la presencia de NO en pequeñas cantidades favorece el crecimiento tumoral, promueve la

angiogénesis estimulando la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), además de aumentar la capacidad de invasión de las células malignas activando la expresión de las metaloproteinasas 2 y 9 favoreciendo el desarrollo de metástasis <sup>130,135</sup>. Por otro lado, la presencia de NO en grandes cantidades, genera daño en la estructura del ADN, produciendo las especies tóxicas nítricas (8-nitroguanina) y oxidativas (8oxodG), además de generar un efecto citotóxico al inhibir enzimas generadoras de ATP (citocromo-c-oxidasa), que finalmente causa la muerte celular <sup>31,47,130,211</sup>. A diferencia del NO derivado de eNOS y nNOS que es sintetizado de manera pulsada y con un tiempo de acción corto, el NO derivado de la iNOS, ejerce sus efectos durante horas, incluso días <sup>130,132</sup>.

Se ha señalado que las altas concentraciones de NO podrían tener un efecto antitumoral por sus efectos citotóxicos <sup>211</sup>, sin embargo, al parecer las cantidades de NO generado en las lesiones premalignas orales y COCE's, no son suficientes para generar este efecto <sup>130</sup>. Por el contrario, estas concentraciones de NO en tales lesiones tendrían un efecto promotor y favorecedor del crecimiento tumoral, de la angiogénesis, de la invasión y de las metástasis <sup>130</sup>. Estos hallazgos también han sido observados en otros estudios sobre lesiones de CCC que mostraban alta expresión de iNOS <sup>136,212</sup>. Por otro lado, otros autores como Avci et al <sup>135</sup> han demostrado una menor concentración de NO en lesiones orales malignas que en las benignas, argumentando que estas concentraciones pudieran favorecer el aumento de la angiogénesis y una disminución de la apoptosis en las lesiones malignas.

Algunos estudios <sup>136</sup>, han demostrado en metástasis de carcinoma oral y en líneas celulares de CCECC, que la expresión de iNOS se asociaba a los casos que presentaban afectación extracapsular y una mayor capacidad de invasión celular. En ese mismo estudio, estos autores <sup>136</sup> demostraron que al utilizar un inhibidor específico de iNOS en las líneas celulares, la capacidad de invasión de estas se reducía considerablemente, pero sin afectar el crecimiento celular. Con estos resultados concluyen que la expresión de iNOS se asocia fundamentalmente a la diseminación extracapsular y a la invasión tumoral.

Actualmente se conocen algunas de las citoquinas que estimulan la expresión y actividad de iNOS (IL-1, 10 y 12, FNT-alfa, IFN-gamma, factor activador de plaquetas, Nuclear-factor-Kappa-beta [NF-κB], EGFR)<sup>57,130,132,150</sup>, así como también otras que la inhiben (TGF-beta, IL-4, 8 y 10)<sup>130</sup>. En este sentido, se sabe que varias de estas citoquinas son expresadas en el LPO de manera patológica<sup>3,9,12</sup>, por lo que la inhibición o expresión de iNOS, en este proceso estaría condicionada al tipo de citoquinas o “perfil de citoquinas” que prevalezcan en dicho proceso<sup>130,132</sup>.

Existen varios tipos celulares que pueden expresar iNOS, algunas de estas células son características del LPO, como son los linfocitos T, los macrófagos y los queratinocitos del epitelio oral<sup>47</sup>. Además, también se ha demostrado la expresión de iNOS en neoplasias malignas de colon, de mama e hígado, en las que dicha expresión se relaciona con estadios tempranos, progresión y mal pronóstico de estas lesiones<sup>132,210,213-215</sup>.

Aunque existen numerosos estudios<sup>35,37,48,131,138,212</sup> que han demostrado la expresión de iNOS y su relación con estadios tempranos de la carcinogénesis en lesiones premalignas orales, existen pocos que hayan analizado esta enzima en lesiones de LPO<sup>34,137</sup>.

En nuestro estudio hemos encontrado expresión epitelial de iNOS en casi todas las muestras de ELO (95,5%), y expresión en el infiltrado inflamatorio en todas ellas. La expresión epitelial mostró un patrón nuclear, citoplasmático y membranoso, lo que concuerda con otros estudios<sup>34,35,47</sup>. No hemos encontrado diferencias en la expresión epitelial de iNOS en relación a los grupos clínicos (C1 y C2). Estos resultados sugieren que el tipo de lesión clínica no parece influir en la expresión de esta enzima.

Por otro lado, hemos encontrado diferencias significativas de expresión epitelial de iNOS entre los grupos histológicos (HT y HC). Además, hemos observado que la mayoría de los casos (63,3%) con expresión intensa pertenecían al grupo HC. También observamos que los casos con expresión epitelial intensa de iNOS, mostraban un infiltrado inflamatorio profundo,

característica histológica que ha sido señalada por diversos autores como sugestiva de LLO's <sup>13,16,26,98,101,102</sup>. Junto a esto, al analizar los grupos histológicos que mostraban sobreexpresión epitelial de iNOS, observamos que la presencia de hiperqueratosis severa era más frecuente en los casos HC que en los HT.

Según nuestros resultados, la presencia de un infiltrado inflamatorio profundo, podría ser una característica histológica sugestiva de LLO, y además, una respuesta a fenómenos inmunológicos propios de las LLO que estarían asociadas a una mayor expresión epitelial de iNOS. Creemos que la presencia de hiperqueratosis severa en las LLO, es una característica más difícil de valorar, debido al elevado grado de subjetividad del examen histológico, aunque también podría ser un indicativo de un mayor grado de proliferación o actividad epitelial de las LLO.

En el estudio realizado por Brennan y cols. <sup>137</sup> sobre lesiones de LPO, no encuentran diferencias en la expresión epitelial ni inflamatoria de iNOS respecto a los controles de mucosa normal, a pesar de demostrar una mayor cantidad de macrófagos en las muestras de LPO. Estos autores <sup>137</sup>, argumentan que este hallazgo podría deberse por un lado, a la presencia de citoquinas expresadas en el LPO, ya que algunas de ellas son conocidas inhibidoras de la expresión de iNOS. En este sentido, muchas de las citoquinas que son expresadas de manera anómala en el LPO (IL-1, 10, 12, FNT-alfa y TGF-alfa), son por el contrario favorecedoras de la expresión de iNOS <sup>3,12,132</sup>, lo que sería contradictorio a la teoría propuesta por estos autores <sup>137</sup>. Otra explicación propuesta por Brennan y cols. <sup>137</sup>, es que la alta expresión de p53 en el LPO generaría una inhibición de la expresión de iNOS. En este sentido, en nuestro estudio también hemos observado una alta expresión de p53 en estas mismas lesiones, sin afectar la alta expresión de iNOS. Esto podría sugerir que los mecanismos que inhiben la expresión de iNOS ejercidos por la expresión de p53 en las lesiones de ELO, son insuficientes o se ven desbordadas por los estímulos que favorecen la expresión de esta enzima. Lo anterior podría explicar en parte, la alta expresión de p53 e iNOS observada en nuestro estudio.

En el estudio realizado por Chaiyarit y cols.<sup>34</sup>, demuestran daño del ADN por la iNOS derivado de la síntesis de 8-nitroguanina en muestras de LPO y de COCE. Esto autores demuestran con técnicas de inmufluorescencia, que la localización citoplasmática de 8-nitroguanina, 8-oxodG e iNOS en el epitelio de lesiones de LPO es la misma, hallazgos que también han sido demostrado por otros autores en lesiones premalignas y malignas orales<sup>35,131,138,216</sup>. En el estudio realizado por Chaiyarit y cols.<sup>34</sup> también observaron que la acumulación de p53 era mayor en las muestras de LPO con expresión de iNOS respecto a los controles, y menor que en las muestras de COCE, lo que estaría en concordancia con nuestros resultados. Estos autores<sup>34</sup> concluyen que la expresión de iNOS y la subsecuente formación de 8-nitroguanina, molécula altamente tóxica para el ADN, podría contribuir en la transformación maligna del LPO.

Si tomamos en cuenta que las lesiones consideradas “histológicamente típicas” (Grupo HT), son las que debemos considerar como LPO “verdadero o típico”<sup>8</sup>, nuestros resultados apoyarían en parte los obtenidos por Brennan y cols.<sup>137</sup> (Brennan et al 2000b). Siguiendo lo anterior, serían las lesiones “compatibles” (Grupo HC) las que estarían sometidas en mayor medida a los efectos negativos ocasionados por la expresión de iNOS, tales como una mayor promoción de la angiogénesis, proliferación celular y daño del ADN aumentando la posibilidad de transformación maligna. No obstante, aunque la expresión de iNOS en las lesiones HC es mayor que en las lesiones HT, esta leve expresión sigue siendo mayor que en una mucosa no afectada por ELO, motivo por el cual dichas lesiones seguirían sufriendo los efectos negativos y consecuencias ocasionados por la expresión de iNOS de forma crónica.

Basándonos en nuestros resultados, las lesiones HC (LLO), independientemente del tipo clínico de la lesión presentarían una mayor expresión de iNOS, y por lo tanto serían más susceptibles a sufrir transformación maligna.

#### 5.4. En relación con la expresión de EGFR

El Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) es una glicoproteína transmembrana que forma parte de una familia de receptores de factores de crecimiento (Erb1 o EGFR, Erb2, Erb3 y Erb4) <sup>57,150</sup>. El EGFR es un receptor de acción tirosina-quinasa dependiente que se compone de tres partes, la porción extracelular que actúa como punto de unión con una gran variedad de ligandos entre los que se encuentran el EGF [epidermal growth factor], TGF- $\alpha$  [transforming growth factor-alpha], betacelulina, amfiregulina, heregulina y HB-EGR [Heparin binding-EGF like growth factor], una vez unidos provocan la activación del EGFR. La segunda porción se encuentra inmersa en la membrana citoplasmática de la célula, uniendo la porción extracelular a la tercera porción intracelular. Esta última, al haber sido estimulada previamente por su respectivo ligando, provoca una dimerización y fosforilación del receptor iniciando una cascada de señales intracelulares tirosina quinasa dependientes que ponen en marcha diferentes y complejas vías de estimulación y/o modulación celular (Ras/Raf/MAPK; P13K/AKT; PCLgamma; STATs) como son la proliferación y diferenciación celular, la inhibición de la apoptosis, la promoción de la angiogénesis, y la migración e invasión celular <sup>55,57,217</sup>.

En condiciones normales la expresión y función del EGFR, esta estrechamente controlada y regulada por mecanismos que incluyen el desarrollo epitelial, la respuesta a las lesiones de este, además de ser un pilar importante en la activación de otras proteínas involucradas en estos mismos procesos, formando una red de intercomunicación celular y molecular <sup>55-57,218</sup>.

Algunos estudios <sup>55</sup> han demostrado una sobreexpresión del EGFR en diferentes tipos de neoplasias malignas, entre las que se encuentra el carcinoma oral de células escamosas (COCE). Además de esto, otros estudios <sup>141-143</sup> señalan que la sobreexpresión del EGFR en lesiones premalignas orales, se incrementaba desde estadios iniciales de la carcinogénesis como serían la hiperplasia epitelial hasta la displasia severa y el COCE. Estos autores <sup>141,143</sup> encuentran que el aumento en la expresión de EGFR en los estadios de la

carcinogénesis era más notorio entre un epitelio normal y un epitelio aparentemente normal adyacente a tumor, y entre el cambio de displasia severa a COCE. Lo anterior sugiere que la expresión de EGFR podría estar relacionada con la severidad y cambios fenotípicos de la lesión.

Otros autores <sup>141,144,219</sup>, además de asociar el incremento en la expresión de EGFR y la severidad de las lesiones premalignas orales, encuentran un fenómeno similar en relación a la expresión del Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), uno de los principales ligandos del EGFR. Algunos estudios <sup>220</sup> encuentran una asociación entre una alta expresión de EGFR y la presencia de ganglios linfáticos positivos en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CCC), lo que influía negativamente en el pronóstico de estos pacientes. Otros estudios <sup>146,147,149</sup> también han señalado este hallazgo, encontrando una mayor capacidad de invasión en pacientes con sobreexpresión de EGFR <sup>221,222</sup>, lo que algunos autores <sup>148</sup> atribuyen en parte a la activación secundaria de MMP-9. No obstante, existen otros autores <sup>223</sup> que no encuentran esta asociación.

Desde hace algunos años, la terapia dirigida a la inhibición del EGFR ha ofrecido un nuevo panorama para los pacientes con CCC <sup>55,57,139,150,218,224,225</sup>. Esta circunstancia ha abierto distintas posibilidades para el tratamiento de pacientes con cierto tipo de cánceres, entre ellos el CCC <sup>139,218,224,225</sup>.

Algunos autores <sup>218</sup> han señalado que la valoración de la expresión del EGFR como factor pronóstico en el cáncer de cabeza y cuello ha tenido resultados variables, probablemente debido a que la expresión de EGFR por sí sola no ofrece un dato del todo confiable. Estos autores <sup>218</sup> señalan que podría ser más importante la cantidad de EGFR fosforilado o activado en estas lesiones. En este sentido, autores como Hirashi y cols. <sup>222</sup>, han señalado una correlación entre una alta expresión de EGFR y la presencia del EGFR activado.

Se ha demostrado la importante participación y colaboración sinérgica entre el EGFR y otras enzimas asociadas a la inflamación crónica y a su vez

relacionadas con la carcinogénesis oral como: COX-2, iNOS, MMP-9 y algunos supresores de tumor como p53<sup>42,57,120,151,152,226,227</sup>. En este sentido, algunos autores<sup>120</sup> han observado un aumento en la expresión de EGFR y COX-2 en leucoplasias sin displasia comparado con controles. Otros autores<sup>151</sup>, han observado una correlación entre el aumento de RNAm de EGFR y de COX-2 en líneas celulares de COCE. De forma similar, autores como Chen y cols.<sup>228</sup>, al emplear conjuntamente inhibidores específicos del EGFR tirosina quinasa y de COX-2 en líneas celulares derivadas de CCC, han logrado disminuir considerablemente el crecimiento de estas líneas celulares, poniendo de manifiesto la importante comunicación e interacción existente entre el EGFR y la COX-2.

Al parecer la iNOS se relaciona con EGFR a través de la estimulación de STAT-3, y con la COX-2 por medio de la síntesis de PGE2<sup>55,153</sup>. Se cree que la expresión de estas dos enzimas claves (iNOS y COX-2), aumenta y/o se mantiene en parte, por mecanismos indirectos derivados de la estimulación de las vías intracelulares afectadas por la expresión del EGFR, las cuales en diversos puntos se solapan y coinciden frecuentemente<sup>55,57</sup>.

En nuestro estudio hemos demostrado que el EGFR se expresa en todas las muestra de ELO, presentando la gran mayoría de los casos una expresión alta (79,5%), sin que hayamos podido encontrar diferencias en relación con los grupos clínicos e histopatológicos de la enfermedad. Previamente solo existen dos estudios que analizan la expresión de EGFR en el LPO<sup>56,154</sup>, que obtienen resultados que contrastan entre si.

En el estudio realizado por Ebrahimi y cols.<sup>154</sup>, se reconoce que la expresión de EGFR en el LPO era menor que en los controles de mucosa normal, lo que contrasta con nuestros resultados. La explicación que estos autores<sup>154</sup> dan a sus resultados, presenta dos posibilidades; por un lado que la alta actividad o expresión de la proteína p53 demostrada en el LPO, actuaría inhibiendo la expresión de EGFR, y por otro que se trate de un falso negativo, donde el anticuerpo primario empleado no detecte la forma mutada de EGFR

(EGFRvIII), sugiriendo que esta forma mutada de EGFR prevalecería sobre la forma salvaje en el LPO.

Al analizar los resultados obtenidos por Ebrahimi y cols.<sup>154</sup>, creemos que es probable que la expresión de p53 disminuya la expresión de EGFR, sin embargo, nosotros no hemos encontrado que la expresión de p53 disminuyera o anulase la expresión de EGFR. En relación a la mutación de EGFR en el LPO, se ha demostrado que la mutación de EGFR en lesiones premalignas orales como podría ser el LPO, es muy baja, debiéndose la alteración de su expresión más a una sobreexpresión tanto del EGFR salvaje como de sus ligandos, principalmente del TGF- $\alpha$ , amfiregulina, epiregulina y HB-EGF<sup>56,141,143,144,150</sup>.

Otros estudios realizados en muestras de CCC<sup>229</sup>, también han demostrado que la expresión de EGFRvIII (mutado) siempre se acompaña de la sobreexpresión de EGFR salvaje, señalando además, que la mutación de EGFR (EGFRvIII) podría ser un evento más bien tardío en la evolución del CCC, distinto a lo que sería el LPO. Pensamos que todos estos hallazgos anularían la teoría propuesta por Ebrahimi y cols.<sup>154</sup> para explicar la baja expresión de EGFR que obtienen en las muestras de LPO.

Nosotros consideramos, que la diferencia de nuestros resultados con los de Ebrahimi y cols.<sup>154</sup>, podrían deberse al diferente anticuerpo utilizado y a los criterios clínicos e histopatológicos empleados en nuestro estudio para incluir nuestros casos como ELO, y después para distinguir entre LPO y LLO.

Por otro lado en el estudio realizado por Kumagai y cols.<sup>56</sup>, obtienen una alta expresión de EGFR en todas las muestras de LPO y ausencia de expresión Erb-2 y Erb-3 al ser comparado con controles, lo que iría en concordancia con nuestros resultados. En este estudio<sup>56</sup> no señalan el tipo de lesión clínica de cada caso, por lo que no podemos comparar nuestros resultados en relación con los grupos clínicos, así como tampoco hacen distinción de grupos histológicos. Estos autores<sup>56</sup> además encuentran una sobreexpresión de ligandos como amfiregulina, epiregulina y HB-EGF, así

como una disminución de TGF-alfa en las lesiones de LPO, señalando además que esta expresión era más evidente en los linfocitos del infiltrado inflamatorio de la lámina propia. De acuerdo a estos resultados, señalan que la sobreexpresión de EGFR podría contribuir a la carcinogénesis de este proceso.

Nuestro trabajo ha demostrado diferencias significativas en cuanto al patrón de expresión entre los grupos histológicos, ya que en el grupo HC la mayoría de las muestras (70,5%) mostró un patrón de expresión combinado membranoso y citoplasmático, y en más de la mitad (58,1%) de los casos ésta era moderada-severa. En este sentido, algunos autores <sup>147</sup> han señalado que la expresión citoplasmática de EGFR en muestras de CCC se asociaba con la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos. Además, señalan que las líneas celulares de CCC resistentes a inhibidores de las tirosina-quinasa, se asociaban a este patrón de expresión citoplasmático, lo que a su vez también se relacionaba con la resistencia de estas células a los inhibidores de tirosina-quinasa.

En el estudio de Muller y cols. <sup>147</sup>, también se encontró que la expresión membranosa se asociaba a un mal pronóstico, reduciendo el tiempo libre de enfermedad y supervivencia. Estos autores <sup>147</sup> sugieren que la localización membranosa de EGFR hace que las células sean más susceptibles a la estimulación por parte de los ligandos. Partiendo de estos resultados <sup>147</sup>, el patrón de expresión membranoso y citoplasmático de EGFR en el grupo HC, sugiere dos posibilidades. La primera, que este tipo de lesiones serían más susceptibles a los efectos de los ligandos extracelulares y por ello tendrían un mayor riesgo de sufrir transformación maligna. En este sentido, la localización de los distintos ligandos (EGF, TGF- $\alpha$ , Amfiregulina, Epiregulina) de EGFR en las lesiones de ELO, sería un dato importante de determinar, ya que conoceríamos si guarda alguna relación con la sobreexpresión de EGFR como ya se ha demostrado en otras lesiones premalignas orales <sup>141,143,144,153</sup>. La segunda posibilidad sería que una vez desarrollada la transformación maligna, el riesgo de metástasis podría ser mayor. No obstante, es difícil contrastar de momento este hallazgo con nuestros datos.

Otros estudios <sup>141</sup> también han demostrado expresión citoplasmática de EGFR en muestras de mucosa normal adyacentes a CCC, y que esta localización coincidía con la expresión de su principal ligando el TGF- $\alpha$ . Además, observaron que la intensidad y la extensión epitelial de la expresión de EGFR en este tipo de muestras se incrementaban cuanto mayor era la severidad de la displasia epitelial.

En nuestro estudio hemos observado una expresión intensa en la mayoría de las muestras y casi en la totalidad (88,6%) de los casos la expresión aparecía en todo el espesor del epitelio, sin encontrar diferencias entre los grupos clínicos ni histológicos. Este hallazgo sugiere que las lesiones de ELO, serían más susceptibles a los efectos de los ligandos de EGFR y a una posible transformación maligna, independientemente de las características clínicas e histopatológicas que muestre la lesión.

### **5.5. En relación con la expresión de MGMT**

La enzima reparadora del ADN O<sup>6</sup>-Metilguanina-ADN Metiltransferasa (MGMT), forma parte de un amplio sistema reparador de ADN que es crucial en la eliminación de grupos alquilantes unidos a la posición O<sup>6</sup> de la guanina, que al unirse forma O<sup>6</sup>-Metilguanina (O<sup>6</sup>MetG), lesiones altamente mutagénicas <sup>58</sup>. Las lesiones del tipo O<sup>6</sup>MetG tienen tendencia a aparearse con timina durante la replicación, provocando una conversión errónea de guanina-citosina (G-C) en adenina-timina (A-T), dando lugar a una mutación transicional puntual que a su vez puede afectar genes implicados en la proliferación celular y diversos tumores, entre los más señalados estarían el K-ras y p53 <sup>58,156</sup>.

Las lesiones del tipo O<sup>6</sup>MetG se producen de forma endógena a través de la formación de compuestos nitrosos derivados de aminas y del daño oxidativo generado por la inflamación o infección <sup>34,157,158</sup>; de forma exógena por alimentos, productos de combustión, algunos agentes quimioterapéuticos que producen especies alquilantes reactivas, y por último uno de los más

importantes, por la exposición a distintos químicos contenidos en diferentes formas de tabaco <sup>58,60,62,65,160,161</sup>.

La enzima MGMT actúa eliminando los grupos premutagénicos O<sup>6</sup>MetG del ADN, transfiriendo el grupo o “aducto” metilo hacia un sitio cisteína localizado en MGMT restaurando la base original, para posteriormente sufrir degradación y ser resintetizada en una molécula nueva de MGMT <sup>60,156</sup>. En este sentido, se ha demostrado que la cantidad de MGMT expresada en los tejidos, es proporcional a la capacidad de reparar lesiones O<sup>6</sup>MetG del ADN <sup>58,161-163</sup>.

Se sabe que la metilación del gen MGMT es responsable en la mayoría de los casos de la ausencia de expresión de dicha proteína, impidiendo la reparación de las lesiones del tipo O<sup>6</sup>MetG, y con esto aumentando el riesgo a que las mutaciones sigan acumulándose a lo largo de las diversas replications celulares, incrementando el riesgo de desarrollar lesiones neoplásicas malignas <sup>64,156</sup>.

Numerosos estudios han demostrado la hipermetilación del promotor del gen MGMT en CCC y COCE así como sus respectivos tejidos adyacentes de apariencia normal <sup>59-61,160</sup>. Resultados similares han sido demostrados por nuestro grupo <sup>63</sup> en lesiones potencialmente malignas, así como por otros autores <sup>230</sup>.

En el estudio realizado por Sawhney y cols. <sup>60</sup> sobre lesiones premalignas y malignas orales, encuentran una disminución de la expresión de MGMT progresiva desde los estadios más tempranos como es la hiperplasia hasta el COCE, señalando además que esta falta de expresión en los pacientes con COCE, se asociaba con un estadio avanzado y metástasis ganglionar, sugiriendo una asociación entre la pérdida de expresión de MGMT y un comportamiento agresivo del COCE. Estos autores concluyen que la pérdida de expresión de esta enzima es un evento temprano que puede ser utilizado como un marcador pronóstico en estas lesiones.

Otros autores <sup>62,65,160</sup> han demostrado resultados similares a los descritos por Sawhney y cols. <sup>60</sup>. En el estudio realizado por Kulkarni y cols. <sup>62</sup>, señalan un alto porcentaje de hipermetilación del gen MGMT en muestras de COCE y sus tejidos adyacentes de apariencia normal, y ningún caso de metilación de dicho gen en las muestras de pacientes sanos. Estos resultados sugieren que la hipermetilación de MGMT ocurre de manera temprana durante la carcinogénesis de los tejidos que aún no han sufrido cambios fenotípicos. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores <sup>65</sup>, al analizar la hipermetilación de MGMT en líneas celulares derivadas de leucoplasias.

Aunque existe suficiente evidencia del importante papel que juega MGMT en las etapas tempranas de la carcinogénesis oral en distintas lesiones premalignas y malignas, no existen estudios que hayan analizado esta enzima en LPO ni en LLO. La naturaleza inflamatoria crónica de la ELO, hace que este tipo de lesiones sufran agresiones constantes por daño oxidativo derivado de la inflamación crónica, lo que incrementaría el riesgo de desarrollar lesiones del tipo O<sup>6</sup>MetG y por tanto sería indicativo de una importante participación de MGMT en la eliminación de dichas lesiones <sup>34,158,231</sup>.

En nuestro estudio hemos encontrado expresión en la mayoría (88,6%) de las muestras de ELO y no hemos observado diferencias en la expresión entre los grupos clínicos ni histológicos. El hecho de que no existan estudios previos que hayan analizado la expresión de MGMT en estos procesos dificulta la comparación de nuestros resultados. Sin embargo en un estudio <sup>157</sup> donde se analiza la hipermetilación de distintos genes, entre ellos MGMT, en muestras de gastritis crónicas, encontraron una baja hipermetilación en general de todos los genes estudiados, no obstante, los casos que mostraban más genes hipermetilados, fueron aquellos con una mayor inflamación crónica y con metaplasia intestinal. Esto sugiere una participación de la inflamación crónica en la aparición de este tipo de lesiones genéticas, probablemente derivadas del daño oxidativo y nítrico <sup>231</sup>.

El bajo número de casos con expresión negativa en nuestro estudio sugeriría una baja hipermetilación de gen MGMT en la ELO. Algunos estudios

<sup>232</sup> señalan la presencia de polimorfismos en el gen MGMT que condicionarían la síntesis de proteínas distintas de la forma salvaje. Tanto la hipermetilación como las distintas proteínas de MGMT, podrían explicar los casos negativos observados en nuestro estudio. No obstante, al parecer la presencia de estos polimorfismos parece no tener implicaciones clínicas importantes <sup>231,232</sup>. Por otro lado, el alto número de casos positivos y la localización suprabasal de MGMT, unido al alto número de casos positivos en las capas suprabasales de p53 encontradas en este estudio, estaría acorde con la dependencia funcional descrita para ambas proteínas <sup>58,64,156,161</sup>.

No hemos encontrado diferencias en la localización ni en el patrón de expresión entre los distintos grupos clínicos ni histológicos. No obstante, en la mayoría (81,8%) de los casos existía un patrón predominantemente citoplasmático y suprabasal, sugiriendo un acumulo de MGMT, cuando la expresión normal es nuclear y basal <sup>64,156</sup>.

Se ha señalado que la capacidad celular para hacer frente a las lesiones O<sup>6</sup>MetG, depende del número de moléculas de MGMT disponibles en cada célula <sup>58,161-163</sup>. En este sentido, creemos que la presencia de MGMT citoplasmático responde a la constante agresión inflamatoria crónica en las lesiones de ELO. Esto nos sugiere tres posibles escenarios: 1) un sistema de reparación de ADN eficiente en las lesiones de ELO, 2) que la agresión al ADN se extiende hacia capas epiteliales superficiales y, 3) que la ausencia de esta enzima supondría un incremento del riesgo a sufrir mutaciones por lesiones O<sup>6</sup>MetG derivadas de la inflamación crónica presente en la ELO. En cualquier caso, es evidente que la expresión de MGMT en la ELO es importante en la protección de la agresión constante derivada de la inflamación crónica, lo que se demuestra en nuestro estudio al observar su alta expresión en las muestras de ELO.

## 5.6. En relación con la expresión de MMP-9

La MMP-9 forma parte de la amplia familia de MMP-s, específicamente del grupo de las gelatinasas donde también se encuentra la MMP-2<sup>40</sup>. Tanto la MMP-9 como la MMP-2, se expresan en tejidos normales o sanos en pequeñas cantidades para desempeñar funciones fisiológicas.

Tanto la MMP-9 como la MMP-2 están encargadas de la degradación de varios componentes de la matriz extracelular, pero además, pueden degradar el colágeno tipo IV de la membrana basal epitelial, hecho que las relaciona directamente con la carcinogénesis y la progresión maligna<sup>36,40,217</sup>. Se ha señalado<sup>9,10,36,103</sup> que la inflamación crónica estimula la expresión de la MMP-9, la cual favorece la carcinogénesis en distintos procesos inflamatorios crónicos asociados al desarrollo de cáncer, como podría ser la ELO. La relación entre la MMP-9 y la carcinogénesis se basa en que esta enzima actúa en diversos aspectos de la inflamación, estimulando la expresión de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias y proangiogénicas, además de promover las señales intracelulares de proliferación, de crecimiento y antiapoptóticas<sup>36,103,233</sup>.

Entre las células que expresan esta enzima se encuentran las estromales, las inflamatorias y las epiteliales<sup>40</sup>. Entre las células relacionadas con la inflamación, se sabe que los mastocitos son una fuente importante de quimasa la cual es un potente activador de la MMP-9<sup>9</sup>. Diversos estudios<sup>9,26,41</sup> han demostrado que existe una importante población de mastocitos en el LPO<sup>41,234,235</sup>, señalando que gran parte de éstos mastocitos están en fase de degranulación. Esto a su vez favorece la expresión de FNT-alfa, el cual perpetúa la inflamación de manera crónica y promueve de nuevo la expresión de MMP-9 formando un círculo vicioso entre la MMP-9 y el TNF-alfa<sup>165</sup>.

Diversos estudios han demostrado la estrecha relación existente entre la expresión de la MMP-9 y el desarrollo y pronóstico de lesiones premalignas y

malignas orales <sup>40,41,52,165-169,217,236</sup>, de esófago <sup>50,51,237</sup>, del seno paranasal <sup>53</sup> y en modelos experimentales de carcinogénesis cutánea sobre ratones <sup>54,238</sup>.

En el estudio realizado por Jordan y cols. <sup>52</sup>, demuestran que la presencia de RNAm de MMP-9 era mayor en las displasia epitelial que progresaban hacia COCE comparado con las que no lo hacían. Otros autores <sup>166</sup>, demuestran que la expresión de MMP-9 en lesiones de COCE, es más importante que la expresión de MMP-2 en el proceso de metástasis. Estos resultados concuerdan con los obtenidos sobre lesiones malignas de glándulas salivales <sup>239</sup>, y en COCE <sup>167</sup>, los que además de señalar un mayor potencial de metástasis en los casos que expresan MMP-9, demuestran que la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas-2 (TIMP-2) junto con la expresión de MMP-9 es un marcador de un peor pronóstico.

Existen pocos estudios que hayan analizado la expresión de MMP-9 en lesiones de LPO <sup>41,169</sup>, y ninguno sobre LLO. En nuestro estudio hemos observado que la gran mayoría de las muestras (81%) de ELO mostraron sobreexpresión de MMP-9, y en más del 70% lo hacía con un patrón citoplasmático-nuclear. En el 83,3% de los casos la expresión se localizaba desde la capa basal hasta la espinosa. Respecto al patrón de expresión, nuestros resultados concuerdan con lo descrito previamente por otros autores <sup>169</sup>.

En el estudio realizado por Chen y cols. <sup>169</sup>, se reconoce una mayor expresión en las lesiones de LPO comparándolas con los controles, expresión que se incrementaba en sus respectivas lesiones malignas. Estos resultados estarían en concordancia con el elevado porcentaje de casos con sobreexpresión observado en nuestro estudio y sugiere que la expresión de MMP-9 podría ser marcador epitelial temprano de carcinogénesis en la ELO.

Como se ha comentado anteriormente se puede explicar la sobreexpresión de MMP-9 en la ELO en base a la presencia y el desequilibrio entre gran cantidad de citoquinas (Il-1, 8, 10, 12, FTN-alfa, IFN-gamma, TGF-beta, factor nuclear kappa B [NF-κB]), quimiocinas (RANTES y respectivos

receptores) y activadores de MMP's (quimasa y triptasa), alteraciones frecuentes en la ELO y en otros procesos patológicos inflamatorios crónicos<sup>3,9,12</sup>. Sin embargo, existen algunos estudios que no encuentran una sobreexpresión epitelial de MMP-9 en el LPO<sup>41</sup>. Estos autores<sup>41</sup> señalan solo una leve expresión epitelial de MMP-9, siendo mayor la expresión de MMP-2 y MMP-3, proteínas también relacionadas con la carcinogénesis oral<sup>166,167,217,236</sup>. Por otro lado, estos autores<sup>41</sup> observaron que la expresión de MMP-9 era mayor en el infiltrado inflamatorio y que ésta derivada de los linfocitos T, señalando su posible participación en la patogénesis en el LPO.

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de MMP-9 en relación a los grupos clínicos. A diferencia de nuestros resultados, Chen y cols.<sup>169</sup> encuentran una mayor expresión de MMP-9 en las lesiones atróficas, erosivas y bullosas comparado con las lesiones no atróficas (reticulares, en placa y papulares), lo que indicaría un mayor riesgo de transformación para las lesiones atróficas. Creemos que las discrepancias entre nuestro estudio y el de Chen y cols.<sup>169</sup> puede deberse a los distintos tipos y concentraciones de anticuerpos primarios empleados en cada estudio.

En relación a los grupos histológicos, no hemos encontrado diferencias significativas en la expresión epitelial de MMP-9. Hasta ahora no existen estudios que comparen la expresión epitelial de MMP-9 en lesiones histológicamente típicas (LPO) con lesiones histológicamente compatibles (LLO), haciendo difícil la comparación de nuestros resultados. En relación a las características histológicas, no hemos observado ninguna asociación entre la expresión de MMP-9 con características epiteliales ni inflamatorias, como podría ser la intensidad de la inflamación o la presencia de linfocitos como señalan otros autores<sup>41</sup>.

Según nuestros resultados, la ausencia de diferencias en la expresión de MMP-9 entre LPO y LLO, indica que la expresión epitelial de MMP-9 en la ELO, no estaría determinada por el tipo clínico de la lesión ni tampoco por el tipo o imagen histológica. Esto también sugiere que dicha expresión epitelial de MMP-9, esta regulada por mecanismos moleculares inflamatorios<sup>36,103,240</sup>, que probablemente no se relacionan con la intensidad o el tipo celular inflamatorio

presente en este proceso. Podríamos decir que la sobreexpresión de MMP-9 en ambos subtipos de ELO indicaría un mayor riesgo de transformación maligna, sin embargo, la transformación maligna no solo dependería de esto, por el contrario, se necesita la presencia de alteraciones a distintos niveles para que la transformación maligna ocurra <sup>241</sup>.

## 5.7. En relación con la expresión de CD31

La angiogénesis es un proceso fundamental para numerosos fenómenos fisiológicos esenciales para el correcto desarrollo, crecimiento y funcionamiento del organismo. La angiogénesis por definición, es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes <sup>68</sup>, y es el resultado del balance de múltiples estímulos angiogénicos y antiangiogénicos generados en el tejido en cuestión <sup>68,171</sup>.

La angiogénesis también juega un papel fundamental y decisivo en la carcinogénesis de las lesiones potencialmente malignas como el LPO y las LLO <sup>66-69</sup>, principalmente en las etapas más tempranas, donde los cambios fenotípicos malignos aun no han ocurrido. Distintos autores <sup>66-69</sup>, han demostrado una mayor microdensidad vascular (MDV) en lesiones premalignas orales al encontrar una mayor expresión de diferentes marcadores moleculares de la angiogénesis como es CD31 (PCAM-1), el CD34 y el VEGF, lo que favorecería el aporte sanguíneo y con ello el suministro de factores promotores de la proliferación celular <sup>69</sup>. Estos mismos estudios <sup>66,67,69</sup> señalan que un aumento de la angiogénesis y MDV, es más frecuente e intensa en los estadios más tempranos de la carcinogénesis oral como serían la hiperplasia y la displasia epitelial comparándolos con sus respectivas lesiones malignas. En este mismo sentido, autores como Huang y cols. y Jain y cols. <sup>172,173</sup>, señalan la importancia que puede tener la terapia antiangiogénica en distintas lesiones premalignas y malignas originadas en el ser humano en relación al tratamiento y pronóstico de estas lesiones.

Diversos autores <sup>9,10,32,33,67,68,110</sup> han destacado la importante participación de la angiogénesis en distintos procesos inflamatorios crónicos como serían las lesiones premalignas orales incluidas en la ELO (LPO y las LLO), así como en los carcinomas derivados de estas. Algunos autores <sup>171</sup>, proponen que la alteración en la expresión de distintos marcadores angiogénicos y en algunas moléculas de adhesión vascular con participación en la angiogénesis, desempeñan un papel importante en la patogénesis del LPO, como se ha demostrado en otras enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide, la psoriasis y la osteoartritis <sup>68,174</sup>.

En nuestro estudio hemos observado que más de la mitad de los casos de ELO (54,4%) presentaban una MDV alta (>5). Esto estaría en concordancia con lo descrito con otros estudios <sup>66,123,171,174,175,177</sup>. Según diversos autores <sup>36,68,103,171</sup>, este aumento de la angiogénesis y MDV en el LPO, responde a los múltiples estímulos proangiogénicos y mitogénicos derivados de citoquinas y factores de crecimiento presentes en los procesos inflamatorios crónicos como sería la ELO.

Autores como Jin y cols. <sup>66</sup> encuentran un mayor número de capilares tanto en el LPO, como en displasias epiteliales y mucosa adyacente a COCE al compararlo con lesiones con inflamación crónica inespecífica y con controles de mucosa sin alteraciones. Esto sugiere la existencia de distintos potenciales angiogénicos en la inflamación crónica asociada al LPO y a lesiones premalignas, en relación con los que existen en lugares con inflamación crónica inespecífica. Otros autores <sup>176,177</sup>, además demuestran la presencia de una morfología vascular distinta asociada con la proliferación vascular desorganizada en el LPO.

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en la MDV entre los distintos grupos clínicos ni histológicos, lo que difiere en parte con lo descrito previamente por otros autores <sup>174</sup>. En el estudio de Tao y cols. <sup>174</sup>, se observó una mayor MDV en las lesiones atrófica-erosivas al compararlo con las lesiones que eran solo reticulares, además, curiosamente la MVD de las lesiones reticulares no era mayor que la de los controles. Estos autores <sup>174</sup>

encuentran una correlación entre la MDV y la expresión de VEGF en las lesiones atróficas erosivas, concluyendo que la angiogénesis y la expresión del VEGF podrían jugar un papel importante en la cronicidad y patogénesis de ciertos tipos de lesiones clínicas del LPO.

Dentro los primeros esbozos de la angiogénesis se encuentran la presencia de células endoteliales en forma de “brotes” para la posterior organización y formación del vaso sanguíneo a partir de un vaso preexistente. En nuestro estudio no hemos observado diferencias significativas entre los grupos clínicos ni histológicos en relación a la presencia de vasos de neoformación (VnF) o grupos de células endoteliales CD31+. Algunos autores<sup>67</sup>, han encontrado una asociación entre el aumento de brotes vasculares o vasos en neoformación en lesiones de leucoplasia y displásicas al compararlo con controles.

En nuestro estudio tampoco hemos encontrado asociación entre la MDV alta y/o presencia de VnF con alguna característica histológica en los distintos grupos clínicos e histológicos. En este sentido, se ha señalado que la presencia de inflamación se acompaña de fenómenos de angiogénesis y una mayor MDV si se compara con un tejido sin inflamación<sup>36,68</sup>. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias en la MDV y VnF en relación a la intensidad inflamatoria. Este hallazgo podría sugerir que además del número de células inflamatorias en el infiltrado, probablemente sean más importantes una vez más, los perfiles de citoquinas que expresen dichas células inflamatorias para promover la angiogénesis. No obstante, esta teoría debería ser demostrada con más estudios.

Se ha hecho evidente el aumento de la angiogénesis en la ELO, no obstante, según nuestros resultados este aumento de MDV y de VnF no se ven influenciado positivamente o negativamente en relación con el tipo clínico o histológico.

Podemos decir que la presencia de una alta MDV en la mayoría de los casos de la ELO estudiados pudiera jugar un papel importante en el riesgo asociado de transformación maligna en ambos procesos.

### 5.8. En relación con la expresión de p53

La proteína p53 es sintetizada por el gen supresor de tumor TP53, y actúa como un factor de transcripción ante diferentes situaciones de estrés celular como es el daño al ADN, hipoxia, choque térmico, cambios metabólicos y en respuesta a múltiples citoquinas<sup>75,76</sup>. Una vez que p53 se une a los sitios específicos del ADN, genera la expresión de diversos genes (Mdm2, p21, WAF, Cip-1, GAD45, Bax, IGF-BP3), que activan diversos mecanismos y vías para el control del ciclo celular, reparación de daños genéticos, o bien inducir apoptosis en caso de no poder reparar el ADN dañado<sup>185</sup>. Este gen crucial en la estabilidad genómica, razón por la que recibió el nombre de "guardián del genoma"<sup>75,76,80</sup>.

Las alteraciones de p53 están presentes en un gran porcentaje de distintos cánceres del ser humano como es el de pulmón, colon, esófago, ovario, páncreas, piel, estómago, cabeza y cuello, entre otros, considerándose uno de los genes más frecuentemente alterados en las neoplasias malignas<sup>76,178</sup>. Diversos estudios han señalado que la sobreexpresión de p53 en lesiones potencialmente malignas y malignas orales se asocia con distintas fases de la carcinogénesis<sup>70,77,78,80,179-181,184,193,242</sup>. Sin embargo, el gran número de casos de LPO con sobreexpresión p53, no estaría en concordancia con el bajo porcentaje de transformación maligna observado en este proceso<sup>4,30,70,187,189</sup>.

Por otro lado, se puede producir alteraciones en distintos puntos de las vías involucradas con p53 (sitios de unión, proteínas, genes, etc.), impidiendo la función normal de la proteína y con ello los mecanismos que regulan su expresión, inhibición y degradación, de forma similar a lo que ocurriría en una

mutación en el gen p53<sup>76</sup>. Lo anterior, podría explicar en parte la acumulación y/o estabilización de p53 en lesiones premalignas y malignas en ausencia de mutación<sup>75,76,185</sup>. Por este motivo, la sobreexpresión de p53 en una lesión potencialmente maligna no siempre es sinónimo de mutación.

La proteína p53 se expresa en condiciones normales en células con capacidad de “proliferación” como es la capa basal epitelial, considerándose anormal una expresión en capas superiores o de “maduración” como es la capa espinosa, la granulosa y la córnea<sup>80</sup>. Se ha señalado que la mutación en el gen TP53 ocurre en un porcentaje importante de lesiones potencialmente malignas y sus respectivos carcinomas orales modificando su expresión y su localización<sup>78,80,179,180</sup>.

La expresión de p53 en el LPO ha sido ampliamente estudiada<sup>70,179,180,186-190,192,197,198,243</sup>, en la mayoría de estos estudios observan distintos porcentajes de sobreexpresión de p53. Teniendo en cuenta lo anterior, las implicaciones clínicas, razón de la sobreexpresión y si ésta se debe a la presencia de la proteína salvaje, mutada o a distintas isoformas de p53, serían aspectos importantes a considerar<sup>187-189</sup>.

Según diversos estudios<sup>70,179,180,186-189</sup>, la sobreexpresión de p53 en el LPO parece no estar relacionada con el incremento del riesgo de transformación maligna, por lo que las implicaciones clínicas podrían ser de mayor interés ante ausencia o localización anormal de dicha expresión. El motivo de la sobreexpresión p53 en la ELO, podría ser la intensa agresión celular derivada del infiltrado inflamatorio crónico (oxidativo y nítrico) presente en estas lesiones<sup>10,36</sup>. Esta sobreexpresión induciría la detención del ciclo celular para la reparación del ADN o apoptosis en caso de que el daño no pueda ser reparado.

Respecto al tipo de proteína expresada en el LPO, la evidencia sugiere que la en la mayoría de casos la forma predominante es la salvaje p53 o no mutada<sup>70,187,189</sup>, aunque estudios recientes han demostrado la presencia de otras isoformas de p53 en muestras<sup>187,188</sup>. En nuestro estudio hemos

encontrado expresión de p53 en el 100% de las muestras de ELO. En este sentido, el anticuerpo que hemos empleado en nuestro estudio (DO-7) reconoce fundamentalmente la proteína salvaje de p53, aunque no podemos descartar la presencia de la forma mutada. No obstante, creemos que nuestros resultados estarían en concordancia con los descritos por otros autores <sup>189</sup>.

La evidencia publicada hasta hoy, sugiere que el porcentaje de expresión de p53 por si solo en muestras de LPO parece no siempre estar asociado con mayor riesgo de transformación maligna. Autores como Cruz y cols. <sup>77-80</sup>, han demostrado en lesiones potencialmente malignas, que más que el porcentaje de expresión de p53, es más relevante la localización donde ésta se produce. Estos autores <sup>77-80</sup> señalan que una expresión suprabasal o en capas no proliferativas es indicativo de fenómenos asociados a la carcinogénesis oral, incluso en lesiones que no presentan cambios histológicos o fenotípicos displásicos.

Algunos autores como Acay y cols. <sup>186</sup>, han observado una mayor expresión de p53 en muestras de LPO comparadas con LLO, atribuyendo esta sobreexpresión a la mayor intensidad del infiltrado inflamatorio en el LPO. Por otro lado, Ebrahimi y cols. <sup>190</sup>, encuentra una mayor expresión en muestras LPO y de la enfermedad injerto contra huésped EICH comparado con controles. En nuestro estudio hemos encontrado la expresión suprabasal de p53 en el 65,9% de los casos de ELO, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos clínicos o tipos de lesiones clínicas, lo que concuerda con otros estudios <sup>197</sup>. Del mismo modo, tampoco hemos encontrado diferencias significativas en la expresión suprabasal de 53 entre los grupos histológicos. Debido a que no existen estudios que analicen la localización de este marcador empleando los mismos criterios histológicos que separan los casos HT (LPO) de los HC (LLO), es difícil la comparación de nuestros resultados.

Hemos observado una asociación significativa entre la expresión suprabasal de p53 y la presencia de un infiltrado inflamatorio profundo ( $p=0,026$ ). Este hallazgo podría sugerir que la profundidad de la inflamación en la ELO condiciona distintos mecanismos que inducen daños celulares que

permanecen o se producen en capas suprabasales, y esto a su vez estimularía la expresión suprabasal de p53 para la reparación de dichos daños. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de un infiltrado inflamatorio profundo se ha señalado como un hallazgo sugestivo y más frecuente en las LLO. Lo anterior, podría estar ocasionado por mecanismos inmunológicos (celulares y humorales) distintos a los que se acontecen en el LPO <sup>13,16,26,98,101,102,112,240</sup>.

Según lo descrito por Cruz y cols. <sup>77-80</sup>, el alto porcentaje (62,9%) de casos con expresión suprabasal encontrados en nuestro estudio, sugeriría un alto riesgo de transformación maligna tanto para el LPO como para las LLO. No obstante, lo anterior sería poco probable según lo descrito en la literatura respecto a los porcentajes de transformación maligna de estos procesos <sup>4,7,13,18,28-30</sup>. Por otro lado, las lesiones empleadas por estos autores <sup>77-80</sup> son distintas tanto en su etiología como en su pronóstico (leucoplasias con distintos grados de displasia y mucosa sin alteraciones adyacente a COCE's), haciendo difícil la comparación con nuestros resultados.

Según nuestros hallazgos y en concordancia con lo señalado por otros autores <sup>70,186-189</sup>, creemos que la expresión suprabasal de p53 podría deberse a la reparación de daños celulares ocasionados por la agresión constante del infiltrado inflamatorio (daño oxidativo y nítrico) y en respuesta a los diferentes mediadores de la inflamación presentes en estos procesos. Por otro lado, la interesante asociación observada entre un infiltrado inflamatorio profundo y la expresión suprabasal de p53, puede sugerir la presencia de distintos perfiles de citoquinas y quimiocinas presentes en las lesiones con este patrón inflamatorio <sup>13,16,26,98,101,102,112,240</sup>, lo que generaría daño celular en capas no proliferativas o madurativas y consecuentemente un mayor potencial de transformación maligna.

Hasta el momento y con los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos decir que no existen diferencias en la expresión suprabasal de p53 en los distintos grupos clínicos ni grupos histológicos. La Inflamación profunda en muestras de ELO se asocia con una expresión suprabasal de p53. Las

implicaciones clínicas y pronósticas de esta sobreexpresión suprabasal de p53 en la ELO, solo podrá conocerse al hacer un seguimiento estrecho y a largo plazo de estos pacientes, para conocer si es indicativa de un mayor riesgo de transformación maligna.

### **5.9. En relación con la expresión de Ki-67**

El marcador de proliferación celular Ki-67, es una proteína que se expresa en el núcleo durante las distintas fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), excepto en la fase reposo celular ó G0<sup>70,72,73</sup>, teniendo un pico de expresión durante la fase de síntesis (S) para disminuir drásticamente inmediatamente después de la fase de mitosis (M)<sup>191</sup>. En condiciones fisiológicas normales solo las capas basales del epitelio oral albergan células con capacidad de proliferación para posteriormente madurar en capas superiores manteniendo la integridad del epitelio. Por el contrario, la proliferación celular en capas para o suprabasales debe ser considerada un signo de alarma en donde están ocurriendo trastornos en los mecanismos que regulan el ciclo y la proliferación celular<sup>71,192</sup>.

Diversos estudios<sup>73,184,193,194</sup> demuestran una asociación entre la expresión de Ki-67 y la severidad de las lesiones orales potencialmente malignas y malignas, así como con su pronóstico<sup>195</sup>.

Numerosos estudios que han valorado el índice de proliferación en el LPO<sup>70,72,192,196-198</sup> y en LLO<sup>186</sup>, mediante el análisis inmunohistoquímico de la expresión epitelial de Ki-67, señalan una alta tasa de proliferación celular en ambos procesos. No obstante, otros autores<sup>244</sup> encuentran una tasa de proliferación baja, señalando que esto pudiera explicar el bajo porcentaje de transformación maligna del LPO.

De manera similar a lo que ocurre con la proteína p53, no siempre altos índices de proliferación o de expresión de Ki-67, se asocian a la severidad de la

lesión o a un mayor riesgo de transformación maligna. En este sentido, algunos autores<sup>70,196</sup>, señalan que además del índice o porcentaje de expresión de Ki-67, podría ser relevante la localización suprabasal de este marcador, ya que puede ser un indicativo de un trastorno de la maduración en capas no replicativas, sugiriendo un incremento del riesgo de transformación maligna de estos procesos. Otros autores<sup>192</sup> consideran que tanto la expresión basal como parabasal de Ki-67 en el LPO, coexisten como mecanismo de mantenimiento de la integridad del epitelio; sin embargo, esta situación de gran recambio celular en algunos casos puede sobrepasar los mecanismos de control de la proliferación e incrementar el riesgo de transformación maligna.

Autores como González-Moles y cols.<sup>71</sup>, señalan una mayor expresión y una localización suprabasal de Ki-67 cuanto mayor es el grado de displasia epitelial. Posteriormente, estos mismos autores<sup>245</sup>, han demostrado una mayor expresión y una localización suprabasal de Ki-67 tanto en la mucosa sin displasia como con displasia, cercana (<1cm) y lejana (>1cm) a COCE's aislados y múltiples. Estos autores<sup>245</sup> concluyen que la proliferación celular en capas epiteliales suprabasales en mucosa cercana y distante al tumor forma parte del fenómeno de cancerización de campo en estos pacientes.

En nuestro estudio se observó expresión suprabasal de Ki-67 en el 27,9% de los casos y no hemos encontrado diferencias significativas entre los distintos tipos clínicos, de forma similar a lo que describen otros autores<sup>72,186,197,198</sup>. Estos resultados sugieren que la presencia o ausencia de lesiones atróficas, erosivas y/o ulcerativas en la ELO, no son indicativos de una mayor proliferación. Según nuestros resultados y la evidencia publicada, creemos que la actividad clínica de las lesiones en la ELO no es un reflejo de los mecanismos que suceden a nivel molecular en relación al control de la proliferación celular.

De manera similar, tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión suprabasal de Ki-67 entre los grupos histológicos. Debido a que no existen estudios que utilicen criterios similares a los nuestros, es difícil la

comparación de nuestros resultados. No obstante, en el estudio de Acay y cols.<sup>186</sup> donde emplean criterios similares, tampoco observaron diferencias en la expresión de Ki-67 entre lesiones de LPO y de LLO.

En relación a las características histológicas, algunos autores<sup>198</sup> han señalado una discreta mayor expresión de Ki-67 en las lesiones atróficas comparadas con las acantóticas, sin embargo, no hacen referencia a la localización de dicha expresión. Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por estos autores<sup>198</sup>, ya que no hemos observado casos con atrofia y expresión suprabasal de Ki-67.

Es importante señalar, que en el 83,3% de los casos con expresión suprabasal de Ki-67, se observó también expresión suprabasal de p53. Este fenómeno, que *a priori* sería antagónico, ya ha sido descrito previamente por otros autores<sup>70</sup>, que señalan como responsable de dicho fenómeno a la presencia de dos poblaciones celulares distintas. Por un lado estarían las células en proliferación (Ki-67+) intentando mantener la integridad epitelial ante la agresión del infiltrado inflamatorio, y por otro lado las células en apoptosis ó en parada del ciclo celular (p53+) para la reparación de daños del ADN.

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos decir que no existe diferencia en la expresión suprabasal de Ki-67 entre los grupos clínicos e histológicos. Las lesiones con atrofia epitelial no se asocian con la expresión suprabasal de Ki-67.



## 6. CONCLUSIONES

1. El tipo clínico de enfermedad liquenoide oral en el momento del diagnóstico no condiciona las características histológicas de la biopsia, y solo se reconocen diferencias en el infiltrado inflamatorio entre las lesiones compatibles y las típicas.

2. Las biopsias de enfermedad liquenoide oral muestran una expresión epitelial intensa de Ciclooxygenasa-2 en una mayoría de casos, sin mostrar diferencias en relación con el tipo de lesión clínica, pero si una mayor expresión en los casos histológicamente compatibles.

3. La mayoría de las biopsias de enfermedad liquenoide oral muestran expresión epitelial de la Óxido Nítrico Sintetasa Inducible, sin mostrar diferencias en relación con el tipo clínico, mostrando una mayor expresión epitelial las biopsias histológicamente compatibles.

4. Se reconoce una expresión epitelial intensa del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico en las biopsias de enfermedad liquenoide oral, sin que existan diferencias en relación al tipo clínico y observándose una mayor expresión citoplasmática en las lesiones histológicamente compatibles.

5. Las biopsias de enfermedad liquenoide oral muestran expresión epitelial de la enzima reparadora O<sup>6</sup>-Metilguanina-ADN Metiltransferasa (MGMT) en la mayoría de los casos, sin mostrar diferencias en relación con las variantes clínicas o histológicas.

6. Se observa expresión epitelial de la enzima Metaloproteinasa-9 (MMP-9) en la mayoría de las biopsias de enfermedad liquenoide oral, sin que se reconozcan diferencias en relación con el tipo clínico o histológico.

**7.** Las biopsias de enfermedad liquenoide oral muestran una alta microdensidad vascular (MDV) y de neoformación vascular (VnF) , sin que se observen diferencias en relación con los tipos clínicos o grupohistológicos.

**8.** Un alto porcentaje de las biopsias de enfermedad liquenoide oral muestran expresión epitelial suprabasal de la proteína p53, sin que se observen diferencias en relación con el aspecto clínico. Esta expresión suprabasal se relacionaría con características histológicas inflamatorias frecuentemente asociadas a las lesiones liquenoides orales.

**9.** Las biopsias de enfermedad liquenoide oral muestran, en un pequeño porcentaje de casos, expresión suprabasal de Ki-67, sin que se reconozcan diferencias en relación con el tipo clínico o histológico. Esta expresión suprabasal de Ki-67 se asocia en varios casos a expresión suprabasal de p53.

**10.** Se reconoce un patrón de sobreexpresión epitelial de la Ciclooxygenasa-2, la Óxido Nítrico Sintetasa Inducible y el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, en las biopsias de enfermedad liquenoide oral histológicamente compatibles.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103 Suppl(:S25-12.
- (2) Chainani-Wu N, Silverman S Jr, Lozada-Nur F, Mayer P and Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc.* 2001;132(7):901-9.
- (3) Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian JV and Thongprasom K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis.* 2005;11(6):338-49.
- (4) van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):317-23.
- (5) Aguirre-Urizar JM. Letter to Editor: oral lichenoid disease. A new classification proposal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13(4):E224.
- (6) van der Meij EH, Schepman KP and van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(2):164-71.
- (7) Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB and 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;100(2):164-78.
- (8) 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;32(9):507-12.
- (9) Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB and Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(1):40-51.
- (10) Mignogna MD, Fedele S, Lo RL, Lo ML and Bucci E. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence ? *Oral Oncol.* 2004;40(2):120-30.

- (11) Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(4):350-65.
- (12) Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008;46(1):15-21.
- (13) van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14(7):E310-E314.
- (14) Abdalla SI, Sanderson IR and Fitzgerald RC. Effect of inflammation on cyclooxygenase (COX)-2 expression in benign and malignant oesophageal cells. *Carcinogenesis*. 2005;26(9):1627-33.
- (15) Cortes-Ramirez DA, Gainza-Cirauqui ML, Echebarria-Goikouria MA and Aguirre-Urizar JM. Oral lichenoid disease as a premalignant condition: the controversies and the unknown. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14(3):E118-E122.
- (16) Thornhill MH, Sankar V, Xu XJ, Barrett AW, High AS, Odell EW, et al. The role of histopathological characteristics in distinguishing amalgam-associated oral lichenoid reactions and oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2006;35(4):233-40.
- (17) Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2002;46(2):207-14.
- (18) Bombeccari GP, Guzzi G, Tettamanti M, Gianni AB, Baj A, Pallotti F, et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(3):328-34.
- (19) Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Broccoletti R, Carbone M, Pagano M, et al. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol*. 2004;40(1):77-83.
- (20) Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC and Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. *Med Oral*. 2003;8(1):2-9.
- (21) Lo Muzio L, Mignogna MD, Favia G, Procaccini M, Testa NF and Bucci E. The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. *Oral Oncol*. 1998;34(4):239-46.
- (22) Mattsson U, Jontell M and Holmstrup P. Oral lichen planus and malignant transformation: is a recall of patients justified? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(5):390-6.

- (23) Mignogna MD, Fedele S and Lo RL. Dysplasia/neoplasia surveillance in oral lichen planus patients: a description of clinical criteria adopted at a single centre and their impact on prognosis. *Oral Oncol.* 2006;42(8):819-24.
- (24) van der Meij EH, Mast H and van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol.* 2007;43(8):742-8.
- (25) Carbone M, Arduino PG, Carrozzo M, Caiazzo G, Broccoletti R, Conrotto D, et al. Topical clobetasol in the treatment of atrophic-erosive oral lichen planus: a randomized controlled trial to compare two preparations with different concentrations. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(2):227-33.
- (26) Ismail SB, Kumar SK and Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci.* 2007;49(2):89-106.
- (27) Mignogna MD, Fedele S, Lo RL, Mignogna C, de RG and Porter SR. Field cancerization in oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33(3):383-9.
- (28) Bermejo-Fenoll A, Sanchez-Siles M, Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F and Salazar-Sanchez N. Premalignant nature of oral lichen planus. A retrospective study of 550 oral lichen planus patients from south-eastern Spain. *Oral Oncol.* 2009.
- (29) Carbone M, Arduino PG, Carrozzo M, Gandolfo S, Argiolas MR, Bertolusso G, et al. Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. *Oral Dis.* 2009;15(3):235-43.
- (30) Gonzalez-Moles MA, Scully C and Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis.* 2008;14(3):229-43.
- (31) Kawanishi S, Hiraku Y. Oxidative and nitrate DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-6):1047-58.
- (32) Peek RM, Jr., Mohla S and DuBois RN. Inflammation in the genesis and perpetuation of cancer: summary and recommendations from a national cancer institute-sponsored meeting. *Cancer Res.* 2005;65(19):8583-6.
- (33) Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin.* 2006;56(2):69-83.

- (34) Chaiyarit P, Ma N, Hiraku Y, Pinlaor S, Yongvanit P, Jintakanon D, et al. Nitrate and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2005;96(9):553-9.
- (35) Chen YK, Hsuen SS and Lin LM. Expression of inducible nitric oxide synthase in human oral premalignant epithelial lesions. *Arch Oral Biol.* 2002;47(5):387-92.
- (36) Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-7.
- (37) Brennan PA, Conroy B and Spedding AV. Expression of inducible nitric oxide synthase and p53 in oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;90(5):624-9.
- (38) Lysitsa S, Samson J, Gerber-Wicht C, Lang U and Lombardi T. COX-2 expression in oral lichen planus. *Dermatology.* 2008;217(2):150-5.
- (39) Neppelberg E, Johannessen AC. DNA content, Cyclooxygenase-2 expression and loss of E-cadherin expression do not predict risk of malignant transformation in oral lichen planus. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007;264(10):1223-30.
- (40) Thomas GT, Lewis MP and Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* 1999;35(3):227-33.
- (41) Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW and Walsh LJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *J Cutan Pathol.* 2001;28(2):72-82.
- (42) Mohan S, Epstein JB. Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 2003;39(6):537-46.
- (43) Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1470(2):M69-M78.
- (44) Segawa E, Sakurai K, Kishimoto H, Takaoka K, Noguchi K, Hashitani S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and DNA topoisomerase II alpha in precancerous and cancerous lesions of the oral mucosa. *Oral Oncol.* 2008;44(7):664-71.
- (45) Shibata M, Kodani I, Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoike K, et al. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol.* 2005;41(3):304-12.
- (46) Camacho M, Leon X, Fernandez-Figueras MT, Quer M and Vila L. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2008;30(9):1175-81.

- (47) Brennan PA, Downie IP, Langdon JD and Zaki GA. Emerging role of nitric oxide in cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1999;37(5):370-3.
- (48) Ma N, Tagawa T, Hiraku Y, Murata M, Ding X and Kawanishi S. 8-Nitroguanine formation in oral leukoplakia, a premalignant lesion. *Nitric Oxide.* 2006;14(2):137-43.
- (49) Sawa T, Ohshima H. Nitrate DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide.* 2006;14(2):91-100.
- (50) Herszenyi L, Hritz I, Peregú I, Sipos F, Juhasz M, Molnar B, et al. Alterations of glutathione S-transferase and matrix metalloproteinase-9 expressions are early events in esophageal carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2007;13(5):676-82.
- (51) Herszenyi L, Sipos F, Galamb O, Solymosi N, Hritz I, Miheller P, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in the normal mucosa-adenoma-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the colon. *Pathol Oncol Res.* 2008;14(1):31-7.
- (52) Jordan RC, abeo-Ong M, Shiboski CH, Dekker N, Ginzinger DG, Wong DT, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA is associated with progression of oral dysplasia to cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(19):6460-5.
- (53) Katori H, Nozawa A and Tsukuda M. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 and human papilloma virus infection are associated with malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *J Surg Oncol.* 2006;93(1):80-5.
- (54) Papathoma AS, Zoumpourlis V, Balmain A and Pintzas A. Role of matrix metalloproteinase-9 in progression of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2001;31(2):74-82.
- (55) Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(17):2666-72.
- (56) Kumagai K, Horikawa T, Gotoh A, Yamane S, Yamada H, Kobayashi H, et al. Up-regulation of EGF receptor and its ligands, AREG, EREG, and HB-EGF in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(6):748-54.
- (57) Morgan S, Grandis JR. ErbB receptors in the biology and pathology of the aerodigestive tract. *Exp Cell Res.* 2009;315(4):572-82.
- (58) Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst).* 2007;6(8):1155-60.
- (59) Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, et al. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132(11):735-43.

- (60) Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Gupta SD, Deo SV, Shukla NK, et al. MGMT expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. *Oral Oncol.* 2007;43(5):515-22.
- (61) Viswanathan M, Tsuchida N and Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2003;105(1):41-6.
- (62) Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol.* 2004;40(2):145-53.
- (63) Lopez M, Aguirre JM, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, et al. Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients--a diagnostic and/or prognostic tool? *Eur J Cancer.* 2003;39(16):2306-9.
- (64) Rodriguez MJ, Acha A, Ruesga MT, Rodriguez C, Rivera JM and Aguirre JM. Loss of expression of DNA repair enzyme MGMT in oral leukoplakia and early oral squamous cell carcinoma. A prognostic tool? *Cancer Lett.* 2007;245(1-2):263-8.
- (65) Rohatgi N, Kaur J, Srivastava A and Ralhan R. Smokeless tobacco (khaini) extracts modulate gene expression in epithelial cell culture from an oral hyperplasia. *Oral Oncol.* 2005;41(8):806-20.
- (66) Jin Y, Tipoe GL, White FH and Yang L. A quantitative investigation of immunocytochemically stained blood vessels in normal, benign, premalignant and malignant human oral cheek epithelium. *Virchows Arch.* 1995;427(2):145-51.
- (67) Michailidou EZ, Markopoulos AK and Antoniadis DZ. Mast cells and angiogenesis in oral malignant and premalignant lesions. *Open Dent J.* 2008;2(1):126-32.
- (68) Raica M, Cimpean AM and Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer.* 2009;45(11):1924-34.
- (69) Tipoe GL, Jin Y and White FH. The relationship between vascularity and cell proliferation in human normal and pathological lesions of the oral cheek epithelium. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996;32B(1):24-31.
- (70) Gonzalez-Moles MA, Bascones-Ilundain C, Gil Montoya JA, Ruiz-Avila I, gado-Rodriguez M and Bascones-Martinez A. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: molecular bases in epithelium predisposed to malignant transformation. *Arch Oral Biol.* 2006;51(12):1093-103.

- (71) Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A and Martinez-Lara I. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head Neck*. 2000;22(7):658-61.
- (72) Mattila R, Alanen K and Syrjanen S. Immunohistochemical study on topoisomerase IIalpha, Ki-67 and cytokeratin-19 in oral lichen planus lesions. *Arch Dermatol Res*. 2007;298(8):381-8.
- (73) Thomson PJ, Soames JV, Booth C and O'Shea JA. Epithelial cell proliferative activity and oral cancer progression. *Cell Prolif*. 2002;35 Suppl 1(:110-20.
- (74) Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Esteban F and Bravo M. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol*. 2010;46(7):525-30.
- (75) Loro LL, Vintermyr OK and Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(3):125-38.
- (76) Steele RJ, Thompson AM, Hall PA and Lane DP. The p53 tumour suppressor gene. *Br J Surg*. 1998;85(11):1460-7.
- (77) Cruz I, Snijders PJ, Van H, V, Vosjan M, van dW, I and Meijer CJ. Specific p53 immunostaining patterns are associated with smoking habits in patients with oral squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol*. 2002;55(11):834-40.
- (78) Cruz I, Napier SS, van dW, I, Snijders PJ, Walboomers JM, Lamey PJ, et al. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol*. 2002;55(2):98-104.
- (79) Cruz IB, Meijer CJ, Snijders PJ, Snow GB, Walboomers JM and van dW, I. p53 immunoexpression in non-malignant oral mucosa adjacent to oral squamous cell carcinoma: potential consequences for clinical management. *J Pathol*. 2000;191(2):132-7.
- (80) Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 1998;184(4):360-8.
- (81) Rodstrom PO, Jontell M, Mattsson U and Holmberg E. Cancer and oral lichen planus in a Swedish population. *Oral Oncol*. 2004;40(2):131-8.

- (82) van der Meij EH, Schepman KP, Plonait DR, Axell T and van dW, I. Interobserver and intraobserver variability in the clinical assessment of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(2):95-8.
- (83) van der Meij EH, Reibel J, Slootweg PJ, van der Wal JE, de Jong WF and van dW, I. Interobserver and intraobserver variability in the histologic assessment of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1999;28(6):274-7.
- (84) van der Meij EH, Schepman KP, Smeele LE, van der Wal JE, Bezemer PD and van dW, I. A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88(3):307-10.
- (85) Rad M, Hashemipoor MA, Mojtahedi A, Zarei MR, Chamani G, Kakoei S, et al. Correlation between clinical and histopathologic diagnoses of oral lichen planus based on modified WHO diagnostic criteria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(6):796-800.
- (86) Eisenberg E. Oral lichen planus: a benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(11):1278-85.
- (87) Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH and Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus - a review. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(10):729-34.
- (88) Laeijendecker R, van JT, Tank B, Oranje AP and Neumann HA. Oral lichen planus in childhood. *Pediatr Dermatol.* 2005;22(4):299-304.
- (89) Lo Russo L., Fedele S, Guiglia R, Ciavarella D, Lo ML, Gallo P, et al. Diagnostic pathways and clinical significance of desquamative gingivitis. *J Periodontol.* 2008;79(1):4-24.
- (90) Mignogna MD, Lo RL and Fedele S. Gingival involvement of oral lichen planus in a series of 700 patients. *J Clin Periodontol.* 2005;32(10):1029-33.
- (91) Bidarra M, Buchanan JA, Scully C, Moles DR and Porter SR. Oral lichen planus: a condition with more persistence and extra-oral involvement than suspected? *J Oral Pathol Med.* 2008;37(10):582-6.
- (92) Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88(4):431-6.
- (93) Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(1):86-122.

- (94) Petruzzi M, De BM, Pastore L, Grassi FR and Serpico R. Penogingival lichen planus. *J Periodontol.* 2005;76(12):2293-8.
- (95) Ramer MA, Altchek A, Deligdisch L, Phelps R, Montazem A and Buonocore PM. Lichen planus and the vulvovaginal-gingival syndrome. *J Periodontol.* 2003;74(9):1385-93.
- (96) Thornhill MH, Pemberton MN, Simmons RK and Theaker ED. Amalgam-contact hypersensitivity lesions and oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(3):291-9.
- (97) Thornhill MH. Oral lichenoid lesions and amalgam fillings. *Evid Based Dent.* 2006;7(3):74-5.
- (98) McCartan BE, McCreary CE. Oral lichenoid drug eruptions. *Oral Dis.* 1997;3(2):58-63.
- (99) Ditrichova D, Kapralova S, Tichy M, Ticha V, Dobesova J, Justova E, et al. Oral lichenoid lesions and allergy to dental materials. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2007;151(2):333-9.
- (100) Issa Y, Brunton PA, Glenny AM and Duxbury AJ. Healing of oral lichenoid lesions after replacing amalgam restorations: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(5):553-65.
- (101) Savage NW. Oral lichenoid drug eruptions. *Oral Dis.* 1997;3(2):55-7.
- (102) Juneja M, Mahajan S, Rao NN, George T and Boaz K. Histochemical analysis of pathological alterations in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *J Oral Sci.* 2006;48(4):185-93.
- (103) de Visser KE, Eichten A and Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(1):24-37.
- (104) Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer.* 2007;121(11):2373-80.
- (105) Kamp DW, Shacter E and Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria. *Oncology (Williston Park).* 2011;25(5):400-10, 413.
- (106) Li N, Grivennikov SI and Karin M. The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment. *Cancer Cell.* 2011;19(4):429-31.
- (107) O'Byrne KJ, Dalglish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br J Cancer.* 2001;85(4):473-83.

- (108) Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM and Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603-16.
- (109) Scrivo R, Vasile M, Bartosiewicz I and Valesini G. Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmun Rev.* 2010.
- (110) Liu Y, Messadi DV, Wu H and Hu S. Oral lichen planus is a unique disease model for studying chronic inflammation and oral cancer. *Med Hypotheses.* 2010;75(6):492-4.
- (111) McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, et al. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One.* 2011;6(1):e15366.
- (112) McLean MH, El-Omar EM. Genetic aspects of inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):370-4.
- (113) Lonkar P, Dedon PC. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer.* 2011;128(9):1999-2009.
- (114) Culig Z. Cytokine disbalance in common human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(2):308-14.
- (115) van der Meij EH, Reibel J, Slootweg PJ, van der Wal JE, de Jong WF and van der Waal I. Interobserver and intraobserver variability in the histologic assessment of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1999;28(6):274-7.
- (116) Mauro A, Lipari L, Leone A, Tortorici S, Burrano F, Provenzano S, et al. Expression of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 in normal and pathological human oral mucosa. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010;48(4):555-63.
- (117) Atula T, Hedstrom J, Ristimaki A, Finne P, Leivo I, Markkanen-Leppanen M, et al. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx: association to p53 and clinical outcome. *Oncol Rep.* 2006;16(3):485-90.
- (118) Banerjee AG, Gopalakrishnan VK, Bhattacharya I and Vishwanatha JK. Deregulated cyclooxygenase-2 expression in oral premalignant tissues. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(14):1265-71.
- (119) Mendes RA, Carvalho JF and van der Waal I. An overview on the expression of cyclooxygenase-2 in tumors of the head and neck. *Oral Oncol.* 2009.
- (120) Prado SM, Cedrun JL, Rey RL, Villaamil VM, Garcia AA, Ayerbes MV, et al. Evaluation of COX-2, EGFR, and p53 as biomarkers of non-dysplastic oral leukoplakias. *Exp Mol Pathol.* 2010;89(2):197-203.

- (121) Renkonen J, Wolff H and Paavonen T. Expression of cyclooxygenase-2 in human tongue carcinoma and its precursor lesions. *Virchows Arch.* 2002;440(6):594-7.
- (122) Urade M. Cyclooxygenase (COX)-2 as a potent molecular target for prevention and therapy of oral cancer. *Jap Dent Sci Rev.* 2008;44):57-65.
- (123) Sappayatosok K, Maneerat Y, Swasdison S, Viriyavejakul P, Dhanuthai K, Zwang J, et al. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14(7):E319-E324.
- (124) Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res.* 2000;6(4):1229-38.
- (125) Mao XY, Wang XG, Lv XJ, Xu L and Han CB. COX-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis using tissue microarray. *World J Gastroenterol.* 2007;13(25):3466-71.
- (126) Legan M, Luzar B, Marolt VF and Cor A. Expression of cyclooxygenase-2 is associated with p53 accumulation in premalignant and malignant gallbladder lesions. *World J Gastroenterol.* 2006;12(21):3425-9.
- (127) Gauthier ML, Pickering CR, Miller CJ, Fordyce CA, Chew KL, Berman HK, et al. p38 regulates cyclooxygenase-2 in human mammary epithelial cells and is activated in premalignant tissue. *Cancer Res.* 2005;65(5):1792-9.
- (128) Cervello M, Montalto G. Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2006;12(32):5113-21.
- (129) Cortes-Ramirez DA, Rodriguez-Tojo MJ, Gainza-Cirauqui ML, Martinez-Conde R and guirre-Urizar JM. Overexpression of cyclooxygenase-2 as a biomarker in different subtypes of the oral lichenoid disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(6):738-43.
- (130) Brennan PA, Thomas GJ and Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol.* 2003;48(2):93-100.
- (131) Chen YK, Lin LM. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase in DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2000;36(2):221-4.
- (132) Keklikoglu N, Koray M, Kocaelli H and Akinci S. iNOS expression in oral and gastrointestinal tract mucosa. *Dig Dis Sci.* 2008;53(6):1437-42.

- (133) Ohashi M, Iwase M and Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. *J Oral Pathol Med.* 1999;28(8):355-9.
- (134) Sunitha M, Shanmugam S. Evaluation of salivary nitric oxide levels in oral mucosal diseases: A controlled clinical trial. *Indian J Dent Res.* 2006;17(3):117-20.
- (135) Avci A, Tuzuner-Oncul AM, Gokcan MK, Namuslu M, Ozturk A and Durak I. Nitric oxide metabolism in cancerous and non-cancerous oral gingivomucosal tissues: possible implications of nitric oxide in cancer process. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(3):304-6.
- (136) Brennan PA, Dennis S, Poller D, Quintero M, Puxeddu R and Thomas GJ. Inducible nitric oxide synthase: correlation with extracapsular spread and enhancement of tumor cell invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2008;30(2):208-14.
- (137) Brennan PA, Umar T, Palacios-Callender M, Spedding AV, Mellor TK, Buckley J, et al. A study to assess inducible nitric oxide synthase expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2000;29(6):249-54.
- (138) Chen YK, Hsuen SS and Lin LM. Increased expression of inducible nitric oxide synthase for human oral submucous fibrosis, verrucous hyperplasia, and verrucous carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31(4):419-22.
- (139) Egloff AM, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor and SRC pathways in head and neck cancer. *Semin Oncol.* 2008;35(3):286-97.
- (140) Beenken SW, Hockett R, Jr., Grizzle W, Weiss HL, Pickens A, Perloff M, et al. Transforming growth factor-alpha: a surrogate endpoint biomarker? *J Am Coll Surg.* 2002;195(2):149-58.
- (141) Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative Immunohistochemical Analysis of Transforming Growth Factor Receptor-alfa and Epidermal Growth Factor Receptor in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck *Cancer* 1996;78[6]:, 1284-92.
- (142) Grandis JR, Tweardy DJ, Melhem MF. Asynchronous modulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1998;4:13-4.
- (143) Shin DM, Ro JY, Hong WK and Hittelman WN. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res.* 1994;54(12):3153-9.

- (144) Srinivasan M, Jewell SD. Evaluation of TGF- $\alpha$  and EGFR expression in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis by quantitative immunohistochemistry. *Oncology*. 2001;61(4):284-92.
- (145) Taoudi BM, Saintigny P, Thomas SM, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in the risk of oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(7):800-9.
- (146) Bankfalvi A, Krassort M, Vegh A, Felszeghy E and Piffko J. Deranged expression of the E-cadherin/beta-catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2002;31(8):450-7.
- (147) Muller S, Su L, Tighiouart M, Saba N, Zhang H, Shin DM, et al. Distinctive E-cadherin and epidermal growth factor receptor expression in metastatic and nonmetastatic head and neck squamous cell carcinoma: predictive and prognostic correlation. *Cancer*. 2008;113(1):97-107.
- (148) Ohnishi Y, Lieger O, Attygalla M, Iizuka T and Kakudo K. Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of the oral cancer cell lines HSC3 and SAS. *Oral Oncol*. 2008;44(12):1155-9.
- (149) Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, et al. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2008;99(8):1589-94.
- (150) Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther*. 2004;102(1):37-46.
- (151) Husvik C, Bryne M and Halstensen TS. Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression in oral squamous cell carcinoma cell lines is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 but is Src and nuclear factor-kappa B independent. *Eur J Oral Sci*. 2009;117(5):528-35.
- (152) Li Y, Wo JM, Ray MB, Jones W, Su RR, Ellis S, et al. Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006;12(6):928-34.
- (153) Moraitis D, Du B, De Lorenzo MS, Boyle JO, Weksler BB, Cohen EG, et al. Levels of cyclooxygenase-2 are increased in the oral mucosa of smokers: evidence for the role of epidermal growth factor receptor and its ligands. *Cancer Res*. 2005;65(2):664-70.
- (154) Ebrahimi M, Boldrup L, Wahlin YB, Coates PJ and Nylander K. Decreased expression of the p63 related proteins beta-catenin, E-

- cadherin and EGFR in oral lichen planus. *Oral Oncol.* 2008;44(7):634-8.
- (155) Fu J, Chen W and Sun Z. [Gene expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in oral lichen planus]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2005;40(6):455-8.
- (156) Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer.* 2000;36(18):2294-300.
- (157) Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH and Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol.* 2003;163(4):1551-6.
- (158) Liu L, Xu-Welliver M, Kanugula S and Pegg AE. Inactivation and degradation of O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase after reaction with nitric oxide. *Cancer Res.* 2002;62(11):3037-43.
- (159) Huang SH, Chang PY, Liu CJ, Lin MW and Hsia KT. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene coding region polymorphisms and oral cancer risk. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(8):645-50.
- (160) Huang SH, Lee HS, Mar K, Ji DD, Huang MS and Hsia KT. Loss expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to betel quid chewing in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(6):883-9.
- (161) Kaina B, Christmann M, Naumann S and Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* 2007;6(8):1079-99.
- (162) Becker K, Gregel C, Fricke C, Komitowski D, Dosch J and Kaina B. DNA repair protein MGMT protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced conversion of benign into malignant tumors. *Carcinogenesis.* 2003;24(3):541-6.
- (163) Iwakuma T, Sakumi K, Nakatsuru Y, Kawate H, Igarashi H, Shiraishi A, et al. High incidence of nitrosamine-induced tumorigenesis in mice lacking DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis.* 1997;18(8):1631-5.
- (164) Taioli E, Ragin C, Wang XH, Chen J, Langevin SM, Brown AR, et al. Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. *BMC Cancer.* 2009;9(354).
- (165) Hohberger L, Wuertz BR, Xie H, Griffin T and Ondrey F. TNF-alpha drives matrix metalloproteinase-9 in squamous oral carcinogenesis. *Laryngoscope.* 2008;118(8):1395-9.

- (166) Hong SD, Hong SP, Lee JI and Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol.* 2000;36(2):207-13.
- (167) Katayama A, Bando N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004;10(2):634-40.
- (168) Nyberg P, Moilanen M, Paju A, Sarin A, Stenman UH, Sorsa T, et al. MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances in vivo invasion of human tongue carcinoma cells. *J Dent Res.* 2002;81(12):831-5.
- (169) Chen Y, Zhang W, Geng N, Tian K and Jack WL. MMPs, TIMP-2, and TGF-beta1 in the cancerization of oral lichen planus. *Head Neck.* 2008;30(9):1237-45.
- (170) Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M and Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2002;95(9):1902-10.
- (171) Regezi JA, Dekker NP, MacPhail LA, Lozada-Nur F and McCalmont TH. Vascular adhesion molecules in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81(6):682-90.
- (172) Huang G, Chen L. Tumor vasculature and microenvironment normalization: a possible mechanism of antiangiogenesis therapy. *Cancer Biother Radiopharm* 1-10-2008;23[5]:, 661-7.
- (173) Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 2001;7(9):987-9.
- (174) Tao X, Huang Y, Li R, Qing R, Ma L, Rhodus NL, et al. Assessment of local angiogenesis and vascular endothelial growth factor in the patients with atrophic-erosive and reticular oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103(5):661-9.
- (175) Scardina GA, Ruggieri A, Messina P and Maresi E. Angiogenesis of oral lichen planus: a possible pathogenetic mechanism. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14(11):e558-e562.
- (176) Scardina GA, Messina P. Morphological characteristics of microcirculation in oral lichen planus involving the lateral border of the tongue. *J Oral Sci.* 2009;51(2):193-7.
- (177) Scardina GA, Picone V, Cacioppo A and Messina P. Study of microcirculation in oral lichen planus by video-capillaroscopy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103(4):e30-e34.
- (178) Sheikh MS, Fornace AJ, Jr. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol.* 2000;182(2):171-81.

- (179) Ogmundsdottir HM, Bjornsson J and Holbrook WP. Role of TP53 in the progression of pre-malignant and malignant oral mucosal lesions. A follow-up study of 144 patients. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(7):565-71.
- (180) Ogmundsdottir HM, Hilmarsdottir H, Bjornsson J and Holbrook WP. Longitudinal study of TP53 mutations in eight patients with potentially malignant oral mucosal disorders. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(9):716-21.
- (181) Save V, Nylander K and Hall PA. Why is p53 protein stabilized in neoplasia? Some answers but many more questions? *J Pathol.* 1998;184(4):348-50.
- (182) Farshadpour F, Hordijk GJ, Koole R and Slootweg PJ. Head and neck squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients with multiple tumors: etiologic significance of p53 and Ki-67 in non-tumorous epithelium. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(9):549-54.
- (183) Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez-Fernandez J, Sanchez-Fernandez E, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, et al. P53 protein expression in oral squamous cell carcinoma. survival analysis. *Anticancer Res.* 2001;21(4B):2889-94.
- (184) Motta RR, Zettler CG, Cambruzzi E, Jotz GP and Berni RB. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75(4):544-9.
- (185) Nikitakis NG, Sauk JJ and Papanicolaou SI. The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(4):476-90.
- (186) Acay RR, Felizzola CR, de AN and de Sousa SO. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncol.* 2006;42(5):475-80.
- (187) Ebrahimi M, Nylander K and van dW, I. Oral lichen planus and the p53 family: what do we know? *J Oral Pathol Med.* 2010.
- (188) Ebrahimi M, Boldrup L, Coates PJ, Wahlin YB, Bourdon JC and Nylander K. Expression of novel p53 isoforms in oral lichen planus. *Oral Oncol.* 2008;44(2):156-61.
- (189) Gonzalez-Moles MA, Gil-Montoya JA, Ruiz-Avila I, Esteban F and Bascones-Martinez A. Differences in the expression of p53 protein in oral lichen planus based on the use of monoclonal antibodies DO7 and pAb 240. *Oral Oncol.* 2008;44(5):496-503.

- (190) Ebrahimi M, Wahlin YB, Coates PJ, Sjostrom B and Nylander K. Decreased expression of p63 in oral lichen planus and graft-vs.-host disease associated with oral inflammation. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(1):46-50.
- (191) Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992;25(1):31-40.
- (192) Hirota M, Ito T, Okudela K, Kawabe R, Yazawa T, Hayashi H, et al. Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(4):204-12.
- (193) Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999;35(3):333-42.
- (194) Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT and Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J Cancer.* 2009;100(7):1128-34.
- (195) Seoane J, Pita-Fernandez S, Gomez I, Vazquez I, Lopez-Cedrun JL, De AD, et al. Proliferative activity and diagnostic delay in oral cancer. *Head Neck.* 2010;32(10):1377-84.
- (196) Gonzalez Moles MA, Esteban F, Ruiz-Avila I, Gil Montoya JA, Brener S, Bascones-Martinez A, et al. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation and apoptosis in oral lichen planus. *Oral Dis.* 2009;15(2):162-9.
- (197) Montebugnoli L, Farnedi A, Marchetti C, Magrini E, Pession A and Foschini MP. High proliferative activity and chromosomal instability in oral lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(12):1140-4.
- (198) Taniguchi Y, Nagao T, Maeda H, Kameyama Y and Warnakulasuriya KA. Epithelial cell proliferation in oral lichen planus. *Cell Prolif.* 2002;35 Suppl 1(1):103-9.
- (199) Soo R, Putti T, Tao Q, Goh BC, Lee KH, Kwok-Seng L, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in nasopharyngeal carcinoma and association with epidermal growth factor receptor expression. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;131(2):147-52.
- (200) Onofre MA, Sposto MR, Navarro CM, Motta ME, Turatti E and Almeida RT. Potentially malignant epithelial oral lesions: discrepancies between clinical and histological diagnosis. *Oral Dis.* 1997;3(3):148-52.
- (201) Warnakulasuriya S, Johnson NW and van der W, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):575-80.

- (202) Redahan S, O'Regan E, McCartan B and Toner M. Histological evidence for lichen planus in clinically normal perilesional tissue. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(6):674-7.
- (203) Pandey M, Prakash O, Santhi WS, Soumithran CS and Pillai RM. Overexpression of COX-2 gene in oral cancer is independent of stage of disease and degree of differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(4):379-83.
- (204) Prescott SM. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? *J Clin Invest.* 2000;105(11):1511-3.
- (205) Goulart Filho JA, Nonaka CF, da Costa Miguel MC, de Almeida FR and Galvao HC. Immunoexpression of cyclooxygenase-2 and p53 in oral squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol.* 2009;30(2):89-94.
- (206) Ryott M, Marklund L, Wangsa D, Elmberger G and Munck-Wikland E. Cyclooxygenase-2 expression in oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(5):385-9.
- (207) Choe MS, Zhang X, Shin HJ, Shin DM and Chen ZG. Interaction between epidermal growth factor receptor- and cyclooxygenase 2-mediated pathways and its implications for the chemoprevention of head and neck cancer. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(9):1448-55.
- (208) Pu X, Lippman SM, Yang H, Lee JJ and Wu X. Cyclooxygenase-2 gene polymorphisms reduce the risk of oral premalignant lesions. *Cancer.* 2009;115(7):1498-506.
- (209) Peters WH, Lacko M, Te Morsche RH, Voogd AC, Oude Ophuis MB and Manni JJ. COX-2 polymorphisms and the risk for head and neck cancer in white patients. *Head Neck.* 2009;31(7):938-43.
- (210) Hiraku Y, Kawanishi S, Ichinose T and Murata M. The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1203(:15-22.
- (211) Zhao SF, Tong XY and Zhu FD. Nitric oxide induces oral squamous cell carcinoma cells apoptosis with p53 accumulation. *Oral Oncol.* 2005;41(8):785-90.
- (212) Brennan PA, Palacios-Callender M, Zaki GA, Spedding AV and Langdon JD. Does type II nitric oxide synthase expression correlate with cellular proliferation in oral squamous cell carcinoma and dysplasia? *Head Neck.* 2001;23(3):217-22.
- (213) Calvisi DF, Pinna F, Ladu S, Pellegrino R, Muroli MR, Simile MM, et al. Aberrant iNOS signaling is under genetic control in rodent liver cancer and potentially prognostic for the human disease. *Carcinogenesis.* 2008;29(8):1639-47.

- (214) Carvalho SM, Soares FA, Netto MM, Nonogaki S and Castro RA. Is the expression of inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) nitric oxide synthases an early event in breast carcinogenesis? *Breast J*. 2010;16(4):440-1.
- (215) Seril DN, Liao J, Yang GY and Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis*. 2003;24(3):353-62.
- (216) Chen YK, Hsue SS and Lin LM. Increased expression of inducible nitric oxide synthase for human buccal squamous-cell carcinomas: immunohistochemical, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ RT-PCR studies. *Head Neck*. 2002;24(10):925-32.
- (217) Tsai CH, Hsieh YS, Yang SF, Chou MY and Chang YC. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase C inhibitors: preliminary observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(6):710-6.
- (218) Nicholson RI, Gee JM and Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37 Suppl 4(S9-15).
- (219) Beenken SW, Sellers MT, Huang P, Peters G, Krontiras H, Dixon P, et al. Transforming growth factor alpha (TGF-alpha) expression in dysplastic oral leukoplakia: modulation by 13-cis retinoic acid. *Head Neck*. 1999;21(6):566-73.
- (220) Carracedo DG, Astudillo A, Rodrigo JP, Suarez C and Gonzalez MV. Skp2, p27kip1 and EGFR assessment in head and neck squamous cell carcinoma: prognostic implications. *Oncol Rep*. 2008;20(3):589-95.
- (221) Cowden Dahl KD, Symowicz J, Ning Y, Gutierrez E, Fishman DA, Adley BP, et al. Matrix metalloproteinase 9 is a mediator of epidermal growth factor-dependent e-cadherin loss in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 2008;68(12):4606-13.
- (222) Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K and Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2006;12(2):87-91.
- (223) Fischer C, Zlobec I, Stockli E, Probst S, Storck C, Tornillo L, et al. Is immunohistochemical epidermal growth factor receptor expression overestimated as a prognostic factor in head-neck squamous cell carcinoma? A retrospective analysis based on a tissue microarray of 365 carcinomas. *Hum Pathol*. 2008;39(10):1527-34.
- (224) Kim S, Grandis JR, Rinaldo A, Takes RP and Ferlito A. Emerging perspectives in epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer. *Head Neck*. 2008;30(5):667-74.

- (225) Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE and Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control*. 2007;14(3):295-304.
- (226) Grandis JR. Prognostic biomarkers in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(17):5005-6.
- (227) Ryott M, Wangsa D, Heselmeyer-Haddad K, Lindholm J, Elmberger G, Auer G, et al. EGFR protein overexpression and gene copy number increases in oral tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2009;45(9):1700-8.
- (228) Chen Z, Zhang X, Li M, Wang Z, Wieand HS, Grandis JR, et al. Simultaneously targeting epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and cyclooxygenase-2, an efficient approach to inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2004;10(17):5930-9.
- (229) Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res*. 2006;12(17):5064-73.
- (230) Viet CT, Jordan RC and Schmidt BL. DNA promoter hypermethylation in saliva for the early diagnosis of oral cancer. *J Calif Dent Assoc*. 2007;35(12):844-9.
- (231) Bugni JM, Han J, Tsai MS, Hunter DJ and Samson LD. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(8):1116-26.
- (232) Pegg AE, Fang Q and Loktionova NA. Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(8):1071-8.
- (233) Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*. 2000;2(10):737-44.
- (234) Zhao ZZ, Savage NW, Sugerman PB and Walsh LJ. Mast cell/T cell interactions in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2002;31(4):189-95.
- (235) Zhao ZZ, Sugerman PB, Zhou XJ, Walsh LJ and Savage NW. Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. *Oral Dis*. 2001;7(4):246-51.
- (236) Werner JA, Rathcke IO and Mandic R. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(4):275-82.
- (237) Yamamoto H, Vinitketkumnun A, Adachi Y, Taniguchi H, Hirata T, Miyamoto N, et al. Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression

- with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2004;25(12):2353-60.
- (238) Fracalossi AC, Miranda SR, Oshima CT, Franco M and Ribeiro DA. The role of matrix metalloproteinases 2 and 9 during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Mol Histol*. 2010;41(1):19-25.
- (239) Min R, Zun Z, Min Y, Wenhui D, Wenjun Y and Chenping Z. Shikonin inhibits tumor invasion via down-regulation of NF-kappaB-mediated MMP-9 expression in human ACC-M cells. *Oral Dis*. 2011;17(4):362-9.
- (240) de Visser KE, Coussens LM. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(11):1143-52.
- (241) Vineis P, Schatzkin A and Potter JD. Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis*. 2010;31(10):1703-9.
- (242) Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez J, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I and Sanchez-Fernandez E. Significance of p53 expression in non-tumoral epithelium adjacent to oral squamous cell carcinomas. *J Laryngol Otol*. 2002;116(5):355-8.
- (243) Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR and Rosa LE. Immunohistochemical expression of PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. *J Oral Sci*. 2009;51(1):117-21.
- (244) de Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR and Rosa LE. Comparative analysis of cell proliferation ratio in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14(11):e563-e567.
- (245) Gonzalez-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Acebal F, Gil-Montoya JA, Brener S, et al. Ki-67 expression in non-tumour epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for multiple oral tumours. *Oral Dis*. 2010;16(1):68-75.



La Enfermedad Liquenoide Oral (ELO) agrupa diversos procesos inflamatorios crónicos, entre los que se encuentran el Liquen Plano Oral (LPO) y las Lesiones Liquenoides Orales (LLO). El nexo clínico e histológico que une estos procesos o subtipos de ELO, es la pápula reticular blanca y un infiltrado inflamatorio crónico subepitelial en banda que provoca degeneración basal del epitelio mucoso. Este nexo de unión clínico e histopatológico hace muchas veces difícil, si no es que imposible, diferenciar ambos subtipos.

Tanto el LPO como las LLO se consideran desórdenes orales potencialmente malignos (DOPM), habiéndose reportado distintos y controvertidos porcentajes de malignización. Esta disparidad en los porcentajes de malignización, se debe principalmente a la falta de criterios clínicos e histopatológicos diagnósticos estrictos y homogéneos tanto para el LPO como para las LLO, lo que ha ocasionado la inclusión de ambos procesos indistintamente, o incluso otras lesiones de naturaleza no inflamatoria y con reconocido potencial maligno como las leucoplasias y las eritroleucoplasias, haciendo difícil determinar el verdadero potencial maligno tanto del LPO como de las LLO.

El análisis de reconocidos marcadores inmunohistoquímicos asociados a la carcinogénesis oral, como son las enzimas COX-2 y la iNOS, la proteína oncogénica EGFR, la enzima reparadora de ADN MGMT, la enzima MMP-9, la proteína CD31 asociada a la angiogénesis, la proteína p53 y el marcador de proliferación celular Ki-67 en los subtipos de la ELO, podrían ser de gran ayuda para conocer por un lado, si las características clínicas e histopatológicas de estos procesos se relacionan con la expresión de estos marcadores, y por otro lado, si esta expresión es distinta en cada subtipo de ELO. Con ello, podríamos tener más datos para identificar los casos con un mayor riesgo de transformación maligna en base a las características clínico-patológicas y moleculares de cada subtipo de ELO.

Por este motivo, pensamos que la utilización de estos marcadores en los subtipos de ELO como el LPO y las LLO, van a ayudar a la identificación de características clínicas e histológicas relacionadas con la alteración de la expresión de estos marcadores inmunohistoquímicos asociados a la carcinogénesis oral, para mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes diagnosticados de este controvertido desorden oral.