



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“ESTUDIO DE COMPUESTOS NITROGENADOS. SU
RELACIÓN CON EL CÁNCER BUCAL”**

TESISTA:

OD. ROSANA MORELATTO

DIRECTOR:

PROF. DRA. SILVIA LÓPEZ DE BLANC

CÓRDOBA, 2007



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



ESTUDIO DE COMPUESTOS NITROGENADOS. SU RELACIÓN CON EL CÁNCER BUCAL.

**Trabajo de Tesis para optar al título de
Doctor en Odontología**

Od Rosana Morelatto

Año 2007



Director de Tesis

Dra. Silvia López de Blanc
Profesora Titular Cátedra Clínica Estomatológica "B"

Tribunal de Tesis (Res 110/01)

Prof. Dra. Patricia Ortiz
Prof. Dr. Luis José Battellino
Prof. Dr. Fabián Líbero Femopase

A mi cálida, afectuosa y hermosa familia...

Debes amar el tiempo de los intentos.
Debes amar la hora que nunca brilla,
y si no, no pretendas tocar lo cierto.
Sólo el amor engendra la maravilla.
Sólo el amor consigue encender lo muerto...

Debes amar la arcilla que va en tus manos
Debes amar su arena hasta la locura,
y si no, no la emprendas porque será en vano.
Solo el amor alumbra lo que perdura.
Solo el amor convierte en milagro el barro...

Silvio Rodríguez

INDICE

Capítulo I	pág.
Introducción	
1-Generalidades sobre cáncer	
1.1-Conceptos actuales sobre etiología de las neoplasias malignas_____	5
1.2-Oncogenes y genes supresores_____	8
1.3-Carcinogénesis química_____	11
1.3.1-Carcinógenos químicos: características químicas y metabolismo_____	12
1.3.2 .Modelos en animales y carcinogénesis química_____	13
1.3.3. Iniciadores _____	15
1.3.4. Promotores _____	16
1.3.5. Determinación de carcinógenos químicos para humanos y su evaluación en estudios de riesgo poblacionales_____	18
2-Etiopatogenia	
2.1.Generalidades _____	19
2.2.Tabaco y alcohol _____	19
2.2.1.Cancerización de campo_____	21
2.3. Trauma_____	22
2.4. Hongos y virus_____	23

2.5. Mala higiene	24
2.6. Inflamación	25
3-Compuestos nitrogenados	
3.1.Generalidades	28
3.2.Nitratos	
3.2.1.Origen	29
3.2.2 Niveles normales	29
3.2.3 Riesgos para la salud	30
3.3.Nitritos	
3.3.1. Origen exógeno	31
3.3.2 Formación endógena	31
3.3.3. Niveles normales-Metabolismo	31
3.3.4. Riesgos para la salud	32
3.4.Nitrosaminas	
3.4.1. Origen	33
3.4.2. Metabolismo	34
3.4.3. Riesgos para la salud	34
3.5.Oxido nítrico-Oxido nítrico sintetasa inducible	35
3.5.1 NO en enfermedades de la cavidad bucal	38
3.5.2. NO en relación a la inflamación y al cáncer	39
Objetivos	41

Secciones del estudio en base a objetivos :

Parte 1

Capítulo II

Compuestos nitrogenados en saliva

Etapa A: Búsqueda de condiciones preanalíticas	
Material y métodos	42
Resultados	44
Discusión	46
Conclusiones	47
Etapa B: Determinación de nitrato y nitrito en saliva de un grupo de pacientes con cáncer y de un grupo control	
Material y métodos	48
a) Historia clínica	48
b) Recolección de las muestras de saliva	49
c) Determinación de nitrito	50
d) Determinación de nitrato	52
Resultados	53
Discusión	60

Parte 2

Capítulo III

Deteminación de enzima iNOS

Material y Métodos	62
Resultados	65
Discusión	71

Parte 3

Capítulo IV

a-Tasas de mortalidad

Introducción y Objetivo	76
Material y Métodos	77
Resultados	78
Discusión	82

b- Demora en el diagnóstico del cáncer bucal

Introducción y Objetivo	82
Material y Métodos	82
Resultados	83
Discusión	88

Capítulo V

Conclusiones	91
--------------	----

Capítulo VI

Resumen	93
Summary	94

Capítulo VII

Bibliografía	95
--------------	----

Capítulo VIII

Difusión de resultados parciales	120
Publicaciones (originales)	

Introducción

1- Generalidades sobre cáncer

En el año 2000, el cáncer de cabeza y cuello se ubicó entre las 8 principales causas de muerte a nivel mundial. Se desarrollaron aproximadamente 481.000 casos nuevos y 320.000 personas murieron a causa de dicha enfermedad. La tasa de incidencia promedio fue de 8,8 y 5,1 cada 100 mil y de 7,3 y 3,2 cada 100 mil la tasa de mortalidad promedio en hombres y mujeres respectivamente [1]. El cáncer bucal (CB) es uno de los diez tumores más frecuentes a nivel mundial; según Globocan 2002 [2] hubo 274.289 casos nuevos con tasas de incidencia de 5,6 y 3,2 y murieron 127.099 personas, resultando una tasa de mortalidad de 2,6 y 1,5 para el sexo masculino y femenino respectivamente.

El CB es multifactorial, su etiopatogenia en humanos permanece aún en estudio, pero se estima que un 80 a 90% se puede adjudicar a factores ambientales, entre ellos factores físicos, biológicos y probablemente los más importantes, los *carcinógenos químicos* [3].

1.1. Conceptos actuales sobre etiología de las neoplasias malignas

Las células con transformación maligna presentan una serie de características alteradas o diferentes con respecto a las células normales de las que provienen. Por un lado, las células cancerosas pueden sortear las situaciones normales de muerte celular programada o apoptosis. En condiciones experimentales se dice que obtienen la inmortalidad. Esto significa que pueden permanecer por tiempo indeterminado en subcultivos *in vitro* o transplantarse de un hospedador apropiado a otro. Logran la inmortalidad, entre otros factores, porque pierden total o parcialmente la capacidad de madurar y las células inmaduras viven mucho más tiempo que las maduras. Estas células requieren de menos concentraciones séricas para su crecimiento, no necesitan fijarse a ningún sustrato, están menos sometidas a la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad, y son capaces de saltar o evitar los límites de restricción del ciclo celular. También en el crecimiento tumoral *in vivo* las células del parénquima tumoral pueden presentar distintos grados de diferenciación, constituyendo los tumores llamados “diferenciados”, “semidiferenciados” o “indiferenciados”. Cuando las células son tan indiferenciadas que pierden casi totalmente las características de las células normales de origen se los designa como anaplásicos. En términos generales, el grado de diferenciación se relaciona positivamente con el grado de malignidad clínica. En relativa correlación con su indiferenciación, las células transformadas expresan anormalidades

cuali y cuantitativas en sus componentes químicos y estructurales, entre ellos, factores de crecimiento y el ADN nuclear.

Otra característica es el crecimiento celular anárquico, ya que se pueden replicar fuera del control de los factores de crecimiento que regulan la comunicación intercelular normal. También pierden la “inhibición por contacto”, lo que explica su crecimiento en forma de masas desordenadas de células en capas múltiples, al contrario de lo que sucede en las células normales (figura 1).

Las células cancerosas destruyen los tejidos que las circundan, en el fenómeno conocido como invasión o infiltración. Existen varios factores que han sido propuestos como causantes de la invasión, tanto por separado como en combinación, pero no hay aún una respuesta satisfactoria acerca de cuál o cuáles son los verdaderos. Los factores más citados son la presión física que ejerce el tumor sobre los tejidos adyacentes, disminución de la adhesividad y cohesividad de las células normales, aumento de la motilidad de dichas células, pérdida de la inhibición por contacto y liberación de enzimas destructoras (tales como colagenasas, hidrolasas lisosómicas, y activador del plasminógeno) por parte de las células tumorales.

Figura 1: Crecimiento celular normal y neoplásico



Este último parece ser el factor más adecuado para explicar la invasión, ya que se ha encontrado en muchos cánceres humanos niveles de dichas enzimas mucho mayores que los de células normales, o de tumores benignos [4]. Se puede suponer que la destrucción de tejidos

normales por la acción enzimática puede preparar vías para un crecimiento y locomoción expansivos, reduciendo al mismo tiempo los contactos inhibidores.

Las células tumorales malignas tienen la capacidad de migrar hacia otros tejidos, y una vez instaladas en algún tejido que les ofrezca las condiciones necesarias, establecer una nueva colonia de células, formándose así un nuevo tumor metastático. Existen tres formas principales por las que un tumor puede llegar a colonizar un tejido distante. En primer lugar, la implantación en cavidades corporales, cuando el cáncer invade los tejidos llegando a una cavidad como puede ser, por ejemplo, el peritoneo o la pleura: las células tumorales caen dentro de la cavidad, y se adhieren a la pared de la misma, produciendo la formación de otro tumor en esta nueva localización. Otra vía es la diseminación linfática, característica principalmente de los carcinomas, pero no ausente en sarcomas: en este caso, cuando las células tumorales encuentran un vaso linfático migran hacia la luz del mismo a través de las uniones entre las células endoteliales, y una vez dentro del vaso pueden llegar hasta cualquier ubicación irrigada por el sistema linfático. Una tercera manera de generar metástasis es la vía hematológica, típica de los sarcomas pero no desconocida en los carcinomas. Es más común la diseminación por intermedio de las venas, y como de esta manera las células tumorales siguen la vía de drenaje venoso del órgano en el que estaban asentadas, es lógico que los órganos donde más frecuentemente se producen metástasis en tumores que utilizan esta vía, sean el hígado, al que llega todo el drenaje del sistema porta, y los pulmones, que reciben todo el drenaje de las cavas. En los tumores que se propagan a través de las arterias, esto puede ocurrir cuando las células tumorales pasan por el lecho capilar pulmonar o por los cortocircuitos arteriovenosos pulmonares, o cuando las metástasis pulmonares originan émbolos tumorales [5].

El desarrollo de una metástasis implica una compleja secuencia de acontecimientos interdependientes: alteraciones genéticas, eventos epigenéticos y respuesta del huésped que Hart y Fidler (1981) han concebido gráficamente como una escalera, en la que cada escalón secuencial debe ser remontado con éxito para llegar a producir un implante secundario [6]. También influye en el establecimiento de metástasis la heterogenicidad celular del cáncer, puesto que sólo algunas células cancerosas dentro de un tumor pertenecen a clones con capacidad metastásica [7].

El crecimiento progresivo de tumores y la producción de metástasis depende del aporte adecuado de sangre, favorecido por la angiogénesis, que consiste en múltiples pasos secuenciales e interdependientes que empiezan con la degradación local de la membrana que rodea a los capilares y es seguido por la invasión del estroma circundante por las células subyacentes del endotelio [8,9]. La migración de las células endoteliales está acompañada por la proliferación de dichas células y su organización en estructuras tridimensionales que se unen con otras estructuras semejantes para

formar una red de nuevos vasos sanguíneos [10,11].

1.2. Oncogenes y genes supresores

La instalación y el desarrollo del cáncer se producen debido a la acción de agentes cancerígenos capaces de producir un daño al ADN, en los genes cuya función es regular el ciclo de reproducción celular. Se los descubrió investigando la etiología tumoral, por lo que se los denominó genéricamente oncogenes [12]. Sus formas normales, que codifican las proteínas que controlan la proliferación celular, se llamaron protooncogenes. Las alteraciones que transforman los protooncogenes en oncogenes dan lugar a la producción de proteínas alteradas y/o producidas en cantidades aumentadas, las que a su vez condicionan el rasgo más característico de la transformación maligna: el crecimiento descontrolado y continuo de las células tumorales (figura 2).

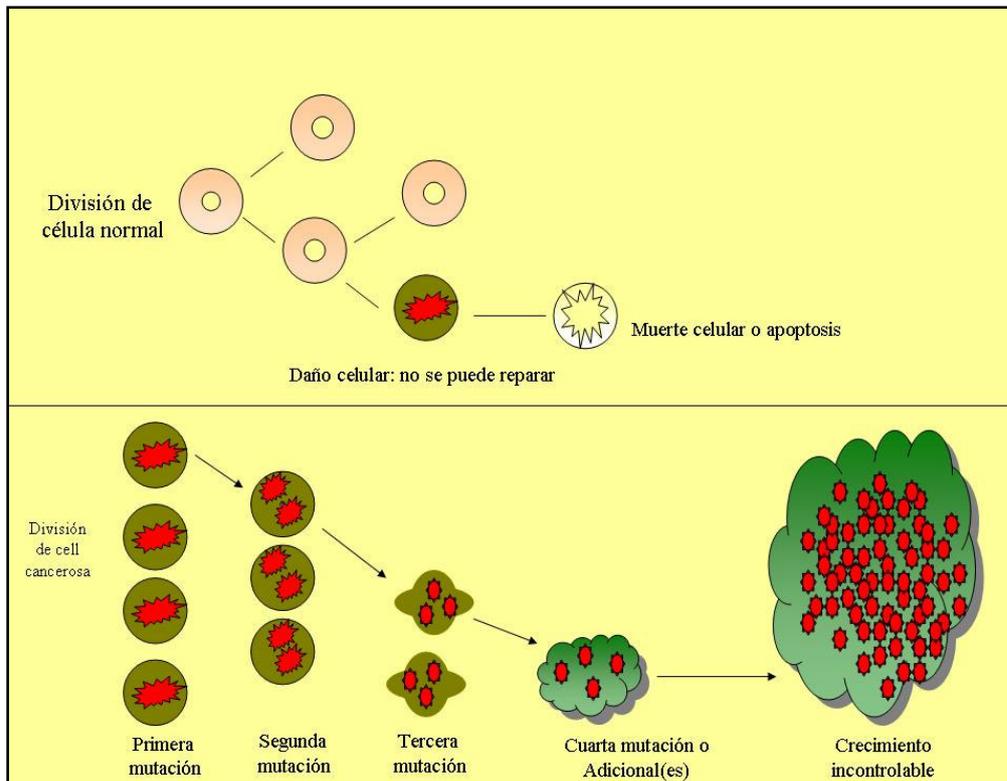


Figura 2:
División celular normal, apoptosis e inicio de mutación.

Existen varios mecanismos para la activación de un oncogén, la que conduce a la transformación maligna de una célula [12]:

-una mutación en la secuencia de nucleótidos del protooncogén que produce una proteína con funciones alteradas;

-la amplificación (existencia de muchas copias de un gen) de un protooncogén que aumenta

la cantidad de proteína producida y dificulta la acción de los mecanismos regulatorios;

-una alteración en la ubicación en el ADN de un protooncogén (debido, por ejemplo, a una traslocación del fragmento de ADN que lo contiene hacia otra localización donde se ve sometido a diferentes mecanismos de control), o el funcionamiento alterado de los mecanismos regulatorios para la expresión de un oncogén (por ejemplo, la inserción de un promotor viral cerca de un protooncogén);

-un defecto en el control post-transcripcional de la expresión del gen, que reduce la destrucción del ARNm o la proteína normal.

En realidad, los oncogenes fueron descubiertos inicialmente en virus con capacidad de transformar células. El primero fue el gen de una proteína con función de quinasa de tirosina codificada por el virus de sarcoma de Rous, un retrovirus que induce sarcomas en aves, y fue bautizado PP60 *v-src* [13], donde PP60 indica que se trata de una proteína fosforilada de 60kD de peso molecular. La “v” identifica a los oncogenes presentes en el genoma de un virus, y más adelante se encontró que prácticamente todos los oncogenes virales (*v-onc*) tenían una contraparte casi idéntica en el genoma de células normales, por lo que a éstos se los denomina como a oncogenes virales de los cuales son homólogos, pero precedidos de una letra “c” (*c-onc*) [14]. Posteriormente, y a partir del conocimiento de que los oncogenes, en células normales, producen proteínas que controlan eventos celulares básicos como la diferenciación celular y la proliferación celular, se hace una diferenciación en la denominación de los *c-onc*, recibiendo el nombre genérico de protooncogenes cuando su acción se halla dentro de los parámetros de normalidad, y *c-oncogenes*, cuando producen las proteínas alteradas de las células transformadas.

Estas proteínas asociadas a transformación celular pueden ser divididas en 7 categorías, de acuerdo a la clasificación enunciada por Hunter (1991) [15]:

*Clase 1: oncoproteínas similares a hormonas de crecimiento, como por ejemplo *sis*, *int-2*, *hst*, de los que el primero presenta semejanzas con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y los otros dos con el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) [16, 17]. Estas proteínas son secretadas al exterior de la célula, estimulando el crecimiento celular en forma paracrina o autocrina.

*Clase 2: proteínas con función de quinasa de tirosina, como el *src*, *abl*, *ros*, *erb-B*, y otras.

Son proteínas de la superficie interna de la membrana plasmática, que ejercen su acción sobre otras proteínas de membrana o sobre proteínas citoplasmáticas.

*Clase 3: receptor de angiotensina sin actividad de proteína quinasa, hasta ahora se conoce un solo

oncogén de este tipo, que es el *mas*, y que se halla en la membrana plasmática.

*Clase 4: proteínas involucradas en el ciclo de guanosina trifosfato/difosfato (proteínas G), que son los oncogenes de la familia *ras* (*N-ras*, *K-ras*, *H-ras*). Se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática, y unen GTP. Cumplen funciones en la transducción de señales desde fuera de la célula hacia adentro.

*Clase 5: proteínas citoplasmáticas con actividad serina quinasas, como el *raf* y el *mos*. Estos tienen que ver con los segundos mensajeros en la transducción de señales.

*Clase 6: proteína del oncogen *crk*, que es citoplasmática y se une a proteínas que contienen fosfotirosina, sugiriendo un papel en la regulación de éstas últimas.

*Clase 7: proteínas nucleares que actúan como factores de transcripción, regulando la expresión del ADN. Como ejemplos, *myc*, *fos*, *jun*, *myb*, *erb-A*, *p53*, etc. Estos factores nucleares pueden representar el último paso de la cascada de transducción de señales.

En general, es necesaria la activación de más de un oncogén para que una célula se transforme, y comúnmente esos varios oncogenes deben cumplir diferentes funciones. Como ejemplo, la mutación de un oncogén *ras*, debe estar acompañada de la sobreexpresión del oncogén *myc* para que la célula llegue a un fenotipo transformado [18]. La activación de un oncogén es en general dominante. Cuando se produce en un alelo se expresa en el fenotipo, pero no se conocen formas de herencia de oncogenes.

Tan importantes como los oncogenes en la etiología tumoral son los llamados antioncogenes o genes supresores de tumor. Estos son genes cuya función normal es producir proteínas que regulan en menos el ciclo celular, es decir, suprimen el crecimiento cuando éste ya no es necesario induciendo, por ejemplo, a la diferenciación o a la muerte por apoptosis. La mutación o delección de estos genes elimina la acción supresora normal, conduciendo a una proliferación continua y anómala [19]. A estos genes se los llamó antioncogenes debido a la acción que ejercen, que es contraria a la de los oncogenes. Actualmente se considera más correcto el nombre de genes supresores de tumor ya que su acción no es directamente sobre el oncogén o sobre el producto del mismo, sino que corre por otra vía. Las mutaciones de los genes supresores (o las delecciones) son en general recesivas, no se expresan en el fenotipo mientras se mantenga el alelo sano, pero esta condición aumenta un 50% el riesgo de producción tumoral por este mecanismo. Muchas de estas alteraciones recesivas pueden ser heredadas, con lo que se hereda el estado de predisposición.

El primero de los genes supresores de tumor descubierto es el RB-1, cuya carencia provoca el desarrollo del retinoblastoma, un tumor de la niñez [20]. En efecto, las personas afectadas de éste cáncer demuestran tener una deleción en ambas copias del cromosoma 13, y este gen produce una proteína de 105-110 kD que se ubica en el compartimiento nuclear de las células, y que cumple funciones en la regulación de la expresión génica [21,22]. Otro ejemplo característico de antioncogén que presenta funciones similares es el gen de la proteína p53, del cual primero se pensó que era un verdadero oncogén, ya que en varios tumores se halla sobreexpresado. Pero luego se descubrió que esta proteína sobreexpresada era en realidad una forma mutada de la normal, y que en muchos tumores, uno de los alelos presenta una mutación y el del otro cromosoma no se encuentra, por haber sido delecionado [23].

1.3. Carcinogénesis química

El origen químico de las neoplasias malignas fue reconocido luego de observar la incidencia inusual de cáncer en ciertos grupos poblacionales. La capacidad de un agente químico de causar cáncer fue posteriormente confirmada por numerosos estudios experimentales en animales. Cuánto contribuye la exposición a un químico en la incidencia de cáncer no fue totalmente confirmado hasta que se llevaron a cabo estudios de base poblacionales que documentaron diferentes tasas de tipos específicos de cáncer en poblaciones geográficamente distintas. Los cambios en la frecuencia de cáncer en grupos étnicos migratorios, las tasas altas de cáncer asociadas a ocupaciones específicas y el alto riesgo de cáncer asociado al hábito de fumar, confirman que la exposición ambiental y el estilo de vida, fueron los mayores determinantes de riesgo de cáncer en humanos [24].

El desarrollo de un tumor maligno involucra complejas interacciones entre diversos factores, tanto exógenos (ambientales) como endógenos (genéticos, hormonales, etc) [25]. Los carcinógenos químicos tienen frecuentemente órganos específicos, se dirigen a células epiteliales (target-cells) y causan daño genético, es decir son genotóxicos. Están relacionados químicamente con el daño al ADN y las consecuentes mutaciones somáticas, pueden ocurrir directamente ante la exposición ambiental o indirectamente por activación de mecanismos endógenos mutagénicos (ej. óxido nítrico y oxirradicales [26].

El análisis de la inducción química de cáncer en modelos animales y poblaciones humanas ha tenido el mayor impacto sobre la salud. Los estudios experimentales han podido validar hipótesis

generadas a partir de observaciones en seres humanos. Los experimentos llevados a cabo en animales confirman las propiedades carcinogénicas y de promoción del tumor del humo del tabaco e identifican los componentes químicos y gaseosos activos [27]. La aplicación de estrategias de prevención de cáncer relacionado con químicos, en especial retinoides, antiestrógenos e inhibidores de la cascada de ácido araquidónico, es el resultado directo de los estudios llevados a cabo en modelos de carcinogénesis química [28] y la reducción de la incidencia de tumores en poblaciones de alto riesgo.

1.3.1. Carcinógenos químicos: características químicas y metabolismo

Si bien una amplia variedad de químicos y clases químicas (tabla 1) pueden causar cáncer en animales y en humanos [29], el proceso es muy específico. Los carcinógenos genotóxicos tienen alta reactividad química, como los agentes alquilantes, o pueden ser metabolizados por el huésped a intermediarios reactivos. Ellos forman uniones covalentes con macromoléculas y tienen como target último al ADN del núcleo y la mitocondria [30]. Los carcinógenos genotóxicos pueden transferir grupos “alquilo” simples o complejos (aril) a sitios específicos de las bases de ADN [26]. Dichos agentes alquil y arilalquilantes incluyen, aunque no se limitan a compuestos nitrogenados, epóxidos alifáticos, aflatoxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros productos de combustión de minerales y vegetales. Otros residuos arilaminas transferidos al ADN son aril-aminas aromáticas y aminas aromáticas heterocíclicas; esta última es producida especialmente en carnes, aves o pescados asados. La interacción de los carcinógenos genotóxicos con el ADN no es al azar, sino que cada agente reacciona selectivamente con purina y pirimidina [30]. En todos los casos, las mutaciones detectadas en los tumores, representa una combinación del efecto de cambios mutagénicos sobre la función de los productos de proteínas y el efecto de la alteración de la conducta de células huésped específicas.

Tabla 1: Carcinógenos químicos en relación a diferentes tipos de tumores.

Organo target	Agente carcinógeno	Industria	Tipo de tumor
Pulmón	Humo del tabaco, arsénico, asbestos, sílica, benzo[a]pireno, berilio, bis(cloro)metil éter, compuestos con cromo VI, alquitrán e impermeabilizantes, compuestos de níquel, hollín, gas mostaza.	Producción de aluminio, bebidas carbonatadas (colas), pinturas, extracción de hematite.	Carcinoma a células escamosas (CCE) y adenocarcinoma
Cavidad bucal	Humo de tabaco, bebidas alcohólicas, compuestos de níquel.	Fabricación de calzados y muebles. Producción de isopropanol, alcohol	CCE
Esófago	Humo de tabaco, bebidas alcohólicas.	-	CCE
Sistema digestivo	Alimentos salados, ahumados y encurtidos.	Industria del caucho	Adenocarcinoma
Colon	Aminas heterocíclicas y asbestos.	-	Adenocarcinoma
Hígado	Aflatoxinas, cloruro de vinilo, humo de tabaco, bebidas alcohólicas	-	Carcinoma Hepatocelular y Hemangiosarcoma
Riñón	Humo del tabaco, fenacetina.	-	Cáncer de células renales
Vejiga	Humo del tabaco, 4-aminobifenil, bencidina, 2-naftilamina, fenacetina .	-	Carcinoma de células transicionales
Próstata	Cadmio	—	Adenocarcinoma
Piel	Arsénico, benzo[a]pireno, alquitrán, aceites minerales, hollín, ciclosporina A, rayos ultravioleta.	Producción de bebidas carbonatadas (colas)	CCE y carcinoma Basocelular
Médula ósea	Benceno, humo del tabaco, óxido de etileno, agentes antineoplásicos, ciclosporina A	Industria del caucho	Leucemia, Linfoma

1.3.2 .Modelos en animales y carcinogénesis química:

Virtualmente, cada forma de cáncer humano puede ser reproducida en animales de experimentación por exposición a carcinógenos químicos específicos. En muchos casos, la célula de origen, morfogénesis, marcador fenotípico y alteraciones genéticas son cualitativamente idénticas a

aquellas de los correspondientes tumores en humanos [31]. Más aún, los modelos en animales han revelado la interacción huésped-carcinógeno entre especies mamíferas, reproduciendo cáncer en órganos específicos en animales, con químicos identificados como carcinógenos humanos, tales como el alquitrán para el carcinoma a células escamosas, cloruro de vinilo para el angiosarcoma hepático, aflatoxina para el hepatocarcinoma, y aminas en el cáncer de vejiga. La introducción de ratones genéticamente modificados destinados a reproducir cánceres humanos específicos, ha permitido la interpretación de la contribución de químicos en la producción de tumores y a la identificación de potenciales carcinógenos exógenos [32]. Dichos estudios han indicado que los agentes carcinógenos pueden activar oncogenes directamente, inactivar genes supresores de tumor y causar el cambio genómico que está asociado con crecimiento autónomo, incremento en la supervivencia y modificación del perfil génico que es requerido por el fenotipo maligno [33].

La producción de modelos experimentales de carcinogénesis ha permitido identificar, en la mayoría de ellos, una secuencia caracterizada por las siguientes etapas: iniciación, promoción y progresión. La fase de iniciación es inducida por compuestos genotóxicos y resulta de eventos mutacionales. La **iniciación** ocurre en células individuales que luego se multiplican dando lugar a la formación de clones celulares. El crecimiento de estos clones es el proceso de **promoción** tumoral. Las células dentro de los clones pueden sufrir mutaciones adicionales originando células con mayor potencial de proliferación. En términos clínicos se podrían ejemplificar las etapas de la carcinogénesis como:

Período latente de la enfermedad: INICIACIÓN

Lesión cancerizable: PROMOCIÓN

Neoplasia benigna o Carcinoma in situ (CIS): CONVERSIÓN

Tumor maligno: PROGRESIÓN

La secuencia de mutación y crecimiento selectivo de nuevos fenotipos puede repetirse resultando en la aparición de tumores de mayor malignidad que son característicos de cada modelo (progresión) [34].

Las sustancias promotoras no son, en su mayoría, carcinogénicas por sí mismas y, en ausencia de iniciación, producen cambios reversibles en la proliferación y expresión fenotípica de las células. La aplicación de una dosis subumbral de un carcinógeno completo, que en esta dosis actúa como iniciador, seguida por el tratamiento repetitivo con un promotor no carcinogénico induce la formación de tumores. Una dosis alta y única de un carcinógeno como el 7,12-

iniciadas requieren de la exposición a radiación adicional o a carcinógenos químicos para convertirse en células cancerosas [36].

Respecto de los iniciadores químicos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos constituyen las sustancias mejor estudiadas. En modelos de cancerización epitelial se ha demostrado su acción como iniciadores tumorales, e incluso como carcinógenos completos. El modelo de carcinogénesis en piel de ratón ha hecho posible la identificación de una gran variedad de potenciales carcinógenos tales como: aldehídos, carbamatos, epóxidos, haloalquiéteres, haloalquicetonas, lactosas, nitrosamidas, sulfonatos y urea.

La iniciación tumoral parece ser un proceso irreversible que probablemente involucre una mutación somática en algún aspecto del control del crecimiento y/o la diferenciación.

Se ha observado una buena correlación entre la carcinogenicidad de muchos carcinógenos químicos y sus actividades mutagénicas [37]. Muchos agentes iniciadores tumorales generan o son convertidos metabólicamente, a reactantes electrofílicos que se unen covalentemente al DNA y otras macromoléculas [38]. Estos carcinógenos son llamados indirectos, a diferencia de los directos, los cuales ejercen ellos mismos su efecto, no a través de sus metabolitos.

Además de los efectos iniciadores de sustancias químicas, se han descrito iniciadores biológicos como virus, bacterias y hongos (ver 2.4 y 2.5).

1.3.4. Agentes Promotores

Los promotores tumorales pueden ser definidos como compuestos que muestran una actividad carcinogénica débil o nula cuando se los utiliza en ausencia de un iniciador, pero que inducen la formación de tumores cuando se los aplica repetidamente después de una dosis baja o subumbral de un iniciador [38, 39, 25]. Las sustancias promotoras, en ausencia de iniciación, producen generalmente, cambios reversibles en las poblaciones celulares, caracterizados por el aumento de la proliferación y disminución de la diferenciación. Habitualmente, en los modelos de carcinogénesis experimental, se utilizan los ésteres de forbol, como el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), como agentes de promoción tumoral. Las radiaciones, de acuerdo a su tipo y dosis, también pueden actuar como promotores tumorales.

El comportamiento habitual de los promotores tumorales no es la unión covalente al DNA como es el de los iniciadores y no son, en general, mutagénicos, pero generan un número importante de cambios epigenéticos [40]. En los tejidos epiteliales, el aumento de la proliferación induce a la lesión hiperplásica asociada habitualmente a reacción inflamatoria del conectivo subyacente [41].

Una gran diversidad de agentes químicos actúan como promotores tumorales. Tanto los dipertenos (ésteres de forbol), como los indol alcaloides, como el benzopireno y el peróxido de benzoílo, resultan promotores eficaces [37].

En cuanto al mecanismo de acción de los ésteres de forbol se cree que, dado que estos compuestos se unen con gran afinidad a los fosfolípidos de membrana e incluso pueden alterar sus propiedades físicas, los mismos actuarían, al menos parcialmente, por inducción de cambios en la estructura lipídica. Estos cambios favorecerían la activación de la proteína kinasa C (PKC) [42, 43, 25]. Dada la importancia de esta proteína en el control del crecimiento normal, su activación podría resultar un evento crítico en el proceso de carcinogénesis.

Diversos estudios que muestran que los promotores tumorales inhiben la comunicación intercelular proveen una clave importante para la comprensión del proceso de promoción tumoral, dado que este tipo de comunicación juega un rol crucial en el control de la proliferación y diferenciación celular [44]. Se ha observado que el TPA y otros promotores inhiben la cooperación metabólica intercelular en cultivo de tejidos [45], y la formación y el mantenimiento del acoplamiento eléctrico de células epiteliales humanas en cultivo [46].

La alteración en la diferenciación parece tener un papel muy importante en la promoción y carcinogénesis en general. Se ha observado que los promotores tumorales tienen la capacidad de inducir, en diversos tipos celulares, una serie de características fenotípicas semejantes a las que se encuentran tanto en células embrionales como en células malignas.

Si bien los efectos epigenéticos son los más conocidos, se han demostrado alteraciones genéticas, principalmente mediadas por la producción de radicales libres, inducidas por agentes promotores. Algunos de ellos, como el peróxido de benzoílo, originan radicales libres espontáneamente; mientras que otros, como los ésteres de forbol y la teleocidina, los originan mediante sus efectos clastogénicos. En diversos modelos se han descrito múltiples efectos de algunos promotores tumorales, como por ejemplo: amplificación génica [47], aneuploidía de levaduras [48], interacciones sinérgicas con virus favoreciendo la transformación celular [49], incremento del crecimiento independiente del anclaje en líneas celulares epidérmicas de ratón [50], e intercambio de cromátidas hermanas [51].

Los efectos epigenéticos de los promotores tumorales son reversibles y, por ende, serían más importantes en los estadios de la promoción, ya que éstos son reversibles durante un cierto período. En cambio, los efectos genéticos serían responsables de la porción irreversible o estadio tardío de la promoción.

1.3.5. Determinación de carcinógenos químicos para humanos y su evaluación en estudios de riesgo poblacionales

El objetivo de estos estudios es dilucidar la etiología del cáncer, definir riesgos en humanos (poblacionales e individuales) e identificar métodos de prevención más racionales. La medicina ha intentado determinar qué causa un cáncer en los individuos. Este proceso requiere de la confección de historias clínicas exhaustivas, exámenes clínicos minuciosos e interpretación de los datos de las investigaciones efectuadas. Se han usado diversos modelos para identificar potenciales carcinógenos en humanos. Extrapolar datos de cultivos celulares en animales a riesgo de cáncer en humanos tiene limitaciones; sin embargo, la epidemiología deberá aportar las mejores evidencias conclusivas acerca de las causas. Existen guías de evaluación de causalidad, disponibles para estudios de cualquier tipo [52].

2- Cáncer bucal: Etiopatogenia

2.1. Generalidades

El excesivo consumo de tabaco y alcohol, son los factores más relacionados y estudiados en relación al cáncer bucal (CB) y en general a los del tracto aerodigestivo superior [53, 54, 55, 56]. La tendencia al incremento en la incidencia en personas que no consumen ni tabaco ni alcohol [57,58], ha llevado a los científicos a considerar otros potenciales factores de riesgo tales como infecciones y enfermedades de la cavidad bucal, problemas causados por prótesis [59,60], higiene oral deficiente [54,61,55,62,63,64], mal estado dentario [65,54,61,66], trauma dentario [62], deficiencias dietarias, bajos niveles de nutrientes, como por ejemplos carotenos [54,55] y también la posible intervención de algunos microorganismos como papilomavirus (HPV) [67,68,69], Herpes virus, Epstein Barr virus [70,71,72] y Cándida [73]. En la región sur de Brasil, Uruguay y nordeste de Argentina, se describió un riesgo aumentado en consumidores de mate [74,75]. Numerosos autores mencionan que el consumo de alimentos y bebidas que contienen nitrosaminas, nitritos y nitratos aumentan el riesgo de cáncer de laringe, esófago y boca [76,77].

2.2. Tabaco y alcohol

La ingesta de alcohol y tabaco han sido relacionados con el cáncer de todo el organismo en forma individual o juntos [78,79].

El tabaco en cualquiera de sus formas genera el mayor riesgo; se han descrito numerosos compuestos nocivos, siendo el benzopireno uno de los más potentes carcinógenos [80]; la nicotina y los alcaloides menores pueden aumentar a las nitrosaminas específicas del tabaco (NET). Las NET son agentes procarcinógenos que requieren activación metabólica y sus formas activas reaccionan con componentes celulares, como el ADN y la hemoglobina [81]. Dentro de ellas la nitrosornicotina (NNN) es una de las nitrosaminas más importantes del tabaco y ha sido implicada en tumores de cavidad bucal, nasal y de esófago. Su actividad biológica está relacionada a los productos metabólicos, producidos por enzimas intracelulares, las cuales interactúan con el ADN celular y las proteínas [82]. Otras NET son la N'-nitrosoanatabina (NAT), la N'-nitrosoanabasina (NAB) y la 4-(N'-methyl-N'-nitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanona (NNK) [83]. La sinergia entre el alcohol y el tabaco, es más obvia en el desarrollo del cáncer bucal que en cualquier otro cáncer y puede relacionarse con el hecho de que las NET son mucho más altas en la saliva cuando el tabaco es masticado donde el contacto con la mucosa bucal es más prolongado.

La nicotina, si bien no es un carcinógeno, resulta citotóxica y puede actuar como co-factor en la carcinogénesis relacionada al tabaco. Los estudios en animales sugieren que la nicotina potencia los efectos de algunos carcinógenos en el desarrollo de carcinomas bucales [84, 85]. Además, los estudios efectuados *in vivo* muestran que la nicotina, aún en bajas concentraciones (2%), puede causar daño epitelial en la mucosa, haciéndola más permeable a la acción de carcinógenos [84].

Muchos de los consumidores de tabaco, lo son también de alcohol. Estudios epidemiológicos han determinado que el alcohol incrementa el riesgo y que también puede actuar de manera independiente en el cáncer bucal, aunque no está claro su mecanismo de acción. Si bien no hay evidencias de que el alcohol sea un carcinógeno *per se*, algunos de sus metabolitos, tales como acetaldehído y superóxido, son mutagénicos y citotóxicos. Por lo tanto, el alcohol es considerado como un co-factor en el desarrollo del cáncer bucal [86].

El uso combinado del tabaco y el alcohol tiene un efecto sinérgico en la etiología del cáncer bucal, es decir que sus efectos combinados son mucho mayores que la suma de los efectos independientes de cada agente [87, 88]. Se han sugerido ambos efectos, locales y sistémicos pero parecería estar más relacionado a los locales.

Los carcinógenos del tabaco y del alcohol pueden atravesar las capas superficiales del epitelio y extender sus efectos; es por ello que la permeabilidad de la mucosa a dichos agentes puede ser considerada como un factor importante en el desarrollo del cáncer bucal [89,90]. Existen estudios epidemiológicos [88] que muestran que el riesgo relativo de aquellos que consumen tabaco y alcohol es más grande en la mucosa oral, donde el tiempo de contacto es mayor que en otras áreas tales como faringe o esófago. Algunos llevados a cabo en EEUU [87,91] demostraron que el alto consumo de bebida blanca (que contenga 40-50% de etanol) y de cerveza, (aproximadamente 5%) implica mayor riesgo que el consumo de vino (cercano al 15%). Sin embargo, en Italia el vino ha sido asociado con el mayor riesgo [92]. Tales hallazgos sugieren que algunos ingredientes de las bebidas alcohólicas (por ejemplo ésteres aromáticos) así como la concentración de etanol, deben ser tenidos en cuenta cuando se considera el rol del alcohol en la etiología del cáncer bucal. Presumiblemente, habría un umbral de concentración de etanol por encima del cual se incrementa significativamente la permeabilidad de la mucosa oral a los carcinógenos del tabaco. Concentraciones de 25 a 30% de etanol incrementan significativamente la penetración de NNN en la mucosa de piso de boca, que es una de las áreas más permeables [93, 94, 95] y por lo tanto una de las más susceptibles de desarrollar cáncer bucal [87, 96].

Otro de los mecanismos sería facilitar la entrada de los carcinógenos del tabaco dentro de las células como resultado de sus propiedades solventes y el primer producto metabólico del alcohol acetaldehído (figura 4), puede actuar sobre el ADN. Finalmente, ambos inducen a la persistencia del daño celular irreparable a través de generaciones de células. El daño térmico y la deficiencia en microconstituyentes específicos, podrían acelerar este proceso [79]. Así también el consumo de alcohol se asocia a otras conductas como el hábito de fumar y ciertos aspectos de la dieta, ya que es frecuente que quienes fuman y/o toman, ingieren escasas cantidades de frutas frescas y vegetales los cuales ejercen actividad protectora [97].

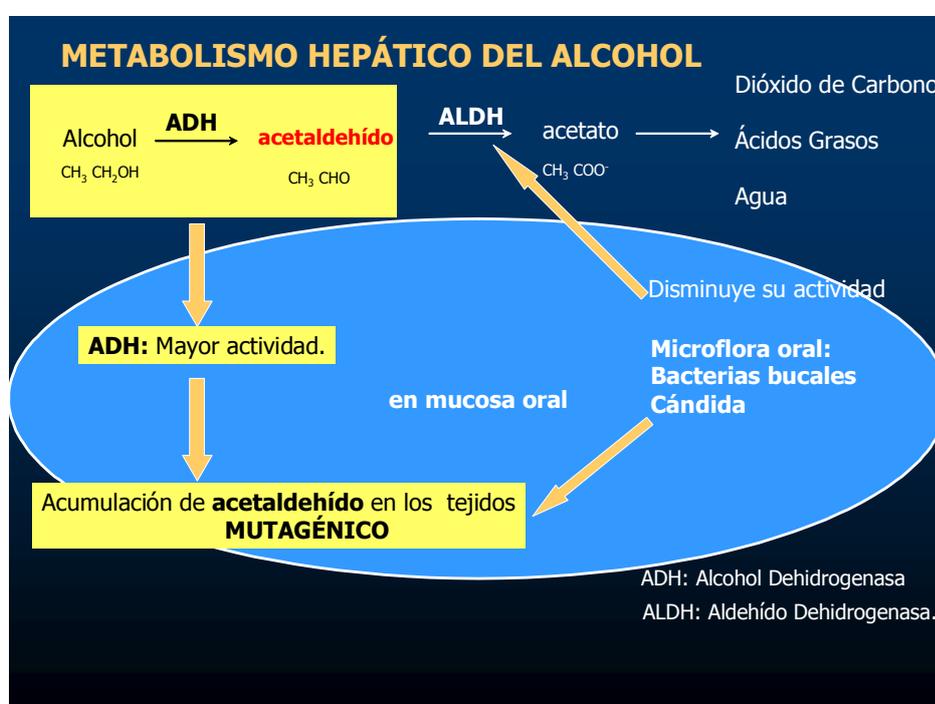


Figura 4: Metabolismo hepático del alcohol.

2.2.1. Cancerización de campo

La particular acción de cancerígenos como el tabaco y el alcohol que actúan desde la superficie mucosa (figura 5), produce el fenómeno conocido como “cancerización de campo”.

El concepto fue introducido por Slaughter en 1953 [98] para explicar el riesgo aumentado de malignidad de áreas extensas de la superficie epitelial de la porción superior del tracto aerodigestivo. Esta hipótesis, fundamentada en la aparición frecuente de segundos tumores primarios o cánceres multifocales, fue luego comprobada por la demostración de cambios moleculares en la mucosa

bucal clínicamente sana de pacientes fumadores [99].

La búsqueda de marcadores del estado de cancerización de campo resulta no solo de interés biológico sino de aplicación en el diagnóstico precoz y en la prevención del cáncer bucal. En este contexto, cobran importancia los marcadores que puedan ser detectados en biopsias de rutina procesadas para diagnóstico histopatológico. Entre ellos, las variaciones de las regiones organizadoras de nucleolo evidenciadas por impregnación argéntica (AgNORs) y cuantificadas por análisis de imágenes han resultado ser marcadores muy sensibles de cancerización de campo [100].

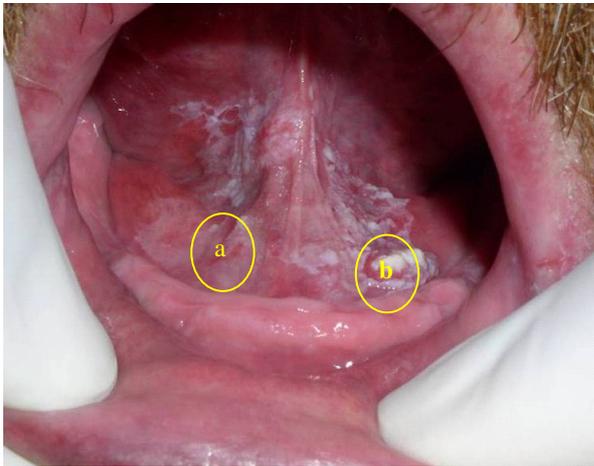


Figura 5: Leucoplasia de piso de boca(a), con sectores de carcinoma infiltrante (b) en paciente consumidor de tabaco y alcohol.

2.3. Trauma

Ya en 1982 Greenspan y col mencionaban la asociación de las lesiones traumáticas crónicas con la aparición de cáncer bucal [101]. Se da el nombre de traumatismo a las lesiones producidas por el efecto mecánico de un agente vulnerante en forma aguda o crónica. En relación al cáncer bucal, actuaría como promotor en el proceso de carcinogénesis, estimulando la proliferación celular. Si el epitelio está iniciado la acción del trauma (promotor) facilitaría la transformación maligna. La pérdida de continuidad del epitelio (figura 6), erosión, ulceración, úlcera, facilitarían la penetración y acción de otros agentes carcinógenos (tabaco, alcohol, H.P.V, etc.) [62].



Figura 6: Ulceración traumática crónica.

2.4. Hongos y virus

Diversos estudios llevados a cabo en China indicaron que algunos hongos, en especial la *Candida*, al infectar el epitelio esofágico predispondría al cáncer de esófago, por un doble mecanismo, como célula mediadora de catálisis para la elaboración de bencil-metil-amina y liberando metabolitos ácidos que bajan el pH del medio, adecuándolo para la nitrosación [102, 103]. A su vez la infección por *Candida* es capaz de producir alteraciones displásicas en el epitelio bucal, lo cual sumado a su capacidad de infectar lesiones cancerizables preexistentes como el Liquefación Plano y la Leucoplasia (figuras 7 y 8) pueden agravar su pronóstico [102, 104].

El virus del papiloma humano, (HPV) es altamente prevalente en la cavidad bucal, en especial los genotipos 11,16 y 18. Se transcribe desde la forma episomal y generalmente se suprime cuando se integra. Las proteínas E5, E6 y E7, codificadas por los HPVs de alto riesgo son consideradas oncogénicas por sus propiedades transformadoras y estimulantes del crecimiento, pudiendo desregular la función supresora de tumor, alterar la función de p21, p53 y Rb, provocar defectos en apoptosis, reparación del ADN, control del ciclo celular y eventualmente inmortalización celular [105].

El virus del Herpes simple (HSV) provoca una inmunosupresión generalizada y sensibiliza a la mucosa a otros carcinógenos, tales como las nitrosaminas presentes en el tabaco [106].



Figura 7: Leucoplasia retrocomisural en paciente fumador (en margen inferior derecho, aspecto histológico).

Figura 8: Leucoplasia infectada por *Candida*.



2.5. Mala higiene oral

Deeb y col. (1989) [107] encontraron en 6 pacientes con CCE bucal no consumidores de tabaco ni de alcohol, que todos tenían gingivitis crónica. Las bacterias asociadas a las infecciones dentales, pueden también relacionarse a otras reacciones inflamatorias y un número importante de investigadores indican que la microflora bucal juega el rol principal en la reducción del nitrato a nitrito [108, 109, 110], compuestos relacionados a la carcinogénesis.



Figura 9: Abundante placa bacteriana y cálculo en elementos dentarios de paciente con úlcera carcinomatosa en encía y de piso de boca.

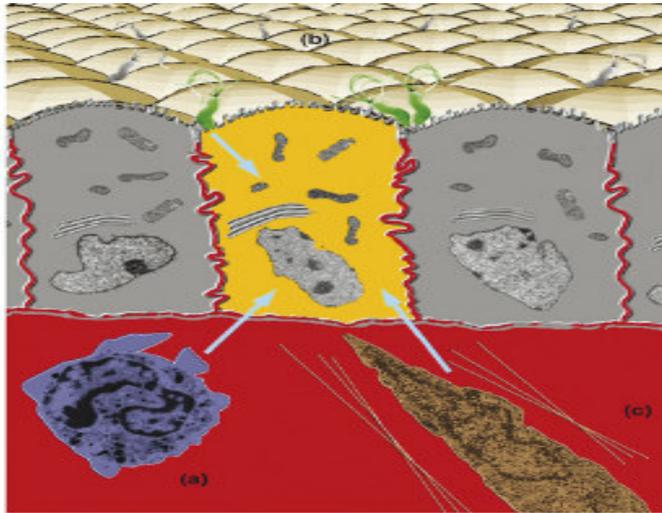


Figura 10: Efectos de la infección bacteriana que contribuye a la carcinogénesis: (a) bacterias asociadas al cáncer provocan una respuesta inflamatoria crónica (b) directamente manipulan la biología celular del huésped

(c) y pueden alterar la homeostasis tisular. La superposición de dichos efectos en el contexto celular correcto puede promover la acumulación de defectos genéticos que resulten en la aparición de células malignas (amarillo) [111].

2.5. Inflamación y cáncer

La inflamación que ocurre por episodios, pero persistentemente durante décadas, es un factor de riesgo para diversos tipos de cáncer: la colitis ulcerativa [112-114] fue relacionada con el carcinoma (CA) de colon, el asma con el CA de pulmón [115-119], la inflamación del epitelio del ovario, con el CA de ovario [120,121], la cistitis eosinofílica, con el CA de vejiga [122-124], la sarcoidosis, con el CA de pulmón, hígado y piel [125], el esófago de Barret con alto riesgo de displasia [126] y el liquen plano ulcerativo, con el CA verrugoso [127,128].

Así, la inflamación persistente incrementa el riesgo de cáncer en los órganos involucrados pero no en órganos más distantes (figura 9 y 10). Esto ocurre debido a que como parte de la función normal de defensa del huésped, los granulocitos secretan radicales libres reactivos y mediadores electrofílicos, exponiendo inevitablemente a células próximas del epitelio y estroma, a sustancias con potencial mutagénico *in vitro* [129-133]. Los granulocitos y linfocitos generan por lo menos cuatro tipos de productos que son genotóxicos o mutagénicos: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxhidrilos (OH^-) [134-144], óxido nítrico (NO) [145-153], especies reactivas lipídicas y sus metabolitos [154-162].

El óxido nítrico, por ejemplo actúa modificando o dañando el ADN [145-150] alterando la p53 [152,144] y en la mutación o transformación celular [145, 146, 151]. Cuando ocurre el daño

genómico, las células disminuyen su velocidad para degradar la p53 y la acumulan en el

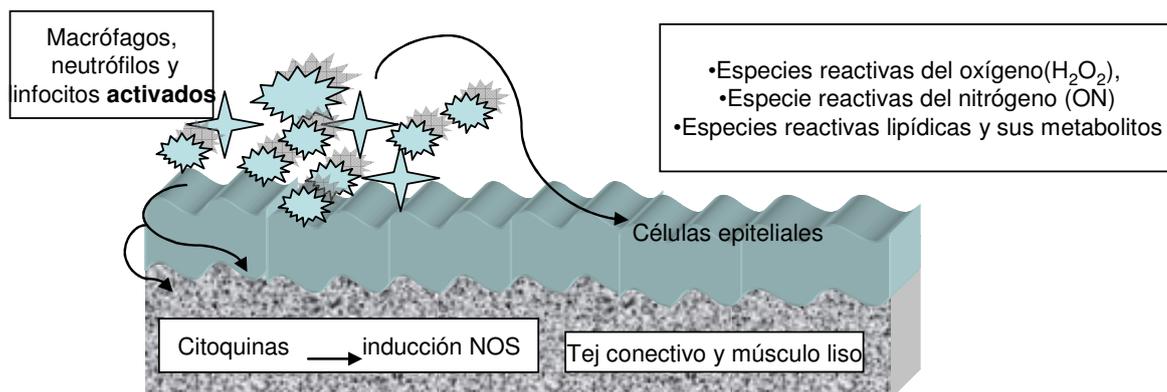
núcleo; reparan el ADN, autorregulan su degradación o propagan la apoptosis. Dicha respuesta capacita a la p53 para funcionar como centinela genómico [163-166]. El daño del gen o proteína p53 tiene graves consecuencias celulares y se estima que 40-60% de los tumores contienen una variante alélica de la p53.

En ciertos tumores, las oncoproteínas virales (ej HPV E6) dañan el ADN por unirse directamente a él [167]. Las células que contienen oncoproteínas con actividad ligasa en cualquier sitio, tienen muy bajos niveles basales y fallas en la acumulación de p53 en respuesta a fallas genómicas. En tales células la degradación basal de p53 es mucho más rápida de la normal.

El daño esporádico a p53 vía redox o alquilantes puede favorecer la aparición de células con un fenotipo mutado [168,169] dando origen a la carcinogénesis. Esta hipótesis integrada ofrece un marco para investigar por qué la persistente inflamación incrementa el riesgo de cáncer en sitios localizados. La inflamación baña el tejido epitelial y el conjuntivo con un exudado que contiene NO o PGE2 el cual rápidamente se deshidrata en PGA2 [170] y una serie de mediadores electrofílicos tipificados como α , β aldehídos insaturados derivados de la síntesis de eicosanoides o de peroxidación lipídica entre otros. De acuerdo a lo expuesto, la relación entre inflamación y cáncer puede clarificarse comprendiendo la relación entre estructura, actividad y mecanismos que capacitan a los mediadores de la inflamación para dañar la transactivación, conformación y fosforilación de p53 y otros factores de transcripción redox "sensibles" involucrados en la vigilancia y reparación genómica.

Fitzpatrick FA (2001) concluye que la inflamación persistente es un factor de riesgo para muchos tipos de cáncer. Este fenómeno relaciona la exposición de los tejidos a la liberación sostenida, durante años, de mediadores electrofílicos genotóxicos (figura 11) aumentando las posibilidades de mutación oncogénica [171].

Figura 11: Modelo para la base molecular y celular de la inflamación relacionada al riesgo de cáncer [171].



3-Compuestos Nitrogenados

3.1. Generalidades

La cavidad bucal, es la vía de entrada más importante a todo el organismo, de sustancias extrañas, frecuentemente peligrosas: microorganismos patógenos, irritantes químicos, contaminantes ambientales o aditivos alimenticios. La saliva es el primer fluido corporal que toma contacto con las sustancias ingeridas. Como consecuencia de dicho contacto, puede ocurrir que se eliminen bacterias o virus y/o modifiquen químicamente compuestos carcinogénicos. La importancia de la saliva en el mantenimiento de la buena salud bucal puede ejemplificarse por los pacientes con xerostomía quienes frecuentemente desarrollan caries rampantes, inflamación e infecciones en la mucosa. Sumada a la función protectora, recientes investigaciones han indicado que bajo ciertas circunstancias, pueden ser generadas sustancias tóxicas en la saliva misma; en relación a esto, el hecho más relevante es la posible formación de nitrosaminas, reconocidas como potentes carcinógenos [172].

El nitrógeno molecular, N_2 , existe en gran abundancia en la atmósfera y es un macronutriente vital para todos los tipos de vida. Casi todos los compuestos biológicamente activos con N lo contienen en forma reducida, y por lo tanto, antes de que se pueda utilizar por los organismos, se tiene que fijar, es decir, reducir desde N_2 o NO_3^- hasta NH_3 (NH_4^+), por los microorganismos y plantas.

La ingesta y metabolismo de nitrato y nitrito ha adquirido interés debido a la sospecha que la formación de nitrito en saliva estaría involucrada en la carcinogénesis de nitrosaminas en el ambiente ácido del estómago [173].

Como se sabe estos compuestos nitrogenados tienen una química compleja, ya que intervienen en muchas reacciones, pudiendo también interconvertirse. Ambos son muy estables por lo cual han sido, en especial el nitrito, los más usados como medida de la presencia de sus precursores y productos en saliva [174]; son altamente solubles en agua y con muy pocas excepciones forman sales con casi todos los cationes [175].

3.2. Nitrato (NO_3^-)

3.2.1. Origen

Los nitratos y nitritos se usan como aditivos alimenticios para preservar el color y la textura de carnes y quesos entre otros productos [176]. Las concentraciones en el agua de bebida son

generalmente <10mg/L en ausencia de contaminación bacteriana [177]. Numerosos vegetales tales como la remolacha, el rabanito, el apio, y en especial los de hoja verde como algunos tipos de lechuga y espinaca presentan niveles altos de nitrato, los que se han ido incrementando en los últimos años debido principalmente al uso de fertilizantes a base de nitrato y a que éste también es un componente de la lluvia ácida [178]. Viinika [179] destaca el alto contenido de nitrato de carnes, pescados, melón, té negro y de hierbas, bebidas a base de malta y vinos.

3.2.2. Niveles normales

Las concentraciones informadas en adultos van de 200 a 600 μM pudiendo llegar 8mM luego de una alta ingesta (por ejemplo de jugo de remolachas) [180].

3.2.3. Metabolismo (gráfico 1)

La saliva contiene nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-). El nitrato proveniente de la sangre es excretado vía glándulas salivales a un promedio diario de aproximadamente 30 mg [108]. La cantidad de nitrato excretada depende directamente de la cantidad de nitrato ingerida [180, 181].

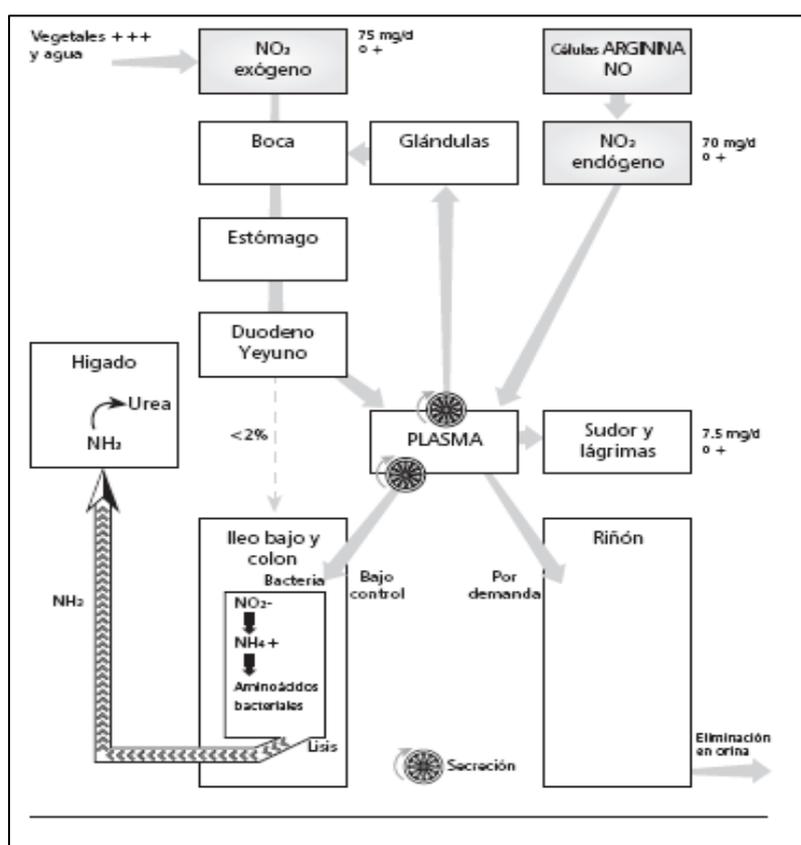


Gráfico 1: El metabolismo del nitrato en el hombre.

El nitrato es inicialmente absorbido en la porción superior del tracto digestivo [182, 183]. La absorción es rápida: entre 1 y 3 horas posteriores a la ingestión de nitrato en alimentos o bebidas, se observa el nivel pico en suero, saliva y orina según diversos investigadores. [180,182, 184,185]. Una

vez absorbido se distribuye rápidamente a las glándulas salivales y probablemente a otras glándulas exócrinas.

El incremento en la cantidad de nitrato secretado por las glándulas salivales está relacionado directamente con la cantidad de nitrato ingerido, si bien existen marcadas variaciones interindividuales y diurnas [180, 182, 186, 181, 187]. En promedio, el 25% del nitrato ingerido se excreta por saliva [187].

El transporte de nitrato a las glándulas salivales es mediado por sistemas “transportadores activos”. Edwards y col. (1954) mostraron una inhibición de la secreción salival de iodo activo por nitrato, tiocianato (SCN^-) y perclorato (ClO_4^-). Así, SCN^- , iodo y ClO_4^- pueden inhibir la secreción de nitrato en saliva [188]. Esto puede ser relevante para los fumadores quienes tienen niveles 3 o 4 veces más altos de SCN^- que los no fumadores [189]. Forman *et al.* (1985) encontraron niveles más bajos de nitrato en la saliva de fumadores en relación a las de no fumadores. Los niveles de nitrato salival fueron generalmente incrementándose con la edad [190]. Sin embargo, los mismos dependen en gran medida del aumento en la ingesta.

3.2.4. Riesgos para la salud

En condiciones comparables a las del estómago, la generación de nitrosaminas es notablemente mayor comparada con la que se produce en saliva [191]. Este hecho ha asociado altos niveles de ingesta de nitrato con la incidencia de cáncer gástrico [192, 193]. Sin embargo, se han publicado resultados epidemiológicos contradictorios [194] y es probable que no exista una correlación entre la ingesta total de nitrato y el cáncer gástrico. La mayoría de los nitratos dietarios provienen de vegetales, los cuales también son ricos en sustancias anticarcinogénicas (tales como el ácido ascórbico que inhibe las reacciones de nitrosación) por lo tanto sería más relevante la relación entre el contenido de nitrato y de vitamina C que el contenido de nitrato solo [195].

El nitrato no es carcinógeno *per se*, pero mientras la formación endógena no resulta significativamente tóxica, pueden potencialmente participar en la formación de compuestos nitrogenados [196].

Resulta importante distinguir entre los nitratos ingeridos con los alimentos o con el agua. Los vegetales son la fuente predominante de nitratos en la dieta humana y existen numerosos estudios que asocian la ingesta elevada de vegetales y la reducción en el riesgo de diversos tipos de cáncer, particularmente de estómago [197]. Parece ser que los potenciales efectos adversos del nitrato son contrabalanceados por el efecto protector de otros constituyentes presentes en los

vegetales tales como carotenos, vitamina C y E, ácido fólico, flavonoides e indoles. Forman (1991), revisando la relación exposición a nitrato y cáncer, llega a la conclusión de que la evidencia epidemiológica es metodológicamente poco consistente y no sugiere asociación positiva [198].

3.3. Nitrito (NO₂⁻)

3.3.1. Origen exógeno

Además del uso como conservantes alimenticios, también se encuentran en productos ahumados, bebidas alcohólicas, productos enlatados, caviar y particularmente en aquellos a base de pescados, carnes o hierbas [199].

3.3.2. Formación endógena

En la cavidad bucal, el nitrato es parcialmente (aproximadamente 20%) convertido a nitrito por la microflora oral [110,180, 200]. La presencia de bacterias y hongos como *Cándida albicans*, mediante sus procesos enzimáticos y con el pH favorable en el medio, reducen los nitratos a nitritos; dicha conversión ocurre principalmente en el tercio posterior del dorso lingual [109, 201]. La saliva recolectada directamente de los conductos de glándulas salivales contiene nitrato pero no nitrito. Sin embargo, la saliva recolectada en otras localizaciones de la cavidad bucal, también contiene nitrito [109, 110, 202]. Algunos estudios han indicado que la microflora oral juega un rol muy importante en la reducción de nitrato [182, 109, 110]. Se ha demostrado que la concentración de nitrito se incrementa después de la incubación de saliva a 37° C, pero no si la misma está estéril [109]. Se han identificado diversos microorganismos productores de nitrito en saliva humana: *Veillonella sp*, *Estafilococo dorado* y *Estafilococo epidermidis*, *Nocardia sp*, *Corinebacterium sp* y un organismo filamentosos, identificado probablemente como *Fusobacterium nucleaum* [110, 181]. La saliva humana posee actividad nitrito y nitrato reductasa [203] la cual probablemente sea de origen microbiano. El pH óptimo para la reducción es 6-6.4, no habiendo actividad más allá de pH 4 y 9 [108].

3.3.3. Niveles normales-Metabolismo

El nivel de nitrito salival es dependiente de los nitratos de la dieta, la circulación enterosalival de nitrato, incluyendo el flujo salival, el potencial redox y el pH en la cavidad bucal y el estómago, así como de la absorción de nitrato en el intestino delgado [204].

La relación nitrito/nitrato en saliva, después 1 a 2 hs de la ingesta de varias dosis de nitrato, se mantiene constante en un individuo, pero difiere notablemente entre individuos [182,184].

Stephany & Schuller, 1978 [186]; Spiegelhalder y col., 1976 [180]; Ishiwata y col., 1975 [109] encontraron que la concentración salival de nitrito estaba directamente relacionada al nitrato ingerido oralmente. Sin embargo, Tannenbaum y col. (1976) [181] sugieren que el proceso de reducción puede saturarse con altas ingestas de nitrato. La reducción oral es la fuente más importante de nitrito en humanos y en la mayoría de las especies [186]. Los factores que pueden influenciar a la flora microbiana bucal son, por ejemplo, el estado nutricional, infección, temperatura ambiente y edad. Los niveles salivales de nitrito (o nitrato), no difieren significativamente entre hombres y mujeres pero se ha visto un incremento en los niveles de ambos con la edad [190,205]. Al igual que en relación a los nitratos, Forman y col., 1985 encontraron que los niveles de nitrito salival fueron generalmente más altos en grupos de mayor edad si bien encuentran grandes variaciones interindividuales.

El rango de los niveles salivales de nitrito es relativamente amplio, estando los valores normales entre 30 y 210 μM [182, 206]. Spiegelhalder y col [180] estimaron en aproximadamente 97 μM el nivel promedio de nitrito salival, los cuales son más altos en personas con mala higiene bucal y pueden disminuirse mediante el uso de colutorios antimicrobianos [181].

Después de ingerir altas concentraciones de nitrato, por ejemplo en jugo de vegetales, los valores de nitrito salival aumentan notablemente, aproximadamente entre 20ppm/100mg de nitrato ingerido [180] y a una comida rica en nitrato, por ejemplo una ensalada de vegetales le sigue un pico de concentración de nitrito de hasta 1,77mM [191]. Dicho nivel se alcanza aproximadamente dos horas después de la finalización de la ingesta y es seguido por una caída en la concentración cercana a los valores observados en ayunas. Sin embargo, la concentración en saliva continua elevada por aproximadamente 21 h. La eliminación (clearance) de nitrato y consecuentemente la de nitrito, se calculó en 12 hs [181].

La conversión de nitrato a nitrito *in vivo* es compleja y los aspectos cuantitativos son difíciles de esclarecer debido a la síntesis endógena de ambos y la oxidación a nitrato de otros compuestos derivados del nitrógeno (ej amoníaco, hidroxilamina). Además, una vez que se forma el nitrito, tiene una vida media corta, siendo rápidamente oxidado a nitrato en la sangre.

3.3.5. Riesgos para la salud

La formación salival de nitrito está relacionada con la metahemoglobinemia infantil ya que éste participa en la oxidación de la hemoglobina (Hb), normalmente presente en la sangre, a metahemoglobina (MetaHb). El hierro ferroso Fe^{2+} del grupo hem es oxidado a hierro férrico (Fe^{3+})

y oxígeno y el nitrito se une más firmemente a este hem oxidado [207,208]. Durante el proceso de formación de MetaHb, el nitrato eventualmente se genera a partir del nitrito. Así, se inhibe el transporte de oxígeno sanguíneo a los tejidos y órganos. La tasa de formación de MetaHb varía considerablemente entre las distintas especies animales, pero a bajos niveles de exposición a nitrito, la formación de MetHb es reversible [209,210].

El nitrito también ha sido muy estudiado en relación a la carcinogénesis [211,212] y es un factor determinante muy importante en la nitrosación gástrica pudiendo contribuir en la etiología del cáncer de pulmón, estómago, esófago, cavidad nasal, vejiga y cavidad bucal, de leucemia y linfoma No Hodgkin [213, 214, 215]. Tienen acción mutagénica a nivel celular y actuarían sobre el gen p53, el cual está estrechamente relacionado con los carcinomas espinocelulares de cabeza y cuello [216, 217].

3.4. Nitrosaminas (figura 12)

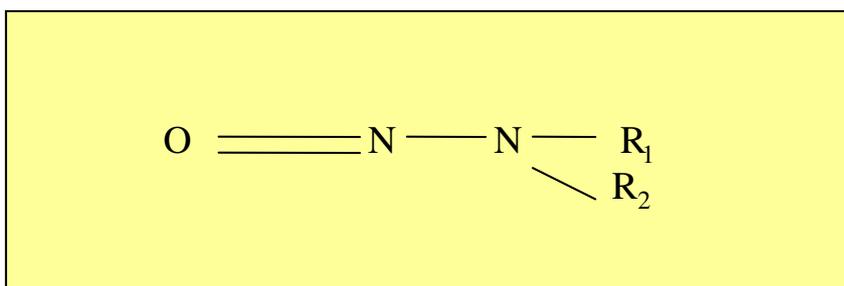


Figura 12: fórmula de nitrosaminas.
R₁ y R₂= residuos orgánicos.

3.4.1. Origen

El riesgo potencial de la presencia de nitritos en saliva es la reacción con amino compuestos nitrosables para producir N-nitroso compuestos carcinogénicos, tales como nitrosaminas [110]. Aminas, amidas y guanidinas están ampliamente dispersas en el ambiente, los barros de las plantas de tratamiento de líquidos cloacales son ricos en nitrosaminas. La fuente endógena está constituida por la ingesta y formación de precursores: nitrito, NO_x (óxidos de nitrógeno) y nitrito a partir de nitrato respectivamente. La exposición exógena involucra a productos relacionados al estilo de vida: tabaco, cosméticos, algunos alimentos, ahumados, y bebidas, en especial la cerveza y ocupacionales: industrias de cueros, gomas, química y metalúrgica, minería, producción de pesticidas, detergentes y fábricas de productos derivados del pescado [218].

3.4.2. Metabolismo (figura 13)

La reacción de nitrito con aminas secundarias depende en gran medida de su condición básica. Así, la formación de nitrosaminas con pK 5,57 (por ej piperacina) es mucho más rápida que con piperidina (pK 11,2 más básico) bajo condiciones comparables y pH óptimo [219]. Sin embargo, en experimentos *in vitro* en los cuales se agregaron aminas secundarias a saliva normal humana, la tasa de formación (nitrosación) fue más dependiente del largo de las cadenas alquilo de las aminas, que de la condición básica de la misma [220]. Se han hecho numerosos intentos en determinar la formación de nitrosaminas en la saliva humana. Rao y McLennon [221] y Rao [222] demostraron que la piperacina, que contiene grupos amino secundarios, produce N-nitrosopiperacina cuando reacciona con nitrito en saliva humana. Usando morfolina como compuesto nitrogenado nitrosable, Tannenbaum y col [220] observaron la formación de N-nitrosomorfolina en saliva también a pH neutro, si bien la acidificación de la saliva incrementó notablemente la formación de nitrosaminas. Sin embargo, cuando las muestras fueron analizadas una hora después de ingerir nitrato (cuatro veces la dosis máxima recomendada por la OMS, 50 mg NO₃ /L), solamente en 6 muestras de 180 salivas se encontraron nitrosaminas. Dicho experimento fue realizado a pH neutro y se sabe que en esas condiciones se inhibe el crecimiento de muchos microorganismos que son necesarios para la síntesis de N-nitroso compuestos. Por lo anteriormente expuesto, resulta evidente que en la saliva a pH neutro, no hay una significativa formación de nitrosaminas pero éstas, pueden aumentar en gran medida si el pH baja o cuando la saliva pasa al estómago donde el pH es más favorable para la nitrosación. En realidad, en condiciones comparables a las del estómago, la generación de nitrosaminas es notablemente mayor comparada con la que se produce en saliva [191].

Los compuestos polifenólicos y el ácido ascórbico presentes en el té chino pueden inhibir la N-nitrosación. Sin embargo, Leaf y col. (1987) [223] demostraron en un estudio que la inhibición de la N-nitrosoprolina no fue completa con ácido ascórbico. Shi TS y col en 1994 [224], estudiaron los efectos inhibitorios *in vitro* del té verde y té negro descafeinado sobre la oxidación y metilación del ADN por NNK, encontrando que dicho efecto probablemente se debe a los flavonoides presentes en dichas infusiones [225].

3.4.3. Riesgos para la salud

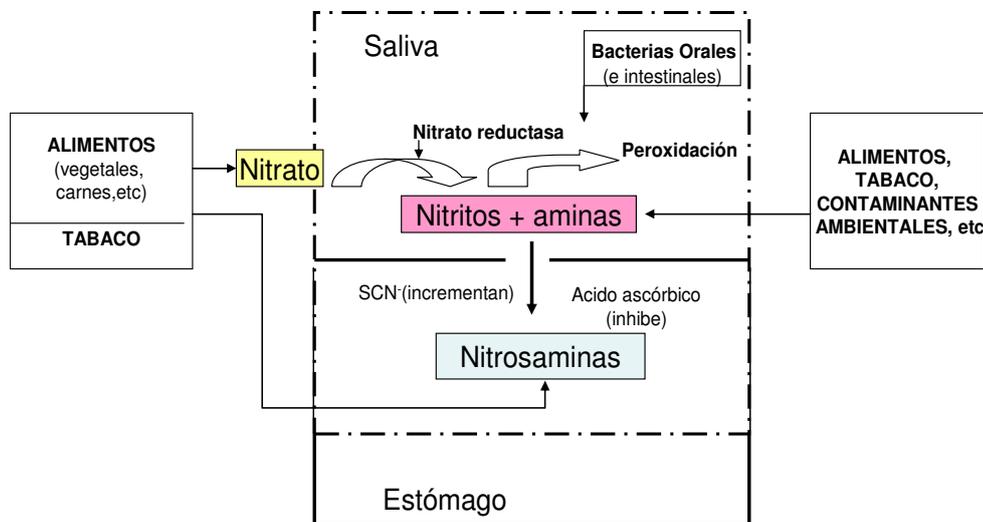
Existen numerosos estudios de experimentación en animales [226,227] relacionados a la carcinogenicidad de nitrosaminas, que pueden resumirse de la siguiente manera:

-Más de 300 diferentes compuestos nitrogenados han sido analizados y aproximadamente el 90% de ellos mostró actividad carcinogénica.

- Tienen especificidad (de efectos carcinogénicos) en determinados órganos, llamados efectos organotrópicos, que están relacionados a la estructura química del compuesto respectivo, además de la especie animal usada, el modo de aplicación, dosis y duración de la exposición.
- Sitios predominantes: cerebro y sistema nervioso central, cavidad bucal, esófago, estómago, intestino, tráquea, pulmón, hígado, riñón, vejiga, páncreas, sistema hematopoyético, corazón y piel.
- Los N-nitroso compuestos son carcinógenos activos en 39 especies animales diferentes.
- La dosis necesaria para inducir el tumor es muy baja (1mg/kg de peso corporal).

Existe también la evidencia desde la epidemiología que los N-nitroso compuestos inducen cáncer en humanos [228, 229], lo cual es previsible a partir de los datos provenientes de estudios en animales, pero salvo en situaciones de exposición muy específicas, es difícil arribar a conclusiones definitivas y se requiere de mayor profundización en el tema.

Figura 13: Esquema propuesto para la formación de nitrosaminas en saliva y/o estómago [212].



3.5. OxidoNítrico (NO)

Oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS)

El óxido nítrico (NO) es una especie inestable que está compuesto por un átomo de N y uno de O y fácilmente se transforma en nitrito (NO_2^-) o nitrato (NO_3^-) en tejidos infectados o inflamados,

puediendo contribuir al proceso de carcinogénesis a través de la generación de nitrosaminas. A pesar de su pequeño tamaño, está involucrado en un amplio repertorio de acciones biológicas, muchas de las cuales aun no están completamente entendidas. La molécula, pasa a través de la membrana celular e influye a enzimas y proteínas en el citoplasma y núcleo.

El NO forma un radical libre altamente reactivo con un electrón desapareado que actúa en la defensa del huésped contra una variedad de patógenos [230] y además activa sistemas que regulan la transcripción de proteínas proinflamatorias tales como las citoquinas [231]. Dicha molécula es sintetizada por la óxido nítrico sintetasa (ONS) usando l-arginina y oxígeno como sustrato. Existen tres isoformas de ONS que se transcriben a partir de tres genes separados y requieren de cofactores para activarse. Cada monómero contiene un sitio con dominio reductasa y oxigenasa. La calmodulina, el NADF (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), el FAD (flavina adenina dinucleótido) y flavina mononucleótido (FMN) son los factores que se requieren para el dominio reductasa (figura 14) Los electrones a partir de este sitio son transferidos al dominio oxigenasa del monómero adyacente; allí la tetrahidrobiopterina actúa como cofactor (BH_4), donde es catalizada la reacción entre O_2 y la l-arginina, dando como resultado la formación de NO y citrulina [232].

Dos isoformas (endotelial o eNOS y neuronal o nNOS) son constitutivamente expresadas y son dependientes de la concentración de calcio y calmodulina. En el sistema vascular, el NO producido por eNOS es un potente vasodilatador y regulador del tono vascular en respuesta al estrés. Un tercer gen (NOS2), produce una isoforma inducible iNOS que es primariamente expresada en células inmunes, en especial en macrófagos y células derivadas de ellos. La iNOS es expresada en respuesta a estímulos inflamatorios que están bien caracterizados en células murinas. Entre dichos estímulos se cuentan citoquinas, lipopolisacáridos, interleuquina-6(IL6), interferón- γ , IL1 β y factor de necrosis tumoral- α (FNT- α), además de algunas drogas como el taxol y cisplatino[233]. También se expresan constantemente a lo largo del epitelio de las vías respiratorias, en la capa de queratinocitos basales de la piel normal [232] (defensa contra patógenos) y en conductos salivales normales [234] donde su rol se desconoce.

En tejidos normales se expresa fuertemente en miocitos, músculo esquelético y células purkinje [235]. La iNOS produce mayores cantidades de NO que las isoformas expresadas constitutivamente. En ambientes con baja cantidad de arginina, la iNOS no puede transferir nitrógeno al oxígeno molecular y los electrones se combinan con oxígeno para producir O_2^- (superóxido) [236].

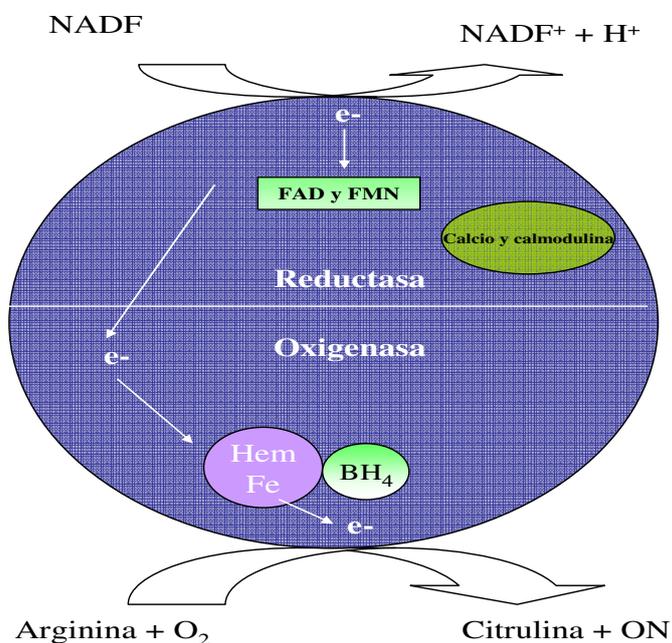


Figura 14: Síntesis de NO a partir de arginina, mediante iNOS y cofactores.

El NO combinado con O_2^- forma peroxinitrito ($ONOO^-$), una molécula más reactiva y tóxica que el NO por sí mismo. El NO tiene el potencial de inducir efectos fisiológicos y patológicos según el ambiente circundante (figura 15). Después de ser sintetizado por la iNOS, eNOS o nNOS, el NO difunde libremente a través de la membrana, formando un gradiente de concentración. En dicho ambiente también existe un gradiente redox formado por la presencia de especies acopladas oxido-reductoras. El estado redox determina si el NO va a formar intermediarios reactivos de nitrógeno (IRN) con efectos benéficos o patológicos [227].

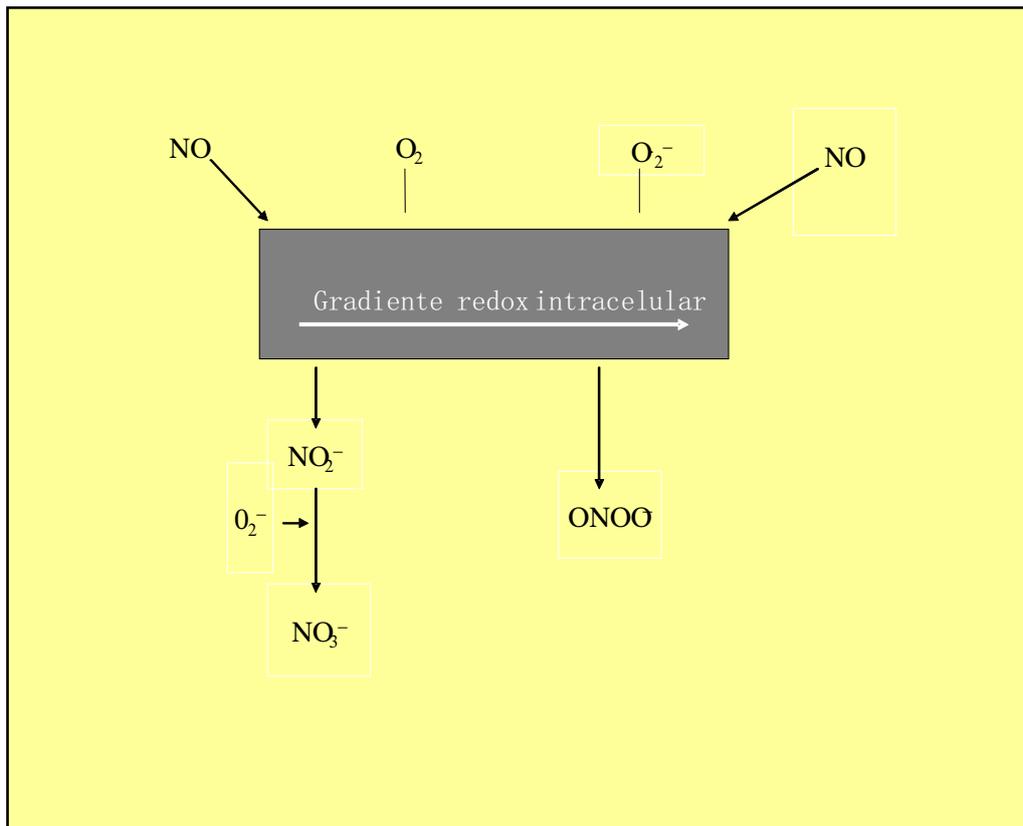


Figura 15: El microambiente celular cambia el destino del óxido nítrico (NO).

3.5.1 Óxido nítrico en enfermedades de la cavidad bucal:

La síntesis de NO se incrementa en la **enfermedad periodontal**, como resultado de la infiltración de macrófagos en los tejidos periodontales [237]. Es probable que la placa bacteriana sea responsable de la activación de la iNOS, ya que ésta no se encuentra en tejidos periodontales de animales estériles [238]. Además, los fibroblastos periodontales en la periodontitis crónica tienen expresión más alta de iNOS que los tejidos gingivales sanos [239]. Es posible que esta inducción ocurra en respuesta a lipopolisacáridos bacterianos o a las citoquinas que se forman en la enfermedad periodontal. Si bien el NO puede ser producido para eliminar bacterias, es probable que, como en el cáncer bucal, la concentración producida pueda dañar al huésped. El NO también ha sido implicado en la patogénesis de la infección apical [240].

Hay pocos estudios que investigan el rol del NO en las enfermedades de la mucosa oral [241-243]. Si bien el liquen plano bucal (LPB) es una enfermedad inflamatoria crónica, algunos autores no encontraron actividad de iNOS a pesar de la cantidad abundante de macrófagos CD68

positivos [241]. La inflamación crónica que induce a la iNOS puede producir suficiente cantidad de NO y productos relacionados para iniciar la carcinogénesis [244-246]. Sin embargo, debido a que estos autores encuentran poca o nula actividad de iNOS en el LPB, es improbable que NO pueda tener un rol en la transformación del LPB en cáncer. En contraposición a estos estudios, Ohashi y col, [242] encontraron que el nitrito salival (implicando que el NO había sido producido) estuvo significativamente incrementado en pacientes con LPB comparado con controles sanos. No es posible especular si la producción salival del NO tiene un efecto nocivo sobre la mucosa oral y puede ser responsable, en parte, del desarrollo del LPB. En pacientes con aftas, los mismos autores encontraron incremento del nitrito salival. Si bien el rol del NO salival en la fisiología de la mucosa oral aun se desconoce, los hallazgos sugieren que el excesivo NO salival tiene un rol potencial en la modificación de la misma.

3.5.2. Óxido nítrico en relación a la Inflamación y al Cáncer

Como parte de su función normal de defensa, los granulocitos secretan radicales químicos reactivos y mediadores electrofílicos. De esta manera, la inflamación expone al epitelio y estroma celular cercanos, a sustancias con potencial mutagénico [247,248]. Los granulocitos y linfocitos, generan por lo menos cuatro tipos de productos que son genotóxicos o mutagénicos, entre los que se encuentra el NO [250].

La participación del NO en la carcinogénesis puede explicarse desde diversos mecanismos, tales como daño al ADN, y participación en la formación de nitrosaminas. Para esta última existiría un mecanismo de tres pasos, y estaría mediado por macrófagos activados: primer paso el NO es generado a partir de l-arginina por la NOS, luego el NO se oxida y forma NO_2^- , enzimática o químicamente; por último el NO_2^- generado está en equilibrio con potentes agentes nitrosantes (N_2O_3 y N_2O_4) que a pH neutro, con aminas, formarán nitrosaminas [251].

Además, existen antecedentes bibliográficos que sugieren que el NO promovería la carcinogénesis por inactivación del gen supresor de tumor p53 [252] además de permitir el crecimiento del tumor, la angiogénesis y favorecer las metástasis [253] y que la concentración de NO encontrada en cánceres humanos probablemente sea insuficiente para producir muerte celular o apoptosis [248,252].

En cuanto a la actividad de la iNOS, existen numerosos trabajos que demuestran su incremento en displasias epiteliales bucales, fibrosis de la submucosa, en la hiperplasia verrugosa [254] y aun en los carcinomas a células escamosas de cabeza y cuello [255]. Chen y col (2000)

estudiaron la presencia, caracterización y localización celular de iNOS en la bolsa del hámster induciendo la carcinogénesis con DMBA y encontraron inmunoreactividad en especial en los queratinocitos de las bolsas tratadas. Esto sugiere que una alta actividad de iNOS puede estar ligada a la carcinogénesis y sería el primer estudio en boca, si bien hay trabajos previos en cáncer de cabeza y cuello, pulmón, colon y próstata [256]. Brennan y col [254] y Bentz y col [243] demostraron que la expresión y actividad de la iNOS está incrementada en adenomas de glándulas salivales benignos (pleomorfo) y malignos (adenocarcinoma) [253,254] así como en CCE bucal. También, los estudios efectuados por Gallo y col [257] aportan datos fehacientes acerca del rol de la iNOS que genera NO en la angiogénesis y metástasis en el carcinoma a células escamosas de cabeza y cuello (CCECC). Otros autores sugieren que la iNOS puede jugar un rol importante en la transformación de la displasia epitelial a carcinoma invasivo [258]. Bentz y col [243], basaron su investigación en el rol del NO en la carcinogénesis de cabeza y cuello, indicaron que el CCE ofrece una oportunidad única para estudiar el rol del NO en la inducción y desarrollo del cáncer.

La concepción del NO en relación al cáncer introdujo una gran controversia debido a su carácter dual. Se conoce que dicha molécula puede tener efectos promotores e inhibidores del tumor los cuales van a depender de la concentración local del mismo. La regulación del crecimiento tumoral del NO por sí mismo o por un inhibidor de su producción parece ser de beneficioso efecto terapéutico en el tratamiento del cáncer. Serán necesarios estudios en el futuro para clarificar la utilidad del NO en este campo.

Según la revisión del tema, no existen suficientes antecedentes que correlacionen a los carcinomas bucales, con los valores de compuestos nitrogenados en la saliva y en el tejido y otras variables como el índice de placa, de tártaro, candidiasis, consumo de tabaco y alcohol.

Objetivo general

Estudiar la concentración de nitritos en la saliva y en la mucosa bucal de pacientes con cáncer bucal y relacionarla con la presencia de diferentes factores carcinogénicos.

Objetivos Específicos

- 1- Estudiar la concentración de nitritos salivales en pacientes con carcinomas bucales y relacionarla con la de un grupo control.
- 2- Relacionar el contenido de nitritos salivales con diversos factores como la sepsis bucal, la cantidad aproximada de tabaco y alcohol consumidos y la presencia o no de candidiasis bucal.
- 3- Dosar el contenido de nitritos en la mucosa bucal de pacientes con neoplasias malignas orales.
- 4- Dosar el contenido de nitritos en la mucosa bucal de pacientes con lesiones hiperplásicas simples que requieran tratamiento quirúrgico los cuales serán considerados como grupo control.
- 5- Relacionar los valores de nitritos en saliva con los obtenidos en el tejido bucal.
- 6- Analizar las tasas de mortalidad por cáncer bucal en la provincia de Córdoba (período 1975-2000).

CAPÍTULO II: Compuestos nitrogenados en saliva.

En relación al dosaje de **compuestos nitrogenados** en saliva se puede dividir el trabajo en dos etapas:

- **A:** En primer lugar se efectuó el ajuste de condiciones pre analíticas para la determinación de dichos compuestos en saliva, en un grupo de voluntarios sanos (n=9).
- **B:** con posterioridad y en base a los resultados de la etapa anterior, se dosaron los nitratos y nitritos en saliva en un grupo de pacientes con cáncer (n=18) y en un grupo control (n=11).

Etapa A

Búsqueda de condiciones adecuadas de recolección y procesado

A pesar de los numerosos trabajos que se han publicado en relación a la determinación de nitrato y nitrito en saliva, las técnicas usadas en el muestreo y almacenamiento varían según los diferentes autores. Con el objeto de obtener las condiciones pre analíticas más convenientes, se planificó un estudio considerando las diferentes variables.

Material y métodos

Para analizar el efecto de las condiciones de almacenamiento, se incluyeron 9 personas sanas, 7 de sexo femenino y 2 de sexo masculino, rango de edad 26 a 53 años. Se excluyeron a las embarazadas, fumadores, con alta ingesta de alcohol, que hubieran consumido suplementos vitamínicos, antibióticos y antiinflamatorios en los últimos 15 días. Todos fueron informados de las razones del estudio. Fueron instruidos acerca de no ingerir alimentos con alto contenido de nitrato y nitrito durante las 24 horas antes y ningún tipo de alimento las 8 horas previas a la recolección; se les permitió cepillarse los dientes.

Recolección de saliva: a las 8:30h, 3 mL de saliva total no estimulada, directamente en tubos plásticos estériles que contenían 0,06 mL de una solución 1 M de Na OH. Se agregaron 3mL de ZnSO₄ 0,15 M y se llevó a centrifuga durante 15 minutos a 9000 rpm [259]. El sobrenadante se usó para la determinación de nitrato y nitrito. La muestra de cada voluntario fue dividida en 8 alícuotas; una fue inmediatamente procesada y 4 durante las cuatro horas siguientes (tabla 1); las restantes tres fueron colocadas en freezer a -37°C y procesadas luego de

7, 15 y 30 días (condiciones 1 a 5).

Tabla 1. Condiciones de almacenamiento de las muestras antes del análisis

Muestra	Condición	Almacenamiento	Procesado
8:30 hs	Uno	No	inmediato
	Dos	Temperatura ambiente	2 hs
	Tres	4 °C	2 hs
	Cuatro	Temperatura ambiente	4 hs
	Cinco	4 °C	4 hs
	Seis	Freezer -37 °C	7 días
	Siete	Freezer -37 °C	14 días
	Ocho	Freezer -37 °C	30 días

La dependencia de la concentración de nitrito y nitrato con la hora de recolección fue evaluada en muestras obtenidas de 5 voluntarios a las 8:30, 10:30 y 12:30h, los individuos permanecieron en ayunas hasta la finalización de la recolección; las muestras fueron procesadas inmediatamente.

Para evaluar la variación individual, el nitrito salival fue determinado 3 meses consecutivos, agosto, setiembre y octubre, en la saliva de cuatro voluntarios. Las muestras fueron procesadas inmediatamente de ser recolectadas.

La concentración de nitrito fue determinada mediante el método colorimétrico de Griess, la absorbancia se midió en un espectrofotómetro Shimadzu. El nitrato fue analizado luego de la reducción a nitrito en una columna de Cu / Cd [260] en un sistema de inyección en flujo (FIA) usando una bomba peristáltica Gilson.

Para evaluar los efectos de la temperatura y el tiempo después de la recolección, se procesó la muestra en forma inmediata a 2 y 4 horas mantenida a temperatura ambiente y en heladera (4°C), ver tabla 1. Para el análisis estadístico se aplicó el ANOVA de una y dos vías; los sujetos fueron considerados como bloque, desde el punto de vista estadístico, a fin de reducir el efecto de las diferencias biológicas entre ellos. Como la muestra es muy pequeña (n=5), para analizar el efecto del tiempo y día de recolección, se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon y de correlación de Spearman. Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat/Professional version 1.1 (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba) statistical software

package.

Resultados

La media salival obtenida en este estudio fue: nitrato 749 μM rango: 108-1582 y de nitrito 98 μM (rango 46-173).

Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la concentración de nitrito

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en la saliva recolectada de 9 pacientes a las 8:30h y procesadas de acuerdo a las condiciones establecidas en la tabla 1.

El ANOVA de dos vías, usado para evaluar las condiciones del almacenamiento de la muestra durante las primeras 4 horas, indicó cambios significativos en la concentración de nitrito después de 2 horas de la recolección, tanto a 4°C como a temperatura ambiente ($p < 0,05$). Puede observarse también en dicha tabla que la variabilidad es muy dependiente de los sujetos.

Para evaluar los efectos de varios días de almacenamiento en las tres restantes alícuotas mantenidas en freezer a -37°C; el análisis fue repetido a los 7, 15 y 30 días y el resultado fue comparado con la muestra procesada inmediatamente. Hasta el día 7, los valores de nitrito fueron prácticamente constantes, y a partir de allí se notó una disminución estadísticamente significativa. También se encontró gran variabilidad en la concentración de nitrato cuando se evaluó el tiempo de almacenamiento.

Tabla 2: Concentraciones de NO_2^- en μM obtenidas a las 8:30h (n=9). Valores según diferentes momentos de procesado y tipo almacenamiento.

Sujeto	Procesado inmediato Condición un Media \pm DS	2h 4°C Condición de Media \pm DS	2h Temp. ambiente Condición Tres Media \pm DS	4h 4°C Condition cuatr Media \pm DS	4h Temp. ambiente Condition cinc Media \pm DS
1	58 \pm 3	47 \pm 2	37 \pm 9	41 \pm 1	50 \pm 3
2	93 \pm 3	87 \pm 5	88 \pm 2	139 \pm 2	98 \pm 5
3	100 \pm 5	60 \pm 3	68 \pm 4	62 \pm 5	73 \pm 6
4	79 \pm 5	84 \pm 9	86 \pm 1	134 \pm 8	87 \pm 4
5	93 \pm 5	121 \pm 5	99 \pm 4	194 \pm 8	137 \pm 1
6	444 \pm 5	647 \pm 3	569 \pm 9	813 \pm 5	554 \pm 2
7	87 \pm 2	98 \pm 6	76 \pm 1	167 \pm 6	101 \pm 6
8	198 \pm 5	155 \pm 7	144 \pm 2	185 \pm 1	187 \pm 1
9	118 \pm 6	65 \pm 4	78 \pm 1	51 \pm 4	73 \pm 4

Efecto del horario de recolección

Para estimar la variación de los valores según la hora de recolección, se obtuvo saliva de 5 voluntarios a las 8:30, 10:30 y 12:30hs y se midió inmediatamente la concentración de nitrato y nitrito. Los valores más altos de nitrito salival se obtuvieron a las 8:30 y el test de Wilcoxon indicó que fueron estadísticamente diferentes de aquellas salivas recolectadas 2 o 4 horas después (fig. 1).

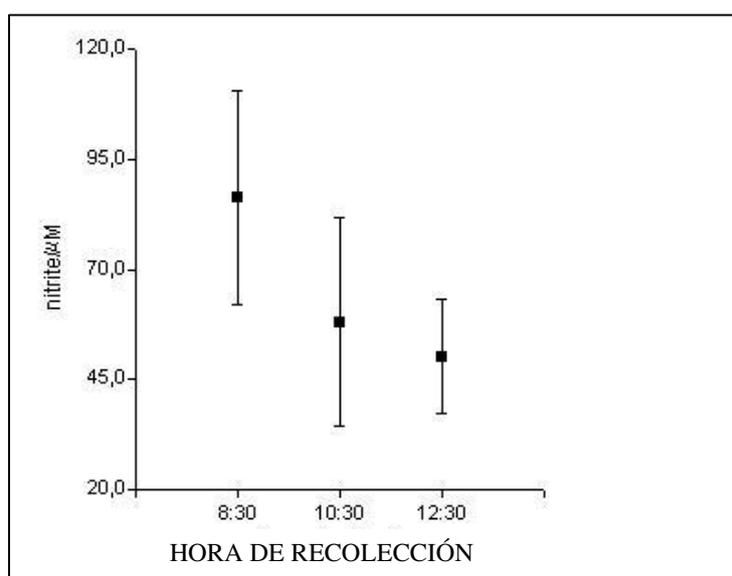


Figura 1: Concentraciones promedio de nitrito salival en los tres horarios de recolección.

Los valores de nitrato también disminuyeron y el test de Spearman mostró correlación con los valores de nitrito. La relación nitrato/nitrito fue medida en los 3 momentos de recolección y la conducta fue similar en todos los voluntarios como lo muestra la fig 2.

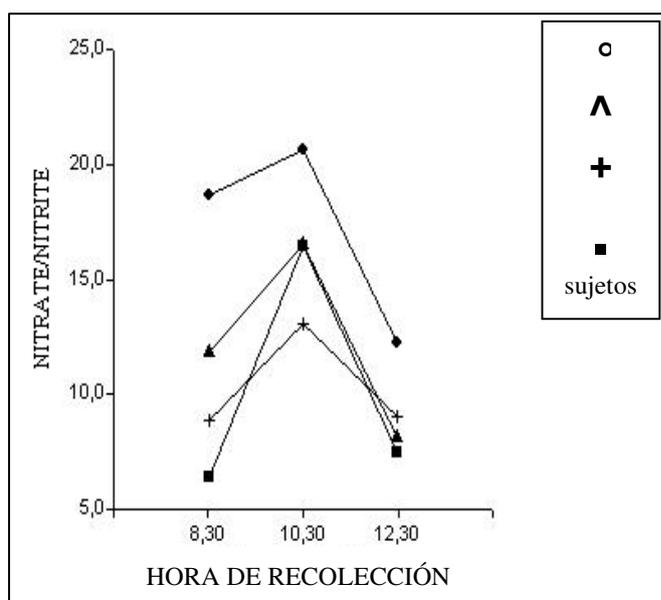


Figura 2: Relación nitrato/nitrito en los tres momentos de recolección (los símbolos representan a los sujetos).

Efecto del día de recolección

El experimento se efectuó con el fin de analizar diferencias intra-individuales. Los valores de nitrito salival medidos mensualmente en la saliva de cuatro voluntarios en tres días diferentes, no mostraron diferencias significativas como lo indicó el test de Wilcoxon (figura 3).

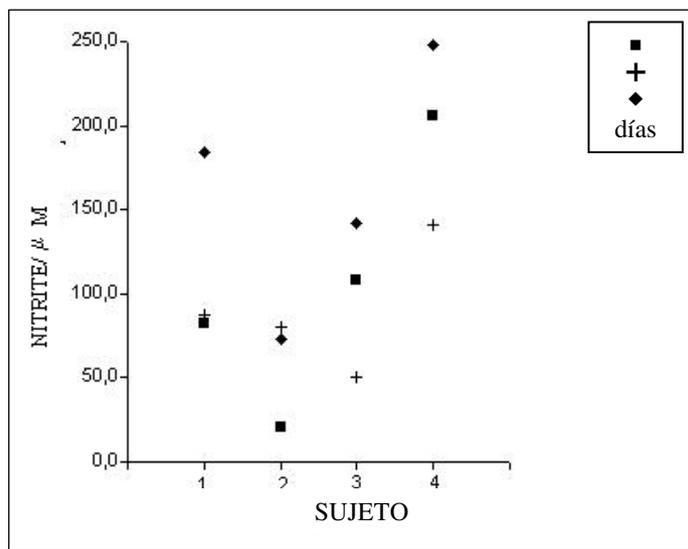


Figura 3: Valores de nitrito en tres días diferentes de recolección (n=4), representados por los diferentes símbolos.

Discusión

La determinación de nitrito en saliva es relevante debida a su contribución en la formación de nitrosaminas, muchas de las cuales son carcinogénicas. Los cánceres inducidos por N-nitroso compuestos formados en el estómago pueden ser prevenidos por reducción de los niveles de nitrito salival de acuerdo a lo citado por diversos estudios; dicho objetivo podría lograrse reduciendo la ingesta de nitrato en la dieta y agua de bebida, mejorando la higiene dental y usando colutorios antisépticos y pastas dentales [261-263]. Ellis y col indican que un inadecuado almacenamiento de la muestra de saliva y la contaminación bacteriana pueden incrementar los nitritos [174]. Las variables técnicas usadas para el muestreo y almacenamiento varían en las diferentes publicaciones; Xu y col [264], y Bojić y col [204] colocan las muestras a -20°C durante una semana y un mes hasta el análisis respectivamente. Por otro lado Mirvish y col [173] y Yu y col [265] consideran que la saliva debe colocarse a temperatura ambiente o a 4°C si va a procesarse durante el día y a -15°C durante menos de un mes hasta el análisis. Como puede observarse, las diferencias en las condiciones de almacenamiento encontradas en la literatura, son muy grandes.

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, se demuestra una gran influencia de las condiciones de almacenamiento en los valores de nitrato y nitrito salival. Sin embargo la

concentración promedio de nitrato salival fue 749 μM , y la de nitrito 98 μM , son valores similares a los encontrados en la literatura [260, 266]. Se observó que a mayor tiempo de almacenamiento, la variabilidad de los resultados aumenta y que este hecho es marcadamente dependiente de los sujetos (tabla 2). A pesar de la gran dispersión de los valores con las diferentes condiciones de almacenamiento, una importante observación de este estudio fue el valor constante de cada sujeto en los diferentes días de muestreo (figura 3).

Otro resultado importante se encontró cuando se analizó el horario de recolección; Phizackerley y Al-Dabbagh [267] encuentran variación en el contenido de nitrito y nitrato salival durante el curso del día: el contenido de nitrato en la saliva fresca disminuye rápidamente y el nitrito primero se incrementa y luego disminuye hasta valores cercanos a cero

en un período de alrededor de 2hs. Nuestros resultados, como se muestra en la figura 1, indican que los valores de nitrito salival obtenidos a las 8:30h, fueron más altos que aquellos recolectados dos o cuatro horas más tarde y la misma tendencia se observó en los valores de nitrato. El comportamiento del radio nitrato/nitrito fue similar en todos los sujetos. Es importante destacar la correlación observada entre las concentraciones de nitrato y nitrito con la hora de recolección, como se puede ver en la figura 2.

Este resultado es muy interesante y significa que las variaciones intraindividuales son más bajas que las debidas al almacenamiento, las cuales pueden deberse a la particular química de los compuestos nitrogenados y/o a la naturaleza compleja de la saliva.

Conclusiones

- La hora de recolección de la muestra debe ser la misma en todos los pacientes.
- Las muestras deben ser analizadas inmediatamente.
- Bajo condiciones pre analíticas similares, cada voluntario sano mantiene valores constantes de nitrito salival.

La saliva es una matriz que ofrece interesantes posibilidades para estudios de investigación con fines básicos o clínicos; es fácil de recolectar, y en relación a compuestos nitrogenados, nitritos y nitratos son fáciles de determinar. En este trabajo observamos que controlando algunos parámetros analíticos y de recolección, muestreo y almacenamiento, se puede mejorar la reproducibilidad de los resultados para lograr informaciones clínicas valederas.

Etapa B

Determinación de nitrato y nitrito en saliva de un grupo de pacientes con cáncer y en el grupo control.

Material y métodos

La incorporación de pacientes se llevó a cabo en la Cátedra de Clínica Estomatológica B, de la Facultad de Odontología de la UNC. Se seleccionaron aquellos, de demanda espontánea o derivados, con diagnóstico presuntivo de Carcinoma a Células Escamosas (CA), que luego fuera confirmado histopatológicamente y que no estuvieran bajo tratamiento oncológico, estos pacientes constituyeron el Grupo de Estudio. Además, se incluyeron aquellos con lesiones hiperplásicas que requerían extirpación quirúrgica, quienes fueron considerados como Grupo Control (C).

Criterios de exclusión: se excluyeron aquellos pacientes con alta ingesta de alcohol, consumo de suplementos vitamínicos, embarazo, toma de antibióticos y antiinflamatorios. Aquellos bajo tratamiento oncológico.

Fueron citados a las 8:30hs, en ayunas e instruidos acerca de no ingerir alimentos con alto contenido de nitrato y nitrito durante las 24 horas antes y ningún tipo de alimento las 8 horas previas de la recolección. Les fue permitido cepillarse los dientes y se contraindicó el uso de pasta dental y de colutorios.

a) Historia clínica:

A cada paciente se le completó un protocolo, donde, además de los datos filiatorios, se consignaron datos referidos a:

***índice de cálculo** de Björby y Løe [268], fueron categorizados: índices 0 y 1 fueron considerados “poca cálculo” y 2 y 3 “mucho cálculo”.

***caries** índice CPOD [269].

***candidiasis:** diagnóstico clínico con presencia de lesión en por lo menos dos localizaciones y confirmación mediante estudio micológico [270].

***tabaco:** se calculó la cantidad aproximada de cigarrillos fumados durante su vida: multiplicando el número de cigarrillos por año, por número de años, según el método utilizado por

Lanfranchi y col. [271]. Luego fueron categorizados de acuerdo a si habían fumado:

-poco < de 100 mil cigarrillos, moderado entre 100 y 200 mil, en exceso: > 200 mil.

***alcohol** se calculó la cantidad aproximada en gramos consumida durante su vida, se determinó según el método propuesto por Rogers MA y col. del Dpto. de Medicina Preventiva, de la Universidad de Nueva York [272].

Vino 80 g/L (1 vaso: 250ml)

Cerveza 44g/L

Bebida blanca promedio 500 g/L

Alcohol puro 960 g/L

También fueron categorizados según el consumo aproximado de alcohol en 15 años:

-poco <100 mil g; moderado, 100 a 450 mil g; en exceso > 450 mil g.

***hábitos dietéticos:** se interrogó mediante una encuesta recordatoria alimenticia, sobre la frecuencia de ingesta de un listado de alimentos con alto contenido de nitratos, nitritos y nitrosaminas y con aquellos alimentos que se sabe ejercen actividad protectora ante los compuestos nitrogenados, como la vitamina A, C, las fibras, etc. También se consideró lo ingerido **48 horas previas** a la recolección de la muestra. La cantidad estimada de alimentos fue determinada según la National Academy Press de Washington DC [273], y mediante una tabla

de pesos y medidas aproximadas de los alimentos, de la Escuela de Nutrición de la UNC [274]. Para el análisis estadístico se consideró 0: si había ingerido menos de 3 alimentos con alto contenido de nitrato y 1: si había ingerido más de 3, en las últimas 48 horas.

***consentimiento informado:** todos los pacientes fueron informados de las razones del estudio, de los pasos a seguir y firmaron su conformidad.

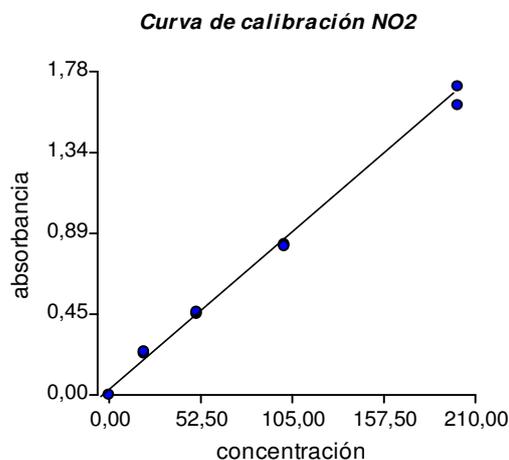
b) Recolección de las muestras de saliva: a las 8:30hs se obtuvieron 3mL de saliva total no estimulada, directamente en tubos plásticos estériles que contenían 0,06mL de una solución 1M de hidróxido de sodio (NaOH) para evitar el desarrollo bacteriano. Las muestras fueron inmediatamente procesadas. Se agregaron 3mL de 0,15 M de ZnSO₄ (sulfato de zinc) 50:50 v/v a 4°C y se llevaron a centrifugar durante 15 minutos a 9000g [259]. El sobrenadante se usó para la determinación de nitrato y nitrito.

c) Deteminación de nitrito:

-Método espectrofotométrico: La concentración de nitrito fue determinada mediante el método colorimétrico de Griess [275] (fig. 1). Se consideró “nivel bajo de nitrito” cuando la concentración obtenida fue menor a 100 μM . Este método espectrofotométrico consiste en la formación de un azocromóforo coloreado entre una amina aromática y el nitrito contenido en la saliva, cuya absorbancia máxima ocurre a 540nm, la absorbancia se midió en un espectrofotómetro Shimadzu. El nitrato fue analizado luego de la reducción a nitrito en una columna de Cu/ Cd [260] en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) usando una bomba peristáltica Gilson.

Se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras independientes y el análisis de regresión logística multivariado. Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat/Professional version 1.1 (Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Nacional de Córdoba) statistical software package. La concentración determinada corresponde a la suma de nitrato y nitrito existente en saliva.

Gráfico 1: Curva de calibración de nitrito.



La determinación de NO_2^- se realizó mediante el método de Griess, mientras que para determinar NO_3^- fue necesario reducirlo previamente a nitrito.

-Método electroquímico (EQ): Se basa en medir la **corriente de reducción** de un compuesto generado mediante la reacción esquematizada en la Figura 1. Las mediciones se realizaron mediante cronoamperometría, en “Batch”.

El compuesto (B) formado por nitración de trihidroxibenceno (A) con los nitritos presentes en la saliva es reducido sobre un electrodo de carbono vítreo (figura 2A). La corriente de reducción es proporcional a la concentración de NO_2^- (Figura 2B).

Para hacer las determinaciones se usó el método de adiciones de estándar [276].

Figura 1: Esquema de la reacción de nitración

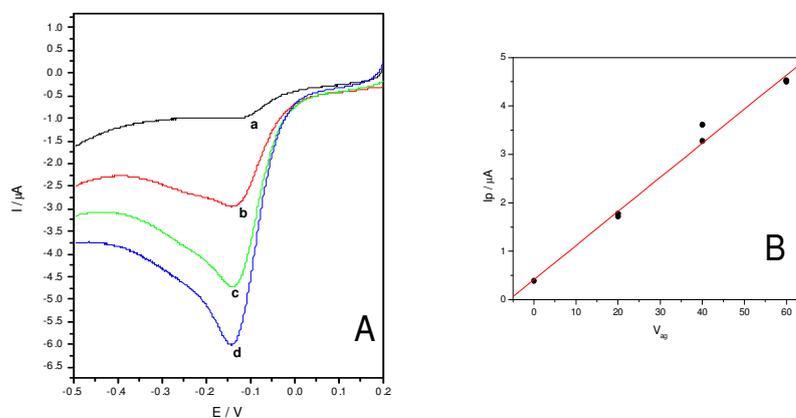
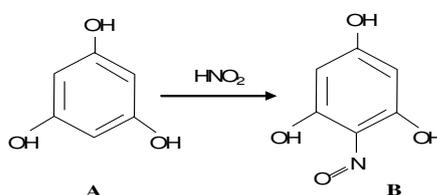


Figura 2

A-Determinación electroquímica de nitrito en saliva por adición de estándares. a) Solución de THB + 300 $\mu\text{g(m) L}$ Saliva, b), c) y d) agregados sucesivos de 20 μL de NaNO_2 10 mM. B- Análisis de regresión lineal de los resultados obtenidos en A

El método fue probado exitosamente para el NO_2^- con muy baja dispersión.

D) Determinación de nitrato

Para determinar NO_3^- es necesario reducirlo a NO_2^- en una primera etapa.

Se probaron diferentes reductores:

- Vanadio (III): no fue posible utilizarlo como reductor ya que también reacciona con el compuesto B (figura 2) impidiendo su determinación electroquímica.

-Se probaron otros reductores, como Cu metálico y SO_3^{2-} los cuales tampoco funcionaron. En el primer caso porque el Cu (II) generado en la reacción también tiene actividad electroquímica y en el segundo porque no fue posible impedir la posterior reducción del nitrito a óxido nitroso.

-Se utilizó entonces Cadmio metálico, que no reduce por completo al nitrato.

-Con el Cu/ Cd se obtuvo una reducción completa y se optimizaron las condiciones de reducción mediante automatización para evitar la dispersión en los resultados, mediante sistema FIA.

-Método FIA (Flow Injection Analysis) Análisis por inyección en flujo:

La misma reacción utilizada en el método anterior se automatiza por inyección en flujo. Se realizó la detección por amperometría (electrodo de trabajo: carbono vítreo, electrodo de referencia: Ag/AgCl, Cl⁻). La señal es proporcional a la concentración.

El método se desarrolló:

-Se fijó un potencial de trabajo de -250mV a partir de un voltograma hidrodinámico.

-Se optimizó el sistema de flujo en cuanto a:

a) variables químicas: concentración de los reactivos.

b) variables FIA: velocidad de flujo de cada uno de los reactivos, longitud de los reactores de mezcla, tamaño de la muestra que se inyecta.

c) Curva de calibrado para NO_2^- con estándares de nitrito de 2 a 75 μM .

d) Tamaño de la columna de Cd utilizada para la reducción de NO_3^- .

*Validación del método y aplicación a muestras reales:

*Al pasar nitrato para la reducción: la columna daba una interferencia (más señal de la debida) probablemente se desprendiera algo de la columna.

-Se aplicó a muestras reales: no se obtuvieron resultados reproducibles, ¿por contaminación del electrodo? ¿por proteínas de la saliva?.

La ventaja del FIA en relación al EQ, es que este último, en batch: no mide concentraciones tan bajas. Con FIA se puede bajar el límite de detección a 2, pero con ello aumentan las interferencias.

Se probó también con lámpara UV directamente con muestras: a pesar que se fotoreduce el nitrato a nitrito, la reacción no es del 100%. No se obtuvieron los resultados esperados.

Se decide:

*Procesar las muestras por método colorimétrico de Griess para determinar nitrato y nitrito.

Nitrato, previa reducción en flujo continuo mediante el pasaje de una alícuota por columna de cadmio cuperizado. Con esta metodología se obtuvieron resultados reproducibles.

Resultados

El número total de pacientes incluidos fue de 30, uno se descartó luego de haberse confirmado histopatológicamente que se trataba de un Carcinoma Verrugoso asociado a Sarcoma. Dieciocho (18) pacientes integraron el Grupo de estudio (CA) y once (11) el Grupo Control (C). El rango de edad y la media de los pacientes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Edad de los pacientes de ambos grupos.

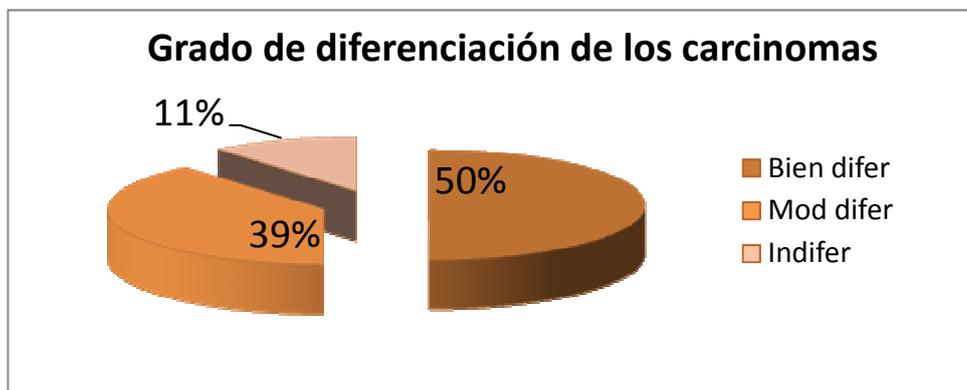
grupo	n	Media	rango
CA	18	63,00	55-77
C	11	57,55	47-82

Distribución por sexo

CA		Control	
Femenino	9 (50%)	Femenino	8 (73%)
Masculino	9 (50%)	Masculino	3 (27%)

La mayoría de los pacientes del grupo CA presentaron carcinoma a células escamosas (CCE) bien diferenciado (50%) (gráfico 1) y fueron diagnosticados en un 61% en estadios iniciales (I y II).

Gráfico 2: Distribución de los carcinomas según el grado de diferenciación histológica.



En el grupo C, el 90% de los pacientes tuvieron hiperplasia fibrosa y el 10% presentó condiloma acuminado.

La tabla 2 muestra los valores de concentraciones salivales de nitrito y nitrato en el grupo CA y la tabla 3, los obtenidos en C.

Tabla 2: Concentración salival de nitrito y nitrato en el grupo CA (expresadas en μM).

Grupo	Nro.	Nitrito (μM)	Nitrato(μM)	Suma(μM)
CA	1	135,2	4,9	140,1
CA	2	37,3	66,5	103,8
CA	3	32,9	1205,8	1238,7
CA	4	106,3	300	406,3
CA	5	nd	nd	nd
CA	6	694,7	6358,7	7053,4
CA	7	233,2	1225,6	1458,8
CA	8	98,9	456,5	555,5
CA	9	84,8	201,1	285,9
CA	10	203	171	374
CA	11	43	1142	1185
CA	12	126,3	779,8	906,1
CA	13	111,5	818,9	930,4
CA	14	175,4	634,7	810,1
CA	15	44	876,7	920,7
CA	16	131	892	1023
CA	17	53	1279	1332
CA	18	174	2094	2268

Tabla 3: Concentración salival de nitrito y nitrato en el grupo C (expresadas en μM).

Grupo	Nro	Nitrito (μM)	Nitrato (μM)	Suma (μM)
Control	1	79,4	6893,1	6972,5
Control	2	150,4	635,6	786
Control	3	9,25	1505,1	1514,4
Control	4	636,6	4964,9	5601,5
Control	5	79	2021	2100
Control	6	127,2	1116	1243,2
Control	7	197,6	556,9	754,5
Control	8	18,8	707,5	726,2
Control	9	204,9	1034,9	1239,8
Control	10	149,7	914,5	1064,2
Control	11	52	1002,8	1054,8

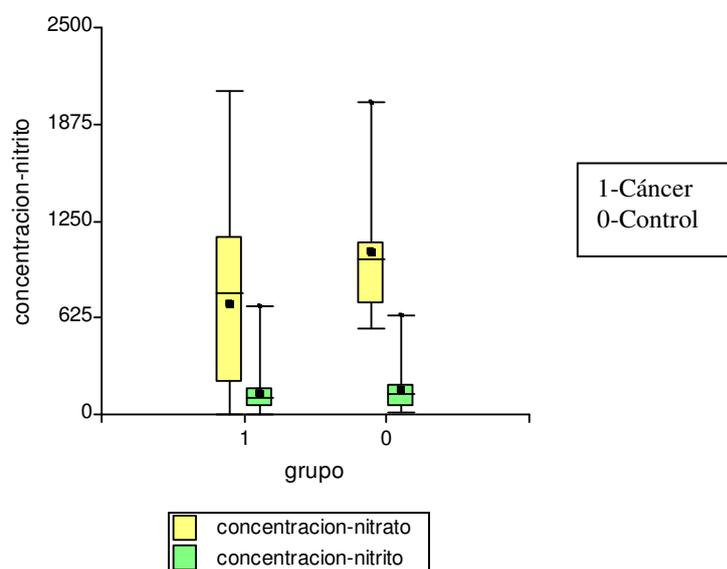
Al aplicar el test de Wilcoxon, no se encontraron diferencias significativas en los valores de nitrito y nitrato entre ambos grupos (gráfico 3).

Tabla 4: Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	p
grupo	nitrito	CA	Control	17	10	105,3	162,55	0,51
grupo	nitrato	CA	Control	17	10	714,6	1445,93	0,08

Gráfico 3: Concentración promedio de nitrito y nitrato en ambos grupos, expresada en μM por mL

de saliva. No se encontraron diferencias significativas.



Para correlacionar el contenido de nitritos salivales con la edad, la mala higiene, la cantidad aproximada de tabaco y alcohol consumidos y la presencia de candidiasis bucal (gráfico 4), se aplicó el análisis de regresión logística multivariado.

Se encontró una tendencia de asociación con la edad (OR=1,93), la alimentación (OR=4,08), la candidiasis (OR=2,33) el tabaco (OR=2,25) y los niveles salivales de nitrito (tabla 5), aunque estos valores no se reflejan en el valor de *p*. Cuando la variable dependiente fue el cáncer, se encontró una aparente asociación con tabaco, candidiasis y alimentación (tabla 6).

Gráfico 4: Porcentaje de pacientes que presentaron candidiasis crónica en ambos grupos.

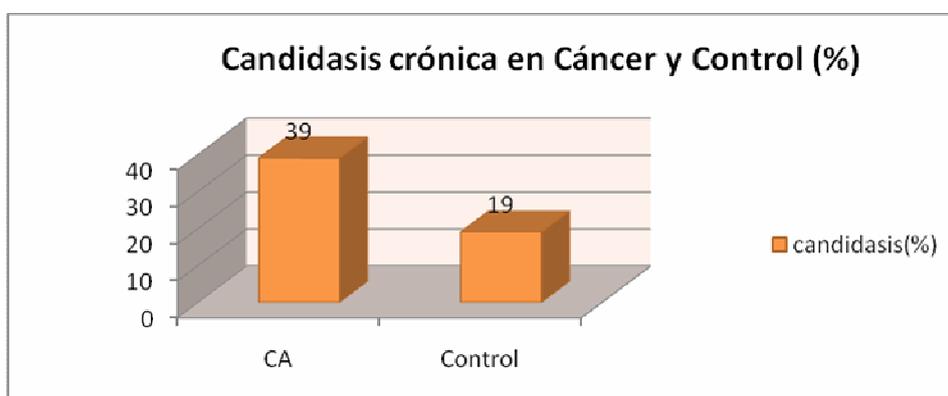


Tabla 5: Regresión logística: variable dependiente: nitrito (alto o bajo) en relación a las demás

variables estudiadas.

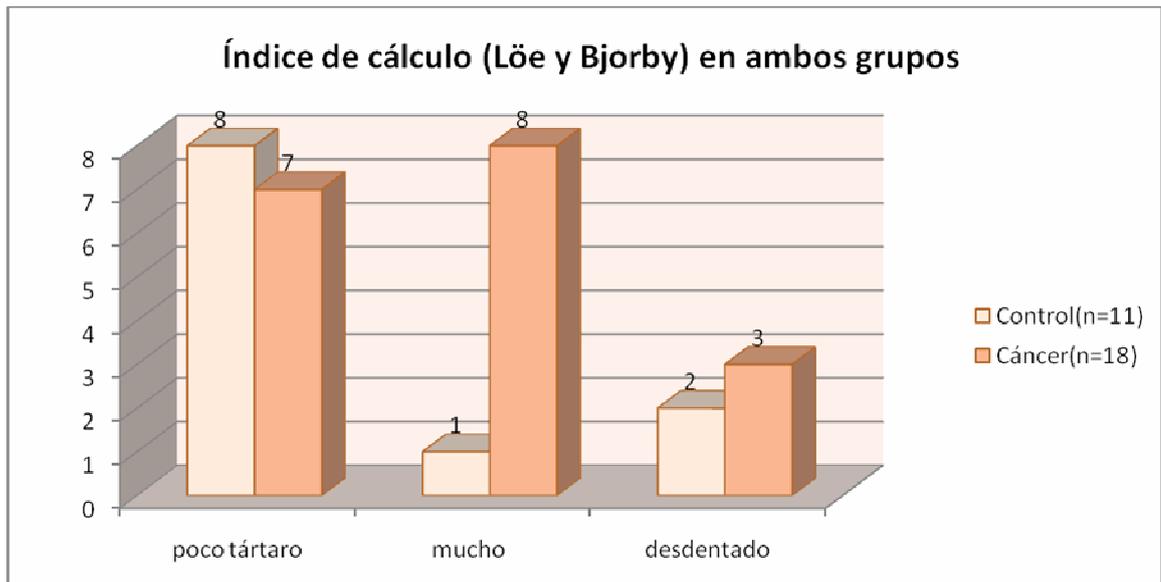
<u>Parámetros</u>	<u>Est.</u>	<u>EE</u>	<u>Odd</u>	<u>CI(95%)</u>	<u>p-valor</u>
Constante	-1,23	1,81	0,29	0,01-10,08	0,50
tabaco	0,81	1,21	2,25	0,21-24,12	0,50
alimentación	1,41	1,05	4,08	0,53-31,71	0,18
sexo	-1,10	1,17	0,33	0,03-3,29	0,35
cálculo	-0,84	0,91	0,43	0,07-2,58	0,36
edad	0,66	0,98	1,93	0,28-13,27	0,50
alcohol	-0,99	0,96	0,37	0,06-2,42	0,30
candidiasis	0,84	1,52	2,33	0,12-45,79	0,58

Tabla 6: Regresión logística: variable dependiente: grupo (CA-C) en relación a las demás variables estudiadas.

<u>Parámetros</u>	<u>Est.</u>	<u>EE</u>	<u>Odd</u>	<u>CI(95%)</u>	<u>p-valor</u>
Constante	-3,11	2,27	0,04	5,2-3,9	0,17
tabaco	1,33	1,08	3,79	0,45-31,6	0,21
alcohol	0,27	1,19	1,31	0,15-11,4	0,80
cálculo	-1,72	1,81	0,18	0,01-6,17	0,34
candidiasis	1,98	1,86	7,24	0,19-280	0,28
alimentación	1,95	1,14	7,04	0,75-66	0,08
nitrito	-0,47	0,97	0,63	0,09-4,21	0,63

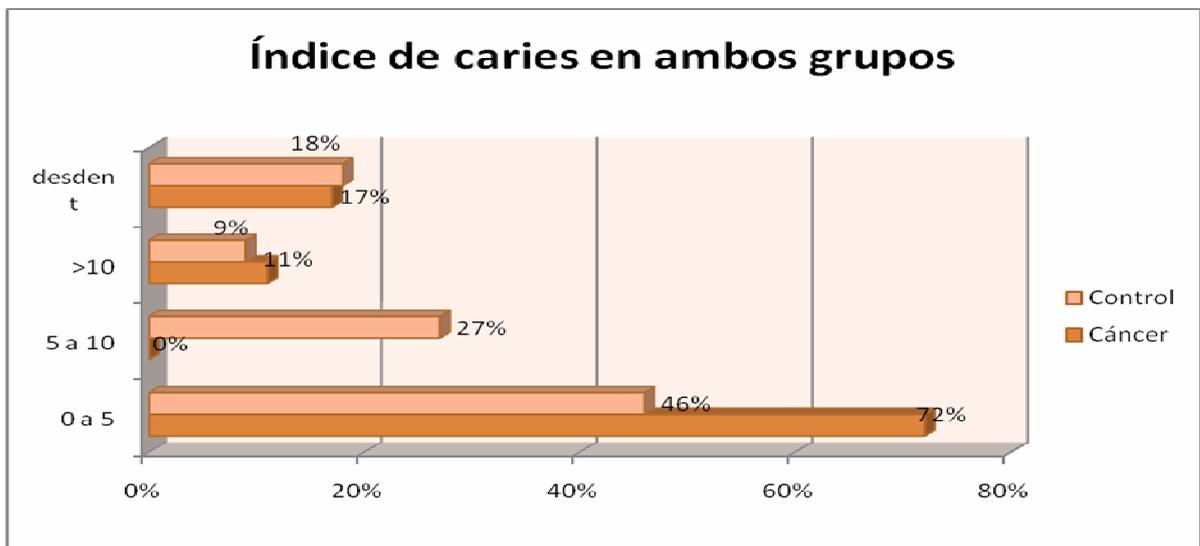
Se obtuvo el Odds ratio de cáncer para el cálculo dental, variable asociada a la biopelícula de larga data, resultando muy significativo: $p < 0,006$, OR=9, IC 95% 1-92 (gráfico 5).

Gráfico 5: Índice de cálculo (Löe y Bjorby) en ambos grupos.



p<0,006. OR=9 (IC 95% 1-92).

Gráfico 6: Índice de caries (CPOD) en ambos grupos



CPOD Cáncer=23,3

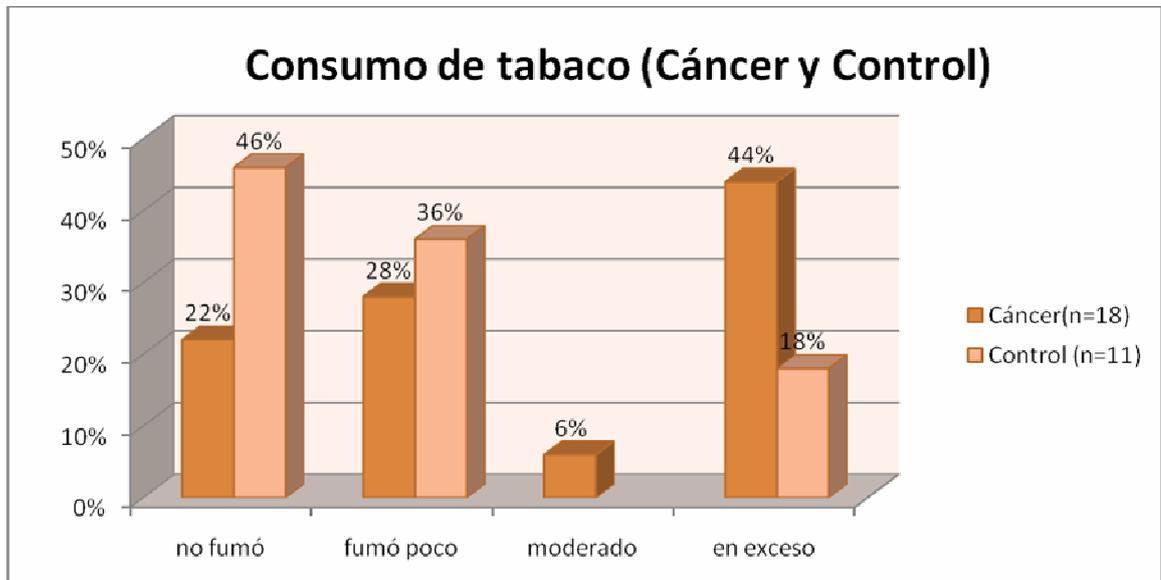
CPOD Control=22,6

Perdidos: 19,4

Perdidos: 17,3

El OR de cáncer para la variable CPOD resultó no significativo (gráfico 6). En relación al consumo de tabaco, el 78% de los pacientes con CA fueron fumadores (entre mucho, moderado y poco), siendo el OR=4,5 (IC 95% 0,75-27), (gráfico 7).

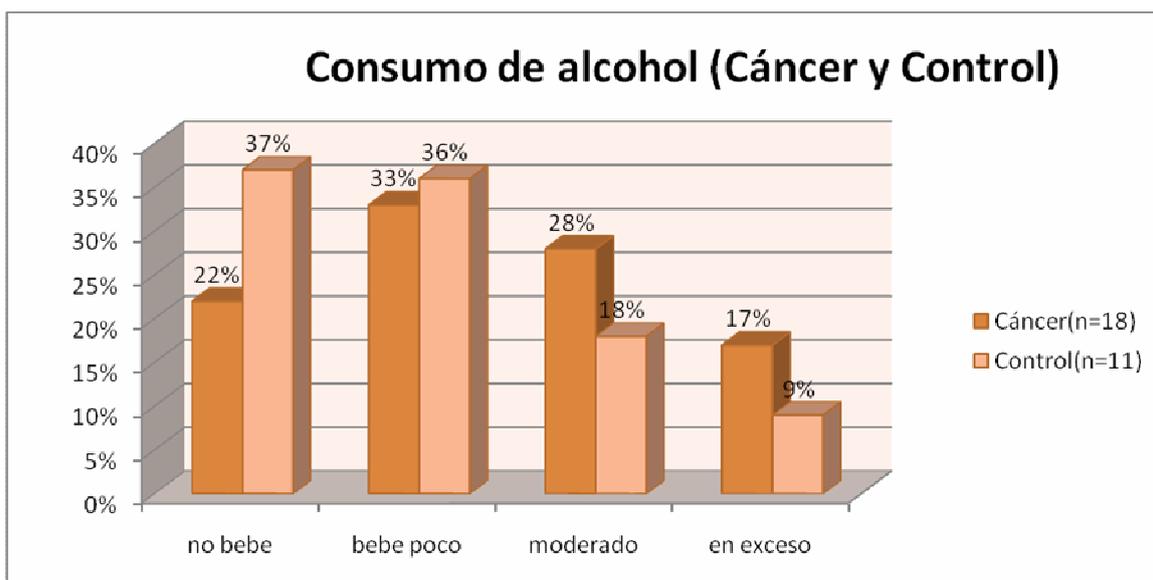
Gráfico 7: Distribución según el hábito de fumar en ambos grupos.



78% de los pacientes con Cáncer y 54% de los Controles fueron fumadores. OR=4.5. (IC 95%:0.75-27).

El 78% de los pacientes eran consumidores de alcohol, como se muestra en el gráfico 8, con un OR=2 (IC 95% 0,42-10,8). También se observó igual porcentaje de fumadores.

Gráfico 8: Distribución de los pacientes de ambos grupos según el consumo de alcohol.



78 % de los pacientes con Cáncer y 63 % de los Controles fueron consumidores de alcohol.

OR=2, IC 95%:0.42-11.

Discusión:

El interés en medir nitratos y nitritos en fluidos corporales, se incrementó en los últimos años, en especial porque se sospecha que la formación de nitrito en la saliva estaría relacionada con la carcinogénesis de diversos órganos [212-215].

La saliva es una herramienta útil, que permite procedimientos por lo general de bajo costo y no invasivos, se recolecta rápidamente y puede utilizarse para el diagnóstico de enfermedades sistémicas, ya que contiene constituyentes identificables del suero. Posee una amplia variedad de funciones biológicas [277]. Sumada a la función protectora, recientes investigaciones han indicado que bajo ciertas circunstancias, pueden ser generadas sustancias tóxicas en la saliva misma; en relación a esto, el hecho más relevante es la posible formación de nitrosaminas, reconocidas como potentes carcinógenos [172]. Hasta el presente, la identificación positiva de nitrosaminas puede ser hecha sólo por cromatografía gaseosa; como dichas técnicas son muy costosas y generalmente no están disponibles [278], la determinación

de sus precursores, nitrato y nitrito ofrece una buena alternativa. Dichos compuestos están presentes en el ambiente, alimentos, sistemas industriales y en condiciones fisiológicas, y mientras la comprensión de su rol en tales matrices se ha incrementado, persiste un sustancial grado de especulación y de incertidumbre acerca de sus efectos en la aparición de cáncer [279]. En relación al cáncer bucal, existen pocos antecedentes que lo vinculen con los valores de dichos iones. Badawi y col 1998 [266] encuentran aumento en la concentración salival de nitrito en pacientes con cáncer comparada con la de un grupo control. En la población objeto de nuestro estudio, no encontramos diferencias entre la concentración salival de nitritos y nitratos entre CA-C. Un alto porcentaje de nuestros pacientes en el grupo de estudio (CA) fueron fumadores, 78%, de los cuales un 44% habían fumado más de 200 mil cigarrillos. Forman y col. (1985) [191] encontraron niveles más bajos de nitrato en la saliva de fumadores en relación a las de no fumadores, ya que los primeros tienen niveles 3 o 4 veces más altos de SCN⁻, que se sabe puede inhibir la concentración de nitrato en saliva [189]. Los mismos autores encontraron que los niveles de nitrito salival fueron incrementándose en grupos de mayor edad y en nuestro estudio se observó aparente correlación entre la edad y los mayores valores de dichos compuestos. De cualquier manera, los estudios *in vivo* tienen gran dispersión en los resultados obtenidos en y entre individuos [280]. En relación a la determinación salival de compuestos nitrogenados, se pudo observar que existe una gran influencia de la matriz y de la química de dichos compuestos en las condiciones de almacenamiento y procesado. Es por ello

que adquiere fundamental importancia controlar las condiciones de recolección, almacenamiento y procesado. En el análisis de las condiciones preanalíticas, cuando se evaluaron las variaciones individuales, éstas mostraron una aparente estabilidad de los valores de nitritos salivales en cada sujeto y una relación constante nitrato/nitrito, por lo que su determinación sería útil para el seguimiento de pacientes en estudios de cohorte, particularmente en aquellos de riesgo. A modo de ejemplo, la Leucoplasia es una lesión precancerosa relacionada con el consumo de tabaco, alcohol y la infección por *Candida*, la cual interviene en reacciones de nitrosación a través de reacciones bioquímicas tisulares [104]. Además, Dombi C y col (1999) encontraron que las áreas de leucoplasia y aún de mucosa normal, fueron más permeables a las nitrosaminas específicas del tabaco en fumadores en relación a las mismas zonas en no fumadores [281].

El OR obtenido en nuestros pacientes confirma la tendencia general a relacionar el cáncer bucal con el consumo de tabaco (OR: 4,5), de alcohol (OR: 2) y con la mala higiene bucal (placa OR: 3, tártaro OR: 9). Schildt y col [282] encontraron que las infecciones dentales frecuentes, el consumo de bebida blanca y de tabaco fueron los factores de riesgo más importantes en un estudio llevado a cabo en Suecia (1998) y Deeb y col. encontraron en 6 pacientes con CCE bucal no consumidores de tabaco ni de alcohol, que todos tenían gingivitis crónica [107]. Las bacterias asociadas a las infecciones dentales, pueden también relacionarse a otras reacciones inflamatorias y un número importante de investigadores indican que la microflora bucal juega el rol principal en la reducción del nitrato a nitrito [108, 109, 110] que ocurre principalmente en el dorso lingual [283]. Cummins y col (1992) [283] Shapiro y col (1991) [284] y Van Maanen y col 1996 [261], observaron que los enjuagues con clorhexidina tuvieron efectos inhibitorios sobre la conversión de nitrato a nitrito en la cavidad bucal.

El análisis multivariado muestra que el tabaco, la candidiasis y la alimentación con alto contenido de nitrato serían las variables más relacionadas al cáncer bucal, mientras que la alimentación y la candidiasis muestran una aparente asociación con los valores de nitrito salival,

según los valores del OR, los cuales no se reflejan en el valor de **p** debido a la amplia dispersión en el IC, relación que seguramente podría confirmarse aumentando la muestra.

CAPÍTULO III: enzima iNOS en la mucosa bucal.

Se determinó la presencia de la enzima iNOS en la mucosa bucal de pacientes con neoplasias malignas orales y en un grupo de pacientes con lesiones hiperplásicas simples que requerían tratamiento quirúrgico, los cuales fueron considerados como grupo control (objetivos 3 y 4).

Material y métodos

A todos los pacientes, que integraron el Grupo de estudio (CA) dieciocho (18) y once (11) del Grupo Control (C), el mismo día de la recolección de saliva, se les realizó una toma de material para biopsia, abarcando los siguientes sectores: Zona A-fondo de la úlcera o zona central de la lesión y borde y Zona C-margen circundante (figura 1 y figura 2).

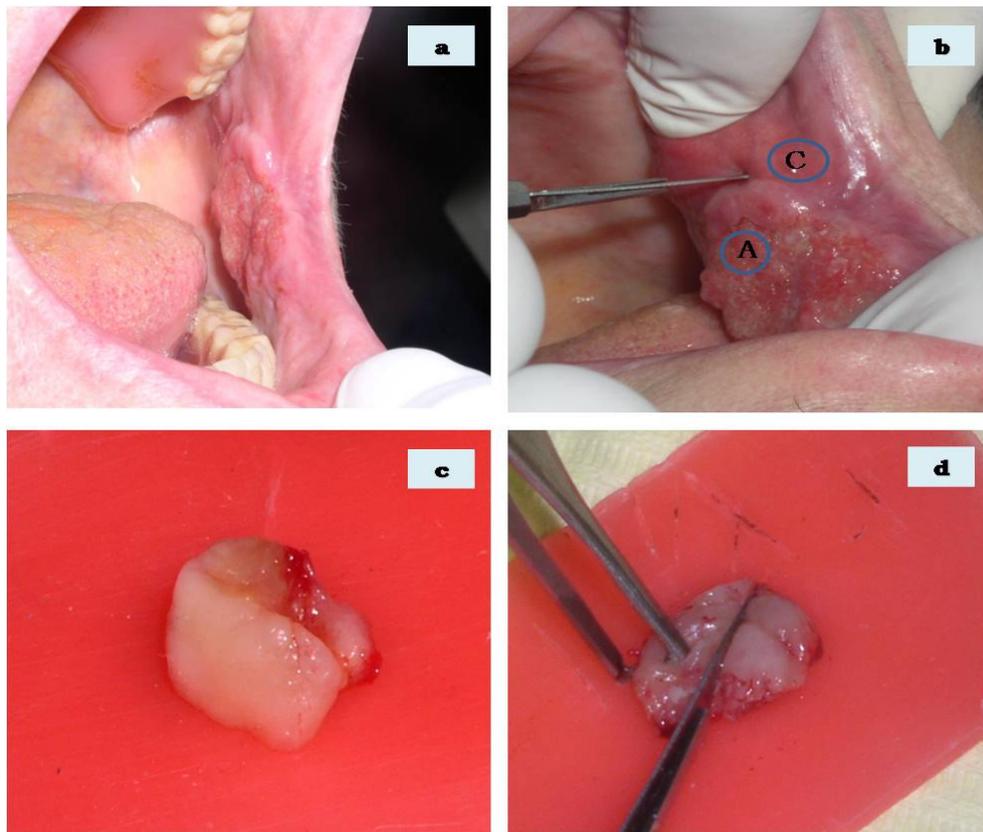


Figura 1: Paciente con lesión de mucosa yugal (CCE): (a) aspecto clínico, (b) toma de material para biopsia, A (centro) y C (margen sano), (c) muestra obtenida y (d) división en zonas.

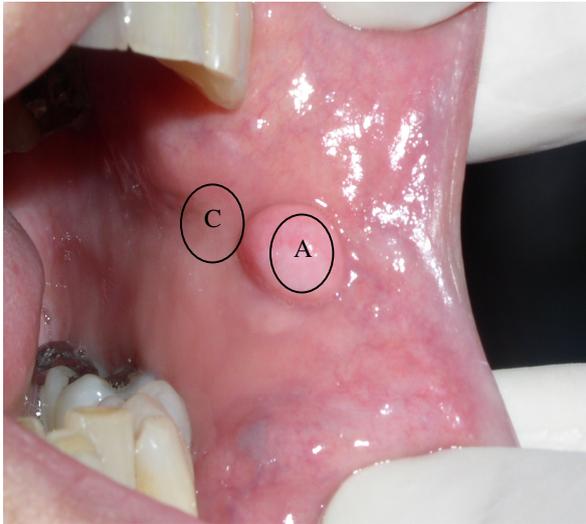


Figura 2: Paciente del Grupo Control con hiperplasia fibrosa de mucosa yugal, previo a la toma biopsica: A (centro) y C (margen circundante).

Las muestras fueron conservadas en formol al 10%* y enviadas al servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Urgencias. Fue solicitado que de cada taco se prepararan dos vidrios, uno coloreado con hematoxilina-eosina (HE) y otro sin coloración, adecuado para estudio inmunohistoquímico (IHQ). La preparación de dichos vidrios se llevó a cabo en el Dpto. de Biología Celular (Facultad de Ciencias Médicas UNC).

*De las mismas zonas se guardaron muestras en freezer de -85°C.

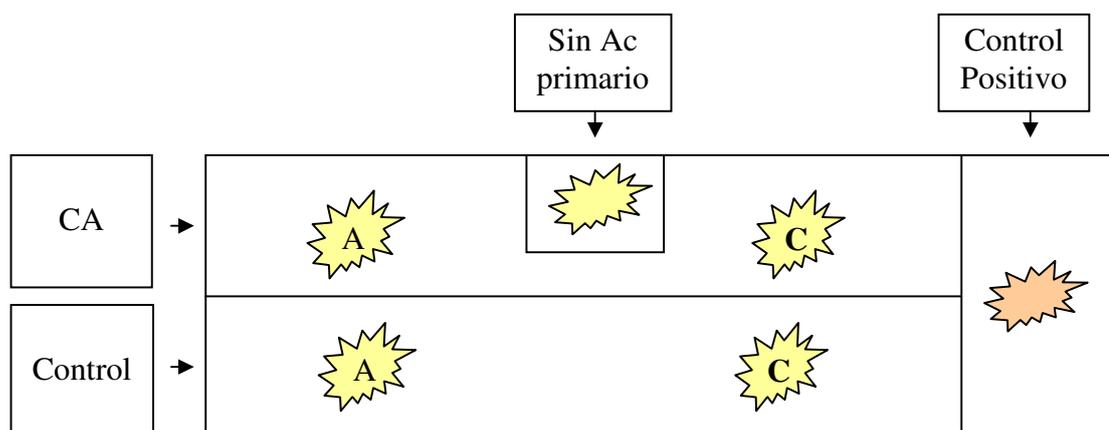
Técnica para determinar compuestos nitrogenados en tejido

Para la determinación de nitrito en biopsias, se empleó el método propuesto por la AOAC [285]. Se pesó el tejido biopsiado al que se agregó agua en cantidad suficiente para cubrirlo. Se calentó a 80°C durante 3hs y posteriormente se agregó igual volumen de sulfato de zinc 0,15M para la digestión y desproteínización. Luego de reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 10min a 4000g y el sobrenadante fue empleado para la determinación de nitrito por el método de Griess. Al trabajar con las biopsias, aproximadamente 60 mg de tejido epitelial y conectivo bucal, se determinó en paralelo en una muestra de embutido. La

técnica resultó sensible sólo en el caso del embutido, pero no en el caso de las biopsias, ya que se requiere de mayor tamaño de las muestras.

Así, debido a la imposibilidad de dosar nitrito en tejido, se procedió a determinar la **actividad** sintasa del óxido nítrico por el método de Bredt y Snyder [286] en las biopsias que estaban almacenadas en freezer de -85° . Este método consiste en incubar el homogenato del tejido con arginina marcada (el sustrato de la enzima) y determinar la formación de citrulina marcada en un determinado tiempo de incubación a 37°C . La citrulina marcada se separa de la arginina marcada, mediante columna de intercambio iónico y se cuenta el eluido mediante un contador beta. El empleo de la técnica resultó exitoso, observándose actividad de la enzima en todos los casos. Debido a la necesidad de utilizar arginina marcada con C^{14} y al no contar con la infraestructura necesaria para manipular material radiactivo, se decidió determinar **presencia** de la enzima iNOS en el tejido, mediante anticuerpos monoclonales.

Antes de efectuar la técnica de IHQ, se seleccionó un control positivo [241] para colocar en todos los vidrios, a partir de tacos de procesos periapicales crónicos existentes en la Cátedra de Anatomía Patológica A (gentileza Dra Ruth Ferreyra). Como control de especificidad de la técnica se utilizó una muestra de CA con la que se usó la misma técnica, sin colocar el anticuerpo primario. Los portaobjetos contenían muestras A y C de pacientes CA y C y fueron distribuidos de la siguiente manera:



A: úlcera o centro de la lesión
C: margen circundante

Una vez obtenidos los tacos, se trabajó en el Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC.

Técnica de IHQ

- 1- Desparafinado con xilol y rehidratación en alcoholes de concentración decreciente
- 2- Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena
- 3- Incubación con anticuerpo 1rio. específico para iNOS- NOS2 (anti-iNOS, c-terminal, de conejo, sc-651, Santa Cruz Biotechnology, inc)
- 4- Incubación con el anticuerpo 2rio (anti-conejo, A 6154, SIGMA) marcado con peroxidasa
- 5- Revelado del complejo de unión con diaminobencidina
- 6- Contra-coloreado con hematoxilina

Dado que esta reacción es difusa y de localización citoplasmática, es difícilmente estimable mediante análisis de imágenes. Se optó por realizar una estimación semicuantitativa en base a la comparación con el control positivo (corte del proceso periapical) de cada grupo de reacción. Esta forma de evaluación es, por otra parte, frecuentemente utilizada en los trabajos que estiman determinan actividad inmunocitoquímica de iNOS [241,254].

Cada portaobjeto fue observado al microscopio óptico, por dos observadores y revisados por un tercero. Se caracterizó la presencia de áreas de iNOS marcadas positivamente, así como el control positivo que se tiñó intensamente. Se consideró al preparado (+) o (-) en epitelio y/o corion y se determinó la distribución (células aisladas, focos celulares, y capas del epitelio involucradas).

Resultados

Se realizó estudio IHQ a 14 muestras del grupo CA y 10 del grupo C, debido a que algunos tacos no pudieron recuperarse debido a que los pacientes los retiraron del servicio de Anatomía Patológica para interconsultas.

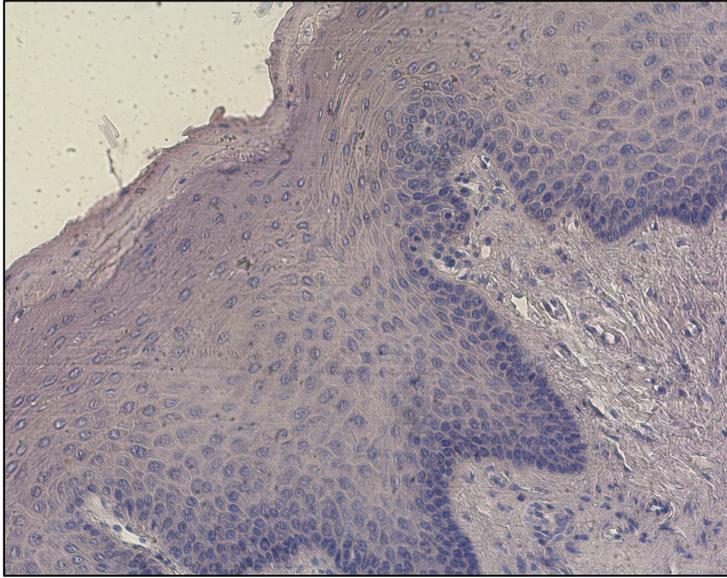
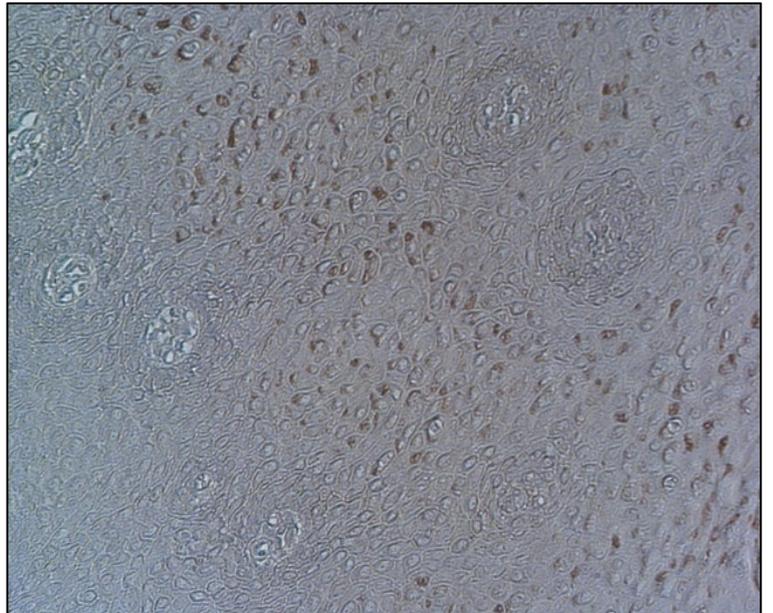


Figura 1: Epitelio iNOS negativo (10X).

Figura 2: Epitelio iNOS positivo (20X).



Las figuras 1 y 2 muestran la tinción epitelial negativa y positiva del epitelio para iNOS mediante IHQ.

La tabla 1 muestra los resultados de la presencia de la enzima iNOS mediante IHQ obtenidos en el epitelio y corion en la zona A y zona C en los dos grupos de estudio (CA y C) y el grado de diferenciación de los carcinomas (50% bien diferenciados).

La figura 3 muestra las zonas iNOS positivas en A y C de pacientes del grupo CA.

Tabla 1: Presencia de iNOS en las distintas zonas (A o C) en epitelio y corion Grupo CA(n=14).

Paciente	Zona A Epitelio	Zona A Corion	Zona C Epitelio	Zona C Corion	Tipo histológico
1	(+)	(-)	(-)	(-)	Bien difer
2	(+)	(+)	(+)	(+)	Mod difer
3	(+)	ne	(+)	(+)	Bien difer
4	(+)	(+)	(-)	(+)	Mod difer
6	(-)	(-)	(-)	(-)	Bien difer
8	(+)	(+)	ne	ne	Bien difer
9	(+)	(+)	ne	ne	Bien difer
10	(+)	(-)	ne	ne	Mod difer
12	(+)	(+)	(+)	(+)	Mod difer
13	(+)	(+)	(+)	(+)	Bien difer
14	(-)	(-)	(+)	(-)	Bien difer
16	(-)	(+)	(+)	ne	Mod difer
17	(+)	ne	(-)	ne	Mod difer
18	(-)	(-)	(-)	(-)	Mod difer

ne: no evaluable

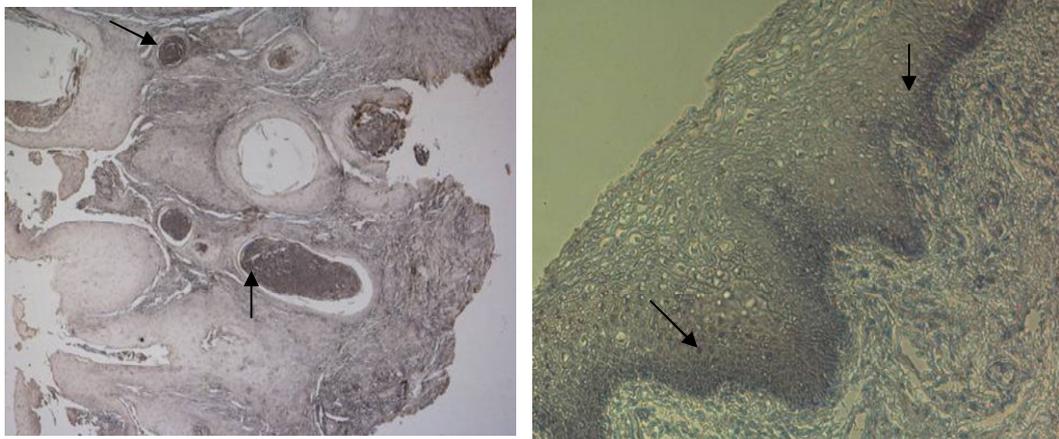
Figura 3: Pacientes CA con tinción positiva de iNOS en epitelio, tanto en zona de lesión(A) como en mucosa circundante (C).

IHQ-10x

Pacientes CA

lesión

mucosa sana



La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en el grupo C y la figura 4 fotos de pacientes de dicho grupo, donde no se observa tinción epitelial, aunque si abundantes focos en el corion.

Las tablas 3 y 4 muestran los porcentajes de positividad de iNOS en el epitelio: el 71% de los pacientes CA tuvieron presencia de iNOS en la zona A (OR 40) y 54,5% en la zona C (OR 11). En el grupo Control, ningún paciente tuvo presencia de la enzima en el epitelio de la lesión. Ambos grupos mostraron positividad de iNOS en el corion, con porcentajes similares en la zona A.

Tabla 2: Presencia de iNOS en las distintas zonas (A o C) en epitelio y corion Grupo Control(n=10).

Paciente	Zona A Epitelio	Zona A Corion	Zona C Epitelio	Zona C Corion	Tipo histológico
1	(-)	(-)	(-)	(-)	Condiloma
2	(-)	(+)	(-)	(-)	Hiperplasia fibro
3	(-)	(-)	(-)	(-)	Hiperplasia fibro
5	(-)	(+)	(-)	(+)	Hiperplasia fibro
6	ne	ne	(-)	(+)	Hiperplasia fibro
7	(-)	(+)	(-)	(+)	Hiperplasia fibro
8	(-)	(+)	(-)	(+)	Hiperplasia fibro
9	(-)	(-)	(-)	(-)	Hiperplasia fibro
10	(-)	(-)	(+)	(+)	Hiperplasia fibro
11	(-)	(+)	(-)	(+)	Hiperplasia fibro

ne: no evaluable

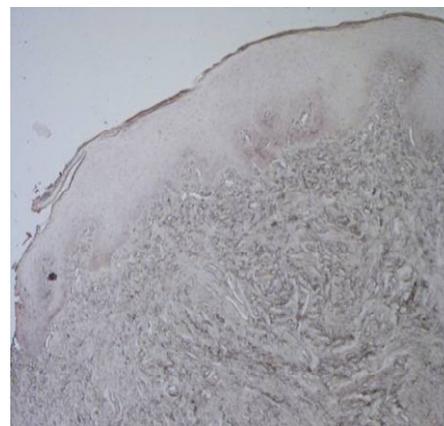
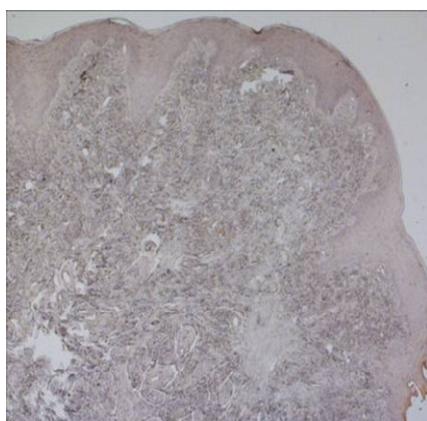
Figura 4: Tinción positiva de iNOS en epitelio de pacientes Control, solamente en corion de la zona de la lesión y de la mucosa sana.

IHQ-10x

Pacientes Control

lesión

mucosa sana



Tablas 3 y 4: Porcentaje de positividad de iNOS en las diferentes zonas de ambos grupos de pacientes. OR en epitelio A=40 (IC 95%: 1.9 - 845.4), OR en epitelio C=11 (IC 95%: 1-117).

Tabla 3:

CA (n=14)		
	Zona A	Zona C
Epitelio +	71%	54,5%
Corion +	58%	55,5%

Tabla 4:

Control (n=1)		
	Zona A	Zona C
Epitelio +	0%	10%
Corion +	55%	70%

La presencia positiva de iNOS en el epitelio de la lesión resultó estadísticamente significativo ($p=0,002$) $OR=40$ (IC 95%: 1.9 - 845.4) y también en el epitelio de la mucosa circundante: $p=0,06$, $OR=11$ (IC 95%: 1-117).

No se observó correlación entre la positividad de iNOS en el epitelio de pacientes con CA y valores altos de nitrito salival (Tabla 5).

Tabla 5: Concentración de nitrito salival en relación a la presencia de iNOS en grupo CA (n=14).

N° de Paciente	Valores de nitrito salival en μM	Presencia de iNOS
1	135	(+)
2	37	(+)
3	33	(+)
4	106	(+)
6	695	(-)
8	99	(+)
9	84	(+)
10	203	(+)
12	126	(+)
13	111	(+)
14	175	(-)
16	131	(-)
17	53	(+)
18	174	(-)

Discusión

El 71% de nuestros pacientes del grupo CA (n=14) tuvieron presencia de iNOS en la zona A (centro y/o borde de la lesión) y 54,5% en la zona C (margen circundante).

Los estudios publicados en relación a la iNOS, hablan de positividad a nivel epitelial en el centro invasivo del tumor [255, 264] pero no mencionan el epitelio circundante, que en nuestro trabajo resultó tener presencia importante de la enzima.

En el grupo Control, ningún paciente tuvo presencia de la enzima en epitelio de lesión, lo que está de acuerdo con la literatura, así como la esperada presencia de iNOS en el corion de lesiones con signos de inflamación [287]. Ambos grupos mostraron positividad de iNOS en el corion, con porcentajes similares en la zona A.

En China se realizó un estudio para tratar de correlacionar la presencia de iNOS a nivel ARNm, mediante PCR, con la conducta biológica del tumor, como: crecimiento invasivo, metástasis linfática y pronóstico de sesenta y ocho carcinomas a células escamosas de lengua. Encontraron

mayor expresión positiva de iNOS (86.1%) en el grupo que tenía tumores invasivos y ganglios positivos (85.7%). La tasa de supervivencia a 3 años fue significativamente menor en el grupo de iNOS positivo que en el de iNOS negativo [288].

Diversos autores, sugieren estudiar interacción iNOS-p53 para el mecanismo de la carcinogénesis química bucal. iNOS es también un marcador IHQ para cáncer de próstata. Esto aún no ha sido confirmado en el cáncer bucal y se cree que el estudio de iNOS en lesiones cancerizables podría confirmar o no esta relación [256].

La búsqueda de marcadores del estado de cancerización de campo resulta no solo de interés biológico sino de aplicación en el diagnóstico precoz y en la prevención del cáncer bucal. En este contexto, cobran importancia los marcadores que puedan ser detectados en biopsias de rutina procesadas para diagnóstico histopatológico. La iNOS, enzima estrechamente vinculada a procesos inflamatorios y carcinogénesis, mostró una marcada presencia en la zona sana cercana al tumor por lo que creemos que sería un marcador IHQ importante asociado a cambios epiteliales premalignos.

En relación al objetivo 6: Analizar las tasas de mortalidad por cáncer bucal en la provincia de Córdoba (período 1975-2000), se llevó a cabo el siguiente trabajo:

a-Mortalidad por cáncer bucal en la provincia de Córdoba, República Argentina (período 1975-2000). Estudio comparativo con otras poblaciones.

INTRODUCCIÓN

La mortalidad por neoplasias malignas (NM) figura, a nivel mundial, entre las cuatro primeras causas de muerte en la década del 90, junto con las enfermedades cardíacas y las cerebrovasculares [289-292].

Existe una gran variabilidad en las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer bucal (CB) en las diferentes regiones del mundo. La incidencia del CB y orofaríngeo en hombres es mayor en la zona del bajo Rhin en Francia; en el sur de la India donde es la forma más frecuente de cáncer; en algunas áreas del centro y este de Europa y en algunas regiones de América Latina [293-294]. En mujeres la mayor incidencia se registró en India, observándose un moderado aumento en la mortalidad en el centro y este Europeo en las décadas del 80 y del 90 [295]. Los estudios de cohorte demuestran que el CB ha aumentando su incidencia en todos los grupos etáreos en el mundo en las últimas décadas [294] y especialmente en hombres jóvenes del este Europeo [295,296]. El aumento del riesgo ha sido notado en 19 de 24 países de Europa, encontrándose un incremento de tres a diez veces dentro de una generación [297-299]; sin embargo se observó una tendencia a disminuir la incidencia del CB en algunos países de América Latina y del Caribe [293].

La tasa de mortalidad es un instrumento importante que lleva implícita información sobre incidencia, estadio al momento del diagnóstico, capacidad resolutive de los servicios, de la tecnología disponible y de los programas de salud aplicados, entre otros. Sin embargo debido a que los datos de mortalidad por CB no están publicados en el mismo formato que los de incidencia, se ven dificultadas las comparaciones [293].

El objetivo del presente trabajo es estudiar la tasa de mortalidad por las NM más frecuentes y especialmente por CB en la Provincia de Córdoba, República Argentina en el período 1975-2000, analizar sus características particulares y compararla con la de otras poblaciones de

América y Europa.

MATERIAL Y METODO

Fuente de datos

En una primera etapa se analizó la mortalidad por las ocho NM más frecuentes y luego la Tasa de Mortalidad por CB. Los datos de mortalidad por cáncer en Argentina y Córdoba, ajustados por edad, cada cien mil habitantes, período 1997-2001, pertenecen al Ministerio de Salud de Argentina [300]. Se los comparó con EEUU y con los siguientes países de Europa: España, Francia, Alemania, Eslovaquia y el Reino Unido según Globocan 2000 [301]. Los datos de defunciones y población en Córdoba, fueron provistos por el Departamento de Estadísticas del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba.

Cálculo de tasas en Córdoba:

La tasa cruda de mortalidad se calculó utilizando la siguiente fórmula: $Tc = (Nd / Pt) \times 100.000$, donde Tc: es la Tasa cruda cada 100 mil habitantes, Nd: es el número de defunciones en una población en un período de tiempo definido y Pt: la población total en el mismo período de tiempo.

Para la tasa específica por sexo la fórmula fue: $Ts = (Nds / Ps) \times 100.000$, donde Ts: es la Tasa específica por sexo cada 100 mil habitantes, Nds: el número de defunciones en determinado sexo en una población y en un período de tiempo definido y Ps: la población total de ese sexo en el mismo período de tiempo.

Análisis del comportamiento de las tasas

Para analizar el comportamiento de las tasas se consideraron períodos de cinco años y se calculó el porcentaje de cambio según la siguiente fórmula: $(T-Ti) \times 100 / Ti$; donde T es la tasa promedio de cada período ya sea cruda o específica por sexo y Ti: la tasa del período 75-79 el cual se consideró como período inicial.

Así también se analizó la distribución de las defunciones por CB en Córdoba según sexo, edad y localización.

En el presente trabajo se definió CB como cualquier NM que asiente en labio, lengua,

piso de boca, encía, paladar, mucosa vestibular /yugal o glándulas salivales (CIE 9: del 140-145, CIE 10: del 00 al 08). No se tuvieron en cuenta los códigos de amígdala, hipo, naso y orofaringe [302].

Hasta el año 1996, se utilizó la Clasificación Internacional de Enfermedades 9na. Revisión (CIE-9), la que a partir de 1997 fue reemplazada por la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas relacionados con la salud (CIE-10). La CIE-9 usaba los códigos 140 a 145 a saber: 140: labio, 141: lengua, 142: glándulas salivales mayores, 143: encía, 144: piso de la boca y 145: de otras partes de la boca. En la CIE-10 se consideran: código 00: labio, 01: base de la lengua, 02: otras partes y las no especificadas de la lengua, 03: encía, 04: piso de la boca, 05: paladar, 06: otras partes y las no especificadas de la boca, 07: glándula parótida, 08: otras glándulas salivales mayores y de las no especificadas. Debido a dicha modificación los datos se analizaron en dos períodos diferentes: 1975-1996 y 1997-2000.

RESULTADOS

Al considerar la tasa de mortalidad por tumores en todos los sitios, durante el período 1997-2001 en el sexo masculino, se observó que los países con tasa más alta fueron Eslovaquia y Francia seguidos por Alemania y España, siendo los Tumores más prevalentes los de pulmón y bronquios. En las mujeres el Reino Unido, Alemania y EEUU fueron los países donde se registraron los valores más altos y la NM más frecuente fue la de mama, excepto en EEUU donde el de pulmón lo antecede.

En relación al CB en dichas poblaciones, Eslovaquia y Francia fueron los países con tasa más alta para ambos sexos, estando los valores de Córdoba y Argentina entre los más bajos especialmente en mujeres (tabla 1).

Al analizar el porcentaje de cambio de la Tasa de mortalidad por NM en todos los sitios del organismo en la provincia de Córdoba en el período 1975-2000, se observó un incremento del 6,6% (tabla 2).

Tabla 1: Tasa de Mortalidad por las ocho NM más frecuentes, específica por sexo (ajustada por edad, cada 100 mil habitantes), período 1997-2001.

Poblaciones	Todos los Sitios		Boca		Mama	Colon y Recto		Leucemia		Bronquio y Pulmón		Próstata	Estómago		Utero	
	M	F	M	F	F	M	F	M	F	M	F	M	M	F	Cuello	otro
Argentina*	148.0	93.6	1.9	0.5	20.4	14.5	9.0	3.4	3.1	35.5	7.1	16,3	9.9	3.9	4.5	6.2
Córdoba*	155.3	96.4	1.6	0.4	23.3	13.4	8.9	5.4	3.3	39.3	7.0	16.7	10.2	3.8	2.8	6.0
Francia**	201.5	98.0	4.4	0.8	21.4	18.3	12.1	6.1	3.9	48.5	6.7	19.2	8.0	3.6	3.5	2.1
Alemania**	176.6	116.9	3.2	0.8	23.7	21.7	17.0	5.7	3.9	46.2	9.6	18.4	12.9	7.8	4.2	2.1
EEUU**	161.8	116.4	1.8	0.8	21,2	15.9	12.0	6.6	4.2	53.2	27.2	17,9	4.5	2.3	3.3	2.0
Eslovaquia**	217.8	108.8	9.5	1.0	18.4	28.0	16.1	7.1	3.7	60.7	7.8	14.3	16.9	7.3	5.4	5.2
España **	176.1	85.0	3.9	0.8	18,1	17.3	11.1	5.4	3.2	49.4	4.2	15.0	12.6	6.2	2.7	2.4
Reino Unido**	171.0	128.0	1.8	0.8	26,8	18.7	13.8	4.9	3.3	48.6	21.1	18,5	10.1	4.8	3.9	1.7
Suecia**	137.9	104.0	1.3	0.7	17.5	14.4	11.5	5.1	3.3	22.6	12.6	27.3	7.4	4.0	2.9	2.0

*1997-2001 Ministerio de Salud Nación Argentina [300]

**2000 Jemal et al. [301]

Tabla 2: Tasa de mortalidad promedio por cáncer de todos los sitios del organismo para ambos sexos, en la provincia de Córdoba período 1975-2000 y porcentaje de cambio con respecto al primer período.

75-79	80-84	% cambio	85-89	% cambio	90-94	% cambio	95-00	% cambio
159,3	158,7	-0,38	169,7	6,53	169,8	6,6	169,8	6,6

Tabla 3: Número de defunciones por Cáncer Bucal. Relación sexo y edad según localización, provincia de Córdoba, período 1975-1996. **Códigos (CIE-9)**

Localización	Sexo Masculino		Sexo Femenino		M:F
	Nº defunciones. (%)	Edad Promedio \pm DS	Nº defunciones. (%)	Edad Promedio \pm DS	
Labio	45 (6,6%)	64 \pm 10	10 (6,1%)	73 \pm 12	4,5:1
Lengua	308 (45,2%)	60 \pm 9	60 (36,4%)	61 \pm 16	5:1
Gl. Salivales	155 (22,7%)	64 \pm 10	50 (30,3%)	64 \pm 15	3:1
Encía	15 (2,2%)	61 \pm 15	5 (3%)	57 \pm 10	3:1
Piso de boca	48 (7%)	58 \pm 11	11 (6,7%)	65 \pm 10	4:1
Otras localiz	111 (16,3%)	60 \pm 12	29 (17,6%)	65 \pm 12	4:1
Total	682 (100%)	61 \pm 11	165 (100%)	64 \pm 12	4:1

Tabla 4: Número de defunciones por tumores bucales. Relación sexo y edad según localización, provincia de Córdoba, período 1997-2000. **(CIE-10)**

Localización	Sexo Masculino		Sexo Femenino		M:F
	Nº defuncione (%)	Edad Promedic \pm DS	Nº defunciones (%)	Edad Promedic \pm DS	
Labio	7 (5,8%)	72 \pm 9	2 (5,3%)	84 \pm 12	3,5:1
Lengua	50 (41,7%)	61 \pm 11	19 (50%)	71 \pm 11	2,6:1
Parótida	23 (19,2%)	66 \pm 13	10 (26,3%)	73 \pm 10	2,3:1
Encía	-	-	-	-	-
Piso de boca	15 (12,5%)	61 \pm 11	3 (7,9%)	74 \pm 17	5:1
Otras localiz	10 (8,3%)	62 \pm 14	0	0	10:0
Paladar	15 (12,5%)	66 \pm 10	4 (10,5%)	74 \pm 8	3:1
Total	120 (100%)	65 \pm 11	38 (100%)	76 \pm 12	3:1

En las Tablas 3 y 4 se puede observar el número de defunciones por CB en la provincia de

Córdoba en el período 1975-2000. Sobre un total de 1005 defunciones en ambos sexos, la lengua fue el sitio más frecuente (43,5%), seguido de glándulas salivales mayores (23,7%). Al considerar la distribución de las defunciones por CB según sexo y edad, surge que en todas las localizaciones predominó el sexo masculino; no obstante en el período 1997-2000 la relación M: F se aproxima, en especial en lengua que pasó de 5:1 a 2,6:1.

En cuanto a la edad, el rango para todos los tumores bucales fue de 22 a 87 años, con una media de 59,5. Pueden observarse edades promedio más altas en el segundo período para todas las localizaciones en ambos sexos, especialmente en las mujeres y en labio. La edad promedio más baja en el primer período estudiado fue la de los tumores de piso de boca en hombres con 57,7 años y en mujeres con 57,5 años (tabla 3); mientras que en el segundo período las edades más bajas se registraron en lengua y piso de boca (tabla 4).

Se estudió el porcentaje de cambio de la tasa de mortalidad por CB específica por sexo en el período 1975-2000 (Fig.1). Puede observarse que en el sexo masculino se incrementó un 59% hasta el año 1995, para descender en el último período hasta un valor inferior al del primer período estudiado. En el sexo femenino se produjo un incremento gradual que llega al 77% en el período 95-2000 (tabla 5).

Tabla 5: Tasa de mortalidad promedio por cáncer bucal, específica por sexo, en la provincia de Córdoba período 1975-2000 y porcentaje de cambio con respecto al primer período.

Sexo	75-79	80-84	% cambio	85-89	% cambio	90-94	% cambio	95-00	% cambio
Masc.	2,10	2,41	14,8%	2,33	10,9%	3,34	59%	2,06	-1,9%
Fem.	0,39	0,54	38,5%	0,65	66,7%	0,58	48,7%	0,69	77%

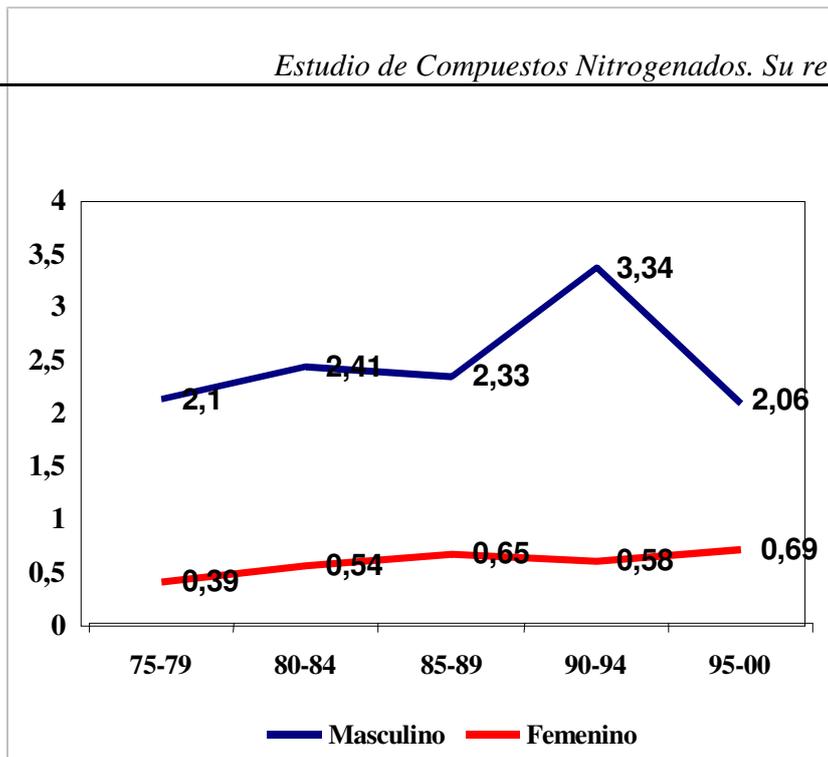


Fig. 1: Tasa de mortalidad por CB, según sexo, provincia de Córdoba, período 1975-2000 (cada 100 mil habitantes).

DISCUSION

Mientras la mortalidad por NM en todos los sitios en EEUU en el período 1992-98 disminuyó un 1,1% promedio por año [301], en Córdoba la tasa es superior a la de Argentina y se incrementó un 6,6% en el período 1975-2000 (tablas 1 y 2).

En el presente trabajo al hablar de CB, se consideraron los códigos C 140-145 de la CIE-9 siguiendo a Shiboski y col [302]. Al comparar con otros autores encontramos que Moore y col consideran sólo algunas localizaciones bucales Códigos 143-145 [294], otros incluyen orofaringe 141-146 [303], un importante número de autores estudiaron al cáncer bucal y faríngeo 140-149 [293, 295, 296, 299, 304-306] y por último están los que excluyen labio, glándulas salivales y naso e hipofaringe [307,308]. Esta diferencia en los formatos utilizados por los diferentes autores, dificulta la comparación con nuestros hallazgos.

La mortalidad por CB en hombres fue aumentando hasta 1994 donde llegó a ser un 59% superior a la tasa del período 1975-79. Este fenómeno es similar a lo observado en el cáncer orofaríngeo en algunos países de Europa como Ucrania, Estonia, Hungría y Rusia [295], sin embargo a partir de 1995 en Córdoba, se registró una disminución de la mortalidad hallazgo de difícil interpretación pero observado también en otras poblaciones como San Pablo, Brasil [305], Suiza, Suecia, Italia y Francia [293, 295].

La edad de los pacientes con CB fue superior en el último período estudiado (Tabla 3) lo

cual se corresponde con las observaciones realizadas por Su y col en Japón [306]. Esto probablemente se explique con lo que pronostica el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos INDEC [309] que considera que de continuar las actuales tendencias demográficas, el peso de la incidencia y mortalidad por cáncer en Argentina, continuará desplazándose hacia los grupos de mayor edad [310]. Esto se debe a que la esperanza de vida pasó de 68,44 a 69,55 años para los hombres y de 75,69 a 75,75 años para las mujeres en el período 1995-2000 [289]. La tendencia actual mencionada en Europa es el aumento de la incidencia de CB en adultos jóvenes, especialmente en la lengua [311-312]; debido a que no existen registros oficiales de incidencia de CB en nuestro país, no se ha podido correlacionar con dicha observación.

El CB es una enfermedad que afecta predominantemente el sexo masculino [313]; no obstante hay evidencias que las tendencias están cambiando y que hay un incremento de casos de cáncer orofaríngeo en mujeres de mediana edad, como se ha descrito en países del centro y este europeo (Eslovaquia, Bélgica, Grecia, y República Checa) en el período 1994-1999 [295]. En Córdoba, si bien la tasa es relativamente baja, puede observarse un incremento gradual que llega a ser en el período 95-2000 un 77% superior al primer período (tabla 5). Estas tendencias son probablemente un reflejo del cambio de hábitos tales como el fumar o beber alcohol, que se han incrementado en mujeres [295, 314-317]. En los últimos años en Argentina se detectó un aumento del consumo de alcohol y tabaco en ambos sexos, llegando de un 30 a un 50% en varones económicamente activos, destacando que es cada vez mayor el porcentaje de adolescentes que se inician en la adicción [318]; estos datos hacen suponer un incremento en la incidencia de las NM en un futuro próximo.

Al analizar las localizaciones del CB se observó que el de lengua en varones mayores de 50 años fue el más frecuente, lo cual es coincidente con la mayoría de los estudios [302, 303, 319, 320]. En el último período analizado (1995-2000) llama la atención el aumento de la tasa de mortalidad en mujeres en los tumores de labio donde la relación M: F pasó de 4,5:1 a 3,5:1 y en lengua de 5:1 a 2,6:1. El cáncer de labio es la NM más frecuente en la cavidad bucal, el tipo histológico predominante es el carcinoma a células escamosas, que representa un 95% de los casos [321]. La mayoría ocurre en semimucosa de labio inferior, en hombres blancos expuestos en forma crónica al sol y en general su pronóstico es bueno. Pero existen además otras NM que pueden asentar en labio como los adenocarcinomas que son más frecuentes en labio superior y en mujeres, cuyo pronóstico es más desfavorable que el carcinoma a células escamosas. En el presente trabajo se encontró que las NM de labio en hombres y mujeres representaron el 6,5% y el 6% del total de defunciones por CB

respectivamente (tablas 3 y 4). Debido a la imposibilidad de comparar estos datos con los de incidencia y tipo histológico, se podría adjudicar el alto porcentaje encontrado en mujeres al incremento en la exposición solar por cambio de hábitos y a una mayor prevalencia de adenocarcinomas como lo han observado otros autores [322]. Si bien un aumento en la incidencia no puede relacionarse directamente con el aumento de la mortalidad, llama la atención la baja tasa de mortalidad por NM de encía siendo ésta una de las localizaciones de más frecuente presentación; probablemente se deba a que dicho sitio sea incluido en la mayoría de los casos en la codificación de "otros sitios" [323-328].

La población de Argentina se estimó en 36 millones en el 2001, representando la urbana un 88,6% en 1996 [289]. Córdoba es una provincia mediterránea, de 3 millones de habitantes, que concentra un 50% de su población en la capital donde existen numerosas fábricas automotrices y metalúrgicas. A su vez en esta provincia hay regiones donde se consume agua con alto contenido de arsénico, lo que ha dado lugar al hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE) que predispone al cáncer de piel y de boca [329-330]. En la tabla 1 puede observarse que la mortalidad por cáncer en todos los sitios es mayor en Córdoba que en Argentina. Debido a que las diferencias en tasas de mortalidad entre períodos de tiempo y áreas geográficas, deberían interpretarse en términos de cambios en exposición a factores de riesgo [294]; sería de fundamental importancia profundizar los estudios de incidencia y mortalidad en nuestra provincia y relacionarla con los factores que puedan estar influyendo en la etiopatogenia del cáncer.

El CB es un serio problema de salud pública que causa gran morbilidad y mortalidad no habiendo mejorado en décadas. Su pronóstico depende fundamentalmente del diagnóstico precoz de lesiones sospechosas en boca, por lo cual es importante mantener adiestrados a los profesionales de la salud particularmente odontólogos y médicos para reducir las devastadoras consecuencias del CB en el mundo.

En relación a las conclusiones del estudio descripto con anterioridad y los datos de bajo porcentaje de sobrevida de nuestros pacientes, así como de la observación de que en un alto porcentaje los pacientes consultan en estadios avanzados, nos preguntamos cuál serían las principales causas de demora en el diagnóstico del cáncer bucal.

b- Demora en el diagnóstico de carcinoma a células escamosas en dos centros de diagnóstico de Córdoba, Argentina.

INTRODUCCIÓN

El estadio al momento del diagnóstico es el indicador de pronóstico más importante para el carcinoma a células escamosas bucal y bucofaríngeo. Desafortunadamente, cerca del 50% de dichos cánceres son identificados tardíamente (estadios III o IV) [331]. Si las lesiones son detectadas cuando son pequeñas, localizadas y tratadas expeditivamente, se pueden alcanzar tasas de sobrevida de entre el 70 y 90% [332]. Así, las posibilidades de curación dependen del tiempo transcurrido entre el primer síntoma y el inicio del tratamiento [333]. En diversas poblaciones se han estudiado la demora en la derivación y diagnóstico así como el rol del odontólogo y de los profesionales médicos en la detección del cáncer bucal [334-345], no habiendo datos de lo que ocurre en nuestro medio.

OBJETIVO

Investigar la demora en el diagnóstico del CB en pacientes concurrentes a dos servicios estomatológicos de la ciudad de Córdoba, Argentina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo de historias clínicas completas de pacientes con carcinoma a células escamosas bucal (CCE), que asistieron al servicio de Clínica Estomatológica B y al servicio de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas entre los años 1992 y 2004.

El examen clínico y el diagnóstico fue realizado por profesionales entrenados y supervisados por el profesor a cargo del servicio. Todos los pacientes firmaron el consentimiento antes de ser atendidos.

Se consignó: sexo, edad, signo o síntoma, primer profesional de la salud (PS) al que consultó y tratamiento indicado. El estadio al momento del diagnóstico fue clasificado de acuerdo a la versión 1997 de la “Union Internationale Contre le Cancer”- American Joint Committee on Cancer Classification- [344]. Los síntomas se clasificaron como: dolor, tumoración, ulceración, mancha blanca y desadaptación protética, entre otros. Los estadios III y IV fueron considerados como avanzados (EA) y I y II, como iniciales (EI) [345].

La demora en el diagnóstico del CB fue dividida, de acuerdo a estudios previos, en:

A-Demora atribuible al paciente: desde el primer signo o síntoma que notó el paciente hasta la 1ª consulta a un PS [340].

B-Demora del profesional: el período de tiempo transcurrido entre la primera consulta con un PS y con el especialista que hace la biopsia [340].

C-Demora del paciente y del profesional: el período de tiempo entre el diagnóstico definitivo y el inicio del tratamiento [346].

Más de 30 días en cualquier período (A, B o C) fue considerada como demora [340].

Se aplicaron los test de Wilcoxon (Mann Whitney U) y análisis de regresión logística múltiple, usando InfoStat/Professional versión 1,1.

RESULTADOS

Se incorporaron un total de 70 pacientes con diagnóstico de CCE, 6 (66%) fueron de sexo masculino, relación 1,9:1. El rango de edad fue de 25 a 93 años , media 59,9.

El tumor de localización más frecuente fue el de lengua, 37% (n=27). Todos los tumores localizados en encía, paladar duro, piso de boca y trigono retromolar fueron diagnosticados en estadios en EA. El 100% de los tumores de labio fueron diagnosticados en EI (tabla 1).

Tabla 1: Localización y estadios de los tumores al momento del diagnóstico.

Localización	%	n=73*	Estadio temprano (%)	Estadio tardío (%)
Lengua	37	27	38	62
Encía	11	8	-	100
Reborde	11	8	28	72
Piso	14	10	-	100
M.yugal	10	7	28	72
Trígono	4	3	-	100
Labio	5	4	100	-
Paladar	8	6	-	100

*Tres de los pacientes tuvieron CCE de más de una localización.

El dolor fue el primer signo y síntoma, n=27 (38,5%), como lo muestra la Tabla 2. El primer PS consultado fue el odontólogo, 30 pacientes (41,4%), seguido del médico clínico, 21 pacientes (30%). El 80% de los pacientes recibió alguna indicación de tratamiento, siendo polimedicados el 30% de ellos; se indicaron colutorios en el 26% de los casos y antibióticos y antiinflamatorios en el 20%. Sólo 4 pacientes (6%) recibió la indicación de biopsia en la primera consulta (Tabla 3). Las tablas 4 y 5 muestran los datos correspondientes a las demoras A y B respectivamente clasificadas por estadios, 40 pacientes (58%) tuvieron demora A y 44 (64%), demora B.

Tabla 2: Síntoma o signo que lo llevó a consultar a un profesional de la salud.

Síntomas más frecuentes	%	n
Dolor	38	27
Tumor	11	8
Ulcera	11	8
Sangrado	7	5
Ardor	7	5
Mancha	4	3
Desadaptación protética	6	4
Endurecimiento	3	2
Mov. dentaria	3	2
Dificultad en el habla	1	1
Sin síntomas	7	5

Tabla 3: Medicación y/o conducta clínica adoptada en la primera consulta.

Medicación indicada(en la primera consulta)	n (%)
Colutorios	18 (26)
Antibiótico-otros	14 (20)
Antibiótico únicamente	4 (6)
Analgésicos-antiinflamatorio	14 (20)
Antifúngico	6 (8,5)
Tratamiento tópico	10 (14)
Automedicado	5 (7)
Polimedicado	21(30)
Exodoncia	7 (10)
Adaptación protética	8 (11)
Biopsia	4 (6)
Ninguno	14 (20)
sin datos	6 (8,5)

Tabla 4: Demora A (del paciente) en relación al estadio.

	<30 días n (%)	30-60 días n (%)	60-120 días n (%)	>120 días n(%)	Demora total n(%)
E I y II	6 (32)	2 (10)	3 (16)	8 (42)	13 (68)
E III y IV*	23 (46)	12 (24)	8 (16)	7 (14)	27 (54)*
Total	29 (42)	14 (20)	11 (16)	15 (21)	40 (58)

*en 1 paciente se desconoce demora.

En E I: 69% y en E A: 53% de los pacientes demoraron en consultar.

Tabla 5: Demora B (del PS) en relación al estadio.

	<30 días n (%)	30-60 días n (%)	60-120 días n (%)	>120 días n (%)	Demora total n (%)
E I y II	5 (28)	4 (22)	-	9 (50)	13 (72)*
E III y IV	20 (39)	6 (12)	18 (35)	7 (14)	31 (61)
Total	25 (36)	10 (14)	18 (26)	16 (23)	44 (64)

En ambos casos, la demora fue más importante en los EI, especialmente en los profesionales; estos resultados se muestran en la Figura 1.

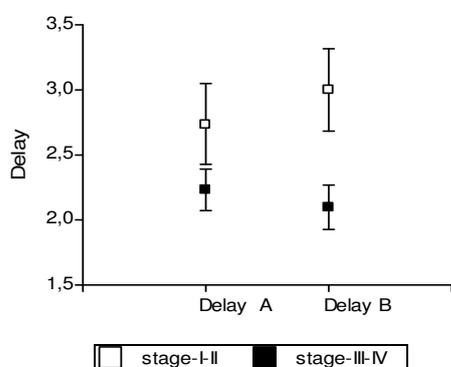


Figura 1: Demora del paciente y del profesional de acuerdo al estadio.

Por otra parte, el promedio de demora A en días fue 77,5 en mujeres y 67,8 en hombres. La demora B fue: 70,4 días en mujeres, y 62,6 en hombres. Solamente el 22% de los pacientes tuvieron demora C, la cual fue ligeramente mayor en estadios avanzados (23%) (Tabla 6). Cuando se aplicó el análisis de regresión logística, la demora del profesional ($p=0.03$) fue la variable más relacionada al estadio al momento del diagnóstico (Tabla 7). El sexo, la edad y el sitio del tumor, no estuvieron relacionados al estadio al momento del diagnóstico de CCE bucal.

Tabla 6: demora C (paciente y PS) relacionada al estadio del tumor.

	<30 días n(%)	30-60 días n(%)	60-120 días n(%)	>120 días n(%)	Demora total n(%)
E I y II	12 (64)	2 (13)	1 (7)	-	3 (20) ^a
E III y IV	37 (77)	6 (13)	2 (4)	3 (6)	11 (23) ^b
Total	49 (78)	8 (12)	3 (5)	3 (5)	14 (22)

^a En cuatro pacientes se desconocía la demora C. ^b En tres pacientes se desconocía la demora C.

Tabla 7: Relación entre edad, sexo, localización del cáncer y demora A y B. Análisis de Regresión logística multivariado.

Predictor	Coficiente	EE	Odd	LI	LS	p
Edad	-0,01	0,02	0,99	0,95	1,03	0,58
Sexo	-0,17	0,64	0,84	0,24	2,96	0,79
Localización	-0,17	0,12	0,84	0,66	1,08	0,14
Tratamiento	0,21	0,22	1,23	0,80	1,88	0,35
Demora A	0,27	0,24	1,31	0,81	2,11	0,27
Demora B	0,48	0,22	1,62	1,04	2,51	0,03

DISCUSIÓN

Las tasas de mortalidad por tumores malignos de todo el organismo se incrementó en ambos sexos un 6,6% entre 1975 y 2000 en Córdoba, Argentina. En relación al CB se registró un incremento del 59% en hombres hasta 1995, y disminuyó en el último período hasta un valor inferior al del primer período estudiado (1975-1980); en mujeres, el incremento fue gradual, llegando a un 77% [347]⁽¹⁷⁾. En el servicio de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas de la ciudad de Córdoba, la tasa de supervivencia promedio a cinco años en pacientes con CB, fue de 22% cuando fueron diagnosticados en estadios avanzados (III y IV) y 78% en EI (I y A) [348]⁽¹⁸⁾, indicando la importancia de la detección temprana y tratamiento precoz del CB en la mejora del pronóstico. Desafortunadamente es común la demora a partir de la aparición de los síntomas hasta la biopsia y la mayoría de los casos son diagnosticados tarde. Estas consideraciones nos llevaron a investigar la demora diagnóstica en el CB en Córdoba.

Diversos autores han estudiado este problema tratando de determinar quién puede ser más responsable de la demora, como puede verse en la tabla 8.

En nuestro estudio 61% de la población analizada tuvo demora en el diagnóstico (A y B) de más de 30 días. Un estudio llevado a cabo en Grecia, reportó similares resultados donde el 52% de los pacientes tuvo más de tres semanas de demora [349].

Jovanovic y col. (1992) en los Países Bajos reportan una media de 46 días [334] de demora; en Canadá [350] e Italia [351] fue de 3 meses hasta el diagnóstico y de 4 meses en Finlandia [352], Dinamarca [337] e Israel [336]. Si bien nuestros resultados fueron más favorables que aquellos de las mencionadas poblaciones, la proporción de pacientes con demora todavía se mantuvo considerablemente alta.

Según nuestros resultados, el tiempo transcurrido entre el primer síntoma y la consulta con un PS (demora A) fue de 2,5 meses en mujeres y 2,3 en hombres, mientras Onizawa y col en Japón reportaron 1,6 meses [341]. El porcentaje de pacientes con demora A en Córdoba de más de un mes (58%), fue similar al valor encontrado por Jovanovic et al. (53,7 %) [334] y más bajos que los de Pinholt y col (92%) [353].

Debe considerarse que existen limitaciones para esta investigación, tal como la posibilidad de que los pacientes no registren correctamente la aparición de los síntomas. Wildt y col sugieren que la información acerca del tiempo de aparición del primer síntoma es imprecisa [337]. El dolor fue el primer signo o síntoma más común, pero más de la mitad de los pacientes no consultaron a un PS hasta después de un mes de la aparición de los síntomas. Onizawa y col

consideran que los síntomas pueden no ser lo suficientemente molestos o importantes como para requerir tratamiento profesional [341]. El tiempo transcurrido entre el primer síntoma y el diagnóstico fue mayor en las mujeres que en los hombres en nuestra población de estudio (77 y 68 días respectivamente). Wildt y col informaron resultados similares [337]. En el presente trabajo, observamos que el 100% de los cánceres de labio y el 38% de las lesiones de lengua

Tabla 8: Responsabilidad de la demora en el diagnóstico del CB según diferentes autores

País	Año	Autor	n=	Demora
1992	Holanda	Jovanovic et al.	50	paciente
1992	Australia	Dimitroulis et al.	51	paciente
1994	Brasil	Kowalski et al.	334	profesional
1995	Israel	Gorsky et al.	543	profesional
1995	Dinamarca	Wildt et al.	167	paciente
1998	Malasia	Khoo et al.	65	paciente
1998	Canadá	Allison et al.	188	profesional
2001	Tailandia	Kerdpon et al.	161	paciente
2001	Brasil	Kowalski et al.	69	profesional
2003	Japón	Onizawa et al.	152	profesional
2005	Irlanda	O'Sullivan et al.	370	profesional
2005	Holanda	Tromp et al.	306	paciente

fueron diagnosticados en estadios iniciales (EI) (Tabla1), mientras que Gorsky y col en Israel encuentran el 82% en labio y 58% de los tumores de lengua en el E I [336].

Nuestros hallazgos acerca de que no hubo asociación significativa entre demora del paciente (A) y edad, sexo, localización y estadio, acuerda con reportes previos [334, 335, 337, 340, 354].

La demora del profesional (B), fue la variable más relacionada al estadio en el momento del diagnóstico en nuestro estudio. Onizawa y col informaron resultados similares,

indicando que los odontólogos fueron una de las variables más significativas relacionadas al segundo paso en la demora [341]. Como puede verse en la figura 1, la demora B fue más importante en los

estadios iniciales. Si bien el primer profesional consultado fue el odontólogo (42.8%), solamente el 6% de los pacientes recibieron indicación de biopsia y en lugar de ello 80% fue medicado. En Tailandia 32,3% fueron biopsiados y 28,6% fueron medicados [340].

Los médicos principalmente prescribieron diversa medicación mientras que lo más común entre los odontólogos fue adoptar una conducta más mecánica, efectuando extracciones dentarias o adaptando las prótesis [340] y tienden a ser más lentos en sospechar malignidad.

Considerando que el estadio al momento del diagnóstico tiene un valor pronóstico muy importante y que nuestro estudio revela que la demora B fue más importante en EI (Figura 1), es un desafío de los profesionales entrenarse en el examen bucal para detectar lesiones precancerosas y las primeras manifestaciones clínicas del CB. La instrucción del profesional al paciente debe incluir datos precisos acerca del canal de derivación más directo que pueda ayudar a reducir la demora profesional.

En relación al último paso (demora C) no encontramos asociación entre estadio y el momento de inicio del tratamiento. En relación a este hecho, Kowalski y col informaron que 94.3% de las demoras en iniciar el tratamiento fueron debidas a reticencias del paciente o problemas en el sistema de salud [346].

Si bien el CB se presenta en una parte del organismo que es fácilmente accesible para la detección temprana, la mayoría de las lesiones no son diagnosticadas hasta que alcanzan un estadio avanzado [355]. Los hallazgos del presente trabajo también indican que los pacientes son responsables en la demora del diagnóstico del CB. Es necesaria una intensa promoción pública y campañas educativas destinadas a crear mayor conciencia en la población, focalizando inicialmente en la importancia de hábitos como el de consumo de tabaco y alcohol, los cuales incrementan el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Conclusiones

El Cáncer Bucal es multifactorial y de pronóstico reservado; los factores etiológicos más relacionados son los ambientales y dentro de éstos los carcinógenos químicos adquieren mayor relevancia. El tabaco y el alcohol son los más extensamente estudiados y otros se proponen más recientemente, como la alimentación, la mala higiene, el trauma y la inflamación, todos éstos relacionados con los compuestos nitrogenados, que requieren de mayor profundización.

Cuando se determinó la concentración de dichos compuestos en saliva, se pudo observar que existe una gran influencia de la matriz y de la química de los nitratos y nitritos en las condiciones de almacenamiento y procesado, siendo conveniente extraer la muestra a las 8:30h, a todos los pacientes a la misma hora y procesadas inmediatamente, y de no ser posible guardarlas hasta una semana en freezer de -37°C. En el análisis de las condiciones preanalíticas, cuando se evaluaron las variaciones individuales, éstas mostraron una aparente estabilidad de los valores de nitritos salivales en cada sujeto y una relación constante nitrato/nitrito, por lo que su determinación sería útil para el seguimiento de pacientes en estudios de cohorte, particularmente en aquellos de riesgo.

Por otra parte, la iNOS, enzima estrechamente vinculada a procesos inflamatorios y carcinogénesis, mostró una marcada positividad en el epitelio del tumor ($p=0,002$) y en la zona sana cercana al mismo, por lo que creemos que sería un marcador IHQ importante asociado a cambios epiteliales premalignos.

Si bien la tasa de mortalidad por cáncer bucal en la provincia de Córdoba, es relativamente baja, puede observarse un incremento gradual que llega a ser en el período 95-2000, en el sexo femenino un 77% superior al primer período.

A pesar de encontrarse en una localización que es rápidamente accesible para el diagnóstico, la mayoría de las veces el CB es diagnosticado cuando las lesiones alcanzan estadios avanzados. En nuestro análisis de la situación efectuado en dos centros de diagnóstico de la ciudad de Córdoba, apenas 4 pacientes (6%) recibieron indicación de biopsia en la primera consulta y la variable más relacionada al estadio al momento del diagnóstico, fue la atribuida al profesional quien se demoró más en los estadios tempranos. La formación de los profesionales de la salud a través de programas para el diagnóstico precoz del cáncer bucal, se hace indispensable en nuestro medio. El 58% de los pacientes consultaron después del mes de aparición del primer síntoma lo que indica que son parcialmente responsables de la demora en el diagnóstico del cáncer bucal. Estos hallazgos evidencian la necesidad de desarrollar campañas de educación para la salud de la población, que

junto a una adecuada capacitación de los profesionales facilitará la aplicación de medidas preventivas y como consecuencia un mejor pronóstico de los pacientes afectados.

Resumen

El cáncer bucal (CB) es multifactorial, muchos de los factores de riesgo han sido extensamente estudiados como el consumo de tabaco y alcohol; si embargo el aumento en el número de casos a nivel mundial y la aparición de algunos (cánceres) no asociados a dichos factores, hacen necesaria la búsqueda de nuevos agentes. Los compuestos nitrogenados están relacionados con la alimentación, la mala higiene bucal y la inflamación, factores éstos que se encuentran en estudio en los últimos años. El Nitrito (NO_2^-) y el óxido nítrico, formado por la vía de la óxido-nítrico sintetasa (ONS), se involucran en la formación de nitrosaminas y en la progresión y diseminación de tumores. Diversos estudios sugieren que ONS inducible (iNOS) puede estar ligada a la carcinogénesis.

El Objetivo del presente trabajo fue estudiar la concentración de nitritos en saliva y en la mucosa bucal de pacientes con CB y relacionarla con la presencia de diferentes factores carcinogénicos.

Material y métodos: el grupo de estudio estuvo constituido por 18 (dieciocho) pacientes con diagnóstico de carcinoma a células escamosas bucal (CA), y 11 (once) del grupo control (C) con pacientes con lesiones hiperplásicas simples, que requerían extirpación quirúrgica. Se recolectó saliva en ayunas y se tomó material para biopsia de la zona central de la lesión (A) y del margen circundante (C). La concentración salival de NO_2^- se efectuó por el método de Griess. Se determinó la presencia de la iNOS mediante Inmunohistoquímica (IHQ).

Resultados: Ajustando variables como: horario de recolección, temperatura de almacenamiento y momento de procesado, los valores de estos compuestos se mantuvieron estables en el mismo sujeto siendo mayores las variaciones interindividuales. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en la concentración salival de NO_2^- entre CA y C. Se encontró una tendencia de asociación entre la edad (OR=1,93), la alimentación (OR=4,08), la candidiasis (OR=2,33), el consumo de tabaco (OR=2,25) y los niveles salivales de nitrito según el OR. En las muestras de tejido el 71% de los pacientes CA tuvieron presencia de iNOS en la zona A ($p= 0.002$ OR= 40 IC 95%: 1.9 - 845) y 54,5% en la zona C ($p= 0.06$ OR= 11 IC 95%: 1-117). En el grupo Control, ningún paciente tuvo la enzima en el epitelio de la lesión.

Conclusiones: La presencia de iNOS en el tumor y en el epitelio que lo rodea, así como la tendencia a un incremento de los niveles salivales de nitrito en relación con la edad, la alimentación, la candidiasis bucal y el consumo de tabaco, significan un aporte al estudio etiopatogénico del cáncer bucal, que requiere de nuevos trabajos en dicha línea para obtener resultados aplicables a su prevención.

Summary

Oral cancer (OC) is a multifactorial disease; although many risk factors have been extensively described, including tobacco use and alcohol consumption, many others need yet to be unraveled. Among these risk factors, nitroso compounds have been suggested to be linked to carcinogenesis. In recent studies, they have also been related to diet, poor dental hygiene and inflammation. Nitrite (NO_2^-) and nitric oxide, formed through the nitric oxide synthetase (NOS), are involved in the formation of nitrosamines and in the progression and dissemination of tumors. Several studies suggest that inducible NOS (iNOS) could also be linked to carcinogenesis. The aim of this study was to document the saliva nitrite concentration and the presence of iNOS in oral tissues of patients with OC and to establish its relationship with other carcinogenic factors. Patients and methods: the study population was composed by 18 patients with diagnosis of oral squamous cell carcinoma (CA) and a control group (C) of 11 patients with non-malignant hyperplastic lesions who underwent surgical eradication. The fasting NO_2^- saliva concentration and the presence of iNOS in biopsies [central zone of the lesions (A) and surrounding margin (C)] were determined by the Griess's method and immunohistochemical analyses, respectively. Results: After adjusting for variables such as collection time, storage temperature and processing moment, the saliva NO_2^- concentration was stable in the same individual; however, it showed a great interindividual variation. No association was found between the NO_2^- salivary concentration and the patients' diagnosis; however, there was a tendency towards an association between the NO_2^- salivary concentration with age (OR=1,93), diet (OR=4,08), oral candidiasis (OR=2,33) and tobacco use (OR=2,25). Seventy one percent of patients with CA had iNOS in zone A (OR = 40, IC 95% 1.9 – 845; p = 0.002) and 54.5% in zone C (OR = 11, IC 95% 1-117; p = 0,06); however, no patient from group Control had this enzyme in their lesions. Conclusions: The presence of iNOS in the tumor and in the surrounding epithelium of OC found in this study may suggest that this enzyme may be added to the list of pathogenic factors modulating this disease. Another important finding of this study is the influence age, diet, oral candidiasis and tobacco use may have in the saliva nitrite concentrations. Owing that the important preventive implications these findings may have in OC, more studies in this field are warranted before making any definitive conclusion.

Bibliografía

- 1- Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ: Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of diseases 2000. *BMC Cancer* 26-12-2002; 2:37.
- 2- Globocan 2002. Disponible en <http://www-dep.iarc.fr>.
- 3- Boyd NM, Reade PC. Factors associated with the development of neoplasia. *J Oral Pathol* 1988; 17: 202-207.
- 4- Pérez MA, Raimondi AR, Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med* 2005;34:17-22.
- 5- Liotta LA, Kleinerman J, Saidel G. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastasis. *Cancer Res* 1974; 34: 977.
- 6- Hart IR, Fidler IJ: Cancer invasion and metastasis. *Q Rev Biol* 1980; 55: 121-1.
- 7- Hart IR, Fidler IJ: The implications of tumor heterogeneity for studies on the biology of cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta* 31-8-1981; 651:37-50.
- 8- De Vita V, Hellman S, Rosenberg S. Etiology of cancer: Chemical Factors. In: *Cancer: Principles and Practices of Oncology*. J Paine (ed.), 2005; 7: 97-128.
- 9- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995; 1:27.
- 10- Kerbel RS, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:727.
- 11- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671.
- 12- Bologna M, Sukumar. *Kaleidoscope N° 3: The oncogenes*. S. Rassu ed., Genova, Italy. 1993: 3-96.
- 13- Stehelin D: The transforming gene of avian tumor viruses. *Pathol Biol (Paris)* 1976; 24: 513-515.
- 14- Bishop JM: Viral oncogenes. *Cell* 1985; 42: 23-38.
- 15- Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991; 64: 249-270.
- 16- Bishop JM: The molecular genetics of cancer. *Science* 16-1-1987; 235:305-311.
- 17- Van D V, Nusse R. The molecular biology of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072:33-50.
- 18- Sinn E, Muller W, Pattengale P, Tepler I, Wallace R, Leder P: Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell*

22-5-1987; 49:465-475.

19- Sharp PA. Gene regulation and oncogenes. AACR special conference in cancer research. Cancer Res 15-4-1989; 49:2188-2194.

20- Hansen MF, Cavenee WK: Tumor suppressors: recessive mutations that lead to cancer. Cell 1988; 53: 173-174.

21-Weinberg RA: Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res 15-7-1989; 49: 3713-3721.

22- Szekely L, Uzvolgyi E, Jiang WQ, Durko M, Wiman KG, Klein G, Sumegi J. Subcellular localization of the retinoblastoma protein. Cell Growth Differ 1991; 2:287-295.

23- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature 7-12-1989; 342: 705-708.

24-Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. J Natl Cancer Inst 1999; 91:675.

25- Weinstein IB, Horowitz AD, Fisher PB, Ivanovic V, Gattoni-Celli S, Kirschmeier P. Mechanisms of multistage carcinogenesis and their relevance to tumor cell heterogeneity. En: tumor cell heterogeneity: origins and implications. Owens AH, ed. Academic Press, New York. 1982 : 261.

26- Weston A, Harris CC. Chemical carcinogenesis. In: Holland JF, Frei E, Bast R, et al., eds. Cancer medicine, 6th ed. Ontario: BC Decker, Inc., 2003:267.

27-Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. J Natl Cancer Inst 1999; 91:1194.

28-Sporn MB, Suh N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. Nat Rev Cancer 2002; 2:537.

29-U.S.Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. Report on carcinogens, 10th ed. World Wide Web URL: <http://ehp.niehs.nih.gov/roc/toc10.html>, 2004.

30-Dipple A. DNA adducts of chemical carcinogens. Carcinogenesis 1995; 16:437.

31-Yuspa SH, Poirier MC. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. Adv Cancer Res 1988; 50:25.

32-Gulezian D, Jacobson-Kram D, McCullough CB, et al. Use of transgenic animals for carcinogenicity testing: considerations and implications for risk assessment. Toxicol Pathol 2000;

28:482.

33- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

34- Schulte-Hermann R, Grasl-Kraupp B, Bursch W: Tumor development and apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 363-367.

35- Slaga TJ: Cellular and molecular mechanisms involved in multistage skin carcinogenesis. *Carcinog Compr Surv* 1989;11:1-18.

36- Prasad NK. Radiation carcinogenesis: tissue culture model. En: *Handbook of radiobiology*. Prasad K, ed.p 239.

37- Slaga TJ, Fischer SM, Weeks CE, Nelson K, Mamrack M, Klein-Szanto AJ: Specificity and mechanism(s) of promoter inhibitors in multistage promotion. *Carcinog Compr Surv* 1982; 7: 19-34.

38- Miller EC, Miller JA: Hepatocarcinogenesis by chemicals. *Prog Liver Dis* 1976; 5:699-711.

39- Berenblum I. Sequential aspects of chemical carcinogenesis. En: *Cancer: a comprehensive treatise*. Becker FF, ed. Plenum Press, New York, 2nd (1982). ed.,vol 1, p451.

40- Hecker E, Fusenig NE, Kunz W, Marks F, Thielann HW, eds. *Carcinogenesis: A comprehensive survey*, vol 7. (1982). Raven Press, New York.

41- Slaga TJ, Klein-Szanto AJ, Triplett LL, Yotti LP, Trosko KE: Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound. *Science* 1981; 213:1023-1025.

42- Deleers M, Malaisse WJ: Influence of phorbol esters on ionophore-mediated calcium exchange-diffusion in liposomes. *Chem Phys Lipids* 1982; 31:1-11.

43- Tran PL, Ter-Minassian-Saraga L, Madelmont G, Castagna M. Tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate alters state, fluidity and hydration of 1,2-diacyl-sn glycerol-3-phosphocholine bilayers. *Biochim Biophys Acta* 5-1-1983; 727:31-38.

44- Loewenstein WR: Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 1981; 61: 829-913.

45-Trosko JE, Yotti LP, Warren ST, Tsushimoto G, Chang C: Inhibition of cell-cell communication by tumor promoters. *Carcinog Compr Surv* 1982;7: 565-585.

46- Enomoto T, Sasaki Y, Shiba Y, Kanno Y, Yamasaki H: Tumor promoters cause a rapid and reversible inhibition of the formation and maintenance of electrical cell coupling in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78: 5628-5632.

47- Varshavsky A: Phorbol ester dramatically increases incidence of methotrexate resistant

mouse cells: possible mechanisms and relevance to tumor promotion. *Cell* 1981; 25: 561-572.

48- Parry JM, Parry EM, Barrett JC: Tumour promoters induce mitotic aneuploidy in yeast. *Nature* 19-11-1981; 294: 263-265.

49- Fisher PB, Dorsch-Hasler K, Weinstein IB, Ginsberg HS: Tumour promoters enhance anchorage-independent growth of adenovirus-transformed cells without altering the integration pattern of viral sequences. *Nature* 18-10-1979; 281: 591-594.

50- Colburn NH, Former BF, Nelson KA, Yuspa SH: Tumour promoter induces anchorage independence irreversibly. *Nature* 18-10-1979;281: 589-591.

51- Kinsella AR, Radman M. Tumor promoter induces sister chromatid exchanges: relevance to mechanisms of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75:6149-6153.

52- Hill AB. The environment and disease: association or causation. *Proc R Soc Med* 1965; 58:295.

53- Figuero-Ruiz E, Carretero-Peláez MA, Cerero-Lapiedra R, Esparza-Gómez GC, Moreno-López LA. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. *Med Oral* 2004; 9: 14-23.

54- Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk et al. Smoking, alcohol, diet, dentition, and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *European J of Cancer Prevention* 2003; 12: 25-33.

55- Marshall JR, Graham S, Haughey BP, Shedd D, O'Shea R, Brasure J, Wilkinson GS, West D. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1992; 28B, 1: 9-15.

56- Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzalez-Hernández MJ, Dominguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case control study in Madrid Spain. *Oral Oncol* 2000; 36: 170-174.

57- Bundgaard T, Wildt J, Elbrondt O. Oral squamous cell cancer in non users of tobacco and alcohol. *Clin Otolaryngol.* 1994; 19: 320-326.

58- Wey PD, Lotz MJ, Tiedman LJ. Oral cancer in women nonusers of tobacco and alcohol. *Cancer* 1987; 60: 1644-1650.

59- Lockhart PB, Norris CM, Pullian C. Dental factors in the genesis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol* 1998; 34: 133-139.

60- Velly AM, Franco EL, Schlecht N, Pintos J, Kowalski LP, Oliveira BV Curado MP.

Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 1998; 34: 284-291.

61- Maier H, Zöller J, Herrmann A, Kreiss M, Heller W-D. Dental status and oral hygiene inpatients with head and neck cancer. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1993; 108: 655-61.

62- Orbak R, Bayraktar, Kavrut F, Gündogdu C. Poor oral hygiene and dental trauma as precipitating factors of squamous cell carcinoma. *Oral Oncol EXTRA* 2005; 41: 109-113.

63- Talamini R, Vaccarella S, Barbone F, Tavani A, La Vecchia C, Herrero R, Muñoz N and Franceschi S. Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *Br J Cancer* 2000; 83: 1238-1242.

64- Zheng TZ, Boyle P, Hu HF, Duan J, Jian PJ, Ma DQ, et al. Dentition, oral hygiene and risk of oral cancer: a case control study in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Causes Control* 1990; 1: 235-241.

65- Kabat GC, Herbert JR, Wynder EL. Risk factors for oral cancer in women. *Cancer Res* 1989; 49: 2803-2806.

66- Mandard AM Marnay J, Helie H, Tuyns AJ, LeTalaer YL. Absence of effect of ethanol and apple brandy on the upper digestive tract and oesophagus of the wistar rat: part of research project to assess etiological factors of cancer of the oesophagus in the west of France. *Bulletin Cancer* 1981; 68: 49-59.

67- Woods KV, Shillitoe EJ, Spitz MR. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22:101-108.

68- Abdelsayed RA: Study of human papillomavirus in oral epithelial dysplasia and epidermoid carcinoma in the absence of tobacco and alcohol use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71:730-732.

69-Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, Herrero R, Coutlee F, Franco EL: Human papillomavirus infection and oral cancer: A case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol* 26-4-2007.

70- Miller CS, Jhonstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 622-635.

71- Park NH, Byung MM, Sheng LL. Role of viruses in oral carcinogenesis. Bethesda M Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of 1992. NIH publication N° 92:3461.

- 72- Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004, 33: 71-74.
- 73-Williamson DM: Chronic hyperplastic candidiasis and squamous carcinoma. *Br J Dermatol* 1969;81:125-127.
- 74-Pintos J, Franco EL, Oliveira BV, Kowalski LP, Curado MP, Dewar R: Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. *Epidemiology* 1994; 5:583-590.
- 75-De Stefani E, Correa P, Oreggia F, Deneo-Pellegrini H, Fernandez G, Zavala D, Carzoglio J, Leiva J, Fontham E, Rivero S: Black tobacco, wine and mate in oropharyngeal cancer. A case-control study from Uruguay. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1988; 36:389-394.
- 76-Chyou PH; Nomura AM, Stemmermann GN. Diet, alcohol, smoking and cancer of the upper aerodigestive tract: a prospective study among Hawaii Japanese men. *Int J Cancer* 3-3-1995; 60:616-621.
- 77-Rogers M, Vaughan T, Davis S, Thomas D. Consumption of Nitrate, Nitrite and Nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer. *Cancer-Ep-Biom-Prev* 1995; 4:29-36.
- 78-Du, X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. J Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *Oral Pathol Med* 1999; 29: 80-5.
- 79-Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J, Merletti F, Boyle P: Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B :181-187.
- 80-Hoffmann D, Hecht SS: Nicotine-derived N-nitrosamines and tobacco-related cancer: current status and future directions. *Cancer Res* 1985;45 :935-944.
- 81-Schuster GS; Lubas S; Erbland JF; Singh BB: Binding and uptake of nitrosornicotine by oral epithelial cells. *J. Oral Pathol Med* 1990; 19:114-8.
- 82-Hoffmann D, Hoffmann I. Tobacco consumption and lung cancer. *Cancer-Treat-Res.* 1995; 72:1-42.
- 83-Anderson G, Björnberg G, Curvall M: Oral mucosal changes and nicotine disposition in users of smokeless tobacco products: a comparative study. *J Oral Pathol Med* 1994, 23: 161-167.
- 84-Squier CA, Johnson GK. Role of nicotine as cofactor in smokeless tobacco carcinogenesis. In: *Smokeless tobacco or health: an international perspective.* U.S.Dept. of Health and Human

Services, NIH Publication N°93-3461, 1992; 153-47.

85-Chen YP, Johnson GK, Squier CA: Effects of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on hamster cheek pouch and gastric mucosa. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 251-255.

86-IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol Drinking, Vol 44. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1988.

87-Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1-6-1988; 48: 3282-3287.

88-Kato I, Nomura AM, Stemmermann GN, Chyou PH: Prospective study of the association of alcohol with cancer of the upper aerodigestive tract and other sites. *Cancer Causes Control* 1992;3: 145-151.

89-Siegel IA, Gordon HP: Surfactant-induced alterations of permeability of rabbit oral mucosa in vitro. *Exp Mol Pathol* 1986; 44:132-137.

90-Harris D, Robinson JR. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *J Pharm Sci* 1992; 81: 1-10.

91-Day GL, Blot WJ, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Jr.: Carcinogenic risk of dark vs. light liquor. *Int J Cancer* 1-11-1994;59:319-321.

92-Franceschi S, Talamini R, Barra S, Baron AE, Negri E, Bidoli E, Serraino D, La Vecchia C. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res* 1990; 50:6502-6507.

93-Lesch CA, Squier CA, Cruchley A, Williams DM, Speight P. The permeability of human oral mucosa and skin to water. *J Dent Res* 1989; 68:1345-9.

94-Wertz PW, Swartzendruber DC, Squier CA. regional Variation in the structure and permeability of oral mucosa and skin. *Adv Drug Delivery Rev* 1993; 12:1-12.

95-Bronaugh RL, Stewart RF. Methods for in vitro percutaneous absorption studies. III. Hydrophobic compounds. *J Pharm Sci* 1984; 73: 1255-7.

96-Franceschi S, Barra S, La Vecchia C, Bidoli E, Negri E, Talamini R. Risk factors for cancer of the tongue and the mouth. A case-control study from northern Italy. *Cancer* 1992; 70:2227-33.

97-Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der W, I: Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22:459-462.

- 98-Zain RB: Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer--a brief overview. *Oral Oncol* 2001; 37: 205-210.
- 99-Slaughter, DP, Southwick, HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer* 1953; 6: 963-968.
- 100-Cooper MP, Braakhuis BJ, de Vries N, van Dongen G, Nauta J, Snow G. A panel of biomarkers of carcinogenesis of the upper aerodigestive tract as potential intermediate endpoints in chemoprevention trials. *Cancer* 1993; 71: 825-830.
- 101- Grinspan D. Lesiones Cancerizables. En: enfermedades de la boca: tumores primera parte. Tomo 4. Ed. Mundi. Bs As. Argentina 1982: 2737.
- 102-Krogh P, Hald B, Holmstrup P. Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine 1987;8 :1543-8.
- 103-Krogh P. The role of yeasts in oral cancer by means of endogenous nitrosation. *Acta Odontol Scand* 1990;48:85-88.
- 104-Silverman S Jr, Sugerman PB. Oral premalignancies and squamous cell carcinoma. *Clin Dermatol* 2000;18: 563-568.
- 105-Sinn E, Wang Z, Kovelman R, Roeder RG: Cloning and characterization of a TFIIC2 subunit (TFIIC beta) whose presence correlates with activation of RNA polymerase III-mediated transcription by adenovirus E1A expression and serum factors. *Genes Dev* 15-3-1995;9: 675-685.
- 106- Park NH, Dokko H, Li SL, Cherrick HM. Synergism of herpes simplex virus and tobacco-specific N'-nitrosamines in cell transformation. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49: 276-281.
- 107- Deeb ZE, Fox LA, deFries HO: The association of chronic inflammatory disease in lichen planus with cancer of the oral cavity. *Am J Otolaryngol* 1989; 10:314-316
- 108-Goaz PW, Biswell HS. Nitrate reduction in whole saliva. *J Dent Res* 1961; 40:355.
- 109-Ishiwata H, Boriboon P, Harada M, Tanimura A, Ishidate M. Changes of nitrite and nitrate concentration in incubated human saliva. *J Food Hyg Soc Jpn.* 1975; 16:93-98.
- 110- Tannenbaum SR, Sinskey AJ, Weisman M, Bishop W: Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53: 79-84.
- 111-Vogelmann R, Amieva MR: The role of bacterial pathogens in cancer. *Curr Opin Microbiol* 2007;10: 76-81
- 112-Morson BC: Precancer and cancer in inflammatory bowel disease. *Pathology* 1985;17: 173-180

- 113-Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO: Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1-11-1990;323: 1228-1233.
- 114-Choi PM, Zelig MP: Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention. *Gut* 1994;35: 950-954.
- 115-Vesterinen E, Pukkala E, Timonen T, Aromaa A: Cancer incidence among 78,000 asthmatic patients. *Int J Epidemiol* 1993;22: 976-982.
- 116-Huovinen E, Kaprio J, Vesterinen E, Koskenvuo M: Mortality of adults with asthma: a prospective cohort study. *Thorax* 1997;52: 49-54.
- 117-Kallen B, Gunnarskog J, Conradson TB: Cancer risk in asthmatic subjects selected from hospital discharge registry. *Eur Respir J* 1993;6: 694-697.
- 118-Alavanja MC, Brownson RC, Boice JD, Jr., Hock E: Preexisting lung disease and lung cancer among nonsmoking women. *Am J Epidemiol* 15-9-1992;136: 623-632.
- 119-Wu AH, Fontham ET, Reynolds P, Greenberg RS, Buffler P, Liff J, Boyd P, Henderson BE, Correa P: Previous lung disease and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States. *Am J Epidemiol* 1-6-1995;141: 1023-1032.
- 120-Ness RB, Cottreau C: Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91 (17):1459-67.
- 121-Schildkraut JM, Bastos E, Berchuck A: Relationship between lifetime ovulatory cycles and overexpression of mutant p53 in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2-7-1997;89: 932-938
- 122-Baker TR, Piver MS: Etiology, biology, and epidemiology of ovarian cancer. *Semin Surg Oncol* 1994;10: 242-248.
- 123-Brinton LA, Gridley G, Persson I, Baron J, Bergqvist A: Cancer risk after a Hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176: 572-579.
- 124-Burin GJ, Gibb HJ, Hill RN: Human bladder cancer: evidence for a potential irritation-induced mechanism. *Food Chem Toxicol* 1995;33:785-795.
- 125-Askling J, Grunewald J, Eklund A, Hillerdal G, Ekbom A: Increased risk for cancer following sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160: 1668-1672.
- 126-Persky L: Epidemiology of cancer of the penis. *Recent Results Cancer Res* 1977; 97-109.
- 127-Carlson JA, Ambros R, Malfetano J, Ross J, Grabowski R, Lamb P, Figge H, Mihm MC, Jr. Vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma: a cohort, case control, and investigational study with historical perspective; implications for chronic inflammation and sclerosis in the

- development of neoplasia. *Hum Pathol* 1998; 29: 932-948.
- 128-Mayron R, Grimwood RE, Siegle RJ, Camisa C: Verrucous carcinoma arising in ulcerative lichen planus of the soles. *J Dermatol Surg Oncol* 1988;14: 547-551
- 129-Lewis JG, Adams DO: Inflammation, oxidative DNA damage, and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1987;76: 19-27.
- 130-Jackson JH, Gajewski E, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Fuciarelli AF, Cochrane CG, Dizdaroglu M: Damage to the bases in DNA induced by stimulated human neutrophils. *J Clin Invest* 1989;84: 1644-1649.
- 131-Weitzman SA, Weitberg AB, Clark EP, Stossel TP: Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 8-3-1985;227: 1231-1233.
- 132-Weitzman SA, Gordon LI: Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 15-8-1990;76: 655-663.
- 133-Tamatani T, Turk P, Weitzman S, Oyasu R: Tumorigenic conversion of a rat urothelial cell line by human polymorphonuclear leukocytes activated by lipopolysaccharide. *Jpn J Cancer Res* 1999;90: 829-836.
- 134-Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 1994; 344 : 862-3.
- 135-Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H: Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 1986;7: 1849-1851.
- 136-Olson MJ. DNA strand breakage and poly ADP-ribosylation in promotable and non-promotable JB6 mouse epidermal cells. *Carcinogenesis* 1988;9(2):239-45.
- 137-Muehlematter D, Larsson R, Cerutti P: Active oxygen induced DNA strand breakage and poly ADP-ribosylation in promotable and non-promotable JB6 mouse epidermal cells. *Carcinogenesis* 1988;9: 239-245.
- 138-Beehler BC, Przybyszewski J, Box HB, Kulesz-Martin MF: Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis* 1992;13: 2003-2007.
- 139-Lloyd DR, Carmichael PL, Phillips DH: Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem Res Toxicol* 1998;11: 420-427.
- 140-Hirota N, Yokoyama T: Enhancing effect of hydrogen peroxide upon duodenal and upper jejunal carcinogenesis in rats. *Gann* 1981;72:811-812. *Gann* 1981;72:811-812.

- 141-Radosevich CA, Weitzman SA: Hydrogen peroxide induces squamous metaplasia in a hamster tracheal organ explant culture model. *Carcinogenesis* 1989;10: 1943-1946.
- 142-Moraes EC, Keyse SM, Tyrrell RM: Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis. *Carcinogenesis* 1990;11: 283-293.
- 143-Huang RP, Peng A, Hossain MZ, Fan Y, Jagdale A, Boynton AL: Tumor promotion by hydrogen peroxide in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis* 1999;20: 485-492.
- 144-Lin X, Ramamurthi K, Mishima M, Kondo A, Howell SB: p53 interacts with the DNA mismatch repair system to modulate the cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 2000;58: 1222-1229.
- 145-Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, .: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 15-11-1991;254: 1001-1003.
- 146-Tnguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR: DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1-4-1992;89: 3030-3034.
- 147-Grishko VI, Druzhyina N, LeDoux SP, Wilson GL: Nitric oxide-induced damage to mtDNA and its subsequent repair. *Nucleic Acids Res* 15-11-1999;27: 4510-4516.
- 148-Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR: The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res* 8-3-1999;424: 37-49.
- 149-Caulfield JL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Nitric oxide-induced deamination of cytosine and guanine in deoxynucleosides and oligonucleotides. *J Biol Chem* 22-5-1998;273: 12689-12695.
- 150-Rojas-Walker T, Tamir S, Ji H, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 1995;8: 473-477.
- 151-Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17:25-37.
- 152-Calmels S, Hainaut P, Ohshima H: Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 15-8 1997;57: 3365-3369.
- 153-Chazotte-Aubert L, Pluquet O, Hainaut P, Ohshima H: Nitric oxide prevents gamma-radiation-induced cell cycle arrest by impairing p53 function in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2-3-2001;281: 766-771

- 154-Basu AK, O'Hara SM, Valladier P, Stone K, Mols O, Marnett LJ: Identification of adducts formed by reaction of guanine nucleosides with malondialdehyde and structurally related aldehydes. *Chem Res Toxicol* 1988;1: 53-59.
- 155-Stone K, Uzieblo A, Marnett LJ: Studies of the reaction of malondialdehyde with cytosine nucleosides. *Chem Res Toxicol* 1990;3: 467-472.
- 156-Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR, Yeola SN, Morrow JD, Blair IA, Marnett LJ: Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 9-9-1994;265: 1580-1582.
- 157-Marnett LJ: Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 8-3 1999;424: 83-95.
- 158-Mukai FH, Goldstein BD: Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science* 27-2-1976;191:868-869.
- 159-Basu AK, Marnett LJ. Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis* 1983;4: 331-3.
- 160-Benamira M, Johnson K, Chaudary A, Bruner K, Tibbets C, Marnett LJ. Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* 1995;16: 93-9.
- 161-Fischer SM, Ogle S, Marnett LJ, Nesnow S, Slaga TJ: The lack of initiating and/or promoting activity of sodium malondialdehyde on SENCAR mouse skin. *Cancer Lett* 1983; 19: 61-66.
- 162-Ji C, Rouzer CA, Marnett LJ, Pietenpol JA: Induction of cell cycle arrest by the endogenous product of lipid peroxidation, malondialdehyde. *Carcinogenesis* 1998;19: 1275-1283.
- 163-Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 2-7-1992; 358: 15-16.
- 164-Yu J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B: Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 7-12-1999;96: 14517- 14522.
- 165-Prives C, Hall PA: The p53 pathway. *J Pathol* 1999;187: 112-126
- 166-Ljungman M: Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2000;2: 208-225.
- 167- Broker TR: Structure and genetic expression of papillomaviruses. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1987; 14:329-348.
- 168-Loeb KR, Loeb LA: Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21:

379-385.

169-Meuth M: Patterns of mutation in cancer cells. *Cancer Surv* 1996;28: 33-46.

170-Fitzpatrick FA, Wynalda MA. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2.

Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem* 10-10-1983;258: 11713-11718.

171-Fitzpatrick FA: Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1651-1667.

172-Shank RC: Toxicology of N-nitroso compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;31: 361-368.

173- Mirvish, SS, Reimers KJ, Kutler B, et al. Nitrate and nitrite concentrations in human saliva for men and women at different ages and times of the day and their consistency over time. *Eur J of Cancer Prev* 2000; 9: 335-42.

174-Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M and Makela, S. Nitrite and Nitrate Analyses: A clinical biochemistry perspective. (1998) 31(4): 195-220.

175-Walker R. The metabolism of dietary nitrites and nitrates. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 780-5.

176-Gloria MBA, Vale SR, Vargas OL, Barbour JF, Scanlan RA. Influence of nitrate levels added to cheesemilk on nitrate, nitrite, and volatile nitrosamine contents in gruyere cheese. *J Agricult Food Chem* 1997;45: 3577-3579.

177-Kross BC, Hallberg GR, Bruner DR, Cherryholmes K, Johnson JK: The nitrate contamination of private well water in Iowa. *Am J Public Health* 1993;83: 270-272.

178-Dickson W. Properties of acidified lakes. En: Drabløf D, Tollan A, eds. Ecological impact of acid precipitation. SNSF-project, Oslo 1980:75.

179-Viinikka L: Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56: 577-581.

180-Spiegelhalder B, Eisenbrand G, Preussmann R: Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol* 1976;14: 545-548.

181-Tannenbaum SR, Weisman M, Fett D: The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet Toxicol* 1976; 14: 549-552.

182-Bartholomew B, Hill MJ: The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food Chem Toxicol* 1984; 22: 789-795

183-Witter JP, Gatley SJ, Balish E: Nitrate and Nitrite: Origin in Humans. *Science* 28 9-1979; 205: 1335-1337.

184-Ellen G, Schuller PL, Froeling PG, Bruijns E: No volatile N-nitrosamines detected in blood and urine from patients ingesting daily large amounts of ammonium nitrate. *Food Chem Toxicol* 1982; 20: 879-882.

185-Turek B, Hlavsova D, Tucek J, Waldman J, Cerna J: The fate of nitrates and nitrites in the organism. *IARC Sci Publ* 1980; 625-632.

186- Stephany RW, Schuller PL: Daily dietary intakes of nitrate, nitrite and volatile N nitrosamines in the Netherlands using the duplicate portion sampling technique. *Oncology* 1980; 37: 203-210.

187-Cortas NK, Wakid NW: Pharmacokinetic aspects of inorganic nitrate ingestion in man. *Pharmacol Toxicol* 1991; 68: 192-195.

188-Edwards, G., Whong, W.Z., Speciner, N. Intrahepatic mutagenesis assay: a sensitive method for detecting N-nitrosomorpholine and in vivo nitrosation of morpholine. *Mutat. Res.* 1979; 64: 415-423.

189-Boyland E, Walker SA. Effect of thiocyanate on nitrosation of amines. *Nature*, 1974; 248: 601-602.

190-Forman D., Al-Dabbagh S, Doll, R. Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain. *Nature* 1985; 313: 620-625.

191-Walters CL, Carr FP, Dyke CS, Saxby MJ, Smith PL, Walker R: Nitrite sources and nitrosamine formation in vitro and in vivo. *Food Cosmet Toxicol* 1979;17: 473-479.

192-Correa P, Haenzel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975; 11:58.

193-Hill MJ, Hawksworth G, Tattersall G: Bacteria, nitrosamines and cancer of the stomach. *Br J Cancer* 1973; 28: 562-567.

194-Mirvish SS. Gastric cancer and salivary nitrate and nitrite. *Nature* 1985; 315:461.

195-Wishnok JS, Tannenbaum, SR, Tamir ST, De Rojas WT. Endogenous nitrate synthesis. International Workshop on Health Aspects of nitrate and its metabolites (particularly nitrite). *Journal of Council of Europe, Strasbourg.*

196-Gangolli SD, Van Den Brandt PA, Feron VJ, Jannzowski C, Koeman JH, Speijers GJ. et al. Assessment; nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Eur. J. Pharmacol. Env. Toxicol. and Pharmacol.*, 1994 Section 292: 1-38.

197-Duncan C, Li H, Dykhuizen R, Frazer R, Johnston P, MacKnight G, Smith L, Lamza K, McKenzie H, Batt L, Kelly D, Golden M, Benjamin N, Leifert C: Protection against oral and

- gastrointestinal diseases: importance of dietary nitrate intake, oral nitrate reduction and enterosalivary nitrate circulation. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1997; 118: 939-948.
- 198-Forman D: The etiology of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 1991; 22-32.
- 199-Westfelt UN, Benthin G, Lundin S, Stenqvist O, Wennmalm A: Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 1621-1624.
- 200-RW, Schuller PL: Daily dietary intakes of nitrate, nitrite and volatile N nitrosamines in the Netherlands using the duplicate portion sampling technique. *Oncology* 1980; 37: 203-210.
- 201- National Academy of Sciences. The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds, National Academy Press, Washington DC, 1981.
- 202-Savostianov GM. On the question of nitrites in saliva. *Fiziol Zh.*1973; 23:159-164.
- 203-Srivastava RC, Siddiqui MH, Bose B, Mathur A, Mathur SN: Occurrence of nitrate reductase and nitrite reductase in the human saliva. *Naturwissenschaften* 1982; 69:400- 401.
- 204-Bojić D, Aleksandar V, Bojić LJ, Perović JM. The effects of dietary nitrate, pH and temperature on nitrate reduction in the human oral cavity. *Physics, Chem Technol* 2004; 3: 53-60.
- 205-Eisenbrand G, Spiegelhalder B, Preussman R. Nitrate and nitrite in saliva. *Oncology*1980; 37: 227.
- 206-Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵ N] Nitrate in biological fluids. *Analyt Biochem* 1982; 126: 131.
- 207-Jaffe, ER. Methaemoglobinaemia. *Clin. Haematol.* 1981; 10: 99-122.
- 208-Smith JE, Beutler E. Methemoglobin formation and reduction in man and various animal species. *Am. J. Physiol* 1966; 210: 347-350.
- 209-Ellen G, Schuller PL. Nitrate, origin of continuous anxiety. In: *Das Nitrosamin Problem*. R. Preussmann (ed.), Deutsche Forschungsgemeinschaft, Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1983; 97-134.
- 210-Walley T, Fanagan, M. Nitrite-induced methaemoglobinaemia. *Medical Journal* 1987; 63: 643-644.
- 211-Hartman PE: Review: putative mutagens and carcinogens in foods. I. Nitrate/nitrite ingestion and gastric cancer mortality. *Environ Mutagen* 1983;5: 111-121.
- 212-Tenuovo J. The biochemistry of nitrates, nitrites, nitrosamines and other potential carcinogens in human saliva. *J Oral Pathol* 1986;15: 303-307.
- 213-Mirvish SS: Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to

NOC. Cancer Lett 29-6-1995;93: 17-48.

214-Ward MH, Mark SD, Cantor KP, Weisenburger DD, Correa-Villasenor A, Zahm SH: Drinking water nitrate and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. Epidemiology 1996;7: 465-471.

215-Newberne P. Nitrites promotes Lymphoma Incidence in rats. Science 1979;8: 979.204.

216-Rogers M; Vaughan T; Davis S; Thomas D. Consumption of Nitrate, Nitrite and Nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer. Cancer-Ep-Biom-Prev. 1995;.4:29-36.

217-Brennan-JA, Boyle-JO; Koch-WM; Goodman-SN. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N-Engl-J-Med. 1995 ; 332: 712-7.

218-Preussman R, Spiegelhalder B. Environmental N- nitroso carcinogens. Problems and solutions. Interdisciplinary Science Reviews 1989; 14.47-253.

219-Mirvish SS. Formation of N-nitroso compounds: chemistry kinetics and in vivo occurrence. Toxicol Appl Pharmacol 1975; 31:325.

220-Tannenbaum SR, Archer MC, Wishnok JS, Bishop WW: Nitrosamine formation in human saliva. J Natl Cancer Inst 1978;60: 251-253.

221-Rao GS, Mc Lennon DA. High-pressure liquid chromatografic analysis of carcinogenic N-nitroso derivatives of piperazine resulting from drug-nitrite interactions. J Anal Toxicol 1977;143.

222-Rao GS: Nitrosation of drugs by human salivary nitrite. Arch Oral Biol 1978; 23: 749-750.

223- Leaf CD, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Mechanisms of endogenous nitrosation. Cancer Surveys 1989; 8: 323-334.

224- Shi ST, Wang ZY, Smith TJ, Hong JY, Chen WF, Ho CT, Yang CS: Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation, DNA methylation, and lung tumorigenesis in A/J mice. Cancer Res 1-9 1994;54: 4641-4647.

225-Wang ZY, Huang MT, Lou YR, Xie JG, Reuhl KR, Newmark HL, Ho CT, Yang CS, Conney AH: Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12 dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 mice. Cancer Res 1-7-1994;54: 3428-3435.

226-Preussmann R, Stewart .N-nitroso carcinogens, in chemical carcinogens, CE Searle, (Ed.) p. 634-828 1984. Am Chem Soc Monograph N° 182 Analytical Chemical Society, Washington

- DC.231-Lijinsky W. Structure-activity relationship in carcinogenic by N-nitroso compounds. *Cancer Metastasis Rev* 1987; 6: 301-356.
- 227-Hoffman D, Harley H, Fissene I, Adams JD, Brunnemann KD. Carcinogenis agents in snuff. *J Nat Cancer Inst* 1986;76: 435-437.
- 228-Boice J, Greene H, Killen J, Ellenberg R, Kehn E, McFadden E, et al. Leukemia and preleukemia after adjuvant treatment of gastrointestinal cancer with semimustine(methyl-CCNO) *N Engl J Med* 1983; 309: 1079-1084.
- 229-Moshage H. Nitric oxide determinations: much ado about NO-thing? *Clin Chem* 1997; 43: 553-6.
- 230-Hill, MJ. Endogenous N-nitrosation. *Eur J Cancer Prev* 1996: 5:47-50.
- 231-Oates JC, Gilkeson GS: The biology of nitric oxide and other reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2006;121:243-250.
- 232-Shimizu Y, Sakai M, Umemura Y, Ueda H: Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. *J Dermatol* 1997;24:80-87.
- 233-Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor L, Cox G, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 1995; 182:1683-93.
- 234-Brennan PA, Umar T, Zaki GA, Langdon JD, Spedding A, Buckley J, Downie IP: Are myoepithelial cells responsible for the widespread expression of inducible nitric oxide synthase in pleomorphic adenoma? An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 2000;29:279-283.
- 235-Human Proteome Resource Program, NOS2^A in normal tissues available from:http://www.hpr.se/tissue_profile.php?antibody_id=2014.
- 236-Xia Y, Zweier J. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitri oxide synthase in macrophages, *Poc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94:6594-6598.
- 237-Paquette DW, Williams RC. odulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. *Periodontol* 2000; 24: 239-252.
- 238-Lohinai Z, Stahlwit R, Virag L, Szekely AD, Hasko G, Szabo C. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. *J Dent Res* 2001; 80:470-475.
- 239-Daghigh F, Borghaei R, Thornton R, Bee J. Human gingival fibroblasts produce nitric oxid in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol* 2002; 7:392-400.
- 240-Shimauchi H, Takayama S, Narikawa-Kiji M, Shimabukuru Y, Okada H. Production of

- interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *J Endod* 2001; 27: 749-752.
- 241-Brennan PA, Umar T, Palacios-Callender M, Spedding AV, Mellor T, Buckley J et al. A study to assess inducible nitric oxide synthase expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2000b; 29:249-254.
- 242-Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:355-359.
- 243-Bentz BG, Haines GK, Lingen MW, Pelzer HJ, Hanson DG, Radosevich JA. Nitric oxide synthase type 3 is increased in squamous hyperplasia, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108:781-787.
- 244-Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutation Res* 1995; 339:73-89.
- 245-Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17:91-106.
- 246-Murata J, Tada M, Iggo RD, Sawamura Y, Shinoe Y, Abe H. Nitric oxide as a carcinogen: analysis by functional yeast assay of inactivating p53 mutations induced by nitric oxide.
- 247-Jackson JH, Gajewski E, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Fuciarelli AF, Cochrane CG, et al. Damage to the bases in DNA induced by stimulated human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84:1644-9.
- 248-Weitzman SA, Weitberg AB, Clark EP, Stossel TP. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 1985;227:1231-33.
- 249-Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 1990;764:655-63.
- 250-Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenesis process. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1288:31-36.
- 251-Ohshima H, Bartsch. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research* 1994; 305:253-64.
- 252-Felley-Bosco E, Mirkovitch J, Ambs S, Mace K, Pfeifer A, Keefer LK et al. Nitric oxide and ethylnitrosourea: relative mutagenicity in the p53 tumor suppressor and hypoxanthine-phosphoribosyltransferase genes. *Carcinogenesis* 1995;16:2069-74.
- 253-Chen Y, Hsuen S, Lin L. Expression of inducible nitric oxide synthase in human oral premalignant epithelial lesions. *Archives of Oral Biology* 47 (2002), 387-392.
- 254-Brennan PA, Conroy B, Sinclair D, Spedding A. Expression of inducible nitric oxide

synthase and p53 in oral epithelial dysplasia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod.* 2000b;90:624-29.

255-Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1995; 113:541-9..

256-Chen, YK, Lin LM. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase in DMBA-induced hamster bucal pouch carcinogenesis. *Oral Oncology* 2000;36:221-24.

257-Gallo O, Masini E, Morbidelli L et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumour progression in head and neck cancer, *J Natl Cancer Inst* 1998;90: 58,

258-Chen WL, Zeng SG, Li HG, Huang HZ, Pan CB. Ai Zheng Expression of inducible NOS mRNA en squamous cell carcnioma tongue. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases 2002; 21:314-8.

259- Mori V, Bertotti M. Amperometric detection with microelectrodes in FIA: studies on the conversion of nitrate to nitrite in human saliva, *Anal Lett* 1999; 32: 25.

260- Bos PMJ, Van den Bradt PA, Bedel M, Ockhuizen TH. The reproducibility of the conversion of nitrate and nitrite in human saliva after a nitrate load. *Fd Chem Toxicol* 1988; 26: 93-7.

261-Van Maanen JMS, Van Geel AA, Kleinjans JCS. Modulation of nitrate-nitrite conversión in the oral cavity. *Cancer Detect Prev* 1996; 20:590-6.

262-Van Maanen J, Pachen D, Dallinga M, Kleinjans J. Formation of nitrosamines during consumption of nitrate- and amine-rich foods, and the influence of the use of mouthwashes. *Cancer Detect Prev* 1998; 22: 204-212.

263-Nair J, Havevi S, Chakradeo P, Jakhi SA, Bhide SV. Increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the oral cavity of subjects with poor oral hygiene. In: *Nitroso compounds: Biological Mechanisms, Exposures and Cancer Etiology* (eds O'Neill IK, Bartsch H); IARC, Lyon, p.11.

264-Xu J, Xu X, Verstraete W. Quantitative measurement of the nitrate reductase activity in the human oral cavity. *Food and Chem Toxicology* 2001; 39: 393-400.

265-Yu BS, Chen P, NI LH and Yao SZ. Simultaneous determination of nitrate and nitrite in saliva and foodstuffs by non-suppressed ion chromatography with bulk acoustic wave detector. *An Sciences* 2001, 17: 495-98.

266-Badawi AF, Hosny G, El-Hadary M, Mostafa MH. Salivary nitrate, nitrite and nitrate

- reductase activity in relation to risk of oral cancer in Egypt. *Dis Markers* 1998;14: 91-7.
- 267- Phizackerley PJR, Al-Dabbagh SA , The estimation of nitrate and nitrite in saliva and urine. *Anal Biochem* 1983; 131: 242-245.
- 268-Lindhe, Jan. *Periodontología Clínica* 1986;308: 64-65.
- 269-Klein H, Palmer CE, Knutson JW. Studies on dental caries. Dental status and dental needs of elementary schoolchildren. *U.S. Public-Health Rep* 1938; 53: 751-65.
- 270- Greenspan J, Barr C, Sciubba J, Winkler J. Oral manifestation of HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73:142-4.
- 271-Biondi K; Belloni S; Velasco M; Robledo G; Gallardo A; Femopase F; López S; Lanfranchi H. Correlation between oral precancer and cancer and tobacco. *Dept. Clin. Stomatol. Fac. Dent. Natl. Univ. Córdoba. Dept. Boccodent. Pathol. And Clin., Fac. Dent. Univ. Bs. As. Argentina. J Dent Res* 1998; 77:5.
- 272-. Rogers, MA y col. del dpto. de Medicina Preventiva, de la Universidad de Nueva York
- 273-Comité de nitritos y agentes de curado alternativos en alimentos, en la National Academy Press de Washington DC.
- 274-Tabla de pesos y medidas aproximadas de los alimentos. Escuela de Nutrición, Fac. de Ciencias Médicas. UNC.1991.
- 275-Griess JP. *Ber Dtsch Chem Ges* 1879; 12:426.
- 276-Davis J. Mc Keegan K, Cardosi M, Huw Vaughan D. Evaluation of phenolic assays for the detection of nitrite. *Talanta* 50 (1999) 103-112.
- 277- Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo E. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnosis and basic investigation. (Invited critical review) *Clin Chim Acta* 2007; available online at www.sciencedirect.com.
- 278-Groenen PJ, Jonk RJ, van IC, ten Noever de Brauw MC: Determination of eight volatile nitrosamines in thirty cured meat products with capillary gas chromatography high-resolution mass spectrometry: the presence of nitrosodiethylamine and the absence of nitrosopyrrolidine. *IARC Sci Publ* 1976; 321-331.
- 279-Moorcrof MJ, Davis J, Compton R. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta* 2001; 54: 785-803.
- 280- Packer PJ, Leach SA, Duncan SN, Thompson MH, Hill MJ. The effect of different sources of nitrate exposure on urinary nitrate recovery in humans and its relevance to the methods of estimating nitrate exposure in epidemiological studies. *Carcinogenesis* 1989; 10: 1989-1996.

- 281-Dombi C, Banoczy J, Kramer M, Wertz WP, Squier AC: [Study of the permeability of oral leukoplakia]. *Fogorv Sz* 1999;92:137-142.
- 282- Schildt EB, Eriksson M, Hardell L, Magnuson A: Oral infections and dental factors in relation to oral cancer: a Swedish case--control study. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:201-206.
- 283-. Cummins D, Creeth JE. Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels and mouthwashes. *J Dent Res* 1992; 71: 1439-1454.
- 284- Shapiro KB, Hotchkiss JH, Roe DA: Quantitative relationship between oral nitrate-reducing activity and the endogenous formation of N-nitrosoamino acids in humans. *Food Chem Toxicol* 1991; 29:751-755.
- 285- AOAC 1990. *Official Methods of Analysis*. 14th ed .Association Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- 286-Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. .1990) USA* 87: 682-685.
- 287-Ugar-Cankal D, Ozmeric N: A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta* 2006; 366:90-100.
- 288-Chen WL, Zeng SG, Li HG, Pan CB. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in squamous cell carcinoma of tongue. *Ai Zheng* 2002; 21:314-318.
- 289- PAHO. Panamerican Health Organization. *La Salud en las Américas*. 1998;2:26-48.
- 290-Gajalakshmi V, Peto R, Kanaka TS, Jha P. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: retrospective study of 43000 adult male deaths and 35000 controls. *Lancet* 2003;362:507-15.
- 291-Ministério da Saúde. Sistema de Informação sobre mortalidade: Datos Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E230-5.
- 292-Jemal A, Murria T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A et al. *Cancer Statistics, 2005*. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10-30.
- 293-Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol* 2000;36:106-15.
- 294-Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis* 2000;6:65-74.
- 295-La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Levi F. Trends in oral cancer mortality in Europe. *Oral Oncol* 2004;40:433-9.
- 296-La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. *Epidemiology and*

prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33:302-12.

297-Macfarlane GJ, Boyle P, Evstifeeva TV, Robertson C, Scully C. Rising trends of oral cancer mortality among males worldwide: the return of an old public health problem. *Cancer Causes Control* 1994;3:259-65.

298-Macfarlane GJ, Boyle P, Scully C. Oral cancer in Scotland: changing incidence and mortality. *Brit Med J* 1992;305:1121-3.

299-Robinson K, Macfarlane G. Oropharyngeal cancer incidence and mortality in Scotland: are rates still increasing?. *Oral Oncol* 2003;39:31-6.

300-Matos E, Loria D, Zengarini N. Atlas de Mortalidad por Cáncer (Argentina 1997-2001). Publicación del Ministerio de Salud de la Nación 2003;2:13-6.

301-Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47.

302- Shiboski CH, Shiboski SC, Silverman S Jr. Trends in oral cancer rates in the United States. *Comm Dent Oral Epidemiol* 2000;28:249-56.

303- Nieto A, Ruiz Ramos M. Rising trends in oral cancer mortality in Spain, 1975-94. *J Oral Pathol Med* 2002;31:147-52.

304-Cox B, Taylor K, Treasure E. Trends in oral cancer by subsite in New Zealand. *Oral Oncol* 1995;2:113-7.

305-Wünsch Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002;38:737-46.

306-Su W-Z, Tohnai I, Kawamura T, Tamakoshi A, Wakai K, Aoki R et al. Trends in site-specific mortality from oral and pharyngeal cancer among Japanese males, 1950-94. *Oral Oncol* 1999;35:9-16.

307- Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran A, Birch J, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the etiology?. *Oral Oncol* 2000;36:387-9.

308-Hindle I, Downer M, Speigth P. The epidemiology of oral cancer. *British J Oral Maxillof Surg* 1996;34:471-6.

309-INDEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos Argentina, 2002. Available from <http://www.indec.gov.ar>.

310-PAHO. Panamerican Health Organization. Las Condiciones de Salud de las Américas 1994;1:233-50.

311-Slotman GJ, Swaminathan AP, Rush BF. Head and neck cancer in a young age group: high

- incidence in black patients. *Head and Neck Surg* 1983;5:293-8.
- 312-Hindle I, Downer MC, Speight PM. Necessity for prevention strategies in oral cancer. *Lancet* 1994;343:178-9.
- 313-Prince S, Bailey BMW. Squamous carcinoma of the tongue:review. *Brit J Oral Maxillof Surg* 1999;37 :164-74.
- 314-Macfarlane GJ, Evstifeeva TV, Robertson C, Boyle P, Scully C. Trends of oral cancer mortality among females worldwide. *Cancer Causes Control* 1994;3:255-8.
- 315-Boyle P, Leon ME, Maisonneuve P, Autier P. Cancer control in women. Update 2003. *Int J Gynecol Obstet* 2003;83:179-202.
- 316-Dalitsch W, Vazirani S. Oral cancer in women. A study of the increasing incidence. *The Am J Surg*.1959;98:869-74.
- 317-Cusumano RJ, Persky MS. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young adults. *Head and Neck Surg* 1988;10: 229-34.
- 318.PAHO:PanamericanHealthOrganization.Availablefrom:<http://www.publications.paho.org>.
- 319- Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis* 2000;6:75-84.
- 320-Mcfarlane GJ, Boyle P, Scully C. Rising mortality from cancer of the tongue in young Scottish males. *The Lancet* 1987;912.
- 321-Izarzugaza MI, Esparza H, Aguirre JM. Epidemiological aspects of oral and pharyngeal cancers in the Basque Country. *J Oral Pathol Med* 2001;30:521-6.
- 322- Luna-Ortiz K, Güemes-Meza A, Villavicencio-Valencia V, Mosqueda-Taylor A. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. *Oral Oncol* 2004. (in press) <http://www.indec.gov.ar>.
- 323-Barasch A, Gofa A, Krutchkoff D, Eisenberg E, Farmington C. Squamous cell carcinoma of the gingiva. A case series analysis *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;80:184-7.
- 324-Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48:3282-7.
- 325-Chen J, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma. *Cancer* 1990;66:1288-96.
- 326-Keller AZ, Terris M. The association of alcohol and tobacco with cancer of the mouth and pharynx. *Am J Public Health* 1965;55:1578-85.
- 327-Krutchkoff DJ, Chen J, Eisenberg E, Katz RV. Oral cancer: a survey of 566 cases from the

University of Connecticut Oral Pathology Biopsy Service, 1975-1986. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;70:192-8.

328-Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: statistical analysis of 14253 cases by age, sex and race of patients. *J Am Dent Assoc* 1976;92 :571-4.

329-Brown J, Fan A. Arsenic: risk assesment for california drinking water standars. *J Hazard Mat* 1994;39:149-59.

330-Alain G, Tousignant J, Rozenfarb E. Chronic arsenic toxicity. *Int J Dermatol* 1993;32:899-901.

331-Holmes JD, Dierks EJ, Homer LD, Potter BE. Is detection of oral and oropharyngeal squamous cancer by a dental health care provider associated with a lower stage at diagnosis? *J Oral Maxillofac Surg* 2003 Mar; 61(3): 285-91.

332-Silverman S Jr. Early diagnosis of oral cancer. *Cancer* 1988 Oct 15; 62 suppl.(8): 1796-99.

333-Kowalski L, Franco E, Torlni H, Fava AS, de Andrade Sobrinho J, Ramoa G et al. Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related to the tumour, the patient and health professionals. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994 May; 30B(3):167-73.

334- Jovanovic A, Kostense P, Schulten E, Snow G, Van der Waal I. Delay in diagnosis of oral squamous cell carcinoma; a report from The Netherlands. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992 Jul; 28B(1): 37-8.

335-Dimitroulis G, Reade P, Wiesenfeld D. Referral patterns of patients with oral squamous cell carcinoma, Australia. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992 Jul; 28B(1): 23-7. 336-Gorsky M, Dayan D. Referral delay in diagnosis of oro/oropharyngeal cancer in Israel. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995 May; 31B(3): 166-8.

337- Wildt J, Bundgaard T, Bentzen SM Delay in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1995 Feb; 20(1): 21-5.

338- Khoo SP, Shanmuhasuntharam P, Mahadzir WM, Tay KK, Latif A, Nair S. Factors involved in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma in Malaysia. *Asia Pac J Public Health* 1998; 10(1): 49-51.

339-Allison P, Franco E, Feine J. Predictors of professional diagnostic delay for upper aerodigestive tract carcinoma. *Oral Oncol* 1998 Mar; 34(2): 127-32.

340-Kerdpon D, Sriplung H. Factors related to delay in delay in diagnosis of oral squamous cell carcinoma in southern Thailand. *Oral Oncol* 2001 Feb; 37(2): 127-31.

341-Onizawa K, Nishihara K, Yamagata K, Yusa H, Yanagawa T, Yoshida H. Factors associated

- with diagnostic delay of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003 Dec; 39(8): 781-8.
- 342-Tromp DM, Brouha XD, Hordijk GJ, Winnubst JA, De Leeuw R. Patient and tumour factors associated with advanced carcinomas of the head and neck. *Oral Oncol* 2005 Mar; 41(3): 313-9.
- 343-O'Sullivan, E. Some insights into the potential for the earlier detection of oral cancer: A population-based study. In: 7 th International Congress on Oral Cancer, April 2001. The Hague, Netherlands. *Oral Oncology*; 37: 553.
- 344-UICC. International Union Against Cancer. TNM Classification of malignant tumors. Fifth edition 1997. ICD-O. COO, 002-006
- 345-Broua X, Tromp D, Hordijk GJ, Winnubst J, De Leeuw R. Role of alcohol and smoking in diagnostic delay of head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol* 2005 May; 125(5): 552-6.
- 346-Kowalski LP, Carvalho AL. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. *Oral Oncol* 2001; 37(1): 94-98.
- 347-Morelato RA, López de Blanc SA. Oral cancer mortality in the province of Cordoba, Argentine Republic in the period 1975-2000. A comparative study with other populations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 May 1; 11(3): E230-5.
- 348-Morelato R, Robledo G, Lattanzi V, Fernández E, López de blanc S. Head and Neck Cancer. Prevalence, treatment and over life of 51 patients. *J Dent Res* 2003; 82: 52 (abstr).
- 349-Pitiphat W, Diehl S, Laskaris G, Carstos V, Doglass C, Zavras A. Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. *J Dent Res* 2002; 81(3): 192-97.
- 350-Elwood JM, Gallagher RP. Factors influencing early diagnosis of cancer of the oral cavity. *CMAJ*. 1985 Oct 1; 133(7): 651-56.
- 351- Mashberg A, Merletti F, Boffetta P, Gandolfo S, Ozzello F, Fracchia F et al. Appearance, site of occurrence, and physical and clinical characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer* 1989 Jun 15; 63(12): 2522-27.
- 352-Soderholm AL. Oral carcinoma of the mandibular region. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1990 Dec; 28(6): 383-389.
- 353-Pinholt EM, Rindum J, Pindborg JJ. Oral cancer: a retrospective study of 100 Danish cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1997; 35(2): 77-80.
- 354-Ries L, Eisner M, Kosary C, Hankey B, Miller B, Clegg L et al. SEER cancer statistics review, 1973-1997. Bethesda, MD: National Cancer Institute 2000.

Difusión de resultados parciales durante la realización de la tesis

Presentaciones en Reuniones Anuales de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica (SAIO).

Determination of salivary nitrite in patients with oral carcinoma.

Morelatto R, Ferreyra N, Solís V, López de Blanc S. *Cát. Clínica Estomatológica B. Dpto. de Fco. Qca. Fac. de Cs. Qcas. UNC. J Dent Res* 78 (5) 1999 (Abstract).

Correlation between salivary nitrites concentration and different cocarcinogenic factors of the oral cavity. Morelatto R, Belardinelli P, Femopase F, Hernandez S, Ferreyra N, Solís V, Lopez de Blanc S. *J Dent Res* 79 (5) 2000 (Abstract).

Salivary nitrite content in patients with oral Candidiasis.

Morelatto R, Femopase F, Belardinelli P, Ferreyra N, Solís V, Lopez de Blanc S. *J Dent Res* 79 (5) 2000 (Abstract).

Salivary nitrite levels in relation to estomatological lesions. Comparative study. Morelatto R, Azcurra A, Baruzzi A, Solís V, López de Blanc S. *J Dent Res* 82 (Spec Iss C) 2003 (Abstract).

Effect of analytical variables on salivary nitrite levels.

Morelatto R, Azcurra A, Baruzzi A, Solís V, López de Blanc S. *J Dent Res* 82 (Spec Iss C) 2003 (Abstract).

Salival nitrogenated compounds in patients with Oral Cancer.

Morelatto R, Azcurra A, Baruzzi A, Solís V, López de Blanc S. *J Dent Res* 82 (Spec Iss C) 2003 (Abstract).

Nitro compounds in saliva and tissue of patients with oral cancer.

Morelatto R, Azcurra A, Baruzzi A, Benavidez T, Finkelberg A, Linares J, López de Blanc S. *J Dent Res* 85 (Spec Iss C) 2006 (Abstract).