



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“BIOMARCADORES DE DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN
CELULAR EN IRRITACIÓN MECÁNICA CRÓNICA DE LA MUCOSA
ORAL Y SU RELACIÓN CON FACTORES BIOLÓGICOS
POTENCIALMENTE CARCINOGENÉTICOS”**

TESISTA:

OD. GERARDO MARCELO GILLIGAN

DIRECTOR:

PROF. DRA. MABEL N. BRUNOTTO

CÓRDOBA, 2020



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

Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Odontología

**BIOMARCADORES DE DIFERENCIACIÓN Y
PROLIFERACIÓN CELULAR EN IRRITACIÓN
MECÁNICA CRÓNICA DE LA MUCOSA ORAL Y SU
RELACIÓN CON FACTORES BIOLÓGICOS
POTENCIALMENTE CARCINOGENICOS**

Od. Gerardo Marcelo Gilligan

Directora: Prof. Dra. Mabel N. Brunotto

Co- Director: Prof. Dr. Eduardo D. Piemonte

Córdoba, 2020

Comisión de Seguimiento

Prof. Dra. Rosana Morelatto

Prof. Dr. Jorge V. Paván

Prof. Dra. Mabel N. Brunotto

Tribunal de Tesis

Prof. Dra. Rosana Morelatto

Prof. Dr. Jorge V. Paván

Prof. Dr. Rubén H. Sambuelli

Dedicatoria

A mi pequeña gran familia.

A mis padres: Giovanna y Marcelo. A ellos les dedico este trabajo, pero también les agradezco por forjar en mí los principios de honestidad, generosidad, superación personal, responsabilidad por el estudio y compromiso por los pacientes.

Al resto de la familia que, de alguna nube, me alienta a seguir.

A la gente que deposita en mí su confianza; sobre todo los amigos de toda la vida, alumnos y pacientes.

A mis maestros. Los que se preocuparon para que desarrolle un sentido crítico y que sembraron experiencias de inconmensurable valor afectivo.

“El lugar que Dios ha elegido para ti (tu vocación) es la intersección donde se encuentra tu más grande alegría y la más grande necesidad del mundo”

Regina Brett – Dios nunca parpadea

Agradecimientos

Agradezco a Dios, por la vida y por cada momento de inspiración; a la obra salesiana que inculcó desde mi niñez los valores que me ayudan a intentar ser un poco mejor.

A mi familia, por el estímulo permanente y la paciencia. A una compañera especial que me regaló la vida quien me acompañó y colaboró incondicionalmente en este trabajo. A la familia que uno elige: los amigos.

A la Comisión de Tesis, a la Dra. Silvia Hernández, a la Dra. Rosana Morelatto, al Dr. Jorge Paván y al Dr. Rubén Sambuelli por sus valiosas sugerencias.

A la Facultad de Odontología, por la cual siento un enorme sentido de pertenencia. En particular, a mi Directora de Tesis la Prof. Dra. Mabel Brunotto y su equipo de la Cátedra de Biología Celular “A”, por su aporte y cooperación constante los cuales fueron fundamentales para esta producción. De igual manera, a mi Codirector de Tesis, el Prof. Dr. Eduardo Piemonte, quien gracias a su rigurosidad científica colaboró en la faceta clínica de este trabajo. Sin ellos, el camino se hubiera tornado empinado.

A la Cátedra de Estomatología “A”, especialmente al Prof. Dr. René Pánico quien abrió las puertas de la Cátedra y permitió desarrollar allí este trabajo, asesorándome y colaborando incansablemente en la inclusión de pacientes. Esta experiencia permitió forjar un gran equipo de trabajo a su lado. A mis compañeros y amigos de la misma Cátedra: Fernanda, Andrés, Jerónimo, Evelin, Martín y Ángel. También agradezco a las personas que me iniciaron en la Estomatología, Ricardo y Dante. Un agradecimiento especial al Prof. Dr. Victoriano Carrica, director del Servicio de Prevención y Diagnóstico de Enfermedades de la mucosa oral “Prof. Dr. Lanfranchi Tizeira”. A la Cátedra de Estomatología “B”. Al personal no-docente de la Cátedra de Estomatología “A”. A los amigos de la Estomatología y la profesión que estuvieron conmigo en momentos difíciles, especialmente Ignacio Molina, Nicolás Borgo, Nicolás Leonardi y Federico Garola. A mis exalumnos, hoy ayudantes alumnos y odontólogos con fines de perfeccionamiento que se interesaron y siempre ayudaron. Sin la ayuda de todas estas personas, nada de esto hubiera sido posible.

A la técnica Agustina Pereyra y a la Prof. Dra. Ruth Ferreyra de Prato, quienes colaboraron en el procesamiento de la Anatomía Patológica en el Área de Biología Oral. Mi gratitud a la Arq. María Eugenia Pereyra, responsable del área de Seguridad, quien colaboró desinteresadamente en la recuperación del material biológico.

A la Fundación para el Progreso de la Medicina por su apertura interinstitucional ya que, gracias a la firma de un Convenio de Colaboración e Investigación con nuestra casa de estudios, se agilizó el procesamiento del material. A la Dra. Cecilia Di Tada, jefa del área de Inmunohistoquímica y a la Dra. Andrea Lucca, jefa del laboratorio de Biología Molecular y todos los técnicos del laboratorio; gracias por su generoso aporte.

A mis pacientes. Sobre todo, a los que la pasaron y pasan mal. Espero que este trabajo pueda sumar algún granito de arena en el océano de la Patología y Medicina Bucal.

A mis queridos alumnos. Los que me alentaron y se interesaron por este Doctorado. A los que logré intrigar y sembrar la semilla del *ser curioso y apasionado*. Anhele que este trabajo, como el de tantos tesisistas locales estimule la investigación joven en el Área del Cáncer Bucal.

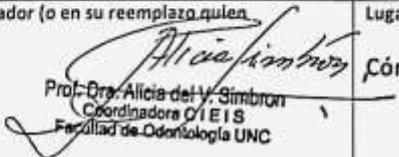
A la Biblioteca de la Facultad de Odontología, por la inmediata y eficiente colaboración en la búsqueda de material bibliográfico. Al personal administrativo de la Carrera de Doctorado (Escuela de Graduados) y de SECYT-UNC. A la generosidad de docentes de Fisiología e Histología “B” en permitirme, en algunas circunstancias, realizar la observación microscópica de los inmunomarcadores allí.

A los maestros que ya no están, quienes me estimularon a seguir siempre estudiando y aprendiendo.

Soy un afortunado que, a lo largo de todos estos años, la causalidad o la casualidad haya puesto en mi camino a las personas que debían estar. De todos, siempre aprendí.

A todos ellos, muchísimas gracias.

Aprobación de Comité Institucional de Ética en Investigaciones de Salud de la Facultad de Odontología

	COMITÉ INSTITUCIONAL DE ETICA EN INVESTIGACION EN SALUD (CIEIS) FACULTAD DE ODONTOLOGIA. UNC	
ODO CAI-CIEIS N°:	11 T	
Título del Proyecto	Biomarcadores de diferenciación y proliferación celular en irritación mecánica crónica de la mucosa oral y su relación con factores biológicos potencialmente carcinogénicos.	
Investigador principal/Director	Gerardo Gilligan	
Trabajo Patrocinado	Describir brevemente: No es patrocinado	
Material biológico de origen humano	Describir brevemente (tipo de Investigación): En este proyecto se propone evaluar las alteraciones de biomarcadores de diferenciación (citoqueratinas) y proliferación (Ki67) celular de la irritación crónica de la mucosa oral a fin de determinar un patrón característico de esta lesión, y compararlo con el patrón que presenten lesiones de HPV y malignas..	
Evaluación del Comité Institucional de Investigación en Salud	Resultado Evaluación:	Se le dio el Visto Bueno para ser evaluado por el CIEIS.
		Fecha: 12/05/2016
Resolución Final:		
<p>El CIEIS-Facultad de Odontología, en reunión plenaria, ha decidido APROBAR el protocolo de referencia, según consta en el Libro de Actas N° 90 con fecha 14 de junio de 2016.</p> <p>La investigación cumple con las disposiciones y regulaciones provinciales nacionales e internacionales que salvaguardan los derechos de los participantes en la investigación clínica.</p> <p>El investigador responsable deberá notificar a este Comité en los formularios correspondientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • El inicio de la ejecución del estudio dentro de las 72 horas. • El informe de avance de reclutamiento anual en donde se incluirá el estado de progreso del protocolo y cualquier otra situación que modifique el curso de la investigación y/o revista mayor seguridad para los participantes. • Los eventos adversos serios dentro de los 10 días hábiles de ocurrido el evento. • Las enmiendas realizadas en el protocolo de manera oportuna y para su aprobación. • La suspensión o cancelación del estudio de manera inmediata. • El informe de finalización de la investigación. <p>De no cumplimentar con los requisitos solicitados, en un tiempo menor a 3 meses, se comunicará al CoEIS el no cumplimiento de los requisitos éticos necesarios para realizar los estudios planteados en el proyecto.</p>		
	Firma Coordinador (o en su reemplazo quien corresponda)	Lugar y Fecha
	 Prof. Dra. Alicia del V. Simbrón Coordinadora CIEIS Facultad de Odontología UNC	Córdoba, 14/06/2016

Autorización para la realización del trabajo

Córdoba, 4 de Julio de 2016

A quien corresponda:

Por la presente, declaro tener conocimiento que los grupos de pacientes incluidos en el trabajo de Tesis Doctoral titulado: "BIOMARCADORES DE DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN IRRITACIÓN MECÁNICA CRÓNICA DE LA MUCOSA ORAL Y SU RELACIÓN CON FACTORES BIOLÓGICOS POTENCIALMENTE CARCINOGENICOS", que se encuentra llevando a cabo el Od. Gerardo Gilligan, Prof. Asistente de la Cátedra a mi cargo, pertenecen a individuos que concurren a la consulta estomatológica en las instalaciones de la Cátedra de Estomatología "A".

Además, autorizo al Doctorando en cuestión realizar el trabajo de su Tesis Doctoral ya mencionado en las instalaciones de Estomatología "A" disponiendo de las mismas.

Para ser presentado, ante la autoridad que corresponda, saludo atte.

Prof. Dr. René Luis Panico

Prof. Titular Interino

Cátedra de ESTOMATOLOGÍA "A"

FOUNC.

ÍNDICE

Agradecimientos	4
Aprobación de Comité Institucional de Ética en Investigaciones de Salud de la Facultad de Odontología.....	6
Autorización para la realización del trabajo.....	7
ÍNDICE.....	8
Resumen	11
Abstract	12
Abreviaturas	13
INTRODUCCION y MARCO TEÓRICO.....	15
1. Cáncer Bucal	15
1.1 Epidemiología	15
1.2 Carcinogénesis	16
1.3 Factores de Riesgo de Cáncer Bucal.....	21
2. Úlcera Traumática Crónica (UTC) e Irritación Mecánica Crónica (IMC) en el contexto del CCEB.....	39
2.1 Irritación Mecánica Crónica.....	39
2.2 Úlcera Traumática Crónica	42
2.3 Inflamación Crónica y Cáncer	44
2.4 Cicatrización de heridas crónicas y Cáncer	49
3. Desórdenes Orales Potencialmente Malignos.....	53
3.1 Leucoplasia.....	54
3.2 Eritroplasia	59
3.3 Liquen Plano Bucal y Lesiones Liquenoides.....	61
3.4 El diagnóstico de Displasia Epitelial Oral	64
4. Biomarcadores de Cáncer y Precáncer Bucal	67
4.1 Biomarcadores de diferenciación celular: las Citoqueratinas.....	68
4.2 Biomarcadores de Proliferación celular: Ki67.....	73
Hipótesis de trabajo	75

Objetivos Generales y Específicos	75
MATERIALES Y MÉTODOS	76
Diseño.....	76
Registro de variables clínicas	77
Inmunomarcación con Citoqueratinas y Ki67- n=53.....	79
Virus Papiloma Humano	81
Análisis Estadísticos.....	82
Protocolo de tratamiento y diagnóstico	82
Aspectos Éticos	83
RESULTADOS.....	85
<i>Características sociodemográficas</i>	85
<i>Factores de Riesgo</i>	90
<i>Biomarcadores</i>	102
<i>Citoqueratinas</i>	102
<i>Ki 67</i>	110
<i>Correlación de biomarcadores inmunohistoquímicos con condiciones clínicas</i>	115
DISCUSIÓN.....	118
Factores biodemográficos.....	118
Localización Anatómica.....	120
Hábitos de riesgo, Irritación Mecánica Crónica y VPH	122
Biomarcadores.....	129
Citoqueratinas.....	129
Ki67.....	133
Inmunomarcación y condiciones clínicas.....	135
CONCLUSIONES.....	140
Perspectivas futuras	141
BIBLIOGRAFÍA.....	142
ANEXO.....	176
HISTORIA CLÍNICA	176

CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	178
VPH – por PCR en CCEB	180
Trabajos de Ck19 en CCEB y DPM.....	181
Producciones Científicas	183
Publicaciones	183
Presentaciones de Resultados preliminares y trabajos afines en Congresos	183
Financiación Científica.....	185

Resumen

Introducción: Las Úlceras Traumáticas Crónicas (UTC) son lesiones asociadas a la IMCO, las cuales fueron sugeridas como una condición con potencialidad de transformación maligna. La IMCO es considerada como un factor promotor de cáncer bucal ya que podría facilitar la absorción de otros carcinógenos provenientes de factores de riesgo (tabaco y alcohol) y la persistencia de una infección bucal por VPH. En la literatura, hasta el momento no hay estudios que evalúan el comportamiento biológico de la UTC y su relación con eventos premalignos o malignos. El objetivo de este estudio fue identificar un patrón de biomarcadores de diferenciación (Ck19, Ck5/6) y de proliferación celular (Ki67) en UTC y compararlo con aquellos patrones observados en Carcinoma de Células Escamosas Bucal (CCEB) y Desórdenes Potencialmente Malignos (DPM). *Materiales y métodos:* se realizó un estudio de corte transversal donde se incluyeron pacientes (n=110) de ambos sexos con UTC (n=41), DPM (n=31) y CCEB (n=38). Se registraron variables clínicas, factores de riesgo de cáncer bucal y VPH (mediante PCR y p16 por inmunohistoquímica). La inmunohistoquímica con Ck19, Ck5/6 y Ki67 fueron realizadas sobre el material obtenido de las lesiones y los patrones obtenidos fueron descriptos según publicaciones previas, diferenciándose en: negativo (0% de células positivas), bajo (10% o menos), medio (10-29%) y altos (más de 30% de células positivas). El presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. *Resultados:* El CCEB mostró una sobreexpresión de los tres marcadores, mientras que se observó un patrón de Ck19 suprabasal y focal en UTC y una expresión baja en el grupo de DPM (p=0,004). La expresión de Ck5/6 tuvo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (p=0,001). Ki67 se observó con una fuerte intensidad (scores medios y altos) de inmunoexpresión en células basales y parabasales del CCEB y DPM, mientras que solo un 15% de las UTC mostraron altos scores de este marcador (p=0,0037). En relación a los hallazgos clínicos, el borde de la lengua fue el sitio con scores altos de expresión de los marcadores en el grupo de CCEB y UTC. Además, IMCO estuvo asociada con la infección por VPH en el 100% de los casos de CCEB y en el 82% de los casos de DPM, sugiriendo un vínculo entre estas dos variables. *Conclusiones:* No hay evidencias científicas sobre patrones de biomarcadores de IMCO; por eso el patrón obtenido es novedoso y podría ser indicativo del rol de IMCO en la carcinogénesis. La persistencia de condiciones celulares ligadas a un epitelio bucal hiperproliferativo e inmaduro en la mayoría de las UTC ubicadas en el borde de la lengua podría representar eventos tempranos similares a los observados en el CCEB. Se necesitan más estudios para comprender completamente el vínculo entre IMCO y CCEB, así como también los mecanismos fisiopatogénicos subyacentes del trauma crónico en el proceso multifactorial de la carcinogénesis bucal.

Abstract

Introduction: Previous experimental and epidemiological studies had provided scientific evidence of the potential role of Chronic Mechanical Irritation (CMI) in the multistep mechanism of oral carcinogenesis. Chronic Traumatic Ulcer (CTU) is a prototype lesion associated with CMI and was recently suggested as a clinical condition with malignant transformation potential. CMI was also considered as an oral carcinogenesis promoter because it could facilitate the absorption of other classical carcinogens (from tobacco and alcohol for example) or the persistent infection of HPV. Nowadays there are no studies in the current literature which evaluate the biological behaviour of CTU and its relationship with oral premalignancy and malignancy. The aim of this study was to identify a biomarker pattern of differentiation (Ck19, Ck5/6) and cell proliferation (Ki67) in CTU and compare it with those observed in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) and Oral Potentially Malignant Disorders (OPMD). *Methods:* a Cross-sectional study with adult patients (n = 110), both sexes, with CTU (n=41), OPMD (n=31) and OSCC (n=38) were included. Clinical variables, risk factors and HPV infection (PCR and p16 by immunohistochemistry) were also recorded. Ck19 and Ki67 immunohistochemistry were carried out in specimens of the lesions and the patterns and scores of immunostaining were described according to previous publications in Negative, Low (10% or less of positive cells), Medium (10-29% of positive cells) and High (more than 30% of positive cells). The present study was approved by the Ethics Committee of the College of Dentistry, Universidad Nacional de Cordoba. *Results:* There were not statistically significant differences between the diagnoses and clinical variables. OSCC showed an overexpression of three markers, while a Ck19 focal and suprabasal pattern was found in CTU, with a lower expression of Ck19 in the OPMD group (p=0,004). Ck5/6 immunoexpression was found significant between the three groups (p=0,001). Ki67 was found with strong intensity in basal and parabasal cells of OSCC and OPMD (medium and high scores), while only 15% of CTU showed high scores of this marker (p=0,0037). Regarding clinical findings, the lateral tongue border was the site with the highest scores of immunostaining in CTU and OSCC group. CMI was associated with HPV infection in 100% of OSCC cases and in 82% of OPMD cases suggesting a link between both conditions. *Conclusions:* there is no scientific literature on biomarker patterns of CMI. Therefore, the described pattern is novel and could be indicative of the relationship between CMI and oral carcinogenesis. The persistence of cell conditions associated with an immature and an hiperproliferative oral epithelium found in the majority of CTU located on the lateral tongue could represent early malignant changes similar to those observed in OSCC. Further studies are needed to completely understand the relationship between CMI and OSCC as well as the underlying mechanisms of chronic trauma within the multistep and multifactorial process of oral carcinogenesis.

Abreviaturas

- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- aldAJCC: American Joint Committee Cancer
- ALDH-1: Aldehido Dehidrogenasa-1
- ARN: Ácido Ribonucleico
- As: Arsénico
- ATO: Azul de Toluidina
- BVP: Virus Papiloma Bovino
- CAI: Comité Académico de Investigación
- CB: Cáncer Bucal
- CCC: Cáncer de cabeza y cuello
- CCEB: Carcinoma de Células Escamosas Bucal
- CIEIS: Comité Institucional de Ética en Investigaciones de Salud
- Ck: Citoqueratina
- COPV: Canine Oral Papiloma Virus
- COX: Ciclo Oxigenasa
- CRPV: Cotton Tail Rabbit Papiloma Virus
- DEO: Displasia Epitelial Oral
- DMBA: Dimetilbenzantraceno
- DPM: Desórdenes Potencialmente Malignos
- EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico)
- FGF: Fibroblastic Growth Factor (Factor de Crecimiento Fibroblástico)
- FDI: Federación Dental Internacional
- FNT: Factor de Necrosis Tumoral
- FOS: Fibrosis Oral Submucosa
- GUTEE: Granuloma Ulcerativo Traumático con Eosinofilia Estromal (del inglés TUGSE)
- HACRE: Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico
- HGF: Factor de Crecimiento de Hepatocitos, (Hepatocyte Growth Factor)
- IARC: International Agency for Research of Cancer
- IC: Intervalo de confianza
- Ig: Inmunoglobulina
- IMCO: Irritación Mecánica Crónica Oral
- LL: Lesiones Liquenoides
- LPB: Liquen Plano Bucal

- LVP: Leucoplasia Verrugosa Proliferativa
- NK: Natural Killer
- NFkB: Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las Células B activadas
- MMP: Metallo Proteinasa
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OR: Odd Ratio
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PGE2: Prostaglandinas E2
- PGsHs: Proteoglicanos de Heparan Sulfato
- pRb: proteína Retinoblastoma
- QPI: Queratosis de Pronóstico Incierto
- ROPV: Rabbit Oral Papilloma Virus
- ROS: Reactive Oxygen Species
- RNS: Reactive Nitrogen Species
- SC: Stem Cell
- SCC: Stem Cell de Cáncer
- TIS: Tumor In Situ
- TGF- α : Factor de Crecimiento Transformante
- TME: Transición Mesénquima - Epitelio
- TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral
- THC: Tetrahidrocannabinoides
- UTC: Úlcera Traumática Crónica
- UM: Úlcera de Marjolin
- VEB: Virus de Epstein Barr
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular)
- VPH: Virus Papiloma Humano
- ZT: Zonas de transición

INTRODUCCION y MARCO TEÓRICO

1. Cáncer Bucal

1.1 Epidemiología

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 7.6 millones de personas murieron durante el año 2005 y que 84 millones morirán en los siguientes diez años sino se realizan acciones adecuadas. Cerca del 43% de los cánceres se deben al consumo de tabaco, a dietas no saludables, a consumo de alcohol y/o a la asociación con procesos infecciosos[1]. A nivel mundial, el cáncer bucal (CB) representa entre el 2 al 5 % del total de los cánceres de todo el organismo[2].

El Cáncer de Cabeza y Cuello (CCC) es una entidad muy heterogénea que comprende aquellas neoplasias malignas que se ubican anatómicamente por arriba de la caja torácica y por debajo de la base craneana, incluyendo las malignidades que asientan sobre las superficies mucosas de cavidad bucal, faringe, laringe, senos paranasales y tumores provenientes de las glándulas salivales[3].

En 2018, en un estudio realizado por Globocan en base a estadísticas de 185 países de todo el mundo, existieron 354864 casos nuevos (casi 15000 solo en América del Sur), representando el 2% de todos los cánceres. Además, se registraron casi 180000 muertes por esta patología. Según estos mismos registros, en América del Sur, es más frecuente en varones (el doble que en mujeres)[4].

Según diferentes informes globales, más de la mitad de los tumores bucales se presentan en Asia con una estimación de 168.850 nuevos casos de CB[2,5,6]. Dentro de los países asiáticos, aquellos ubicados hacia el sudeste de ese continente (Indonesia, Singapur, Malasia, Brunei, Camboya, Filipinas, Vietnam, Tailandia, Myanmar, etc.) son los que presentan, aún con subregistros de la enfermedad, las tasas más importantes y alarmantes de CCEB en todo el mundo. Las razones de estas cifras estarían ligadas a hábitos propios de dichas regiones geográficas como la masticación de betel[6].

La incidencia de CCEB en América del Sur varía de acuerdo con los registros de cada país y las tasas más altas corresponden a Brasil. La mayoría de los tumores son

diagnosticados en estadios tardíos, y casi el 30% de los casos registrados no incluye el estadiaje al momento del diagnóstico. En cuanto a la mortalidad en América del Sur por CCEB, varía de 0.72 a 6.04/100.000 habitantes. Curado y cols, informaron una gran heterogeneidad de los registros de CCEB sudamericanos. Las bases de datos públicas y representativas de CCEB en América del Sur son insuficientes y desactualizadas, generando estadísticas incompletas que no reflejan el verdadero problema de esta patología en nuestro continente[7].

En lo que respecta a la Provincia de Córdoba, Argentina, según los datos del Registro Provincial de Tumores, el CB y de orofaringe, durante el período 2004-2013 no se presentó como una localización frecuente (no estuvo dentro de los diez tumores más frecuentes en la población cordobesa). Según estos registros, en el período anteriormente mencionado, se diagnosticaron con CB 466 mujeres, de las cuales 181 fallecieron y 1043 varones, de los cuales, 499 fallecieron[8].

El CCEB se presenta en una cavidad que se encuentra accesible para la detección temprana, a diferencia de tumores de otras partes del organismo. Sin embargo, la mayoría de las lesiones son diagnosticadas en estadios avanzados. Los profesionales de la salud se ven implicados también en la demora en el diagnóstico de CB, por lo que es relevante la educación continua en temas inherentes al diagnóstico precoz de CB y a los DPM[9,10].

1.2 Carcinogénesis

El término *carcinogénesis* describe una serie de cambios fenotípicos que generan la conversión de una célula normal a una neoplásica, donde además se requieren mutaciones genéticas a lo largo del tiempo. El CCEB, involucra una serie de pasos caracterizados por una acumulación secuencial de defectos genéticos seguidos de una proliferación por clonación. Los procesos neoplásicos que se inician en un epitelio normal, lo modifican transformándolo a un epitelio hiperplásico, displásico, carcinoma in situ y finalmente en un carcinoma invasivo[11,12]. En este proceso se han visto múltiples eventos genéticos y/o epigenéticos que alteran a los oncogenes, genes supresores de tumores, vías regulatorias de funciones celulares como división celular, diferenciación y apoptosis. Esto puede ocasionar un incremento de los factores de crecimiento o número de receptores de superficie celular, aumento de mensajeros intracelulares, y/o incremento

de producción de factores de transcripción. En combinación con la pérdida de actividad de supresión tumoral, esto lleva a un fenotipo celular con capacidad de proliferación incrementada, con pérdida de cohesión celular, modificación de su citoesqueleto y habilidad para infiltrar localmente el tejido y diseminarse a distancia[13].

Las mutaciones de genes que regulan la estabilidad genética pueden conferirle a una célula una ventaja selectiva, permitiendo expandirse e iniciar una dominación clonal[14]. Los proto-oncogenes son genes normales que regulan el ciclo celular y cuya mutación lleva a un crecimiento descontrolado. Cuando un proto-oncogén es alterado por un carcinógeno, se transforma en un oncogén. En consecuencia, se desregula el ciclo celular, las vías de diferenciación, promoción neoplásica y crecimiento tumoral. La ciclina D1, myc, p63 y EGFR (Factor de Crecimiento Epitelial) parecerían ser los protooncogenes mayormente activados en CCC[13,15]. En cambio, los genes de supresión tumoral o antioncogenes son genes que regulan el ciclo celular, la apoptosis, suprimen la proliferación descontrolada y por ende el crecimiento tumoral. Algunos eventos que desactivan al antioncogen, generan una señal continua, anormal, hiperproliferativa y de crecimiento neoplásico. Una de las consecuencias más importantes de la mutación de genes de supresión tumoral (por ejemplo p53), es la inestabilidad genética y la consecuente susceptibilidad del genoma a adquirir múltiples alteraciones[16].

1.2.1 Iniciación, promoción y progresión: la secuencia multietápica de la carcinogénesis bucal

Las células que se encuentra en la primer fase de la carcinogénesis (iniciación), se caracterizan por poseer alteraciones genéticas irreversibles adquiridas por la exposición a diferentes carcinógenos o por circunstancias del azar. Estas células dominan de manera clonal a las vecinas normales y acumulan más alteraciones genéticas hasta que alguna completa las características de una célula maligna, completando la conversión. Son selectivamente reproducidas a través de factores genéticos, propios de dichas células, que influyen la proliferación celular, como crecimiento alterado y resistencia a la citotoxicidad y también por factores epigenéticos que actúan sobre la expresión génica.

La promoción tumoral es un proceso gradual que requiere exposición prolongada al agente promotor, ocupando la mayor parte del período de latencia de la carcinogénesis. No requiere eventos genéticos y es parcialmente reversible. La promoción tumoral ocurre

cuando células iniciadas son selectivamente reproducidas y a partir de ahí se expanden clonalmente. Los promotores tumorales son todos los compuestos tumorigénicos que afectan las células iniciadas y sus vecinas normales. Algunos promueven la expansión de las células iniciadas por modulación e incremento de la expresión del crecimiento y diferenciación de células iniciadas, estimulando la división celular; mientras otros inducen toxicidad selectivamente a las células no iniciadas del tejido circundante. Cualquiera sea el mecanismo, el resultado es la expansión específica de las células iniciadas.

A diferencia de los iniciadores, los promotores tumorales no necesariamente promueven el crecimiento tumoral a través de eventos genéticos específicos; más bien actúan al aumentar la proliferación celular y la expansión clonal de células previamente mutadas. Los iniciadores y promotores no están limitados en sus acciones a la iniciación o a la promoción, ya que pueden contribuir al desarrollo de eventos genéticos a través de todo el proceso de carcinogénesis. Los carcinógenos físicos y químicos son frecuentemente capaces de generar cambios genéticos y epigenéticos[12,17].

La progresión tumoral es definida como la adquisición progresiva de ciertos atributos de malignidad (capacidad de infiltración, capacidad para producir metástasis, respuesta a hormonas, etc.), que permiten el crecimiento a lesiones clínicamente detectables. Requiere proliferación clonal continuada de las células genotípicamente o fenotípicamente alteradas. El proceso puede estar acelerado por exposición a estímulos carcinogénicos o por presiones de selección ambiental (Figura 1). Las células proliferan causando un rápido incremento de tamaño, dependiendo del aporte de factores de crecimiento y de un adecuado aporte sanguíneo [18]. A medida que el tumor progresa, las células pierden su capacidad de adhesión y producen metástasis por medio de etapas comunes a la mayoría de los tumores: invasión de tejidos normales locales, ingreso y tránsito de células neoplásicas en sistemas linfático y sanguíneo, y establecimiento de crecimientos tumorales secundarios en sitios distantes[19,20].

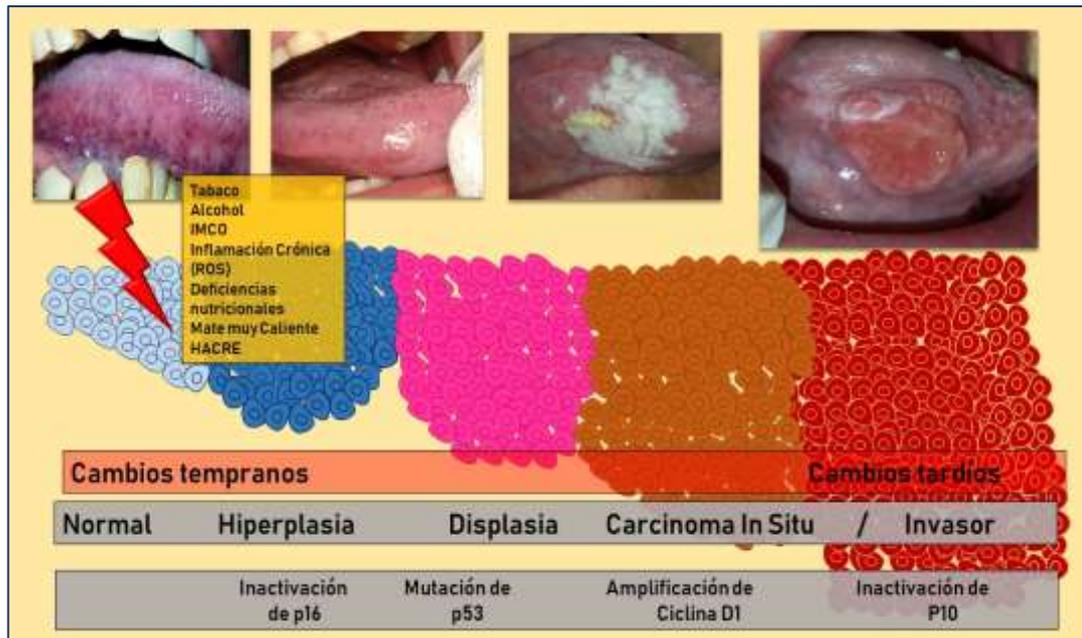


Figura 1 –Modelo clínico, histológico y molecular de carcinogénesis bucal. Los diferentes agentes carcinogénicos actúan sobre una mucosa bucal clínicamente sana, pero con posibilidades de contener cambios genómicos (mucosa iniciada). Los cambios moleculares tempranos pueden llevar a un epitelio hiperplásico a desarrollar cambios celulares y la instalación de la displasia. La historia natural de la enfermedad lleva a la acumulación de cambios genómicos con inactivación y mutación de genes. Cuando estos cambios involucran toda la integridad epitelial, se desarrolla el carcinoma in situ, para luego, hacerse infiltrante. Extraído y modificado de *Panta y cols. Oral Cancer Detection. Springer. Panta y cols. Enero 2019. DOI:10.1007/978-3-319-61255-3.* y de *Farah y cols. Premalignant conditions of oral cavity. Capítulo 3: Oral Carcinogenesis and malignant transformation. Enero 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-2931-9[21,22]*

1.2.2 Células madre y células madre de cáncer

En los últimos años, los estudios que abordan el rol de las Células Madre y Células Madre de Cáncer (del inglés, Stem Cells; SC y Cancer Stem Cell; SCC) han provisto de relevante evidencia científica al campo de la carcinogénesis bucal. Durante la fase inicial, una SC adquiere alteraciones genéticas que las transfiere a sus hijas, formando nidos celulares. En la segunda fase, existe una expansión clonal (un clon es una unidad genéticamente homogénea), formando un campo de células. A medida que el proceso transcurre, las SC forman clones celulares con alteraciones genéticas, para finalmente formar un campo expandido que puede variar en tamaño y no ser detectado, o aparecer clínicamente como leucoplasias o eritroplasias. Existen clones que dominan sobre otros, y son los que llevan al desarrollo de carcinomas. Desafortunadamente estos clones celulares son informados como benignos en estudios histopatológicos de rutina[21,23–25].

El término *cancerización de campo*, fue utilizado hace muchos años inicialmente para referirse a la posibilidad del desarrollo de cáncer en múltiples sitios[12,26]. El CCEB puede desarrollarse durante muchos años en forma latente para luego encontrarse en múltiples sitios de transformación neoplásica presente en la mucosa bucal. En algunos estudios, se observaron acumulación de genes supresores de tumores en sitios de DPM y en mucosa clínicamente sana cercana a carcinomas[27], lo que indicaría que el proceso de carcinogénesis bucal inicia con cambios a nivel celular, sin expresión clínica. Una reciente investigación basada en hallazgos genéticos reveló que los tumores bucales desarrollados en sitios distantes, pero dentro de la misma cavidad bucal derivan de un clon inicial[28]. La cancerización de campo también fue vinculada a la presencia de SCC[29]. Existen marcadores celulares de SC identificados en CCC, siendo CD44 el más utilizado, sin embargo hay otros como CD133, CD24, ALDH-1, etc.[30,31] y menos específicos CD147, CD97, CD117, Ck19 y ESA[32].

El CCEB deriva de una naturaleza heterogénea ligada a SCC. Son histológicamente heterogéneos, con áreas de diferenciación celular dispar, patrones diferentes de proliferación, de expresión genética y perfiles inmunohistoquímicos no siempre similares[32]. Existirían dos modelos que explican esto: en el modelo estocástico, la transformación maligna deriva de una mutación al azar que puede afectar cualquier célula y el tumor resulta de una progresión clonal de la progenie mutante que adquiere ventajas proliferativas, acumulación de eventos genéticos y epigenéticos y en consecuencia subclones más agresivos[33]. El desarrollo de características proliferativas y fenotípicas diferentes por parte de los subclones sería la explicación a la heterogeneidad tumoral[34]. El otro modelo es el relacionado a SCC, basado en hallazgos experimentales que sugieren que un número reducido de SCC son capaces de generar tumores cuando son inoculados a diferentes animales de experimentación[35,36]. La longevidad de las SC aumenta el riesgo de acumular múltiples mutaciones y por eso, el desarrollo del CCEB llevaría meses e incluso años de células iniciadas, que clínicamente se observan normales. Las SCC generarían una apropiación de la maquinaria implicada en los procesos de autorrenovación de las SC normales[37] Figura 2.

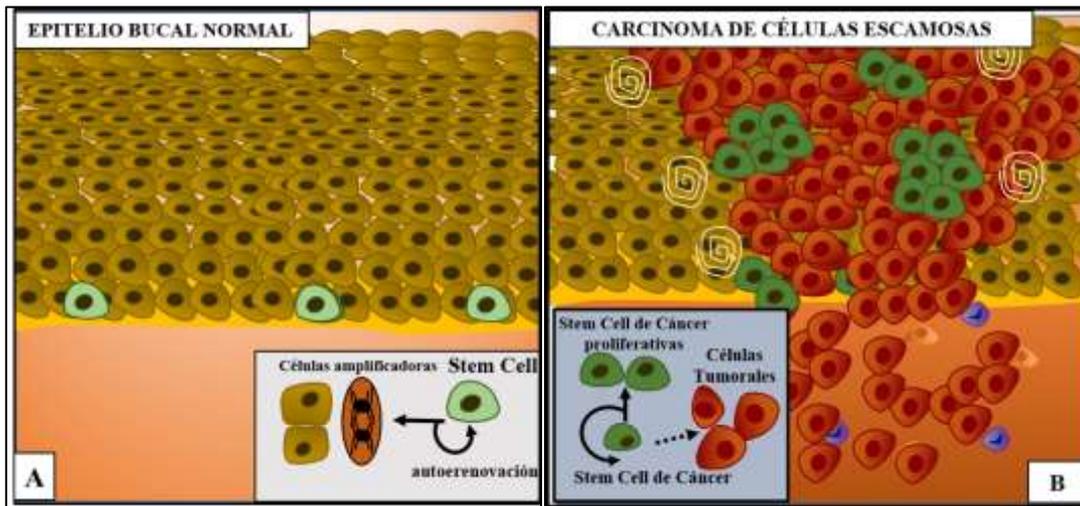


Figura 2 – A Esquema del epitelio bucal normal. B Esquema de CCEB. En A, la división asimétrica de SC normales ubicadas en forma intermitente en la capa basal genera una SC hija, proporcionando su autorrenovación y otra SC hija amplificadoras que lleva a cabo la diferenciación epitelial. En B, la pérdida del control de genes relacionados al crecimiento celular se genera en respuesta a la acumulación de mutaciones somáticas de SC, llevando a la conversión de SC de Cáncer. Estas células retienen las propiedades biológicas de autorrenovación y generación de células tumorales. Estas SC de Cáncer, reflejan el la habilidad del tumor para el crecimiento indefinido y la heterogeneidad morfológica de los tumores. Extraído y modificado de Oliveira y cols, 2017). "Oral Cancer Stem Cells – properties and consequences" Oliveira y cols 2017. *J Appl Oral Sci.* <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0665>. [38]

1. 3 Factores de Riesgo de Cáncer Bucal

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) con sede en Lyon, Francia, tiene como objetivo principal la preparación de revisiones y evaluaciones de la evidencia disponible sobre los diferentes agentes carcinogénicos (físicos, químicos, biológicos, etc.). Los aportes realizados por IARC, se basan en publicaciones previas en cooperación con diferentes grupos de trabajo de expertos internacionales. Las *Monografías* de IARC representan el primer paso en la evaluación de un riesgo carcinogénico para humanos. Además, estas revisiones tienen como objetivo informar cuáles son las áreas temáticas donde se necesita más esfuerzos en investigar, específicamente cuando la evidencia no es concluyente [39,40].

A pesar de que la carcinogénesis bucal es un proceso multifactorial, la mayoría de los estudios relevan factores de riesgo tradicionales como tabaco y alcohol, y mucho menos frecuentemente otros factores [41]. Los primeros trabajos publicados de factores de riesgo asociados al desarrollo de CCEB, datan de la década del 50 y relacionan directamente el consumo de tabaco con un riesgo incrementado de desarrollar la enfermedad [42–45]. La investigación clínica ha permitido en las últimas décadas la generación de más evidencia científica, resaltando la naturaleza multifactorial de CCEB,

dependiente de otros factores de riesgo y no solo la limitación a factores de riesgo clásicos.

El CCEB, ha sido previamente asociado con las cinco Eses (del inglés “the 5 Ss”): *smoking, spirits, syphilis, spices, sharp/septic teeth*. Esta teoría propone al consumo de tabaco, alcohol, especias (refiriéndose a algunos hábitos asociados a la masticación de la nuez de betel en la India), infecciones bacterianas como Sífilis y la presencia de dientes sépticos o filosos como factores causales de CCEB. El consumo de tabaco y alcohol son factores de riesgo en forma individual, aunque la combinación de ambos generaría un efecto sinérgico. La evidencia científica en estudios epidemiológicos los posiciona como factores clásicos, evidentes y aceptados[41,46,47]. El rol de la sífilis terciaria en la carcinogénesis bucal ha sido propuesta a los inicios del siglo XX, sin embargo actualmente es raro encontrar en la clínica pacientes sifilíticos en ese estadio [48,49].

Bajo el título de “dientes sépticos o filosos” los investigadores han propuesto factores locales inherentes al tejido dentario, periodontal y su asociación con la mucosa bucal. A la hora de elaborar medidas preventivas, es importante entender los factores de riesgo asociados a la enfermedad.

Para organizar la evidencia científica disponible y el abordaje de este tema, clasificaremos los factores de riesgo según Warnakulasuriya, 2009[50]:

- **No modificables:** *edad, etnias y estado socioeconómico;*
- **Modificables:** *consumo de alcohol y tabaco, dieta y betel;*
- **Emergentes:** *infección por VPH, inmunosupresión y consumo de mate;*
- **Controversiales o con evidencia limitada:** *factores dentarios, higiene bucal, contaminación ambiental;*
- **Inconsistentes o sin evidencia:** *herencia mórbida de cáncer, consumo de cannabis, masticación de khat, HIV y alcohol en enjuagues bucales.*

En nuestro medio, los factores de riesgo de CCEB, han mostrado diferencias importantes en su frecuencia respecto a los conocimientos previos de los mismos, como es el caso del tabaco. La acumulación de factores de riesgo de CCEB es el factor de riesgo de mayor potencia y con mayor capacidad predictiva que cualquiera de los factores de riesgo considerados individualmente. La naturaleza multifactorial del CCEB requiere incluir la mayor cantidad de variables posibles en las investigaciones, para permitir el estudio de factores de riesgo emergentes en CCEB[51].

1.3.1 Edad y Género

El CCEB ha sido considerado históricamente una enfermedad de adultos mayores varones y de todos los factores que pueden contribuir al desarrollo de CCEB, la edad es el factor que confiere el riesgo más alto[52]. La alta prevalencia de CCEB en varones, se relaciona con un mayor consumo de tabaco y alcohol por el género masculino en el pasado[53]. Como esta conducta comenzó a ser prevalente también en el género femenino, la diferencia entre géneros ha disminuido también a una relación que aproxima cada vez más a 1:1[54,55], de manera que algunos autores sugieren no considerarlo un factor de riesgo[5]. En países donde los hábitos de consumo de tabaco y alcohol persisten en el género masculino, la relación varón: mujer aumenta a 4:1[56].

Aproximadamente el 90% de los pacientes con CCEB son mayores de 40 o 45 años[52,53,57]. La relación entre la mayor incidencia de CCEB y la edad puede deberse a la exposición acumulada por largo tiempo a agentes carcinogénicos, a la incorporación de alteraciones genéticas o epigenéticas del ADN mediante procesos dependientes de la replicación celular (aneuploidía, mutaciones, daño oxidativo, acortamiento de telómeros, etc.) como así también a la disminución de la capacidad de reparación del ADN, a la depresión de la inmunovigilancia, y a la pérdida de la homeostasis proliferativa[58,59].

En la última década, existió un aumento de la incidencia del CCEB en adultos jóvenes. Los estudios epidemiológicos han demostrado que los factores de riesgo difieren a los presentes en los pacientes mayores a 45 años. Algunos de los trabajos han propuesto como posibles factores de riesgo para CCEB en pacientes jóvenes la presencia de una dieta pobre en vegetales verdes y frutas, el consumo de marihuana, la inmunosupresión, la infección con VPH oncogénico, etc.[60–64]. El dramático incremento de pacientes jóvenes con CCC asociado a VPH caracteriza a un “nuevo paciente con cáncer” el cual es joven, no toma y no fuma [65].

1.3.2 Consumo de tabaco, tabaco libre de humo y marihuana

El tabaco continúa siendo el factor de riesgo más prevalente de las neoplasias malignas y por sí solo lleva a millones de muertes anualmente. La relación entre el consumo de tabaco y CCEB fue ampliamente reportada en diferentes estudios epidemiológicos[49]. Aquellas personas que fuman presentan un riesgo mayor de padecer CCEB que aquellos que no fuman, así como también presentan mayor riesgo de padecer CCEB aquellos exfumadores. Es fundamental, además, entender que existe una relación

dosis-efecto entre el hábito de fumar y el riesgo incrementado de padecer CCEB. [57,66–71].

El humo de tabaco es una mezcla compleja que contiene más de 4000 sustancias químicas. Al menos 200 son tóxicas en humanos o en animales de laboratorio, y más de 50 han sido identificados como carcinógenos conocidos, probables o posibles para el ser humano[72]. La actividad carcinogénica total del humo del tabaco refleja la combinación de iniciadores, promotores y compuestos que activan la proliferación celular[73]. Los carcinógenos más importantes son los hidrocarburos aromáticos benzo-pirénicos y nitrosaminas específicas asociadas a tabaco [49]. La nicotina es la que genera el principal efecto sobre la carcinogénesis ya que indirectamente, provee de la dependencia a través del cual los fumadores, son repetidamente expuestos a los elementos carcinogénicos y genotóxicos del cigarrillo. [74]. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos del humo del tabaco pueden producir eventos genéticos, daños en el ADN y la consecuente sustitución de bases, pudiendo afectar varios genes, por ejemplo, p53. Asimismo, las nitrosaminas pueden generar hipermetilación del ADN, mutaciones simples e inactivaciones de los genes supresores tumorales, etc. [73].

Los daños en el ADN generado por los químicos carcinogénicos del humo del tabaco pueden ser reparados por sistemas que restituyen la estructura normal del ADN. Estos sistemas no siempre son eficientes. Las enzimas xenobióticas son aquellas que se encuentran implicadas en la activación o degradación de carcinógenos o procarcinógenos. Los polimorfismos genéticos de la codificación de genes para estas enzimas, juegan un rol fundamental en la predisposición a CCC asociados a tabaco[75]. Estas enzimas son polimórficas y condicionan la respuesta biológica individual a los carcinógenos que generan daño en ADN ligado a tabaco [76]. Algunos tumores de tejidos no expuestos directamente a tabaco, han sido asociados a los no fumadores que respiran el humo de tabaco ambiental, ya que inhalan los mismos carcinógenos que los fumadores activos, como también otros componentes tóxicos [77,78].

La marihuana, el nombre popular que se le da a las flores secas de la planta *Cannabis Sativa*, también suele ser fumada en cigarrillos. La planta posee altas dosis de Tetrahidrocannabinoides (THC) y también su consumo libera carcinógenos como benzo-pirenos, fenoles, fitoesteroles y ácidos durante su combustión[49]. El CCEB en los pacientes jóvenes tiene patrones etiológicos que difieren con los del adulto, y el consumo de marihuana aparece entre algunos de los factores de riesgo implicados, sobre todo de

localización lingual [79,80]. Es controversial la relación entre marihuana y riesgo de CCC. En el trabajo de Gillison y cols, el consumo diario de marihuana estuvo estadísticamente asociado a CCCVPH16. No hay pruebas suficientes para implicar o exonerar la marihuana como un carcinógeno en humanos. Por ello, es biológicamente probable que la marihuana actúe como promotor del desarrollo del VPH y su infección en el CCC y su relación con carcinogénesis asociada a virus[81]. Los Cannabinoides, al unirse a receptores CB2 expresados en células B, NK, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T suprimen la actividad de ellas. Esto pudo evidenciarse en estudios animales [81–83], suponiendo un aumento y persistencia de la infección e inhibición de la inmunidad antitumoral [81].

La utilización del tabaco libre de humo (sin combustión), ha comenzado a ser un hábito prevalente en las últimas décadas en todo el mundo. Es un hábito que permite mayor contacto entre el tabaco y la mucosa facilitando la absorción de la nicotina, aunque también puede ser utilizado por medio de la masticación o por vía nasal [84]. Por ejemplo, el uso de “oral snuff” (moist snuff) es más común en el oeste asiático. Este hábito causa una entidad llamada “Cáncer asociado a snuff”, con similitudes al carcinoma verrugoso (CV)[85]. En resumen, no es una forma segura de consumir el tabaco ya que los estudios han demostrado un incremento del riesgo de CCEB [84,86]. Finalmente, en algunas regiones de Colombia se practica el hábito de “*candela p’adentro*”, asociado fuertemente a CCEB. El fumar invertido supone la utilización de la parte quemante hacia el interior de la mucosa. Los individuos que practican este hábito tienen alta incidencia de leucoplasias, palatitis nicotínicas y carcinomas. La injuria térmica sostenida en el tiempo podría tener el efecto sinérgico carcinogénico[87].

1.3.3 Consumo de alcohol

Las bebidas alcohólicas han sido consideradas carcinogénicas para el humano generando particularmente tumores de cavidad bucal, faringe, laringe, esófago e hígado[49]. El consumo de alcohol ha sido demostrado que actúa sinérgicamente con el efecto deletéreo del tabaco incrementando el riesgo de CCEB [49,50,57,60,71,88]. Pocos estudios han logrado analizar pacientes bebedores, pero no fumadores y viceversa. En un estudio, se determinó que el consumo de alcohol fue un factor de riesgo independiente para lesiones de precáncer en un grupo de pacientes de la India[89]. El aumento del riesgo de CCEB aumenta aún en ex bebedores, con una relación dosis efecto. [66,67,71,90,91].

La IARC ha establecido que existe suficiente evidencia para identificar al acetaldehído, metabolito más importante del etanol, como carcinógeno en animales, siendo posiblemente carcinógeno para humanos[40]. Al igual que ocurre en el hígado, el metabolismo del etanol en la cavidad bucal se caracteriza por una primera oxidación que lo transforma en acetaldehído a través de enzimas presentes tanto en la microflora bucal como en las células de la mucosa. Posteriormente, el acetaldehído sufrirá una segunda oxidación que lo transformará en acetato. Esto resulta en elevadas concentraciones de acetaldehído carcinogénico a lo largo de todo el tracto gastrointestinal[92–94]. La escasa higiene bucal, el hábito alcohólico y el consumo de tabaco en forma crónica modifica la flora bucal, produciendo más acetaldehído que el presente en el alcohol ingerido[95].

El alcohol tiene un efecto especial en zona ventro-lateral de lengua y piso de boca[96,97], generando un incremento de la permeabilidad, permitiendo mayor absorción de otros carcinógenos[49,96]. La disminución del espesor del epitelio bucal, facilitaría la penetración de carcinógenos hacia la capa basal del mismo, en donde se ubican las células con capacidad mitótica, y por lo tanto más susceptibles a la acción de los mismos[49,51,77]. Esta respuesta hiperproliferativa es importante ya que las células en continuo estado de replicación presentan la posibilidad de acumular mayores errores genéticos y mutaciones, generando daños irreversibles[93,98].

Una de las mayores alteraciones causadas por el etanol es la interferencia en el metabolismo de la vitamina A, conocida por estar implicada en funciones biológicas como regular el ciclo celular, crecimiento, diferenciación y apoptosis de una amplia variedad de células. Entre algunas de sus funciones está la activación de factores de transcripción de una serie de genes de supresión tumoral. La disminución de vitamina A por alteración en su metabolismo y activación interfiere en la señal de transducción de estos genes, resultando en proliferación celular y potencialmente transformación maligna[99]. La falta de una alimentación saludable ligada al alcoholismo incluye ingesta deficiente de zinc, selenio y vitaminas (ácido fólico, riboflavina, retinol, ácido ascórbico, alfa tocoferol). La inmunosupresión secundaria asociada al consumo crónico de etanol, agrava esta situación[94,98].

La ingesta de alcohol disminuye la secreción salival e influencia la composición bacteriana, resultando un incremento en la proporción de *Neisseria spp* en cavidad bucal, las que a su vez presentan una capacidad de transformar etanol en acetaldehído hasta cien veces mayor que otras especies bacterianas. Los bajos niveles de higiene bucal

frecuentemente presentes en bebedores, repercutiría en una mayor concentración de acetaldehído salival[100–102].

Por último, la elevada cantidad de alcohol en algunos colutorios, así como su permanencia en la mucosa bucal durante más tiempo que una bebida alcohólica, puede hacer pensar en un efecto nocivo a partir de un mecanismo local. Un estudio reciente determinó citotoxicidad y genotoxicidad de queratinocitos bucales asociados a la exposición por treinta segundos de etanol al 20% en colutorios, a partir de un mecanismo ligado a mayor división de stem cells y mayor riesgo de adquirir propiedades neoplásicas[103].

1.3.4 Consumo de mate

El mate es una infusión acuosa preparada con las hojas secas de *Ilex paraguarensis*, consumida principalmente en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. Es usualmente bebido con agua muy caliente, aunque en algunas regiones de Paraguay, sur de Brasil y noreste de Argentina se toma también frío (tereré). Entre numerosos constituyentes, han sido identificados en el mate sustancias como cafeína, teobromina y un número de ácidos clorogénicos[49,104,105]. La temperatura puede considerarse “caliente” cuando está en 50-65°C y “muy caliente” más de 65°C. Sin embargo, existe una variación considerable en la subjetividad de los individuos para identificar estas variables. Esta subjetividad también puede estar condicionada por factores culturales, género y edad de consumo[105]. El consumo de mate caliente es probablemente carcinogénico para humanos (Grupo 2^a de IARC). La revisión de la evidencia epidemiológica en este vínculo se ha fortalecido desde el Volumen 51 de IARC con la asociación positiva en estudios que consideraron diferentes graduaciones de temperaturas (fría, tibia, caliente y muy caliente).

En estudios experimentales, se demostró que el agua por encima de los 65°C, tendría acciones carcinogénicas [105]. El consumo de mate con agua caliente tiene un rol significativo en el desarrollo de cánceres bucales, orofaríngeos y esofágicos en estudios realizados en Argentina, Brasil y Uruguay[104,106–109]. Si bien la injuria térmica ha sido propuesta como mecanismo de acción, no se puede descartar que tenga también un efecto de carcinogénesis química, ya que el mate puede actuar como un solvente para los carcinógenos químicos. El mate contiene también taninos y compuestos nitrogenados, los cuales son sospechados como posibles carcinógenos[107,110]. Otros estudios sugieren

que el efecto carcinogénico del mate se debería a la presencia de benzopireno, el cual es incorporado durante el proceso de industrialización de la yerba[111,112]. Sin embargo, el efecto antioxidante de la infusión de yerba mate, podría generar un efecto protector sobre el CCEB [113].

Uno de los primeros trabajos publicados en la relación entre consumo de mate y cáncer, fue en relación con tumores esofágicos [114]. En Argentina, un estudio de casos y controles realizado por Castelletto y cols, encontró una relación positiva entre el incremento de riesgo de cáncer de esófago y consumo de tabaco y alcohol, pero no con la ingesta de mate. Sin embargo, el riesgo de cáncer fue mayor para el grupo que bebía mate caliente o muy caliente en relación a los que no bebían[115]. En un reciente metaanálisis y revisión sistemática, se encontró un aumento del riesgo de cáncer bucal, faríngeo y esofágico entre los consumidores de mate[116].

1.3.5 Infección Bucal por Virus del Papiloma Humano

Los Virus Papiloma Humano (VPH), son un grupo de virus de doble cadena que pueden infectar células epiteliales. La evidencia aportada por estudios de casos y controles y estudios de cohortes indican que algunos subtipos de VPH aumentan el riesgo de cánceres del tracto aerodigestivo superior.

En 1977, Zur Hausen[117] sugirió que el VPH está implicado en carcinogénesis cervical. Siete años más tarde, en 1983, se publicó la primera evidencia que planteó que un 20% de los cánceres bucales se asocia con el VPH, basada en la detección de las proteínas estructurales de VPH. En 2011, la IARC declaró que existen pruebas suficientes que el VPH16 está asociado causalmente con el CCEB [39].

El VPH infecta células basales a través de microabrasiones epiteliales evadiendo el sistema inmune ya que durante su replicación no induce citólisis, necrosis o viremia. Sin embargo, el 90% de las infecciones son eliminadas a los dos años a partir de una respuesta mediada por células sobre las proteínas tempranas del VPH(12, 13). En investigaciones sobre modelos animales se observó una relación entre la presencia de una herida previa y la inoculación de VPH. Los Virus Papiloma están asociados con abrasiones epiteliales y la presencia de una pérdida de sustancia es necesaria para iniciar la infección. En un estudio sobre conejos se observó que la herida producida tres días previos a la infección con VPH aumentó significativamente la eficiencia de la infección.

Este hecho es indicativo de la importancia de un microambiente particular para que la infección sea viable y eficiente[120].

Además, el VPH latente puede reactivarse llevando a la recrudescencia de la enfermedad. En algunos casos, la inmunosupresión parecería ser uno de los mecanismos facilitadores de la reactivación del VPH, pero en otros, en asociación con factores locales relacionados con la reactivación del Papiloma latente, la irritación mecánica también contribuiría a este proceso. En los ratones *Mastomys natalensis* se demostró que luego de repetidas irritaciones mecánicas sobre la piel durante 8 semanas, se aumentó el número de copias virales por célula 58 veces más que en la piel no irritada. Estos descubrimientos sugirieron que la estimulación celular y la inducción mecánica de la irritación traumática sobre el epitelio son suficientes para promover la activación del genoma del Virus Papiloma que aparentemente se encontraba latente. Esto también se demostró en experiencias con modelos animales lepóridos del género de los *Sylvilagus* (conocidos como conejos cola de algodón) y el virus del conejo cola de algodón (CRPV; del inglés Cotton Tail Rabbit Papilloma Virus)[118,119,121–123].

Una vez internalizado, el virus escapa a diferentes respuestas inmunológicas e infecta sitios inmunológicamente privilegiados [62,124]. Además, se ve desregulada la expresión de interleuquina 10 y 7 y se subregula la expresión de cadherinas, llevando a una débil adhesión entre los queratinocitos y las células de Langerhans, bloqueando la migración a los ganglios linfáticos[125,126]. Benitez y cols, estudiaron la asociación entre VPH, tabaco, alcohol, irritación mecánica crónica y candidiasis y la presencia de DPM y CCEB. En la población bajo estudio, se observó que los pacientes con diagnóstico de carcinomas tenían asociados factores como candidiasis, infección con VPH y factores traumatizantes crónicos. Los individuos con DPM, presentaron una asociación con IMCO y presencia de VPH[127]. El vínculo entre VPH e IMCO fue previamente postulado en diferentes modelos de infección viral en cuello de útero. Gravitt, informó que el VPH ginecológico en fase latente se reactiva por el microtrauma que se genera durante el acto sexual, ya que al estimular en forma mecánica las células basales infectadas, se promueve la síntesis de partículas virales[128]. En consonancia, se postuló un modelo similar para la cavidad bucal[129].

Durante la carcinogénesis ligada al VPH, el virus, sobre todo los genotipos 16 y 18, se integran a los cromosomas de las células hospedadoras (no así en el caso de VPH de bajo riesgo como VPH 6/11 donde su ubicación es episomal). Durante la integración

al genoma celular, se pierde la expresión del represor transcripcional, E2 y se expresan las proteínas virales E6 y E7 las cuales son necesarias para el mantenimiento del fenotipo transformado de las células carcinomatosas. La actividad de estas oncoproteínas virales están relacionadas a la capacidad de asociarse y desregular varios complejos de proteínas regulatorias como p53 y pRb[62,124,130–133]. E6 y E7 son capaces de inmortalizar queratinocitos, aunque inmortalización no es sinónimo de transformación carcinomatosa, por eso se necesitan cofactores adicionales[124]. Esto ha sido recientemente demostrado utilizando las proteínas E6 y E7 de VPH16 en el epitelio escamoso estratificado de ratones transgénicos. La exposición a bajos niveles de estrógenos durante seis meses resultó en el desarrollo de carcinoma cervical, pero en la mucosa bucal, solo se observó una proliferación epitelial aberrante. En presencia de carcinógenos químicos, los animales desarrollaron carcinomas bucales y esofágicos como así también papilomas asociados al virus[134,135]. Los modelos experimentales una vez más permitieron entender la progresión de las lesiones de alto grado ligadas a VPH. Este proceso en la cavidad bucal ocurriría con escasa frecuencia y requiere de mutaciones adicionales [124,133].

Uno de los trabajos más citados en relación con la asociación entre VPH y CCC es una revisión sistemática de Kriemer y cols. La prevalencia de VPH sobre 5046 casos de CCC asociados al VPH fue de 25,9%. La cifra fue mayor en tumores orofaríngeos que en CCEB (23,5%)[136]. También fue reportado previamente que la diferencia de la prevalencia de VPH en los diferentes tipos de tumores que afectan cabeza y cuello puede deberse a una divergencia en la distribución geográfica: de 12163 pacientes provenientes de 44 países diferentes, el ADN-VPH fue detectado en 3837 casos, 24% de los casos asociados a CCEB. Los valores más significativos fueron de Asia (43%), mientras que en Europa la prevalencia fue de 17%. El VPH16 fue el 82,2% del total de los genotipos detectados[137]. En 2016, Castellsague y cols, reportó sobre un total de 3680 tacsos parafinados de CCEB, cáncer de faringe y laringe provenientes de 29 centros de patología de diferentes partes del mundo, la detección de ADN viral en 24,9% de los ejemplares de carcinomas orofaríngeos. Este valor disminuyó a 18% cuando el criterio para positividad se basó en VPH-ADN y la positividad de la proteína p16 y 16 E6 mARN positivo. En CCEB la detección viral fue de 7,4% y solo el 3% fue simultáneamente VPH-DNA, p16+ y 16 E6 mARN[138]. En 2007, se reportaron 1121 de estudios de casos y controles que evaluaban VPH y su relación con CCEB y DPM (desde 1996 a 2010) encontrando una heterogeneidad importante entre ellos. La prevalencia total fue de 33% en CCEB y 12%

en los controles, con odds ratio de 3,98 (95% IC: 2,62-6,02). VPH16 fue el genotipo más frecuentemente detectado. Los odds ratio de asociación entre VPH y DPM fueron de 4,1 (95% IC: 2,87-5,93). Esto implica la importancia de identificar la presencia de VPH16 en DPM ya que podría condicionar la evolución de la lesión[139].

Recientes estudios han demostrado que el VPH y el consumo de tabaco son factores de riesgo independientes para cáncer orofaríngeo y que la prevalencia de la enfermedad se incrementa con el consumo de tabaco tanto en tumores VPH16 positivos como negativos[140]. Sin embargo, en estudios de nuestro medio, se encontró una fuerte asociación de lesiones bucales asociadas a VPH en pacientes fumadores, y esto podría deberse a una relación entre el efecto nocivo de los compuestos del tabaco sobre las células presentadoras de antígenos, pudiendo cooperar a una infección más eficaz y persistente[141,142].

Por muchos años, el VPH fue diagnosticado a partir del examen de microscopía óptica a través de los cambios histológicos observados, producto del efecto citopático viral como la coilocitosis. En la mucosa bucal, existen frecuentemente células vacuoladas similares a las coilocíticas, generadas por IMCO por lo que no sería confiable asociar esta imagen con el virus, tal como ocurre en cuello uterino[143]. La proteína p16 fue recomendada como un marcador alternativo de la infección por VPH. La concordancia entre p16 y VPH-ADN parecería ser muy marcada en el cáncer orofaríngeo, seguido por el de lengua. Sin embargo, su expresión no es confiable para estimar la positividad de infección por VPH en mucosa bucal. Recientemente se demostró que la utilización de p16 como signo de infección por VPH podría resultar en un 20% de falsos positivos en CCC[124,144,145]. Según otros autores, existiría un tipo de displasia epitelial bucal ligada al VPH, llamada antiguamente como *displasia coilocítica*, la cual presenta un patrón inmunohistoquímico p16 positivo y en bloque a lo largo de todo el epitelio, asociado a la infección por VPH. En el mismo estudio, se detectaron que todas las displasias p16 positivas albergaron VPH de alto riesgo mediante técnicas de hibridación in situ. Además, mediante la utilización de técnicas de rutina, los hallazgos histológicos más importantes fueron células apoptóticas eosinofílicas en todo el epitelio asociados a queratinocitos con cambios displásicos. Estos casos mostraron una positividad intensa en el citoplasma para VPH de alto riesgo e intensa inmunotinción con p16, similares a los patrones encontrados en neoplasias intraepiteliales cervicales y carcinomas orofaríngeos ligados al VPH[146–149]. La infección por VPH puede ser identificada también mediante

la detección de ADN o ARN. La detección de VPH por ejemplo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), solamente indicaría la presencia de ADN viral, pero no permite establecer un diagnóstico de infección activa o pasada[124,150].

1.3.6 Factores dento-periodontales, rol de la microbiota

En las últimas décadas, cada vez son más los estudios que profundizan la relación entre CCEB y factores dentarios, con una gran diversidad de variables dentarias estudiadas y escasa concordancia en la forma de mensurarlas[51]. Entre ellas, se encuentran las siguientes: condición general de la boca, higiene bucal, sangrado gingival, cálculo dental, frecuencia de control dental, frecuencia de cepillado dental, dientes perdidos, dientes defectuosos, prótesis desadaptadas e IMCO[57,67,70,151–165]. La enfermedad periodontal, evaluada a través de la pérdida de inserción, ha sido reportada también como un factor de riesgo independiente para CCEB [162,166]. Los individuos que no realizan controles dentales regulares tienen significativamente peor higiene bucal, lo que permite la acumulación de placa bacteriana, y a largo plazo el asentamiento de procesos cariosos y enfermedad periodontal, con el consecuente estado dental deficiente por pérdida de elementos dentarios o presencia de dientes defectuosos[160]. Según un trabajo efectuado en Nigeria, en ausencia de otros factores de riesgo, la pobre higiene bucal y los índices periodontales alterados fueron factores de riesgo para CCEB [167].

En la cavidad bucal residen múltiples comunidades bacterianas de más de 700 especies así como también bacterias oportunistas y comensales, hongos y virus, los cuales conviven en una relación simbiótica con el organismo y su sistema inmunológico[168–170]. Algunas bacterias como *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, etc. estuvieron relacionadas con el CCEB [171,172] y algunas bacterias gram positivas (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus alfa-hemolíticos*, *Corynebacterium spp*, *Stomatococcus spp*) y los hongos (*Candida spp*) estuvieron asociados con producción aumentada de acetaldehído, fundamentalmente entre bebedores de alcohol[100]. Estos hallazgos sugieren que algunos biotipos de microbiomas bucales contribuirían al desarrollo de cáncer más que otros. La posibilidad de estar implicados o no estaría en relación a la capacidad de colonizar el epitelio, producir carcinógenos, estimular la promoción tumoral, metabolizar procarcinógenos y modificar el microambiente y la inflamación crónica[168,173]. La microbiota podría cooperar en el desarrollo del CCEB a partir de tres mecanismos: inflamación crónica, proliferación

celular/inhibición de la apoptosis[174] y producción bacteriana de ROS, RNS, compuestos de sulfuro volátil y ácidos orgánicos [175,176]. En pacientes con enfermedad periodontal se ha detectado la presencia de VPH en forma significativa, indicando que la bolsa periodontal puede constituirse en un reservorio de VPH. El epitelio de la vertiente interna presenta células basales expuestas fisiológicamente al medio bucal, siendo una condición facilitadora de infección por VPH[165,177].

El edentulismo, es un indicador de una historia de larga data de higiene deficiente. Además, la presencia de diastemas, dientes extruidos, palatinizados, lingualizados o vestibulizados, junto a dientes con caries macropenetrantes, fracturados o con restauraciones rugosas, a prótesis defectuosas y a hábitos parafuncionales de deglución, mordisqueamiento o succión, aumentan la irritación de la mucosa bucal en forma crónica, pudiendo producir una amplia gama de lesiones traumáticas [51,88,153,178–180].

La inflamación crónica a menudo resulta en ciclos repetidos de daño y proliferación celular compensadora, incrementando el número de células que están dividiéndose y por lo tanto susceptibles de sufrir daño en su ADN. Además, procesos inflamatorios crónicos llevan al desarrollo de displasia epitelial, por lo que también estaría implicado en los procesos de precáncer[181]. La inflamación crónica de la mucosa bucal puede ser consecuencia de la disbiosis de la microbiota asociada a procesos infecciosos bacterianos, virósicos o micóticos [176,182] o a eventos traumáticos persistentes e incluso a autoinmunidad[183].

1.3.7 Carcinógenos Ambientales y/o profesionales

Si bien la evidencia científica es escasa, es conocido que la exposición a carcinógenos ambientales o laborales podría estar asociado a un incremento del riesgo de cáncer. Entre las sustancias implicadas se pueden destacar hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas, herbicidas, fertilizantes, combustibles, aceites minerales, monóxido de carbono, asbestos, pinturas, lacas, barnices, solventes, polvo de metal, madera, cemento y nitrosaminas[184–186]. IARC ha catalogado con evidencia científica suficiente de carcinogenicidad humana a más de treinta sustancias a las que numerosos individuos pueden resultar expuestos por motivos laborales[40]. Muchas veces la exposición no puede ser definida con claridad, por lo que, en muchos estudios el dato registrado es la circunstancia de exposición: lugares de trabajo, duración de la exposición, etc. Un metaanálisis que aborda el riesgo de CCC en relación a carcinógenos laborales en

Europa, mostró una significativa asociación cuando los individuos estuvieron en contacto con formaldehído, polvo de madera, polvo de carbón, asbestos y humos de soldadores [187]. El riesgo asociado a exposición ocupacional aumenta a medida que se incrementa el tiempo de exposición hasta los 10 años, pero a partir de allí ya no se presentan aumento significativo[188]. Es muy probable que el riesgo de cáncer resultante de factores laborales sea modulado por factores del huésped como capacidad de reparación de ADN dañado y la interacción con los hábitos del paciente [189].

Nuestro país posee amplias regiones dedicadas a la industria agrícola-ganadera y por eso existe parte de la población argentina sometida a la acción de pesticidas, herbicidas, fungicidas, etc. En una revisión reciente, se encontró que de once estudios que evalúan la relación entre CCC y la exposición a pesticidas, solo dos encontraron un vínculo patogénico, siendo el cáncer de tiroides el más vinculado. No hay claras evidencias hasta el momento en la asociación del uso de pesticidas con CCEB [190].

El arsénico (As) es un contaminante ambiental que causa daños en la salud de millones de personas en todo el mundo. Alrededor de 70 países y 137 millones de personas están afectadas directamente por el consumo de agua subterránea que está contaminada. Bangladesh y Bengala Occidental en la India son las dos áreas más afectadas en el mundo hasta la actualidad[191,192]. El As fue clasificado por la IARC como un agente carcinogénico para humanos. La OMS recomienda un valor orientador para agua de consumo de 10 $\mu\text{g}/\text{l}$ [86]. Los estudios realizados en 1888 permitieron identificar algunas lesiones asociadas a la contaminación con As, como queratosis cutáneas, hiperpigmentaciones y carcinomatosis[193] además de otras manifestaciones como neuropatías, enfermedades pulmonares crónicas; hepatomegalia; enfermedad vascular periférica, etc [194–197].

En Argentina, las regiones más contaminadas corresponden a las provincias de Córdoba (zonas sur, este y sureste), La Pampa, Santa Fe, Chaco, Salta, San Luis, Buenos Aires (algunos distritos de zonas norte y noreste) y Santiago del Estero, aunque la determinación de las áreas afectadas es aún incompleta[51]. En 1913, en Argentina se reportaron los primeros síntomas de una intoxicación por As. El número de casos fue en aumento y la enfermedad llegó a ser conocida como enfermedad de Bell Ville, por ser esta localidad el lugar donde se registraron niveles superiores a 1000 $\mu\text{g}/\text{l}$ en agua de consumo humano. En 1917, el hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE)

fue presentado como una condición sindrómica que involucra múltiples lesiones y síntomas asociadas al consumo de agua contaminada con As [194]. En las regiones afectadas, las personas que han bebido agua de pozo contaminada con As por más de 10 años, tienen un mayor riesgo de presentar CCEB y DPM como leucoplasias, liquen y queratosis labiales[198]. Algunos estudios provenientes del sudeste Asiático con la misma problemática, indicarían una relación con CCEB [199–201].

El As actuaría como cocarcinógeno y raramente induce mutaciones puntuales, aunque altera la reparación de ADN y produce cambios en metilación de ADN, en el ciclo celular, y en las proteínas involucradas en la reparación del ADN. Además, induce estrés oxidativo y disminución del nivel intracelular de antioxidantes[202]. Por último, produce inmunosupresión, ya que afecta mecanismos de estimulación y proliferación de linfocitos[202], pudiendo ser éste el motivo de la relación con CCEB asociados a VPH en poblaciones asiáticas contaminadas[203].

1.3.8 Herencia mórbida de Cáncer

La predisposición genética ha sido para algunos autores un factor de riesgo importante para el desarrollo de CCEB [49]. En un estudio de seguimiento de 105 familiares de primer grado de pacientes con CCC, encontraron que 31 desarrollaron tumores del tracto aerodigestivo superior[204]. Sin embargo la evidencia sobre este vínculo es limitada por la gran coexistencia de factores como tabaco y alcohol[49]. Los resultados de estudios de historia familiar de CCC asociado a CCC o cáncer de tracto aerodigestivo superior en parientes de primer grado no son consistentes[63,205–207].

Acorde al modelo planteado en el estudio de De Andrade y col, se estimó que los sujetos que fumaban, bebían alcohol y portaban un gen de cáncer altamente penetrante tenían un riesgo de 78% de padecer cáncer de tracto aerodigestivo superior hasta los 70 años; mientras que los que fumaban y bebían alcohol, pero no portaban genotipo de alto riesgo, tenían un riesgo de sólo el 5%. Estos resultados son consistentes con un componente hereditario para el CCEB [50,51,208].

1.3.9 Dieta y Nutrición

La IARC afirmó que el bajo consumo de vegetales y frutas predispone a un incrementado riesgo de desarrollar cáncer. La zanahoria, el tomate fresco, los pepinos verdes fueron los más asociados a una reducción en el riesgo de cáncer orofaríngeo[49]. Varios aspectos de la dieta pueden generar esta relación, entre ellos la ingesta total de

calorías, los componentes químicos presentes en los alimentos, los subproductos de los mismos que se originan durante la cocción y su interacción con otros factores de riesgo, produciendo asociaciones tanto positivas como inversas[49–51,59]. En un estudio de casos y controles llevado a cabo en Córdoba, Argentina, se observó una asociación entre el aumento del consumo de carnes rojas y el riesgo de desarrollar CCEB[209].

Existe fuerte evidencia que sostiene una reducción del riesgo de cáncer de esófago, pulmón, mama, vejiga, estómago y colon en asociación con el consumo de frutas y vegetales[210]. El aumento de consumo frutas y verduras, leche, margarina, aceite de oliva y diferentes cereales también ha sido asociado como efecto protector de CCEB [211,212]. Dicho efecto resultaría consistente con la acción antioxidante de las vitaminas C y E, carotenos, licopeno y flavonoides. Los nutrientes antioxidantes actúan inhibiendo citoquinas proinflamatorias, estimulando genes de supresión tumoral, como el p53, disminuyendo la expresión de oncogenes e inhibiendo factores angiogénicos. La acción de los retinoides estaría directamente dirigida a la estimulación de la diferenciación celular y la apoptosis de células neoplásicas[68,213]. Los β -carotenos se convierten en vitamina A en el organismo, cumpliendo funciones antioxidantes. Se realizaron algunos ensayos clínicos para el tratamiento de precáncer y CCEB los cuales mostraron tasas de éxito considerables, observándose remisión o regresión de leucoplasias en presencia de β -carotenos solos o administrados junto con vitamina A[49,214]. Algunas intervenciones clínicas con α -tocoferol, han mostrado resultados prometedores en CCEB y DPM [214].

La forma de preparación de los alimentos, fundamentalmente los asados, ahumados y fritos, pueden incidir en el aumento del riesgo de CCEB [212,215,216]. La mayoría de las sustancias químicas generadas durante la cocción como las nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, furanos, etc, tienen propiedades mutagénicas [59]. En un estudio realizado en Brasil, las comidas fritas y asadas fueron una de las causas de incremento del riesgo de CCEB [212].

1.3.10 Otros factores de riesgo de CCEB

Además de todos los factores de riesgo arriba descriptos, también existe evidencia de la relación entre CCEB con hábitos particulares de algunos países del sudeste asiático como la masticación de nuez de areca o betel. Es más frecuentemente utilizado como un ingrediente en diferentes productos: *betel quid*[50] (*pan*), en *mawa*, o industrialmente manufacturados como *gutka* y *pan masaala*[49,217]. En Sudán, se utiliza en forma local

la *Nicotiana rustica*, un derivado del tabaco con altos niveles de nicotina y nornicotina, llamada “*Toombak*”. Las hojas del tabaco se mezclan con bicarbonato de sodio y agua formándose una pasta, la cual se posiciona en el vestíbulo bucal donde permanece por horas, de diez a treinta veces por día. Es considerado uno de los factores de riesgo más prevalentes de CCEB en Sudán[218,219].

En el norte de nuestro país, y en regiones de Bolivia, Chile y Perú es frecuente encontrar grupos poblacionales con el hábito de coqueo. La hoja de la *Erythroxylum coca*, es preparada y alojada entre la mucosa yugal y los molares, junto con una sustancia alcalina (yista). La lesión estomatológica más asociada a este hábito fue el leucoedema, y casi no hubo asociación con la presencia de CCEB en trabajos que datan de la década del sesenta y setenta. Si bien la evidencia no es consistente en el nexo entre el coqueo y CCEB, los estudios que abordan este vínculo son escasos y desactualizados. En una revisión cáncer bucal y su asociación con plantas medicinales de 1968, se hizo referencia (un antecedente más histórico que científico) a un grupo de indígenas de Colombia que desde jóvenes tenían el hábito de coqueo, y que desarrollaban úlceras bucales, luego cicatrices fibrosas que terminaban transformándose en carcinomas[220]. En esta revisión, fueron reportados algunos mecanismos del coqueo similares a los hábitos originarios del Sudeste asiático, los cuales presentan evidencia carcinogénica más estudiada. Basado en evidencia científica reciente, pero aún no publicada, en un estudio de casos y controles llevado a cabo en un Servicio de Estomatología de Salta, Argentina, se demostró que el hábito de coqueo estuvo asociado al grupo de pacientes con CCEB. Las características dento-periodontales de poblaciones que practican este hábito, están frecuentemente vinculadas a una higiene deficiente, enfermedad periodontal crónica, atrición dentaria, edentulismo del sector posterior[221], caries asociadas a dietas cariogénicas [222] y en consecuencia presencia de muchas fuentes de IMCO e inflamación crónica.

En relación a carcinógenos biológicos, el virus del Epstein-Barr (VEB), ha sido implicado en la carcinogénesis bucal, sin poder aun comprobarse una relación causal[49,223]. La infección por VEB está estadísticamente asociada a un incremento en el riesgo de CCEB, sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar esta relación[224].

Algunas infecciones producidas por *Cándida* spp, especialmente *Cándida Albicans* fue implicada en la patogenia de DPM, ya que se encontró la infección micótica en leucoplasias, especialmente eritroleucoplasias. La duda que se genera es si la

colonización candidásica es un evento secundario o causal en los DPM. Se ha comprobado que *Cándida Albicans* posee enzimas necesarias para producir nitrosaminas y químicos implicados en la iniciación y promoción de la carcinogénesis bucal[49,225–227]. En una revisión sistemática, se informó que la infección micótica podría jugar un papel importante en las leucoplasias con displasia. Los autores sugirieron que el control de la sobreinfección, sería una intervención oportuna para reducir el riesgo de transformación maligna[227].

La sífilis terciaria ha sido implicada antiguamente en el desarrollo de CCEB, pero conjuntamente a otros factores de riesgo como hábitos (tabaco y alcohol). Actualmente los estadios terciarios de sífilis son extremadamente raros de encontrar en la práctica clínica ya que el diagnóstico suele hacerse antes de llegar a estadios avanzados[49]. En la actualidad, no hay certezas para sostener dicha asociación.

En relación a la carcinogénesis labial, las radiaciones ionizantes cumplen un papel fundamental. Sin embargo, no han podido asociarse con CCE intrabucales. Las queilitis actínicas tienen una tasa de transformación maligna del 3,07%, destacando que existen poblaciones de alto riesgo incluyendo las que viven en regiones tropicales, con excesiva exposición solar, varones adultos y de tez clara[228].

Un estado socioeconómico bajo llevaría a adquirir hábitos nocivos y en consecuencia a combinar los factores de riesgo descritos anteriormente (mala higiene bucal, presencia de IMCO, tabaco y alcohol, carencias nutricionales, etc.) por lo que el estado socio-económico, podría ser considerado otro factor de riesgo de CCEB [50,229].

Independientemente de los factores de riesgo ya detallados anteriormente existen enfermedades y síndromes generales que predisponen al CCEB, y por lo tanto constituyen factores de riesgo[230,231]. Entre los más importantes encontramos la *esclerodermia*[232], la *anemia de Fanconi* (un desorden genético autosómico recesivo) caracterizada por anemia aplásica, pancitopenia progresiva, anomalías congénitas y un incrementado riesgo de carcinomas [233]. Otra patología es el *xeroderma pigmentoso*, el cual constituye una alteración genética caracterizada por defectos en la reparación del ADN llevando a una hipersensibilidad a las radiaciones ultravioletas y a agentes carcinogénicos[234]. Finalmente, la *disqueratosis congénita* incluye pigmentaciones cutáneas, lesiones displásicas en uñas y leucoplasias bucales. En estos casos, los pacientes tienen mayor riesgo de transformación, así como de padecer otro tumor primario de cabeza y cuello[235].

2. Úlcera Traumática Crónica (UTC) e Irritación Mecánica Crónica (IMC) en el contexto del CCEB

2.1 Irritación Mecánica Crónica

Existen condiciones dentarias asociadas al CCEB relacionadas a la presencia de elementos dentarios en mal estado o prótesis traumatizantes, que algunos autores proponen también como factores de riesgo que intervienen directamente en la carcinogénesis bucal[178]. En las últimas décadas, existen relativamente escasos estudios relacionados al CCEB y factores dentarios, los cuales mostraron gran diversidad en la cantidad de variables dentarias estudiadas y escasa concordancia en la forma de medir las variables de estudios. La pérdida de dientes, junto con la presencia de dientes y prótesis removibles en mal estado, es un indicador de una historia deficiente de higiene bucal. A este hecho se suma la pérdida dentaria múltiple, que implica generalmente una serie de cambios en la cavidad bucal y que en coexistencia con hábitos parafuncionales de deglución o mordiscamiento, aumentan la irritación de la mucosa bucal en forma crónica, pudiendo producir lesiones estomatológicas[51].

Se define como IMCO, también llamado traumatismo intrabucal crónico, al efecto mecánico de un agente vulnerante sobre la mucosa bucal, y que ha sido propuesta por varios autores como un factor que interviene en la carcinogénesis bucal[178]. Según Grinspan[236] las lesiones causadas por un agente traumático, pueden clasificarse como agudas, subagudas y crónicas. Estas últimas, pueden generar procesos inflamatorios que perduren en el tiempo y que, en conjunto con otros factores de riesgo, se asociarían a la aparición de signos de malignización. Histológicamente, en las heridas o microtraumas de la mucosa bucal pueden observarse condiciones leves como la desaparición de los estratos superficiales del epitelio, o incluso invadir todo el epitelio llegando a exponer el tejido conectivo. Si la herida queda limitada a los estratos superficiales, éstos se reparan, comenzando a inducir al epitelio a un estado hiperproliferativo por estimulación de las células basales del epitelio. En algunas ocasiones, la reparación puede ir acompañada de una queratinización paraqueratótica transitoria u ortoqueratótica, en el caso que el traumatismo sea de baja intensidad, pero constante y repetido en el tiempo. La IMCO suele determinar una hipertrofia del epitelio, con acantosis, paraqueratosis y leucoedema del estrato superior. En algunos casos, en los bordes de úlceras traumáticas crónicas (UTC), también ha sido reportado el hallazgo histológico de las denominadas “displasias

reactivas”, las cuales hacen referencia a la presencia de cambios celulares y arquitecturales del epitelio, sobre todo a nivel del estrato basal, con caracteres morfológicos displásicos y presumiblemente asociados a un estado inflamatorio originado por el agente traumatizante. En algunos casos, estas displasias reactivas suelen ser difícilmente diferenciables de displasias verdaderas[237,238]. Las entidades nosológicas de la mucosa bucal originadas por IMCO son: ulceraciones y úlceras traumáticas, mucosa mordiscada, papilomas irritativos, queratosis irritativas o reaccionales, indentaciones, lesiones por decúbito, etc.[88].

Las fuentes de IMCO pueden ser diversas dependiendo del agente traumatizante involucrado. Así, encontramos un origen *dentario* (dientes con defectos estructurales, malposiciones dentarias, cúspides agudas y filosas, dientes fracturados), *protético* (aparatos protéticos removibles desadaptados con superficies rugosas, no pulidas, con flancos protéticos sobreextendidos) o *funcional* (parafuncional o disfuncional, como mordiscamiento bucal, interposición lingual, deglución atípica). En los casos donde se presenta un factor dentario traumatizante pero a su vez se le adiciona un factor funcional que permite mayor frecuencia de contacto de agente traumatizante con la superficie mucosa, hablamos de un origen *combinado* [51,88,151,179].

Existen criterios para establecer claramente cuándo una lesión presente en la mucosa bucal está asociada a un origen traumático o IMCO, y estos son: a) la presencia de una lesión (úlceras, erosión, placa queratótica, leucoedema, atrofia, etc.) que se encuentre en relación directa o indirecta, con más de un mes de evolución, b) el agente traumatizante en la cavidad bucal debe encontrarse temporalmente antes del desarrollo de la lesión (este dato es obtenido mediante la anamnesis), c) el agente traumatizante debe estar en contacto directo con la lesión o un contacto generado durante movimientos funcionales o parafuncionales (el caso más frecuente es la deglución disfuncional donde la lengua genera una interposición sobre las arcadas dentarias durante el acto deglutorio, permitiendo mayor fricción con los elementos dentarios)[151].

La relación entre IMCO y CCEB ha sido estudiado en modelos de experimentación animal. El estímulo patogénico sucesivo y simultáneo de IMCO, luego de haber utilizado como iniciador de procesos neoplásicos 7,12-dimetil-bencentraceno (DMBA) en la bolsa de la mucosa yugal de hámsteres, indujo mayor número de carcinomas endofíticos en comparación con aquellos animales que fueron solo inyectados con DMBA, pero sin IMCO. El análisis de ploidía reveló mayores índices de malignidad

en los tumores endofíticos más que en los exofíticos. Gracias a este emblemático estudio, se pudo comprobar el rol promotor de la IMCO en la secuencia multietápica de la carcinogénesis bucal[239].

Cuando se producen heridas en el epitelio de la mucosa bucal, las células proliferan para permitir la cicatrización y cesan de hacerlo cuando la cicatrización se ha completado, mientras que en los tumores malignos la proliferación está desregulada como el resultado de una falla en la regulación del ciclo celular, causada a su vez por proteínas anormales codificadas por oncogenes activados. Este hecho explica el efecto promotor de tumores por agentes que inducen hiperplasia epitelial y concomitantemente inducen inflamación, y requieren iniciación previa del epitelio para inducir formación tumoral[240]. Además de estudios experimentales, hay estudios epidemiológicos que vinculan a la IMCO con CCEB [151,152,241]. Si bien no está totalmente dilucidado el nexo fisiopatogénico que vincula IMCO con el desarrollo del proceso neoplásico de la mucosa bucal, la inflamación crónica, los procesos de alteración en la regulación de los eventos de cicatrización de heridas crónicas, la fibrogénesis, la angiogénesis y la inestabilidad genómica de SC de queratinocitos bucales que llegan al sitio de la injuria tisular podrían ser algunos de los mecanismos fisiopatogénicos involucrados.

En los últimos años, se ha revisado el rol de IMCO en la carcinogénesis bucal, bajo una perspectiva etiológica del análisis de los criterios de causalidad de Bradford-Hill, los cuales incluyen: 1. Fuerza de la Asociación, 2. Secuencia temporal, 3. Efecto dosis-respuesta, 4. Consistencia, 5. Plausibilidad biológica, 6. Especificidad de asociación y analogía, 7. Evidencia Experimental[179].

Asociado a IMCO y a CCEB, suelen observarse infecciones por VPH [46,242]. Luego de un traumatismo o microerosión aguda o crónica, en la mucosa bucal se expresan receptores de membrana de células basales (a los cuales se une el VPH). La exposición de estas últimas al medio bucal, facilitan la penetración del virus al tejido epitelial, generando condiciones óptimas para la instalación de una infección que podrá ser o no eficiente. Un VPH silente o latente, en ausencia de lesiones clínicamente visibles, puede reactivarse desde su latencia en vías de generar una infección efectiva gracias a diferentes estímulos microambientales como lo son: eventos de inmunosupresión por parte del hospedador o también gracias a la presencia de nuevos eventos traumatizantes, ya que la

estimulación de células basales como consecuencia de este estímulo patogénico, permite la activación de la maquinaria celular ahora infectada con el VPH latente[129].

2.2 Úlcera Traumática Crónica

Si bien la OMS no reconoce a la úlcera traumática crónica (UTC) como un DPM, ha sido tenido en cuenta por diferentes autores como un proceso frecuente de transformación carcinomatosa[21,88,243]. La localización de borde de lengua de la UTC, para Grinspan, es el proceso cancerizable más frecuente, pudiendo ser evidenciado la existencia de elementos dentarios con bordes filosos, en malposición y un carcinoma instalado en contacto. La anamnesis es relevante y aporta datos de interés para establecer la relación temporal de causalidad. Tal circunstancia debe ser tomada en cuenta y asignársele también la debida importancia para la prevención y tratamiento de las lesiones previas. La secuencia traumatismo – lesión – cicatrización – traumatismo, fue propuesta como un mecanismo fundamental en la transformación maligna del epitelio que rodea la pérdida de sustancia[88]. La UTC es el resultado del efecto de IMCO persistente de baja intensidad[241]. Clínicamente, es una lesión que se asocia a la forma del agente que le dio origen, irregular, circular y oval, de superficie ulcerada y bordes edematosos, pero no evertidos y discretamente aumentada a la palpación (Figura 3).



Figura 3. Lesión ulcerada en cara ventral de lengua, de bordes blancos leucoedematosos elevados, pero no evertidos y un fondo blanco amarillento necrobiótico. Paciente masculino con patología de Parkinson y hábitos disfuncionales del órgano lingual que generaba la fricción de la cara ventral sobre los elementos anteroinferiores que se presentaban con una superficie áspera y filosa por la atrición fisiológica.

La UTC de borde de lengua suele encontrarse en los tercios posteriores debido a que la fuente traumática se encuentra en el sector de premolar o molares. En cambio, la UTC de fondo de surco gingivolabial y piso de boca, se relaciona con flancos protéticos sobreextendidos, siendo rara la transformación carcinomatosa en estos casos[88,243].

Histológicamente puede observarse un epitelio hiperplásico en los márgenes de la úlcera y tejido de granulación en el lecho ulcerado[244]. El epitelio circundante a la úlcera a veces muestra displasias reactivas, las cuales son difícilmente diferenciables de displasias verdaderas[238]. En la profundidad del conectivo, a veces se encuentra un infiltrado de eosinófilos, llevando a un diagnóstico histopatológico de “Úlcera eosinofílica” o lo que actualmente se denomina “*granuloma ulcerativo traumático con eosinofilia estromal (GUTEE, del inglés traumatic ulcerative granuloma with stromal eosinophilia: TUGSE)*”. La literatura americana hace referencia al hallazgo de eosinófilos en la profundidad de la úlcera. Dicha característica histológica se vería asociada a una respuesta local de las fibras musculares esqueléticas las cuales generan una separación y una posterior degeneración en respuesta a la inflamación crónica. A veces, la presencia de un tejido de granulación exuberante da un aspecto de masa polipoide[146]. La naturaleza traumática de esta entidad como una UTC con un componente histológico particular asociado a eosinófilos, fue destacada por diversos autores[245]. Por ejemplo, la *enfermedad de Riga – Fede*, conocida también como *úlcera de Riga-Fede ó aftoide traumático de Riga-Fede* es considerada una UTC con características particulares. De ubicación en cara ventral de la lengua de recién nacidos, asociada con dientes neonatales y el traumatismo generado por los movimientos fisiológicos del lactante. La úlcera de Riga-Fede, frecuentemente muestra la histología de un GUTEE, pero clínicamente es una UTC. El mecanismo fisiopatogénico propuesto hasta el momento expone en primera instancia la presencia de un agente irritativo que genera IMCO y a consecuencia de ello, la exposición a diferentes patógenos como microorganismos, toxinas o cuerpos extraños. A partir de allí, se desencadenaría una respuesta inmunológica en cascada mediadas por Linfocitos T, producción de linfoquinas proinflamatorias, daño tisular y en consecuencia maduración y atracción quimiotáctica de eosinófilos y diferenciación de mastocitos. Todo esto junto a la liberación de FNT en forma sostenida produciría daño tisular y retraso en la cicatrización de la úlcera[246–249].

La evidencia científica publicada sobre la transformación maligna de UTC es escasa. El rol de IMCO en la patogénesis del CCEB, sobre todo de localización del borde lingual aún es un tema muy discutido, y la consideración de IMCO como factor de riesgo llevaría a postular que la UTC podría ser un DPM. Según un grupo de investigadores de la India, la UTC del borde lingual es un DPM subestimado[250]. La evidencia más sólida está basada en estudios experimentales, los cuales demostraron el rol de IMCO en la promoción de la carcinogénesis bucal en un modelo de UTC experimental[239]. Esos hallazgos, sumado a estudios epidemiológicos que han caracterizado a la IMCO en UTC, lesiones benignas asociadas a trauma y CCEB, demostraron patrones en común entre CCEB y UTC en cuanto a: origen, localización e historia de IMCO[241].

Basados en reportes de casos clínicos publicados, se pudo evidenciar presencia de úlceras asociadas a factores irritativos locales y que en su evolución mostraron áreas de transformación en CCEB [251–256]. En el estudio de Perry y cols, de 57 CCEB del borde de la lengua de pacientes no fumadores, 18 argumentaron la presencia de ulceraciones previas producidas por alteraciones dentarias[46].

2.3 Inflamación Crónica y Cáncer

Las propiedades biológicas adquiridas por las células tumorales durante el proceso de carcinogénesis fueron presentadas como *Hallmarks del cáncer* en 2000 por Hanahan D y cols, constituyendo los principios para entender la complejidad de la enfermedad. Estos “sellos distintivos de cualquier patología maligna” son: *el sostenimiento de la actividad proliferativa, la evasión de la supresores de crecimiento, la activación de vías patogénicas ligadas a invasión y metástasis, la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis y la resistencia a los mecanismos de muerte celular*[19]. El entendimiento de estos sellos distintivos de la oncología molecular fue posteriormente enriquecido con conceptos como inestabilidad genómica e inflamación. En las últimas décadas, la investigación se enfocó en otra dimensión más compleja relacionada al microambiente tumoral[257]. La observación de infiltración de células del sistema inmune en el tumor con capacidad tumorigénica, permitieron volver a estudiar algunos conceptos asociados a la formación de tumores en sitios de inflamación crónica y a la concepción que los tumores podrían ser encuadrados como heridas que no cicatrizan[258]. En los procesos fisiológicos de inflamación y cicatrización normal, las células inflamatorias entran en acción de forma transitoria para luego desaparecer, en

cambio en los sitios de inflamación crónica persisten. Dicha persistencia ha sido asociada con varias condiciones patológicas como la fibrosis, la angiogénesis aberrante y el cáncer[259].

El rol de la inflamación crónica en el CCEB aún no es claro. Para algunos autores, el diagnóstico frecuente de procesos inflamatorios crónicos en la cavidad bucal debería corresponderse con un aumento de la prevalencia del CCEB. Esta discrepancia haría evidente que la inflamación por sí sola, raramente produciría desarrollo de neoplasias[259,260]. La relación entre CCEB y la inflamación bucal asociadas a factores dentarios no está completamente bien establecida ya que la evidencia científica hasta el momento es limitada[50]. La fibrosis oral submucosa (FOS), el liquen plano bucal, el lupus eritematoso discoide, las úlceras bucales relacionadas a injuria tisular y enfermedad periodontal son las entidades nosológicas en donde se vinculan eventos inflamatorios persistentes y CCEB [260].

A continuación, se destacan algunos de los mecanismos y aspectos más relevantes que vinculan la inflamación crónica y el Cáncer:

- Las citoquinas, prostaglandinas, ROS y RNS acumulados en el microambiente tisular son afectados por la inflamación crónica. Si esto persiste, inducen proliferación celular y prolongan la supervivencia celular gracias a la activación de oncogenes y activación de genes supresores de tumores. Esto genera inestabilidad genómica y un incremento en el riesgo de cáncer[261].
- El tabaco, el alcohol, algunos factores locales, agentes infecciosos y mediadores inflamatorios tienen la capacidad de activar STAT-3, AP-1 y NF-κB. Estos factores de transcripción activan oncogenes que regulan la apoptosis, la proliferación celular y la angiogénesis y genes que regulan la producción de mediadores inflamatorios incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, prostaglandinas y proteasas. Por eso, a partir de estos factores transcripcionales, las células tumorales inducen ambos: inflamación y proliferación descontrolada[261–263].
- La Prostaglandina E2 (PGE-2) es uno de los mediadores proinflamatorios más frecuentes implicados en la cancerización. La enzima Ciclo-oxigenasa-1 (COX-1) está expresada en tejidos produciendo prostaglandinas que producen diferentes efectos fisiológicos, pero COX-2 se expresa principalmente en respuesta a estímulos inflamatorios y mutagénicos[264]. COX-2 es fundamental para la síntesis de PGE-2

y curiosamente se sobreexpresa en diferentes tipos de malignidades, activando señales intracelulares oncogénicas como la prolongación de la supervivencia celular, aumento de la proliferación celular, migración y angiogénesis[265].

- La cicatrización normal es un proceso complejo, multifactorial y autoregulado. Si el proceso de cicatrización se encuentra desregulado, las células inmunológicas e inflamatorias persisten en el sitio de la cicatrización generando un proceso incompleto y aberrante. Las cicatrices hipertróficas, los queloides y las úlceras sin tendencia a la cicatrización se encuentran asociadas a un aumento del riesgo de cáncer[257,258,260]. El daño tisular, cuando el estímulo es repetitivo y genera en consecuencia una respuesta regenerativa de las mismas características, en presencia de liberación excesiva ROS y RNS, interactúa con el ADN generando una proliferación epitelial sostenida y alteraciones genómicas como mutaciones puntuales y deleciones. Por ejemplo, se han observado mutaciones de p53 en tumores asociados a enfermedades inflamatorias crónicas [258,266].
- COX-2 y PG-E2 aumentan en sitios de cicatrización de heridas sobre todo en los primeros siete días. Su expresión se confina a las células basales en los márgenes de las heridas, pero también en tejido endotelial y fibroblastos promoviendo la formación del tejido de granulación cicatrizal. Las PG-E2 derivadas de COX-2 posiblemente median la migración y la proliferación de SC de queratinocitos que conduce los procesos de re-epitelización y angiogénesis. En presencia de persistencia de PG-E2, es posible que se genere una estimulación continua de proliferación epitelial y endotelial que contribuiría a un campo precancerizable ya que las células progenitoras en presencia de PG-E2 tendrán una mayor ventaja proliferativa sobre células vecinas que no han sido objeto de traumas repetidos y no expresan COX-2[260].
- En tejidos inflamatorios no tumorales, los macrófagos encargados de la cicatrización son fenotipo M1. Éstos secretan agentes inflamatorios que tienen actividad antimicrobiana, inmunoestimuladora y también son capaces de inducir angiogénesis. M1 son importantes en mediar la cicatrización tisular y mantener la homeostasis. Se han visto presentes en algunos tumores sobre todo en las fases iniciales de la carcinogénesis. En contraste, en tumores avanzados, se reclutan macrófagos M2, los cuales expresan altos niveles de factores pro-angiogénicos como metaloproteinasas

MMP-9, VEGF y COX-2. Estos mediadores inflamatorios, generan una respuesta regenerativa inflamatoria intensa con un exagerado remodelado tisular, angiogénesis, linfangiogénesis promoviendo la movilidad celular, invasión y metástasis [258,262,267].

La Figura 4, ilustra los mecanismos y vías más relevantes que vinculan la Carcinogénesis Bucal ligada a Inflamación Crónica ya sea por estímulos inflamatorios intrínsecos o extrínsecos.

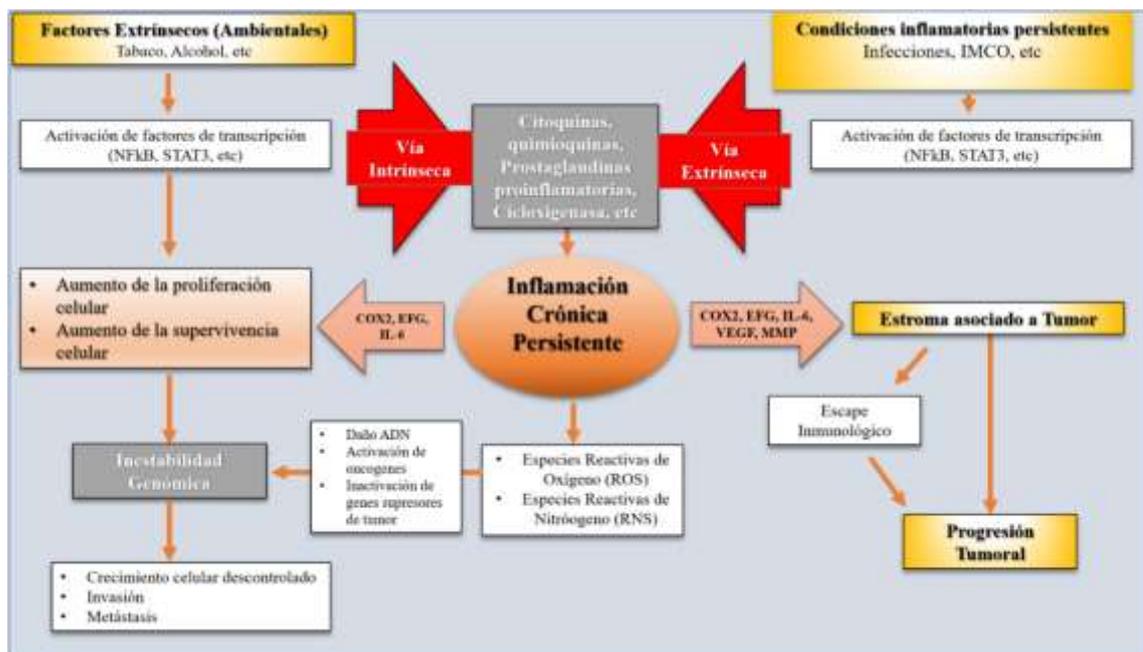


Figura 4 – La interacción entre Cáncer e Inflamación. En las vías intrínsecas, la activación de factores de transcripciones que regulan los circuitos oncogénicos y la inflamación conduce el proceso de desarrollo tumoral. En la vía extrínseca, las condiciones inflamatorias preexistentes, podrían favorecer la carcinogénesis (Extraído y modificado de Feller y cols). "Inflammation in the context of Oral cancer" Feller y cols, 2013. DOI:10.1016/j.oraloncology.2013.07.003[260]

La teoría que las mutaciones somáticas sean los "drivers" de la carcinogénesis cada vez es más cuestionada, ya que hay tumores no asociados a mutaciones. Los tumores hereditarios constituyen un 5 a 10% de todos los cánceres, sobre todos los tumores de mama y ovarios originados por cambios genéticos[268]. Los de origen infeccioso (15%) están vinculados al cáncer gástrico asociado a *Helicobacter Pylori*[269], el cervical y/o al orofaríngeo asociado a VPH[270]. La cifra restante de tumores (70-80%) son considerados esporádicos, un eufemismo para "los de causa desconocida". El 99,9% de todas las mutaciones que se manifiestan dentro del genoma no se encuentran bien comprendidas ni han sido correctamente investigadas [271]. El análisis de estos datos

llevó a un grupo de expertos a plantear una hipótesis de carcinogénesis donde la inflamación crónica cumpliría un rol preponderante. Las fases serían las siguientes[272]:

- 1) *Estímulo patogénico*: El primer receptor jugaría un rol fundamental en el procesamiento de la información que llega a una célula. En los mamíferos, es el glicocáliz, el cual está formado por cinco clases de moléculas de adhesión: inmunoglobulinas, integrinas, cadherinas, selectinas y moléculas de adhesión celular. A través de ellas, el sistema del citoesqueleto celular se comunica con otras células y el microambiente que las rodea[273]. Los autores postulan que, los componentes del glicocáliz podrían tener algún significado en el procesamiento del estímulo nocivo que llega a las membranas celulares y en el hilo conductor de un proceso oncogénico.
- 2) *Inflamación crónica*: La inflamación persistente debido a estímulos patogénicos genera un proceso cicatrizal no resuelto, con una consecuente inflamación crónica. Si el proceso inflamatorio no se resuelve completamente, lleva a la instalación de una condición inflamatoria crónica[274] y a la adquisición de una precondition transformadora de una célula normal a una célula cancerosa. La naturaleza de la inflamación que podría desarrollar un cáncer aún no está bien estudiada; pero para estos autores, el rasgo distintivo de la inflamación que promueve la conversión cancerosa es la habilidad de inducir fibrosis.
- 3) *Fibrosis y cambios en el microambiente*: El proceso de “fibrogénesis”, como una parte integral de la cicatrización de las heridas, está subordinada a factores asociados a un desequilibrio en la síntesis vs degradación de colágeno. La concepción de la fibrosis como un escenario necesario para los eventos que preceden al cáncer está basada en encontrar aumento de riesgo de cáncer cuando hay fibrosis y el hallazgo de fibrosis e inflamación crónica en lesiones de precáncer[275]. En el seno de las fibrosis, existen focos fibróticos que han sido observados en cáncer, como en la FOS asociada a CCEB en la India [276].
- 4) *Nicho precanceroso y estrategias de escape al stress crónico*: Luego de todo esto, se produce un remodelado del microambiente, el cual desarrolla fibrosis. Esto lleva promover la formación de un nicho precanceroso gracias a la instalación de un círculo vicioso. Las diferencias existentes entre la inflamación crónica y la inflamación crónica relacionada a un cambio canceroso en las células estarían dadas por la capacidad de fibrogénesis.

- 5) *Transición célula normal/célula cancerosa*: Se ha demostrado que la transición epitelial-mesenquimática (TEM), mecanismo observado frecuentemente en la embriogénesis/morfogénesis, puede inducir el paso de SC a SCC [277]. La evidencia presentada indica que un estímulo patogénico da lugar a vínculos moleculares y eventos genotóxicos, seguidos por inflamación crónica. TEM y TME son mecanismos fisiológicos necesarios para la reparación tisular y migración, pero también para la invasión y la metástasis.

2.4 Cicatrización de heridas crónicas y Cáncer

Desde que se postuló que “un tumor es una posible sobre-cicatrización”[278] o que “los tumores son heridas que no cicatrizan”, se estudió el vínculo entre alteraciones de la cicatrización y cáncer, reconociendo similitudes entre el estroma tumoral y el tejido de granulación cicatrizal. Sin embargo, este proceso no se encuentra bien regulado en el cáncer, resultando en una incontrolada proliferación celular, invasión y metástasis[279], como lo muestra la Figura 5. Uno de los hallazgos más antiguos que postuló la conexión entre la reparación de heridas, la inflamación crónica y el cáncer fue la observación de los tumores que habían sido inducidos en pollos por el virus del sarcoma de Rous. Estos tumores solo se desarrollaron en el sitio de la inyección viral y en sitios inflamatorios [280,281].

Fases de la cicatrización: El proceso de cicatrización de heridas epiteliales abarca básicamente tres fases que fisiológicamente son dinámicas y se superponen: la formación del coágulo y la inflamación, la formación de tejido cicatrizal y el remodelado tisular.

Formación de la matriz de fibrina en las heridas y en los tumores: Las mallas de fibrina y fibronectina de los coágulos constituyen una barrera protectora en contra de la invasión de microorganismos y en contra de la pérdida de agua. Además, son un reservorio de factores de crecimiento requeridos para la cicatrización, funcionando además como andamiaje para los diferentes tipos de células que son atraídos hacia la zona de la injuria. La instalación de la matriz de fibrina es considerado un evento temprano y transitorio en la reparación normal de las heridas, pero un evento crónico durante la tumorigénesis[258].

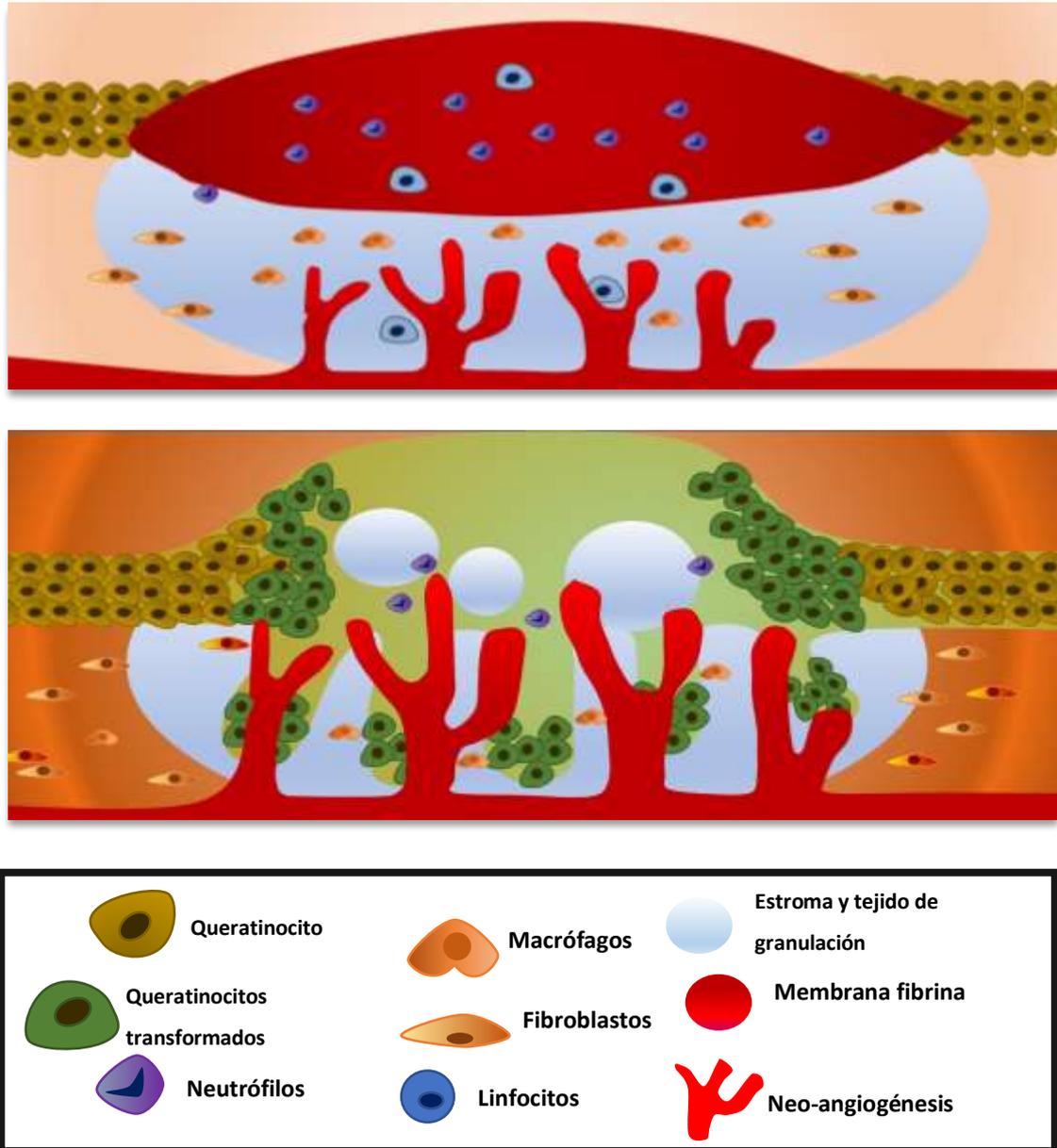


Figura 5 – Paralelismos celulares entre un carcinoma y una úlcera crónica. La representación esquemática de un epitelio carcinomatoso (arriba) y una úlcera crónica en proceso cicatrizal (abajo). Ambos perfiles tisulares se caracterizan por la presencia de un coágulo de fibrina, células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, mastocitos y linfocitos), vasos de neoformación y fibroblastos. Todos estos son componentes de un tejido de granulación, que se asemeja al estroma tumoral. Además, los queratinocitos que migran y proliferan también se encuentran en una herida crónica como en el tejido neoplásico. La principal diferencia es el crecimiento invasivo de los queratinocitos transformados. (Modificado de Schäfer y cols, 2008). *Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revised*. Schäfer y cols. *Nature Reviews. Mol Cell Bio*, 2008. DOI: 10.1038/nrm2455. [258]

Re-epitelización de las heridas: La liberación de moléculas quimiotácticas generada durante la degranulación de las plaquetas y las células inflamatorias inicia la formación de un tejido nuevo. Los queratinocitos presentes en estos frentes epiteliales comienzan a moverse entre el conectivo y la malla de fibrina. Para permitir una mejor migración, los queratinocitos activan su citoesqueleto de actina y lamellipodia

(estructuras del citoplasma a modo de proyección asociada con la motilidad celular), pero pierden el contacto célula con célula y con hemidesmosomas que permiten el anclaje a la membrana basal. Además, alteran la expresión de receptores de integrina para permitir el anclaje a nuevos sustratos y expresan varias proteasas que permiten la degradación del tejido conectivo[282]. Estos eventos son reminiscentes del proceso embriogénico de EMT. En grandes heridas, la migración queratinocítica es seguida por hiperproliferación de estas células para reponer el área lesionada de nuevas células epiteliales [258].

Re-epitelización y crecimiento tumoral: El incremento de la migración y la proliferación de las células epiteliales transformadas es también una principal característica de los carcinomas. Algunos estudios han demostrado que las Beta-1 integrinas son importantes tanto para la re-epitelización de heridas y para la migración epitelio como para células presentes en carcinomas[283]. Muchos mitógenos estimulan ambos: la re-epitelización de las heridas y el crecimiento de los carcinomas. Algunos factores, son mitógenos para queratinocitos y expresados por células endoteliales y fibroblastos de la epidermis normal, de la epidermis irritada y también en tumores[284]. Una de las proteínas principales de la señalización es STAT-3. Esta proteína promueve reparación celular pero también carcinogénesis[285].

TEM: heridas vs tumores: La principal diferencia entre la migración de los queratinocitos en las heridas y las células del cáncer es la completa TEM, frecuentemente observada en las células tumorales. Las células tumorales reactivan un programa latente que es usualmente confinado al desarrollo embriológico y a la reparación tisular, también observado en el cáncer gracias al crecimiento celular de forma exagerada e incontrolada. La adquisición de un fenotipo mesenquimático por parte de las células epiteliales es crucial para la metástasis y la invasión. Las células tumorales asociadas a TEM, han sido descritas como células con propiedades de SC[277].

Formación de nuevos vasos: es crucial para llevar oxígeno y nutrientes. La neovascularización en las heridas y en los tumores es principalmente por la angiogénesis[286]. Seguidamente a la formación de vasos sanguíneos en el proceso cicatrizal, comienza el proceso de linfangiogénesis, para reconstruir la vasculatura linfática [287]. Algunos de los factores de crecimiento proangiogénicos expresados en las heridas incluyen el FGF2, HGF y el factor estimulante de colonias de granulocitos[288]. Estos hallazgos han destacado la fuerte asociación entre las angiogénesis secundarias a

heridas y las encontradas en el tumor. Cuando el tejido de granulación es cubierto por una neo-epidermis, la angiogénesis es inhibida y muchos de los vasos sanguíneos involucionan por apoptosis de las células endoteliales. Existen factores proangiogénicos como VEGF, que son regulados por la hipoxia y por citoquinas proinflamatorias. La disminución de estos estímulos en los estadios finales de la cicatrización, generarían la regresión vascular, evento que no ocurre en la tumorigénesis [258].

Cicatrices y formación de tejido fibroso: días posteriores a la injuria, los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos, responsables de la contracción cicatrizal y la deposición de proteínas de la matriz. Durante el remodelado, el colágeno inicial tipo III del tejido de granulación es gradualmente dominado por colágeno tipo I y el colágeno resultante se ordena anormalmente en bandas paralelas [282]. Los fibroblastos que son atraídos a la injuria se diferencian para sintetizar el colágeno dentro del tejido de granulación y regular la re-epitelización de las heridas en una forma parácrina. Finalmente, los miofibroblastos van a apoptosis y el tejido de granulación es progresivamente reemplazado por un tejido fibrótico y cicatrizal. Una presencia prolongada de miofibroblastos en el sitio de la herida genera la formación de cicatrices hipertróficas, aumentando el riesgo de cáncer mediante estimulación de células proliferativas, inflamación y angiogénesis. Estos hallazgos destacan la relación entre una cicatrización exagerada y el cáncer[289].

La hipótesis que los tumores son heridas que no cicatrizan, ha sido revisada particularmente en los carcinomas. Aurelio Cornelio Celso (26 a.C – 50 d.C.) fue el autor del primer tratado médico en donde se describió la transformación maligna de cicatrices de quemaduras[290]. Mucho tiempo después, Jean Nicolas Marjolin, describió úlceras asociadas a factores irritativos locales[291] que posteriormente algunos autores describieron transformación carcinomatosa[292]. La úlcera de Marjolin (UM), es una entidad nosológica relacionada al desarrollo de tumores malignos ligados a quemaduras, úlceras traumáticas o lesiones cutáneas relacionadas a un factor local inflamatorio crónico [292]. Frecuentemente en miembros inferiores, los autores comulgan en describir a UM como una pérdida de sustancia mayor a tres meses de evolución, de olor desagradable, pudiendo sangrar al contacto, con zonas costrosas y dolor. A veces pueden tener un crecimiento más rápido con bordes elevados, evertidos e indurados[293]. En relación con su fisiopatogenia, muchas son las teorías propuestas, siendo la IMC y en consecuencia la

proliferación celular y el incremento de mutaciones espontáneas, la más aceptada. Las condiciones que estadísticamente demuestran tener mayor riesgo de transformación carcinomatosa en relación a UM, son las quemaduras cutáneas y úlceras traumáticas sin tendencia a la cicatrización[294,295]. La transformación maligna puede darse luego de muchos años de la instalación de la condición inflamatoria inicial, pudiendo ser un proceso análogo a la carcinogénesis bucal y a la UTC diagnosticada en la mucosa bucal. En un caso se observó una úlcera por presión que cicatrizaba y volvía a ulcerarse durante diez años y que luego terminó desarrollando una UM[296]. La intervención temprana con biopsias de diagnóstico mejora el diagnóstico precoz[292].

3. *Desórdenes Orales Potencialmente Malignos*

Existe un conjunto de lesiones de la mucosa bucal que presentan un riesgo incrementado de transformación carcinomatosa. La mayoría de estas lesiones, son asintomáticas inicialmente lo que lleva a una demora en el diagnóstico, a un subdiagnóstico o directamente a una ausencia de diagnóstico oportuno por parte de los profesionales[297]. El CCEB, suele asentar sobre lesiones preexistentes, llamadas “precáncer”, “lesiones premalignas, precancerizables”, “neoplasias intraepiteliales”, etc., pero que en 2007 la OMS comenzó a llamarlas “desórdenes potencialmente malignos”(DPM)[231]. El concepto de precáncer o de DPM está basado en:

- a) En estudios longitudinales, algunas lesiones clínicas clasificadas inicialmente como precancerosas se transformaron en CCEB durante su seguimiento.
- b) Muchas de esas lesiones constituyeron manchas rojas y blancas, también coexistieron en los márgenes de CCEB.
- c) Algunas de estas lesiones muestran cambios citológicos y morfológicos ya observados en CCEB, pero todavía en ausencia de potencial invasivo.
- d) Las alteraciones cromosómicas, genómicas y moleculares del CCEB fueron detectadas en estas fases previas de “precáncer”[231].

El concepto de DPM lleva a una concepción de “riesgo aumentado” o “posibilidad” de transformación maligna independientemente a los componentes clínicos o histológicos y además tiene una finalidad predictiva de riesgo de cáncer en el sitio de la lesión o en cualquier otro sitio de la mucosa bucal. Aunque estos DPM supongan un riesgo aumentado de transformación maligna, es muy difícil predecir el comportamiento de cada

paciente en forma individual[298], estableciendo cuáles son las lesiones que llevarán a un CCEB.

3.1 Leucoplasia

La *leucoplasia*, es una entidad potencialmente maligna cuya nomenclatura y concepto ha variado en las últimas décadas. Sin embargo, el concepto más utilizado en la literatura científica es el propuesto por la OMS en 2007. Warnakulasuriya y cols, habiendo considerado todas las definiciones propuestas y en concordancia con la definición propuesta en 1978, definió a la leucoplasia como “*placas blancas de riesgo incierto que son diagnosticadas una vez que se haya excluido otras patologías conocidas que no son aumentan el riesgo de cáncer*”. Es un término clínico, sin ninguna histopatología particular. Puede mostrar atrofia o hiperplasia y puede o no mostrar zonas displásicas[231]. Sin embargo, su pronóstico es variable de paciente a paciente. La inespecificidad de los hallazgos histológicos que pueden estar presentes en los diferentes grados de leucoplasia, fueron los que llevaron a diferentes autores como Grinspan y Abulafia a dar una definición con criterios clínico-patológicos[88,243]. En el año 2018, aunque todavía no fue publicado, la Academia Europea de Medicina Oral propuso a la leucoplasia como una *lesión predominantemente blanca de la mucosa bucal que no puede desprenderse y posee un potencial de malignidad incierto. Se presenta como una placa bien demarcada, de cualquier tamaño, con una superficie lisa o texturada, con o sin fisuras y que persiste en ausencia de irritantes locales. Su diagnóstico se hace habiendo excluido otros diagnósticos de lesiones blancas clínica e histopatológicamente.*

Clínicamente, las leucoplasias pueden ser homogéneas y no homogéneas. Las homogéneas, suelen ser lesiones blancas uniformes, finas, con bordes bien delimitados, y una superficie que puede encontrarse surcada por zonas de mucosa sana, o de forma irregular con aspecto de empedrado o embaldosado. Los sitios más frecuentes son la mucosa yugal en los casos de leucoplasias asociadas a tabaco, pudiendo ser uni o bilateral, borde y dorso de lengua y piso de boca (Figura 6). Esta última, es de alto riesgo de transformación carcinomatosa[243]. Las leucoplasias no homogéneas también llamadas *moteadas o eritroleucoplasias*, presentan además de las lesiones descritas anteriormente, componentes rojos[299]. El “gold standard” para el diagnóstico y la exclusión de otras patologías queratóticas, siempre es el examen histopatológico[300].

En una revisión sistemática reciente, la prevalencia estimada de la leucoplasia fue de 1,5% a 2,6%[301]. Existen países como la India, donde la incidencia asciende a casi el 4%, debido a hábitos locales como el consumo de la nuez de areca. La relación en cuanto al género tendría una variación geográfica y sería más frecuente en varones mayores de 40 años[299]. En cuanto a los factores de riesgo, si bien a veces suele ser de naturaleza idiopática o desconocida, el tabaco parecería ser el factor de riesgo más estudiado[302]. Sin embargo existen otros relacionados con patologías sistémicas metabólicas[303], masticación de betel y tabaco[304], presencia de infección por VPH[305] y *Cándida spp*[230]. También se encontraron bajos niveles séricos de retinol, alfa tocoferol, licopeno y carotenoides en un grupo de hombres con leucoplasia bucal[306]. La hipovitaminosis A también podría ser considerada también como un factor de riesgo para el desarrollo de leucoplasias[307]. En nuestro medio, el HACRE está asociado al desarrollo de leucoplasias[197,198].

La histopatología de la leucoplasia muestra una hiperortosis o paraqueratosis con o sin displasia, acantosis, acantopapilomatosis y puede mostrar zonas de atrofia o inflamación cuando está asociada a infección con *Cándida spp*. En casos de peor pronóstico, también puede haber zonas de carcinoma in situ, verrugoso o infiltrante[237,299]. Muchas leucoplasias sin displasia, mostrando solo “hiperqueratosis benignas”, pueden en el tiempo, desarrollar displasias e incluso zonas de transformación carcinomatosa, por eso Woo propuso el término de “queratosis de pronóstico incierto” (QPI) a todas aquellas leucoplasias que no presentaron displasias[308], pero que podrían representar la fase inicial de un fenotipo displásico de la leucoplasia. La displasia epitelial asociada a VPH, es una entidad histológica, que clínicamente presenta características de leucoplasias[146,147,237,238]. Sin embargo, algunos estudios, basados solo en observaciones, demostraron que estas lesiones tendrían algunas características que permitirían al clínico sospechar de una infección o sobreinfección viral: el componente blanco tiende a ser más translúcido, los bordes difusos y una discreta tendencia a hacerse verrugoso[127,309].

En su relación con la transformación maligna, la leucoplasia bucal puede mostrar algunos de los mismos genes mutados observados en el cáncer[310]. La expresión aberrante de p53, p16 y mutaciones de TP53 están asociadas al incremento del riesgo de cáncer[311] y dichas alteraciones fueron también reportadas en algunas lesiones.



Figura 6: Izquierda: Lesión ubicada en mucosa yugal, que abarca región retrocomisural, tercio anterior y medio de mucosa yugal en forma de placa queratótica con una región francamente erosiva asociada al factor irritativo de elementos dentarios cercanos con caries macropenetrantes. Paciente masculino, 55 años, fumador crónico con historia de mala higiene bucal, enfermedad periodontal y presencia de IMCO. Diagnóstico: Leucoplasia del fumador asociada a IMCO. Derecha: Lesión ubicada en borde izquierdo, extendiéndose a cara ventral. Se observa la presencia de una lesión blanquecina con áreas francamente queratóticas con tendencia a la verrugosidad. Paciente masculino no fumador, 35 años. Diagnóstico: Leucoplasia. En ambos casos, la Anatomía Patológica demostró ausencia de displasia por lo que para algunos autores podrían diagnosticarse como QPI

La tasa de transformación de leucoplasia varía de acuerdo con diferentes estudios en un rango de 0,13% y 34%. Las lesiones ubicadas en el borde de la lengua y en el piso de boca, son las que presentaron mayor tasa de transformación maligna. Las leucoplasias no homogéneas con zonas más verrugosas o nodulares, o que contengan algún elemento clínico de aspecto moteado o eritroplásico son las que presentan mayor tasa de transformación maligna[231,312,313]. El detalle clínico de la observación permitió establecer que las lesiones con bordes bien demarcados, a diferencia de lesiones reaccionales con bordes difusos, tendrían mayor tendencia a albergar cambios epiteliales displásicos[308].

La utilización de azul de toluidina (ATO) y tinciones vitales, citologías exfoliativas, dispositivos basados en autofluorescencia y biomarcadores celulares podrían ser utilizados con el objetivo de llegar a un diagnóstico temprano[299,314–316]. El diagnóstico mediante la biopsia debe ser muy cuidadoso, e idealmente se deben tomar múltiples biopsias utilizando métodos alternativos como ATO para elegir el o los sitios más representativos [313,317].

Una vez diagnosticada la leucoplasia, y en ausencia de factores inflamatorios locales, la presencia de displasia epitelial justifica la escisión de la lesión, pero no elimina el riesgo de recurrencia o recidiva [298,299,308,318]. Algunas otras alternativas terapéuticas se basan en la aplicación local de agentes farmacológicos, láser de dióxido

de carbono, terapia fotodinámica, eliminación de los hábitos de riesgo y control[319–325].

En 1985, Hansen publicó un grupo de leucoplasias multifocales de la mucosa bucal la cual definió como “*Leucoplasia Verrugosa Proliferativa*” (LVP)[326]. Con la inclusión de esta nueva nomenclatura, la terminología que se utilizaba hasta el momento (Papilomatosis Oral Florida propuesta por Grinspan y Abulafia[327]) para describir cuadros clínicos similares al presentado por Hansen, cayó en desuso[328]. La LVP es considerada actualmente un subtipo de leucoplasia no homogénea, con la mayor tasa de transformación maligna registrada. Su naturaleza “proliferativa” propuesta por los autores, añade la complejidad de la terminología, haciendo referencia a la multifocalidad y a la capacidad de recidivar tras su extirpación quirúrgica[328]. Se ha propuesto modificar el término a Leucoplasia Multifocal debido a que en sus inicios no siempre tiene un aspecto clínico verrugoso[329].

LVP es una de las patologías que generó y genera más debate en torno a su nomenclatura, naturaleza y tratamiento. A lo largo de las últimas décadas se han propuesto diferentes criterios de diagnóstico de la enfermedad (Ghazali y cols, Gandolfo y cols, Cerero-Lapiedra y cols, Villa y cols). En muchos casos, puede comenzar como una leucoplasia única homogénea[328] (o QPI para Woo) que comienza a hacerse multicéntrica, con o sin cambios malignos al momento del diagnóstico. Uno de los criterios diagnósticos más utilizados son los propuestos por Cerero-Lapiedra y cols en 2010:

Tabla 1 Criterios diagnósticos de LVP, Cerero-Lapiedra, 2010.

CRITERIOS MAYORES

CRITERIOS MENORES

A. Una leucoplasia en más de dos localizaciones bucales, frecuentemente gíngiva, proceso alveolar y paladar.	a. Una leucoplasia que ocupa al menos 3 cm sumando todas las áreas afectadas.
B. La existencia de un área verrugosa.	b. La paciente debe ser mujer
C. Las lesiones deben haberse expandido durante el curso de la enfermedad.	c. El paciente, independientemente al género debe ser no fumador/a.
D. La presencia de una recurrencia en un área previamente tratada.	d. Una evolución mayor a 5 años
E. Histopatológicamente puede existir una simple hiperqueratosis, hiperplasia verrugosa, carcinoma verrugoso, o carcinoma in situ o infiltrante.	

Para establecer el diagnóstico de LVP, deben darse cualquiera de las dos combinaciones: 1- tres criterios mayores estando el E siempre, o 2- dos criterios mayores más dos criterios menores[330].

Villa y cols, demostraron que muchas de las LVP tienen zonas eritroplásicas, eritematosas y fisuradas, concordando a veces con la misma tasa de transformación de eritroleucoplasias, por lo que proponen llamarla en estos casos *Eritroleucoplasias Proliferativas*. A partir de ese primer cambio, postularon además que las lesiones blancas queratóticas pueden ser lisas, fisuradas, con superficie verrugosa y hasta pueden estar ulceradas, las lesiones pueden ser contiguas y multifocales o únicas pero mayores a 4 cm, que se expanden en tamaño y que desarrollan multifocalidad y que histopatológicamente, pueden albergar zonas de carcinoma o displasia, pero en el caso de no encontrar estas características histopatológicas, debe haber hiperqueratosis, paraqueratosis, atrofia o acantosis, pudiendo tener además un infiltrado linfocitario. En estos últimos criterios diagnósticos propuestos, el género y el consumo de tabaco se excluyeron de los criterios anteriores, y el autor afirma que si bien LVP es más común en mujeres no fumadoras, también es importante reconocer que el diagnóstico no cambiaría si la lesión se presenta en un varón fumador[331].

Aún no se ha establecido la patogénesis de la enfermedad[332]. Debido al aspecto clínico verrugoso de las lesiones asociadas a LVP, se relacionó la infección por VPH, encontrando en la literatura diferentes tasas de infección por VPH en LVP[333]. Además, se han encontrado aberraciones en genes reguladores del ciclo celular, con deleciones, pérdida de heterocigosidad, y mutaciones en algunas de estas lesiones[334].

Es de destacar que algunos autores han propuesto que algunas LVP podrían tener en sus inicios formas clínicas similares a las reportadas en liquen plano bucal (LPB) y lesiones liquenoides[335]. La frecuencia de LVP en pacientes mujeres, no fumadoras, y con lesiones multifocales usualmente mayores a 50 años y la similitud de este escenario clínico con el LPB, puede ser uno de los puntos que vinculen ambas patologías[336]. Además en algunos casos, se observó un infiltrado linfocitario de interfase yuxtaepitelial similar al de LPB[337,338], lo que genera controversias acerca de la verdadera naturaleza de la patología. La LVP no solamente se caracteriza por su alta tasa de recurrencia post quirúrgica, sino por su alta tasa de transformación carcinomatosa, siendo el DPM con mayor potencialidad de convertirse en un carcinoma. Las tasas de transformación van del

60 al 100%, siendo la gíngiva y el paladar las dos zonas de mayor frecuencia de transformación[328,332,337,339,340]. Figura 7



Figura 7. Paciente femenina, 79 años, no fumadora. Consulta por múltiples lesiones blancas leucoplasiformes que, como se puede observar en las fotografías se distribuyen por diferentes regiones de la mucosa bucal. En este caso, se cumplen todos los criterios diagnósticos, aún el histopatológico para encuadrar a este caso clínico como Leucoplasia Verrugosa Proliferativa. Luego de las biopsias incisionales de lesiones verrugosas, las mismas volvieron a reaparecer en el sitio previamente intervenido.

Finalmente, como parte del manejo se recomienda la documentación mediante fotografías en cada visita, monitoreos y seguimientos rigurosos y biopsias periódicas cuando la situación lo amerite (áreas rojas, nodulares o verrugosas o zonas de induración). En casos de informarse displasia, las lesiones deberán ser eliminadas quirúrgicamente y los patólogos deberán siempre reportar los márgenes de las LVP, aún en ausencia de displasias.[331]

3.2 Eritroplasia

En 1911 Queyrat describió una lesión de pene con límites bien definidos, de color rojo brillante y superficie aterciopelada, con potencial carcinomatoso a la cual denominó *eritroplasia*. Tiempo después otros autores la describieron en la mucosa genital con una histopatología similar a la de la enfermedad de Bowen en piel[341,342]. Mashberg fue el primero en determinar que muchos carcinomas tempranamente asintomáticos localizados en áreas de la mucosa bucal de alto riesgo, comienzan con lesiones eritroplásicas[343]. Debido a su infrecuente presentación, hay escasos estudios que abordan la patología. En un estudio reciente, se determinó que la eritroplasia es mucho menos frecuente que la

leucoplasia u otros DPM, con una prevalencia de 0,2%[344]. Sin predilección por el género y más frecuentes en sexagenarios y/o septuagenarios[341], se observa como una lesión rojiza de superficie granular con focos amarillentos y blanquecinos. Cuando la misma lesión presenta numerosas regiones leucoplasiformes se le denomina *leucoplasia moteada o eritroleucoplasia*[236,297,341,345] (Figura 8). A la palpación, las eritroplasias no son induradas, excepto cuando ya hay zonas de transformación carcinomatosa[346]. El paladar blando, el piso de la boca, la región retromolar y la mucosa yugal parecerían ser las áreas más afectadas[236,341,345].

La OMS definió su presentación clínica como *lesiones rojas que a veces suelen ser planas, lisas, de aspecto granular o nodular, frecuentemente con márgenes bien delimitados adyacentes a la mucosa normal*”[345]. Para definir eritroplasia, Warnakulasuriya utilizó un concepto análogo al actual de leucoplasia. Eritroplasia es una placa roja que no puede ser caracterizada clínica o histopatológicamente como otra enfermedad definible[297]. Por ello, para el diagnóstico de esta lesión, debe primero descartarse otros diagnósticos: candidiasis eritematosa y atrófica y también otras condiciones como áreas rojas de pacientes con LPB, gingivitis descamativas, etc[297,341,347].



Figura 8. Se observa en el borde de la lengua izquierda, una lesión moteada con áreas eritro-leucoplásicas en una paciente sin hábitos de riesgo, VPH16+. El examen histopatológico reveló la presencia de displasia severa.

Mashberg en 1980 postuló que toda lesión con componente eritroplásico, sea eritroplasia o eritroleucoplasia, cuando asienta en sitios de alto riesgo de la mucosa bucal debe ser considerada como carcinoma in situ o carcinoma invasivo hasta que se demuestre lo contrario[341]. En concordancia, Grinspan y Abulafia estudian a las eritroplasias dentro del capítulo de Carcinomas in situ primitivos[236] ya que al momento de la consulta, la eritroplasia presenta histológicamente displasia severa o áreas de carcinoma in situ. Además, es uno de los DPM con mayor tasa de transformación maligna (de 14 a 50%)[341,348].

Algunos estudios apuntan al consumo de tabaco, masticación de betel y alcohol[344] y VPH[341,347] como factores asociados. Al ser una patología infrecuente, se torna dificultoso realizar estudios de prevalencia de VPH en eritroplasias, sin embargo, en un estudio se observó que el 50 % de las eritroplasias (5/10) estaban asociadas a VPH y todas aquellas que en su seguimiento tuvieron transformación carcinomatosa, fueron VPH positivas[349]. Estos hallazgos permitieron concluir que el VPH16, podría comportarse como un cofactor de riesgo de transformación maligna de eritroplasias. En el trabajo de Holmstrup, se ilustra una lesión eritroplásica asociada a IMCO y con zonas displásicas en la histología que una vez eliminado el factor traumatizante, la displasia epitelial desaparece de manera gradual mejorando también clínicamente[347].

Debido a su evolución a carcinoma invasor, se aconseja la intervención inicial haciendo la exéresis correspondiente y controles posteriores para monitorear la posibilidad de recurrencias[350].

3.3 Liquen Plano Bucal y Lesiones Liquenoides

El Liquen Rojo Plano fue una entidad inicialmente descrita en 1860. Los criterios de diagnóstico fueron revisados por múltiples autores, incluyendo a Erasmus Wilson, el primero en describir la afectación bucal del Liquen Plano Bucal (LPB). Más adelante, Louis Wickham describió las estrías blancas que caracterizan dicha patología[351,352]. Recién 40 años más tarde, William Dubreuilh pudo describir algunos hallazgos histopatológicos del LPB[353], y durante todo un siglo diferentes investigadores de todo el mundo han tratado hasta la actualidad consensuar criterios diagnósticos de la enfermedad.

Las lesiones del Liquen Plano Bucal (LPB) son usualmente múltiples y simétricas, sin embargo, se modifican de paciente a paciente. La presentación clínica puede variar entre diferentes subtipos: linear, reticular, anular, papuloide, en placa (queratótico), atrófico, ampollar y erosivo[354]. También se han descrito subtipos penfigoide[355], escleroatrófico y pseudovegetante[236]. La característica distintiva del liquen reticular son las estrías de Wickham, asintomáticas y ubicadas preferentemente en la mucosa yugal con forma y aspecto arboriforme o en hojas de helecho, pudiendo formar dibujos lineales o anulares en toda la mucosa bucal[88]. Su forma queratótica, puede estar en el dorso de la lengua, simulando una leucoplasia con estrías que se disponen periféricamente a la lesión. Las lesiones atróficas y erosivas pueden presentarse con zonas eritematosas y erosivas y a veces de franca ulceración. Este cuadro clínico, genera dolor en el enfermo y sensación de estomatodinia generalizada. El subtipo atrófico puede encontrarse en el dorso de la lengua generando despapilación, pero también con frecuencia verse en la mucosa gingival rodeando los elementos dentarios. A este último escenario clínico se le denomina Gingivitis Descamativa Crónica. La forma ampollar si bien es rara, puede preceder a la forma erosiva. Suele ser recurrente y recidivante, pudiendo aparecer como la variante clínica vulvovaginal-gingival de LPB[88,231,297,351]. La prevalencia de LPB se estima en un 2,2%[356]. Más del 60% de los pacientes con liquen rojo plano, presentan manifestaciones bucales de su enfermedad[357], siendo una patología frecuente entre los 30 y 80 años de edad, con una gran predilección por mujeres postmenopáusicas[351,357–360].

Las *lesiones liquenoides* (LL) tienen una clínica similar al LPB pero con una etiología bien definida, y según diferentes autores podrían clasificarse en 1) Asociadas a materiales de restauración, frecuentemente amalgamas, llamadas *lesiones liquenoides orales por contactantes*, 2) Asociadas a fármacos y 3) Asociadas a la *Enfermedad injerto contra el huésped*[297].

El diagnóstico de LPB y LL, está basado en la combinación de: anamnesis, hallazgos clínicos bucales, dermatológicos y microscopía. Sin embargo, el diagnóstico a veces es difícil dado por el dinamismo de la patología. En la histopatología, el LPB puede incluir zonas de hiperpara o hiperortoqueratosis, cuerpos de Civatte, degeneración hidrópica de las células basales, y un infiltrado yuxtaepitelial[146]. También se pueden encontrar crestas interpapilares con forma de dientes de sierra, acantosis, zona de

ulceración, depósito de melanina asociado a melanófagos, atrofia epitelial, etc. Todo esto dependerá del subtipo clínico de LPB[88,146,297,351]. La Inmunofluorescencia directa permite complementar y confirmar el diagnóstico histopatológico [361] .

Se han encontrado diferentes factores que contribuyen al desarrollo de LPB, que en algunos casos son considerados disparadores de la enfermedad: inductores locales y sistémicos de hipersensibilidad mediada por células, stress, respuesta epitelial a antígenos epiteliales y microorganismos[362]. Asociada a reacciones de hipersensibilidad, se han visto las llamadas *reacciones o lesiones liquenoides*, sobre todo asociadas a materiales restaurativos, medicaciones, condimentos, etc.[363,364]. El rol del estado emocional aún no estaría bien dilucidado pero parecería ser un moderador de la respuesta a través del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal, permitiendo la instalación de las lesiones[365]. Existiría una gran variedad de antígenos que pueden gatillar una respuesta inmune desregulada y autoinmune contra los queratinocitos bucales[366]. En relación a posibles agentes microbianos y su relación con el desarrollo de LPB, el único con evidencia en su asociación con la patología, fue el Virus de la Hepatitis C pero solo en algunas regiones geográficas[362,367]. El VPH-16 también fue investigado en pacientes con LPB y algunos estudios han demostrado un potencial rol en su patogénesis y en su pronóstico debido al potencial carcinogénico viral[368]. En relación a factores sistémicos, se propuso que el LPB en su forma erosiva, estuvo asociado a diabetes mellitus e hipertensión arterial[369].

Los primeros criterios diagnósticos de LPB datan de 1978 publicados por la OMS, y modificados mucho tiempo después (2003) por Van der Meij y Van der Waal[370]. La dificultad más importante que tiene LPB para consensuar los diagnósticos es la variabilidad clínico-histológica que presenta la enfermedad. En una publicación de consenso entre diferentes prestigiosos investigadores, la Academia Americana de Patología y Medicina Bucal, propuso algunas modificaciones al diagnóstico, sobre todo enfatizando que el diagnóstico de LPB es clínico, siendo el profesional tratante quien pueda apoyarse en algunos aspectos de la histopatología provistos por el patólogo. El diagnóstico de LPB no debería finalizar con una biopsia inicial, sino que el seguimiento y monitoreo del paciente en cuanto a la modificación de su clínica y respuesta al tratamiento también serán necesarias como parte del proceso diagnóstico[351].

La transformación carcinomatosa del LPB resulta un tema de controversia. En una revisión sistemática, sobre 7086 pacientes con LPB la tasa de transformación fue de 1,09%, siendo la lengua el sitio más frecuente donde las lesiones generan cambios neoplásicos[371]. En cuanto al subtipo de LPB, el liquen erosivo, en placa y el atrófico parecerían ser los de mayor tasa de transformación a CCEB y Carcinoma Verrugoso[88]. Lanfranchi y cols informó una tasa de transformación (una de las más altas publicadas) de 6,51%, siendo las formas queratóticas y erosivas las más frecuentes que se transformaron, de ubicación en lengua[372]. El mecanismo por el cual el LPB induce la transformación maligna es desconocido, sin embargo la inflamación crónica producida podría ser uno de los tantos mecanismos propuestos que vinculen ambas patologías[260]. Las LL muestran también un potencial de progresión maligna, con trabajos que la proponen aún con mayor potencial de transformación que LPB. Es probable que la inflamación persistente asociada a LL conduzca la evolución de estas lesiones hacia los mecanismos de malignidad epitelial[230].

3.4 El diagnóstico de Displasia Epitelial Oral

La presencia de zonas displásicas en un DPM condicionará no solo el tratamiento a elegir sino la rapidez con la que éste se instale. La displasia epitelial oral (DEO) es un marcador histológico muy importante que el clínico debe conocer e investigar cuando se estudia cualquier DPM. La OMS propuso mantener el sistema de clasificación de displasias: leve, moderada y severa, aunque es reconocido mundialmente que dicha clasificación se ve condicionada por una gran variabilidad intra e interobservador[238,373,374]. La displasia leve está confinada solo a cambios celulares y arquitecturales del tejido epitelial presentes en el tercio inferior del epitelio (basal y parabasal). La displasia moderada exhibe un desorden en la maduración desde la región basal/parabasal a la zona media del estrato espinoso (2/3 del epitelio) y la displasia severa/carcinoma in situ (CIS) revela una maduración anormal celular en casi todo o la totalidad del espesor epitelial[238] (Figura 9). Sin embargo, algunos patólogos recomiendan un sistema binario de diagnóstico de DEO (Alto y Bajo Riesgo) similar al propuesto para las displasias laríngeas con el objetivo de disminuir las discrepancias subjetivas interobservador. [375]. Para la OMS este sistema carece aún de validación para poder ser aplicado.

La siguiente tabla expone las características citológicas y tisulares para el diagnóstico de DEO:

Tabla 2 – Características tisulares y citológicas utilizadas para el diagnóstico histopatológico de DEO.

Características Tisulares	Características citológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Estratificación irregular del epitelio • Pérdida de la polaridad celular • Crestas papilares en forma de gota • Aumento del número de figuras mitóticas • Queratinización prematura aislada (Disqueratosis) • Perlas de queratina • Pérdida de la cohesión celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Variación anormal en el tamaño del núcleo (anisonucleosis) • Variación anormal en la forma del núcleo (pleomorfismo nuclear) • Variación anormal en el tamaño de la célula (anisocitosis) • Variación anormal en la forma de la célula (pleomorfismo celular) • Aumento de la relación núcleo: citoplasma • Figuras mitóticas atípicas • Nucleolos prominentes • Hiperchromasia

Los sistemas de clasificación de DEO se basan en las alteraciones citológicas y organizacionales del epitelio en todo su espesor. Sin embargo, las características arquitecturales del epitelio a veces son dificultosas de establecer ya que dividir al epitelio en tres tercios similares no siempre se puede lograr, por ejemplo, en casos de lesiones verrugosas con hiperqueratosis. En algunos casos también el epitelio está atrófico y por lo tanto es difícil llegar a realizar esta separación para establecer los grados de displasia. También es destacable el hecho de encontrar en las displasias un infiltrando en banda linfocitario, y representa una respuesta inmunológica del paciente a la DEO. En estos casos, no se debe maximizar estos hallazgos histopatológicos, siendo la apariencia clínica de la lesión, la variable de mayor valor en el diagnóstico[237].

Cabe destacar que en algunos casos, se han reportado displasias en bordes hiperplásicos de UTC en lesiones de LPB o LL o en epitelios en vías de reepitelización, etc., a la cual se las denominó “reactivas”, ya que presumiblemente se da como una respuesta a un intenso y exagerado componente inflamatorio[237,238]. El término *Displasia o Atipia de Significado incierto*, fue utilizado para describir hallazgos histológicos donde el nivel de atipia es desproporcionalmente mayor que el esperado para el grado de inflamación presente[376], pero aún no se encuentran antecedentes de su uso en la patología bucal.

En muchos casos de DPM, se observan elementos histológicos que podrían ser diagnosticados como *displasias reactivas* y muchos de ellos asociados a una infección o sobreinfección candidásica crónica. Una vez que el paciente comienza un tratamiento

antimicótico, las alteraciones displásicas en el tejido parecerían ser reversibles y clínicamente la lesión mejora. En el caso de no suceder esto, se indica biopsiar nuevamente. El epitelio displásico parecería estar localmente inmunocomprometido generando condiciones óptimas para la colonización micótica[237].

Un subtipo particular de DEO es la DEO asociada al VPH (DEO-VPH) descrita por Woo[147–149], con características histopatológicas propias y con utilización de la proteína p16 en análisis inmunohistoquímicos. Este término fue previamente descrito en 1996 por Fornatora y cols como *Displasia Coilocítica*, refiriéndose a un epitelio de la mucosa bucal con displasia y que además albergaba signos directos e indirectos con infección por VPH, demostrando la presencia del virus mediante técnicas de biología molecular [309]. El término fue importado desde la patología ginecológica, utilizado para nombrar las lesiones de alto riesgo asociadas al VPH[377].

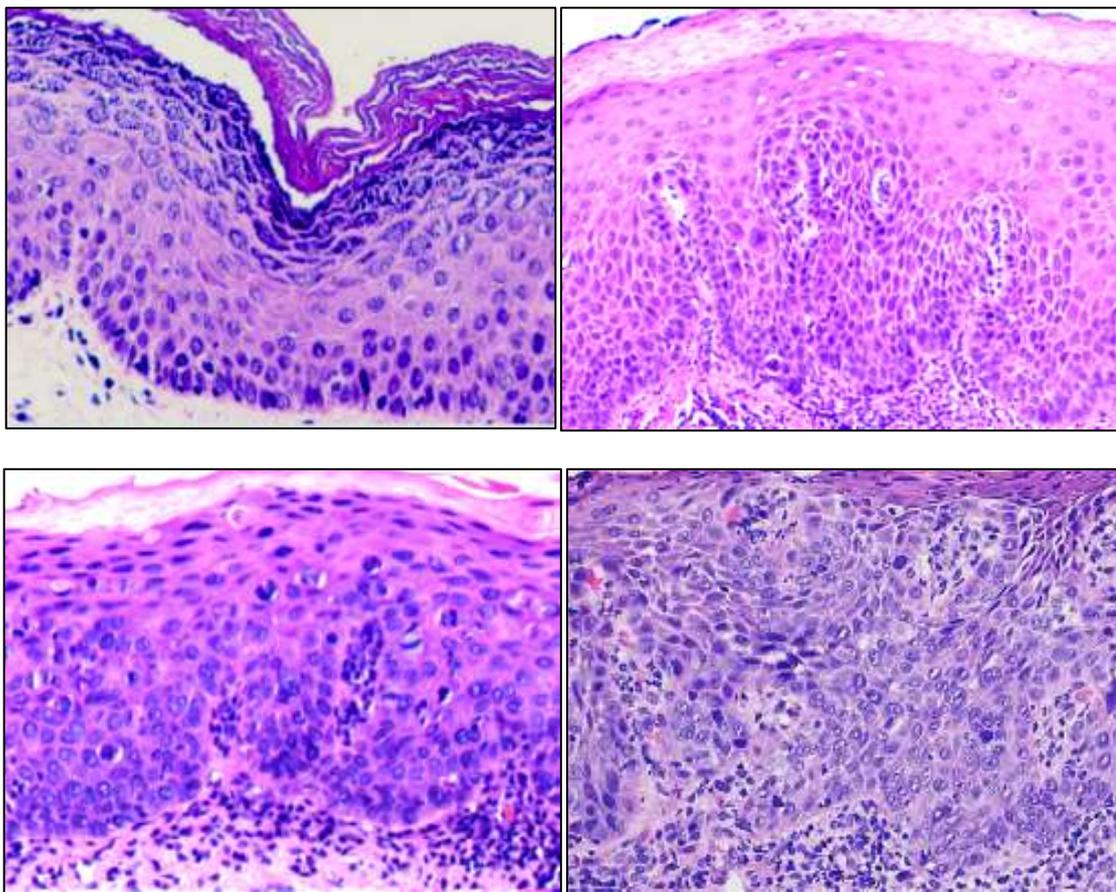


Figura 9. Arriba, izquierda: Histología de displasia epitelial leve, con alteraciones morfológicas que ocupan solo el tercio inferior del epitelio. Arriba, derecha: pérdida de la arquitectura tisular en el tercio medio del epitelio (displasia moderada). Abajo, izquierda: las alteraciones celulares y tisulares ocupan casi la totalidad del espesor epitelial, compatible con displasia severa. Abajo, derecha: Alteración total del espesor epitelial con múltiples imágenes displásicas, pero con membrana basal conservada. Carcinoma in situ. Microfotografías histológicas obtenidas de "Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology". Müller, S. OOOO, 2018. DOI:10.1016/j.oooo.2018.02.12. [238]

4. Biomarcadores de Cáncer y Precáncer Bucal

El diagnóstico de DPM y CCEB empieza con el examen clínico, la realización de una biopsia de diagnóstico y finaliza con el estudio histopatológico. La displasia existente en DPM orienta hacia un potencial de malignización de la lesión bajo estudio. La investigación utilizó en forma selectiva otros exámenes complementarios más específicos con la finalidad de observar el comportamiento particular de diferentes estructuras biológicas, genes, enzimas, mediadores químicos implicados en la carcinogénesis bucal. Hasta el momento, el diagnóstico de DEO es el predictor más confiable de un riesgo incrementado de transformación. Sin embargo, algunas displasias tienen la capacidad para progresar a cáncer y otras se resuelven. Y en algunas lesiones sin displasia no se debe descartar absolutamente el riesgo de transformación. La capacidad de predecir el comportamiento de un DPM mediante la clínica o la histopatología es limitada. Por eso, es importante el desarrollo de diferentes marcadores predictivos que podrían identificar riesgos de progresión[378–380].

Para la prevención y el tratamiento de CCEB, se necesitan bases sólidas de comprensión de los mecanismos moleculares de carcinogénesis, que permitan descubrir más marcadores de diagnóstico, pronóstico, así como también identificar nuevos blancos terapéuticos[381]. Existe un amplio abanico de marcadores que proporcionan información adicional a la recopilada durante el examen clínico y microscópico. En una revisión sobre este tema[382], se agrupó a los biomarcadores utilizados en la investigación de CCEB y DPM de la siguiente forma:

- a) **MARCADORES DE CRECIMIENTO TUMORAL:** EGF (Epitelial Growth Factor), Ciclinas, Antígenos de proliferación celular nuclear, P120, Ki67, AgNor, Skp2, Bcl2, HSP27 y 70 (Heat shock proteins), Telomerasa
- b) **MARCADORES DE SUPRESIÓN TUMORAL Y RESPUESTA ANTITUMORAL:** pRb (Proteína del Retinoblastoma), Inhibidores de la ciclina dependiente de quinasa, p53, Bax, Fas/Fasl, Células Dendríticas (DC)
- c) **MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS:** VEGF/VEGF-R: (Vascular Endothelial Growth Factor/Receptor), NOS₂ (Nitric Oxyde Synthase type II), PD-ECFG (Platelet derived endothelial cell growth factor), FGFs (Fibroblast growth factor)

- d) MARCADORES DE INVASIÓN TUMORAL Y POTENCIAL METASTÁSICO: MMPs (Matrix-Metallo-Proteases), Catepsinas, Integrinas, Caderinas y Cateninas, Desmoplaquinas
- e) MARCADORES CELULARES DE SUPERFICIE: Carbohidratos, HLA (Antígeno de Inmunohistocompatibilidad), CD57
- f) MARCADORES INTRACELULARES: *Citoqueratinas*
- g) MARCADORES DE QUERATINIZACIÓN ANÓMALA: Filagrinas, Involucrininas, Proteínas desmosomales, Análisis nuclear (para valorar dos parámetros: el estado ploide de ADN -anaploide, tetraploide y diploide- y la polisomía cromosómica)
- h) PRODUCTOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO: Metabolitos de la Lipooxigenasa, Cicloxigenasa (COX), Prostaglandinas E2 (PG-E2)
- i) ENZIMAS: Glutathion S- Transferasa

4.1 Biomarcadores de diferenciación celular: las Citoqueratinas

El citoesqueleto de las células epiteliales está formado por tres tipos de filamentos, los cuales están clasificados de acuerdo con el diámetro y a las propiedades fisicoquímicas: *microfilamentos*, *microtúbulos* y *los filamentos intermedios* (Figura 10). Los microfilamentos son los más pequeños de todos con un diámetro de 7 nm, están agrupados en moléculas globulares de actina, que se unen entre sí para formar los microfilamentos de actina. Los filamentos de actina se anclan a la membrana celular mediante proteínas de unión y se adhieren focalmente a ella como partes de las uniones estrechas. El otro componente constituyente del citoesqueleto es el de los microtúbulos, el cual son los filamentos más grandes (20 nm). Están constituidos por moléculas de tubulina, a partir de centros organizadores de microtúbulos. La red de microtúbulos se estabiliza dentro de una célula por los microfilamentos circundantes y los filamentos intermedios. Los centros organizadores de microtúbulos también interactúan con filamentos de queratina para unirse a ellos a través de proteínas mediadoras y por lo tanto mantener la polaridad de algunas células epiteliales. El tercer componente, y el de mayor interés para el desarrollo de este trabajo, es el de los filamentos intermedios. Se diferencian de los dos componentes citoesqueletales anteriores debido a que pueden tener un rango variable de su diámetro que va de los 7 a 12 nm. Los filamentos intermedios del tejido epitelial están formados por *queratina* y esta proteína se expresa exclusivamente

en este tejido. En otros tejidos no epiteliales, los filamentos intermedios están formados por ejemplo por moléculas de desmina (células miogénicas), vimentina (fibroblastos), etc. El turnover de los filamentos intermedios requiere de la acción de diferentes enzimas como quinasas, fosfatasa, etc. Los filamentos intermedios son un componente crucial de las señalizaciones celulares, que son esenciales para el desarrollo celular y posiblemente para la regulación de la degradación de proteínas, encargadas de traducir señales ambientales en modificaciones de la expresión génica. Los filamentos intermedios se unen por un lado a los poros de la membrana nuclear y por el otro a los desmosomas y hemidesmosomas[383–385].

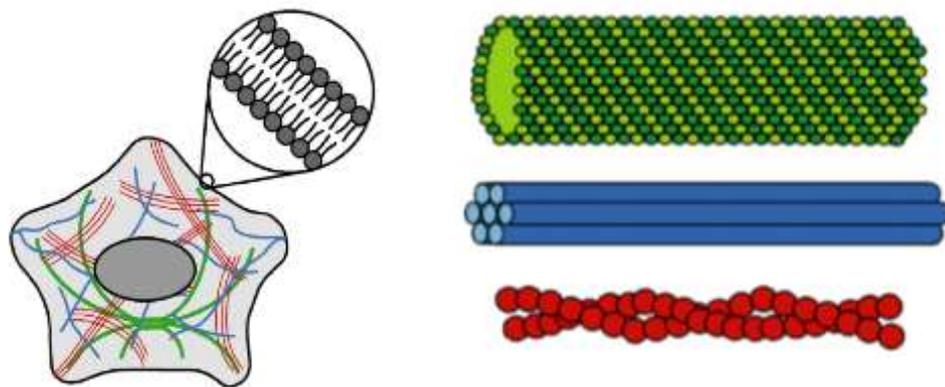


Figura 10 – Componentes estructurales del citoesqueleto celular. Filamentos de actina (Rojo) que se disponen en forma paralela, filamentos intermedios (Azul), los cuales varían en su peso molecular y en el tejido epitelial están formados por queratina o citoqueratina y los Microtúbulos (Verde). Obtenido de *Review on Cell Mechanics: Experimental and modeling approaches. Applied Mechanics Review. Rodríguez, M y cols. Nov 2013. DOI:10.1115/1.4025355*[386]

Los filamentos intermedios de las células epiteliales están formados por *queratinas o citoqueratinas (Cks)*, las cuales se encuentran solo en vertebrados[384]. Las Cks humanas tienen un peso molecular que varía entre 44 a 66 kDa y su expresión puede ir modificándose de acuerdo a diferentes cambios celulares, por ejemplo la transformación de una célula epitelial a mesenquimática durante algunos procesos de la embriogénesis[383]. Existen diferentes tipos de Cks y la clasificación de estas pueden variar de acuerdo con el autor. Fundamentalmente, pueden diferenciarse de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas y de acuerdo con el tejido o a las células que las expresa. Además existen diferencias en la distribución dependiendo el grado de queratinización o cornificación epitelial en epitelios estratificados[383,384].

La biología del epitelio de la mucosa bucal se encuentra en correspondencia con las necesidades que cada subsitio de la cavidad bucal le demanda. El epitelio bucal posee

dos patrones de maduración epitelial: 1) Queratinización: la mucosa madura formando estratos con queratina, a su vez generando *ortoqueratinización* refiriéndose a la ausencia de núcleos en las escamas de la superficie epitelial ó *paraqueratinización* a la retención de núcleos picnóticos en la superficie epitelial. 2) No queratinización: la mucosa madura en ausencia de una cubierta de queratina[387].

Las Cks cumplen las funciones de soporte mecánico y mantenimiento de la arquitectura celular, cicatrización de heridas, establecen la polaridad celular e influyen la actividad mitótica, regulan el crecimiento, transporte intracelular y la síntesis de proteínas, protegen a las células del stress, la apoptosis y la presión hidrostática.

Las Cks son las principales marcadores de diferenciación del epitelio estratificado[383]. La distribución de Cks en el epitelio bucal normal es similar cuando se tiene en cuenta las células del estrato basal o germinativo, siendo el par Ck5/14 las presentes en este estrato. Sin embargo, en estratos suprabasales se diferencian según sea un epitelio queratinizado (Ck1/10) o no queratinizado (Ck4/13)[388–390] (Figura 11). La especificidad de la expresión de Cks a lo largo de la mucosa bucal se encontraría atribuida a una especialización intrínseca de SC de queratinocitos bucales[391].

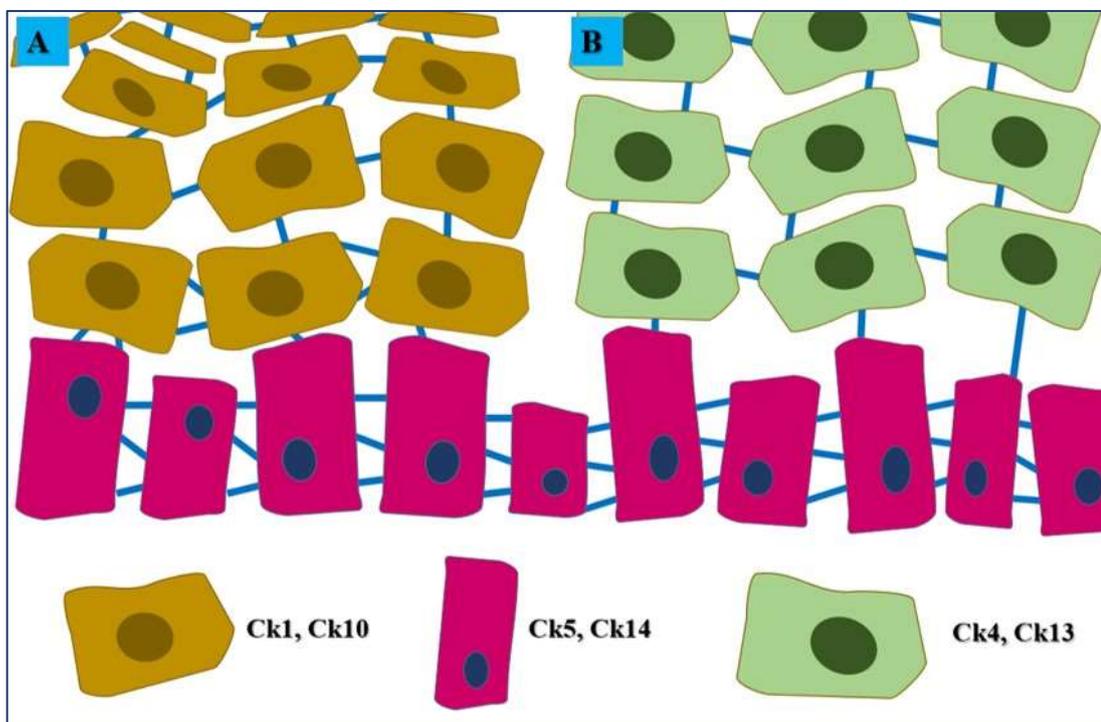


Figura 11 Distribución de Citoqueratinas en la mucosa bucal normal A) Mucosa Queratinizada, expresa en estrato basal Ck5 y 14, mientras que en suprabasal Ck 1 y 10. B) Mucosa No Queratinizada, expresa en estrato basal el mismo patrón de Ck (5 y 14) que la mucosa queratinizada, pero en estratos suprabasales, la Ck 4 y 13 son las más frecuentes.

Las SC epiteliales residen en nichos frecuentemente encontrados en las profundidades de las crestas epidérmicas para aislarse de influencias mecánicas y físicas[392], y expresan Cks específicas como Ck15 y Ck19[392,393]. Al observar frecuentemente una vasta cantidad de figuras mitóticas en los estratos basales del epitelio fetal y expresión de Ck15, se pensó que las células basales de cualquier epitelio estratificado tenían la capacidad para producir nuevas células en forma indefinida con el objetivo de mantener la normalidad del epitelio. Sin embargo, desde el surgimiento de los conceptos de SC de queratinocitos y células amplificadoras transitorias, se reconoció que los telómeros de los cromosomas limitan el número de las divisiones celulares a 30 durante toda la vida de un linaje celular. Esta limitación dada por un restringido número de divisiones celulares no sería suficiente para compensar la pérdida de células que se genera a través de la descamación normal del epitelio[385,394,395]. Desde la nueva perspectiva de las SC, éstas serían capaces de dar lugar a dos células hijas: una SC nueva y otra célula amplificadora transitoria[392,396] y por ende los estratos germinativos de los epitelios estratificados estarían compuestos por SC, células amplificadoras transitorias pero también con células que han comenzado su proceso de diferenciación a queratinocitos. Las SC epiteliales también llamadas queratinoblastos producen queratinas Ck5, Ck14, Ck15 y Ck19. Figura 12.

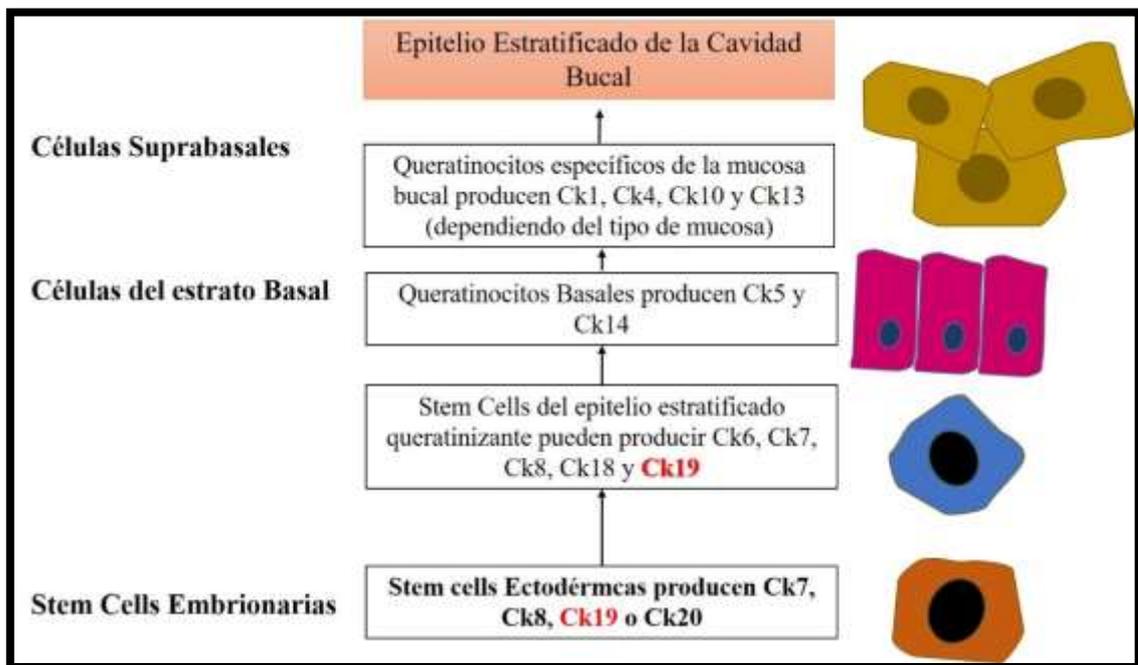


Figura 12 Epitelio estratificado de la mucosa bucal y las queratinas producidas en los queratinocitos basales y suprabasales. Las células basales de todos los epitelios estratificados del organismo humano producen Ck5 y Ck14 pero las células suprabasales generan una producción diferencial de Cks de acuerdo al tejido donde asienten y con características propias de cada tejido. La

Ck19 es una Ck producida por Stem Cells embrionarias y también por Stem Cells de Queratinocitos Bucales. Modificado y extraído de *Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia*. Hermann y cols. *J Anat*, 2009. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.X [384]

El campo de las Cks comenzó a ser exhaustivamente estudiado debido al incremento de nuevas patologías genéticas y/o adquiridas. Desde el descubrimiento de las primeras patologías genéticas de la queratina (Epidermólisis Ampollar, Paquioniquia congénita, etc.), se identificaron muchas mutaciones como causa de patologías de interés dermatológico y estomatológico[397]. Los patrones diferenciales y específicos de expresión de Cks en la mucosa bucal, permitió la utilización de las Cks como marcadores de diferenciación epitelial en biología celular, embriología y patología bucal. Las Cks, en efecto son el “gold standard” de los marcadores inmunohistoquímicos en diagnóstico, clasificación y tipificación de los carcinomas y detección de metástasis inciertas[397]. Otra característica beneficiosa para su uso en la patología es la estabilidad de la expresión aún en estados patológicos, por eso la utilización de las Cks junto a otros marcadores son herramientas muy confiables para el diagnóstico en la patología clínica.

Algunos cambios en los patrones normales de expresión de Cks, han sido previamente detectados en lesiones premalignas y malignas de la mucosa bucal[398]. La Ck19 es considerada un biomarcador de carcinogénesis bucal temprana[399] ya que fue detectada en estratos suprabasales de lesiones displásicas y en cánceres ya establecidos. La detección de Ck19 en estos procesos patológicos respondería a la presencia de células inmaduras y por lo tanto ser considerada un marcador de SC epitelial in vivo e in vitro[398,400–402], pudiendo también relacionarse a la progresión durante la carcinogénesis bucal mediada por SC y por SCC ya que también fue estudiada en DEO[402–405]. Un marcador específico de SCC hallado en CCEB fue CD44. En un estudio donde se utilizó CD44, se observó una correlación con Ck19, sugiriendo que muchas SCC podrían expresar en su citoesqueleto CK19 y por ende ser considerada un marcador (aunque no específico) de SCC bucal[406].

Cuando un epitelio es sometido a una injuria, existe un desequilibrio en la homeostasis epitelial, alterándose los procesos básicos de homeostasis del epitelio: diferenciación y proliferación. La fase de cicatrización de una injuria crónica involucra la migración y la generación de un estado hiperproliferativo de los queratinocitos en los márgenes de la herida, que conlleva finalmente al cubrimiento total de la región dañada

con un epitelio sano. Si bien las SC de queratinocitos bucales se encuentran presentes durante la autorrenovación epitelial debido a injurias tisulares, estas células podrían ser el blanco de carcinógenos ambientales llevando a la acumulación de cambios genéticos, pudiendo generarse condiciones que alteren la señalización celular que regula esta renovación[407]. Algunos estudios describieron que la presencia de Ck19 en estratos suprabasales del epitelio está asociado a cambios premalignos [408]. Hasta el momento no hay ningún estudio que evalúe patrones inmunohistoquímicos de Cks presentes en la carcinogénesis temprana en lesiones asociadas a IMCO.

La exposición al medio ambiente bucal del estrato basal (células basales, células amplificadoras transitorias y SC), asociada a un traumatismo agudo o asociada a IMCO fue descrita como el evento necesario para facilitar la penetración del VPH y el comienzo de una infección viral que podrá o no mantenerse en el tiempo[409]. La identificación de citoqueratinas expresadas a nivel basal (Ck5) o en SC (Ck19) podría ayudar a dilucidar algunos procesos biológicos que vinculen IMCO, infección por VPH en el contexto de la carcinogénesis bucal.

4.2 Biomarcadores de Proliferación celular: Ki67

La proliferación epitelial, debe estar estrictamente controlada por mecanismos de balance de pérdida/producción de nuevos queratinocitos bucales. La pérdida de ese equilibrio puede estar dada por el incremento o disminución de expresión de genes reguladores del ciclo celular. La acumulación de mutaciones somáticas (asociadas a productos carcinogénicos endógenos y/o exógenos) podrían alterar la expresión de genes involucrados en el control del crecimiento celular y la diferenciación epitelial, llevando a un desbalance completo del tejido, que caracteriza el cáncer[38]. Los queratinocitos basales que son capaces de migrar y regenerar el epitelio después de una lesión son positivos para algunos marcadores de proliferación epitelial. Dicha expresión incluye SC proliferativas asociadas a la cicatrización de heridas epiteliales[410]. Para algunos autores, el aumento de la proliferación celular podría ser uno de los tantos mecanismos que vinculan la inflamación crónica y el cáncer[411]. En relación a este vínculo, existen mediadores biológicos presentes en un microambiente inflamatorio que al ser liberados en forma persistente, generan aumento de la supervivencia celular, proliferación, angiogénesis y evasión de la respuesta inmunológica[260]. La actividad proliferativa de

un tejido o una neoplasia puede ser determinada mediante su tasa de crecimiento gracias a la utilización de anticuerpos contra antígenos específicos expresados por células neoplásicas[412]. Los marcadores de proliferación han demostrado resultados prometedores en CCEB y DPM, ya que la hiperproliferación es un evento temprano, necesaria para el crecimiento desordenado. El aumento del índice proliferativo y la distribución de dichas células dentro del tejido, pueden revelar algunos mecanismos regulatorios que se desequilibran durante la carcinogénesis[413].

Ki67 es un marcador de elección ya que su expresión nuclear durante el ciclo celular representa una ventaja como marcador biológico de la actividad mitótica celular[412,414,415]. Es un antígeno nuclear humano expresado durante las fases G1, S, G2 y M pero ausente en G0 o estado quiescente[416]. La inmunomarcación con Ki67 destaca a las células activamente implicadas en fenómenos proliferativos, siendo utilizada para estimar el potencial proliferativo en CCC, observando expresión en el espesor epitelial de carcinomas infiltrantes y sólo en el estrato germinativo basal en aquellos epitelios acantóticos pero no displásicos[417]. Ki67 ha sido ampliamente utilizado en diferentes investigaciones para evaluar el grado de proliferación epitelial en DEO y CCEB. En relación con otros DPM, los diferentes trabajos concuerdan con un aumento de Ki67 en liquen plano[418], leucoplasias[413,416] y lesiones displásicas.

Si bien estos marcadores han sido utilizados por diferentes investigadores en el estudio de cáncer y precáncer, no existe hasta el momento evidencias de biomarcadores de proliferación y diferenciación celular en lesiones asociadas a IMCO como las UTC. La inmunoexpresión de estos biomarcadores en los bordes epiteliales de las UTC podría generar evidencia científica que permita vincular eventos fisiopatogénicos presente en lesiones de IMCO y su relación con el desarrollo de cáncer y precáncer.

Hipótesis de trabajo

La IMCO de la UTC presenta un patrón característico de biomarcadores de proliferación y diferenciación celular, que están presentes en lesiones premalignas y/o malignas bucales y que además se relacionan con otros factores biológicos carcinogénicos como la infección por VPH.

Objetivos Generales y Específicos

Objetivo General

Evaluar la expresión de biomarcadores en UTC a fin de determinar un patrón característico de esta lesión y compararlo con el patrón que presenten los DPM y CCEB asociadas o no con la infección por VPH.

Objetivos Específicos:

1. Analizar la expresión de Cks (Ck5/6, Ck19) en UTC, DPM y CCEB para identificar patrones de alteración de diferenciación celular del epitelio de la mucosa bucal asociado a IMCO.
2. Analizar la expresión de Ki 67 en UTC, DPM y CCEB para identificar patrones proliferativos del epitelio de la mucosa bucal asociado a IMCO.
3. Comparar los patrones de biomarcadores de Cks y Ki67 característicos para cada lesión y su correlación con las distintas condiciones clínicas del paciente.
4. Correlacionar las variables clínicas e inmunohistoquímicas encontradas en UTC con los criterios de diagnóstico de VPH de lesiones premalignas y malignas, a fin de vincular la IMCO y la infección por VPH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

Se realizó un estudio transversal de pacientes (n=114) que concurrieron al servicio de la Cátedra de Estomatología “A” de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, período 2015-2018.

Se conformaron tres grupos de estudio:

- **UTC:** (n=41) pacientes con presencia de úlceras crónicas asociadas a un factor traumatizante según criterios previamente establecidos y publicados por Piemonte y cols [178].
- **DPM:** (n=35) integrado por pacientes con presencia de DPM según clasificación de OMS 2007, Warnakulasuriya y cols [231], incluyendo solo lesiones de leucoplasia y sus variantes eritroleucoplasias y LVP según criterios de diagnóstico previamente establecidos por Woo, Villa y Cerero-Lapiedra[308,330,331].
- **CCEB:** (n=38) pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide: in situ, microinfiltrante e infiltrante y carcinoma verrugoso según la clasificación internacional de enfermedades (ICD-10) código C01-C06 diagnosticados por anatomía patológica con técnicas de rutina hematoxilina/eosina.

Criterios de Exclusión

Pacientes menores de 18 años, individuos que hayan recibido corticoterapias prolongadas, radioterapia o quimioterapias que modifiquen la clínica y que pudieran alterar la expresión de estos marcadores de las lesiones bucales.

En el grupo UTC, no se incluyeron úlceras bucales asociadas con patologías infecciosas o autoinmunes donde sin asociación con factores traumatizantes.

En el grupo de DPM, se excluyeron los pacientes con lesiones de LPB debido a que es una patología con un componente inflamatorio asociado a una reacción de autoinmunidad y un patrón particular de Cks ya estudiado por otros autores[419].

En el grupo de CCEB, se excluyeron los casos de semimucosa labial.

Registro de variables clínicas

Los pacientes fueron examinados por dos profesionales especialistas en el área de Medicina bucal/Estomatología, previamente calibrados ($Kappa = 0,62$), por inspección visual y palpación de la mucosa bucal, dientes y prótesis. Las variables clínicas fueron recogidas en una historia clínica (HC) diseñada ad-hoc y también aprobada por CIEIS-FO-UNC (Protocolo T11-2016).

El análisis de las variables clínicas en los tres grupos fue el siguiente:

- **Edad:** pacientes mayores de 45 años y menores de 45 años según criterios de Llewellyn y cols [60].
 - **Género:** registrado como femenino o masculino
 - **Tiempo de evolución de la lesión:** según lo relatado por el paciente durante la anamnesis, corresponden al período entre el primer síntoma y signo detectado por el paciente hasta el momento de la primer consulta.
 - **Lesión clínica:** según examen estomatológico visual y palpatorio, localización y descripción de la/s lesión/es elementales detectadas.
 - **Exposición ambiental a arsénico o laboral a otros carcinógenos (pesticidas, herbicidas, solventes, etc):** a través de la anamnesis del paciente, considerando una residencia en zona arsenical por un período de 10 años o más consumiendo agua de pozo (HACRE) [198] o cuando el paciente estuvo expuesto a sustancias reconocidas por la IARC como carcinógenos durante 10 años o más[39].
 - **Herencia mórbida de cáncer:** se categorizó como presente o ausente en el caso que durante la anamnesis se registre padecimientos oncológicos de tracto aero-digestivo superior o CCC en familiares de hasta segundo grado de consanguinidad.
 - **Tabaco:** a través de anamnesis, considerando las siguientes categorías a) fumador de más de 100.000 cigarrillos diarios, b) fumador de menos de 100.000 cigarrillos diarios y c) no fumador o exfumadores (en esta categoría fue considerado el paciente exfumador con cese tabáquico por más de 10 años). En relación con el consumo acumulado, se estableció la estimación del promedio de consumo (años de consumo de tabaco x promedio estimativo diario x 365).

- **Marihuana:** mediante anamnesis. Se categorizó si el paciente era o no fumador de cigarrillos de marihuana. En relación con el consumo acumulado, se estableció la estimación del promedio de consumo con el mismo criterio de la variable tabaco.
- **Alcohol:** mediante anamnesis. Se categorizó como: a) no bebedor: nunca ha consumido ni consume alcohol habitualmente, b) bebedor social: consume alcohol en forma esporádica en reuniones sociales o consume ocasionalmente hasta un vaso de bebida semanal). c) bebedor crónico: consume alcohol habitualmente (más de cuatro días en la semana) desde hace más de un año.
- **Mate:** mediante anamnesis y según criterios de Piemonte modificados[51]. El consumo de mate en forma ocasional se lo consideró como ausencia de este factor de riesgo. El consumo en forma habitual, diaria se lo consideró como presente y en este caso se registró la temperatura del agua de la infusión según las siguientes categorías: frío (conocido como tereré), tibio (agua sin hervir), caliente (agua hervida con agregado de agua fría), muy caliente (agua hervida o hábito de distribuir el agua desde la pava sobre el fuego sin ningún intermediario).
- **IMC:** se registró como “presente” cuando se observó clínicamente cualquiera de las siguientes condiciones según criterios ya establecidos[148]: lesión clínica asociada a IMCO de más de un mes de evolución sin tendencia a la reparación y en relación a cualquier agente irritativo de existencia previa a la lesión, que contacte directamente con ella, ya sea por decúbito o durante movimientos funcionales y/o parafuncionales. Una vez categorizada la variable IMCO, por presente o ausente, se procedió a subcategorizar el tipo de IMCO: a) *Dentaria* (elementos dentarios con potencial irritativo, restos radiculares, malposiciones, restauraciones desbordantes, superficies rugosas o filosas, etc. Las coronas y los puentes dento o implanto soportados fueron consideradas de origen dentario), b) *Protético* (asociación con prótesis removible: desadaptación, falta de retención, ganchos metálicos traumatizantes, rugosidad, flancos vestibulares o linguales sobreextendidos, etc.), c) *Funcional* (alteración funcional como por ejemplo deglución atípica, interposición lingual, mordisqueamiento, etc.) y d) *Combinada* (combinación de un factor dentario/protético más el factor funcional). Por último, de acuerdo con los datos recogidos durante el interrogatorio inicial, en los casos donde fue posible, se registró la historia de IMCO en meses.

- **Estadificación TNM (Tumor, Nódulo ganglionar, Metástasis)** De estas tres variables solamente se registró la variable T (tamaño de tumor), midiendo en la clínica con calibre de precisión a la lesión neoplásica en todas las dimensiones del espacio, valiéndose de maniobras de palpación. La clasificación TNM es solo para el grupo de CCEB. Se siguieron los criterios de la American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, 2017 [420], cuyas categorías son: TIS: Carcinoma in situ, T1: tumor clínico menor a 2 cm, T2: tumor entre 2 y 4 cm, T3: tumor mayor a 4 cm, T4a: enfermedad local moderadamente avanzada: tumor invadiendo estructuras adyacentes, hueso cortical maxilar o mandibular, seno maxilar o piel de la cara, T4b: Enfermedad local muy avanzada: tumor invadiendo espacio masticador, región pterigoidea o base de cráneo y/o arteria carótida interna.

Inmunomarcación con Citoqueratinas y Ki67- n=53

La inmunomarcación se realizó en secciones de 5- μ m a partir de bloques de parafina obtenidos de las biopsias de diagnóstico de los pacientes. Se utilizó la técnica peroxidasa-antiperoxidasa y avidina-biotina. Las secciones fueron desparafinadas con xilol, deshidratadas con grados crecientes de alcohol y lavadas con agua destilada. Las muestras fueron lavadas con Tris-buffer salino y calor durante 15 minutos a 100°C en buffer citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) para recuperación de antígenos. Las tinciones inespecíficas se bloquearon con suero bovino fetal al 5% en PBS durante 40 min. Después de los lavados con PBS, los preparados se incubaron durante 9-12 h a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo monoclonal específico (1:100). Luego se lavó 3 veces en PBS y se incubó con inmunoglobulina anti-ratón (1:50) biotinilada. Para la inmunoperoxidasa se lavó nuevamente y se le adicionó el complejo avidina-biotina-peroxidasa y la marcación se reveló con tetrahidroclorato de diaminobenzidina. El control negativo se realizó por reemplazo del anticuerpo primario con buffer fosfato salino. Finalmente, las preparaciones fueron contracoloradas con hematoxilina de Mayer, deshidratadas y montadas con Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania).

Se utilizaron los anticuerpos:

- **Ki67:** anticuerpo concentrado monoclonal de conejo antihumano Ki-67 (SP6), marca CellMarque, código 275R-16, dilución 1/200, incubación 60 min. Se realizó previo pretratamiento en microondas con citrato pH6. Se utilizó como sistema de detección

CystoScan HRP detection system, de Cell Marque, código 951D-30, incubando 15 minutos con HRP streptavidin label y 15 min con polyvalent bitinylated link, según instrucciones del fabricante. Se reveló con DAB substrate kit, incubando 5 min y siguiendo instrucciones del fabricante. Se contracoloró con hematoxilina.

- **Ck5/6:** anticuerpo concentrado monoclonal de ratón antihumano Cytokeratin 5&6 (D5&16BA), marca CellMarque, código 356M-16, dilución 1/50, incubación 60 min. Se realizó previo pretratamiento en microondas con citrato pH6. Se utilizó como sistema de detección CystoScan HRP detection system, de Cell Marque, código 951D-30, incubando 15 minutos con HRP streptavidin label y 15 min con polyvalent bitinylated link, según instrucciones del fabricante. Se reveló con DAB substrate kit, incubando 5 min y siguiendo instrucciones del fabricante. Se contracoloró con hematoxilina.
- **Ck19:** anticuerpo concentrado monoclonal de ratón Cytokeratin 19 (A53-B/A2.26), marca Cell Marque código 319M-16, dilución 1/100, incubación 60 min. Se realizó previo pretratamiento en microondas con citrato pH6. Se utilizó como sistema de detección CystoScan HRP detection system, de Cell Marque, código 951D-30, incubando 15 minutos con HRP streptavidin label y 15 min con polyvalent bitinylated link, según instrucciones del fabricante. Se reveló con DAB substrate kit, incubando 5 min y siguiendo instrucciones del fabricante. Se contracoloró con hematoxilina.

Estos tres anticuerpos se procesaron en equipo marca DAKO Autostainer (Estados Unidos de América).

Los resultados de Ck19 y Ck5/6 se consideraron como “positivos” cuando se observó una tonalidad marrón en el citoplasma celular, mientras que el mismo criterio fue utilizado para Ki67 cuando la tinción se mostró solo en el núcleo. El análisis de las muestras fue realizado por un solo examinador a simple ciego y la inmunomarcación fue categorizada según criterios previamente publicados por otros autores, acordando con Vasca y cols [421] en:

Puntajes:

Score 0 = Negativo, 0% células positivas

Score 1= Bajo, <10% de células positivas

Score 2=Medio, 10-29% de células positivas

Score 3= Alto, ≥ 30% de células positivas

De cada especimen con inmunomarcación, se fijaron tres campos para luego promediar los scores y patrones obtenidos.

Virus Papiloma Humano

El diagnóstico de VPH se realizó dependiendo del grupo de estudio. En el grupo UTC, se realizó PCR para VPH sólo en aquellos casos donde el paciente durante la anamnesis relató tener hábitos sexuales de riesgo orales, tener o haber tenido infección por VPH bucal o extrabucal o lesiones con sospecha clínica de VPH y en pacientes menores de 45 años. En el grupo de DPM, se realizó técnica de PCR para VPH e inmunohistoquímica con p16 en todas las lesiones para poder comparar los resultados obtenidos. En el grupo de CCEB, se realizó solamente técnica de PCR en todos los casos.

Los métodos empleados para la detección viral fueron PCR a partir de células obtenidas por frotis de las lesiones y la utilización de inmunohistoquímica con proteína p16 a partir de biopsias de las lesiones.

- **PCR:** se aisló el ADN viral de muestras de lesiones que se obtuvieron por cepillado con cepillos estériles endocervicales (Cytobrush K-Kaution Yangzhou Jiangsu, China y Medibrush Plus, Medical Engineering Corporation S.A., Bs As, Argentina) los cuales fueron colocados en tubos Eppendorf estériles que contenían el medio de transporte. La detección del genoma viral realizó por medio de PCR utilizando primers MY09/11 y Gp5+/6+. Como control se amplificó una región del gen de la Beta globina humana. El protocolo de amplificación fue de 3 min a 94°C, 1 min a 94°C, 1 min, 55° C y 1 min a 72°C por 35 ciclos y finalmente 72°C por 5 min. La tipificación se llevó a PCR-RFLP y electroforesis en geles de agarosa al 2%. Para la digestión se utilizaron las siguientes enzimas: Rsa I- Dde I- Hinf I- Hae III- Pst I - Bam H1 - Sau 3AI[422]. Los casos que resultaron positivos fueron posteriormente genotipificados.
- **Inmunohistoquímica con p16:** se utilizó anticuerpo monoclonal de ratón CINtec p16 Histology, marca Ventana, código 705-4713 y kit de detección ultraView Universal DAB detection kit, de Ventana, código 760-500, contratinción con Hematoxilina y bluing Ventana, y se procesó en equipo Benchmark GX siguiendo los protocolos del equipo e instrucciones del fabricante de los reactivos. Fue considerado como positivo

cuando se encontraron hallazgos compatibles con los criterios publicados por Woo y cols, 2013: una inmunoexpresión en el epitelio con un patrón en bloque, continuo, desde la región basal a la región superficial del tejido epitelial[148].

Análisis Estadísticos

La descripción estadística de los datos se realizó mediante sus frecuencias absolutas y relativas en porcentaje para variables cualitativas; y sus medidas de centralización (media/mediana) y de dispersión (error standard/rango) para variables cuantitativas. La expresión de las Cks y Ki-67, valorada como puntajes, fue comparada entre los diferentes grupos de pacientes mediante la prueba de Kruskal Wallis (ANOVA no paramétrico). La correlación entre los puntajes de los marcadores se realizó mediante prueba de Spearman.

Los datos fueron analizados con el programa Infostat versión profesional 2015 o el programa libre R (www.r-project.org).

Protocolo de tratamiento y diagnóstico

El diagnóstico de certeza de los diferentes grupos se realizó mediante biopsias incisionales de las lesiones, según la siguiente secuencia: en el grupo de UTC y DPM, en la primera sesión clínica se procedió a realizar la confección de HC y eliminación de agentes traumatizantes locales. En el caso de DPM, se controlaron las fuentes de IMCO en el caso que las hubiere y también se administró, según cada caso en particular, un antimicótico local durante 15 días para eliminar la sobreinfección o colonización candidásica. Los criterios utilizados para la administración del antimicótico en el grupo de DPM fue el hallazgo de signos clínicos de infección por Cándida como por ejemplo regiones atróficas o eritematosas en cualquier sitio de la mucosa bucal de los enfermos.

En el grupo de UTC, al eliminar la IMCO, un grupo de pacientes presentaron resolución clínica de las lesiones y franca cicatrización. En esos casos, no se realizó biopsia y el diagnóstico de certeza fue realizado solamente con la clínica y la respuesta positiva al tratamiento. En los casos donde se observó una resolución parcial de las UTC, o la no respuesta clínica al control de los factores traumatizantes, se realizaron las biopsias incisionales de diagnóstico, 15 días después de la primera sesión, con el objetivo de llegar

a un diagnóstico histopatológico y descartar el diagnóstico de CCEB ulcerado. En los casos de lesiones extensas, se utilizó Azul de Toluidina (ATO)[315] para seleccionar con mayor objetividad clínica las zonas representativas para la toma biopsica (las tinciones vitales, ATO y lugol, fueron utilizadas mayoritariamente en el grupo de DPM, como apoyo adicional al diagnóstico clínico).

El grupo de UTC se conformó inicialmente por 41 pacientes, los cuales fueron tratados eliminando todos los agentes irritativos locales. Las úlceras fueron nuevamente controladas a los 14 – 21 días para registrar la evolución de las lesiones. Se conformó el siguiente protocolo de seguimiento. Figura 13

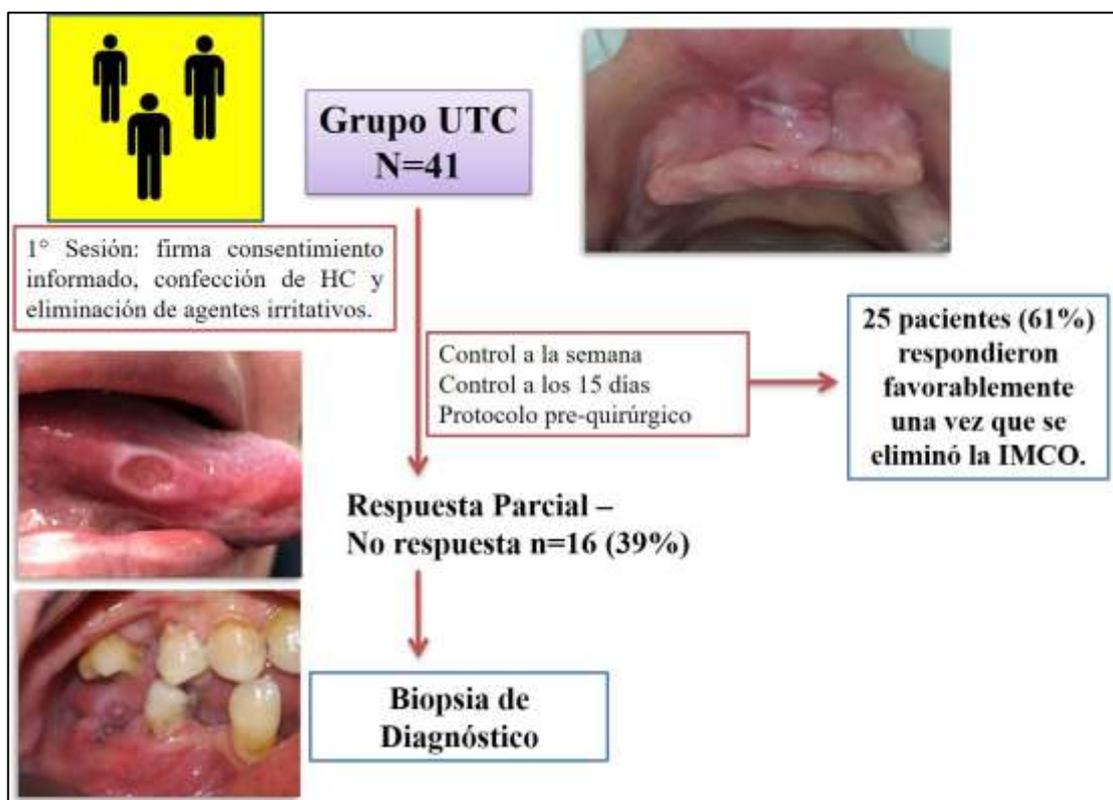


Figura 13- Flujograma explicativo de protocolo de seguimiento y diagnóstico de pacientes con UTC.

Aspectos Éticos

Este estudio se desarrolló en el marco del proyecto “Métodos estadísticos de predicción para enfermedades complejas con manifestación oral” que está aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Adulto- Hospital Córdoba- *Protocolo N° 1378* (CIEIS de la Provincia de Córdoba. <http://www.cba.gov.ar/wp-content/4p96humuzp/2012/07/INFORME-INVESTIGACIONES-2014-WEB.pdf>) y por

el Comité Académico de Investigación (CAI) y Comité Institucional de Ética en Investigación en Ciencias de la Salud (CIEIS) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba – *Protocolo N° 11-T* con fecha 11 de mayo de 2016. Los pacientes expresaron su consentimiento para que los datos obtenidos puedan ser utilizados con fines de investigación, manteniendo la confidencialidad de los registros mediante codificación. Se requirió la firma de consentimiento informado previo informe del trabajo y los beneficios y complicaciones posibles de las mismas maniobras de diagnóstico. En todo el estudio se respetaron las normas de ética para las investigaciones en humanos delineadas por la Declaración de Nüremberg, Helsinki, Tokio de la Asociación Médica Mundial.

RESULTADOS

Características sociodemográficas

En el presente estudio fueron incluidos un total de 114 pacientes (53 varones y 61 mujeres). Se observó un porcentaje significativo de individuos del género masculino en el grupo de CCEB (60.5%) en relación con DPM (34.3%) ($p=0.025$), presentando casi tres veces más de posibilidad de presentar CCEB un individuo de género masculino (Odd ratio (OR)=2.94; IC95% [1.15, 7.52] comparado con uno de género femenino. Figura 14

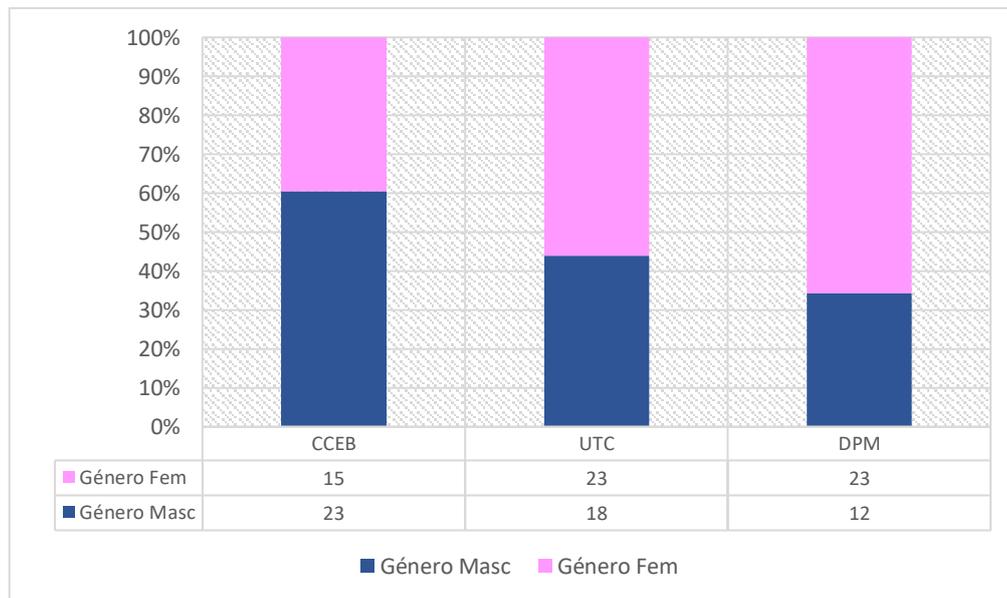


Figura 14: Distribución del género en cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos)- $p=0.025$

La edad promedio fue de 63 años variando desde 21 (valor mínimo) a 93 (valor máximo) años. Según cada grupo de estudio, los valores medios fueron 66 (CCEB), 63 (UTC) y 56 DPM, no observándose una diferencia significativa entre los grupos ($p=0,321$). Cuando se categorizó en menor o mayor a 45 años, tampoco se observó asociación significativa entre las categorías de edad y el grupo de estudio ($p=0,139$) (Figura 15).

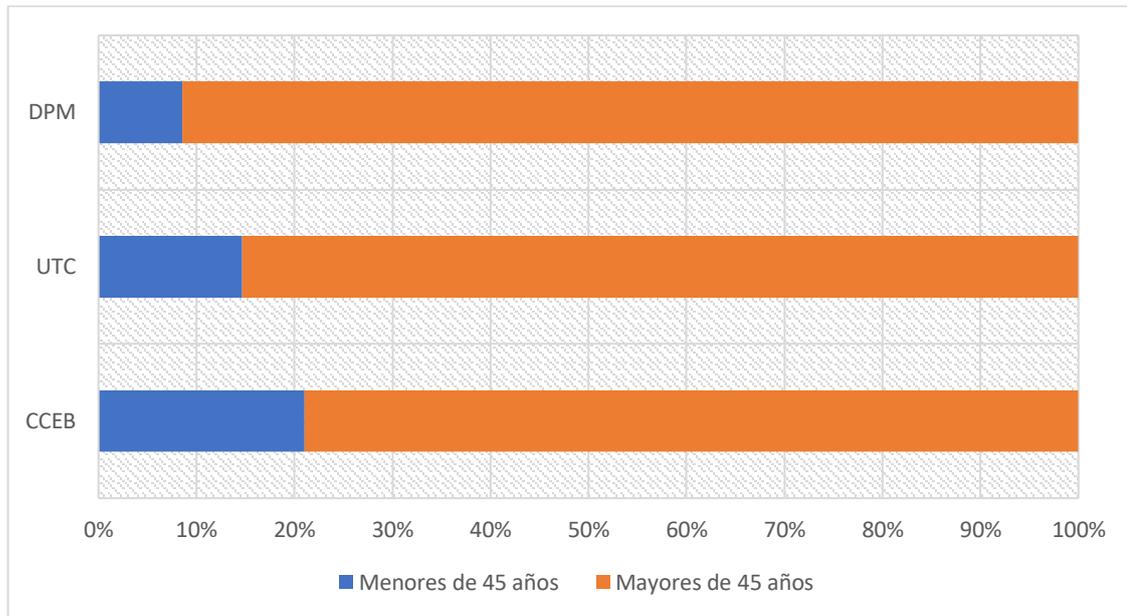


Figura 15: Distribución de pacientes según edad mayor o menor a 45 años en cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos) $p=0,139$

Los diagnósticos obtenidos según cada grupo se muestran en la Figura 16. El grupo de CCEB, mostró un 85% del subtipo carcinomas de células escamosas clásico y un 15% de carcinomas verrugosos, mientras que el grupo de DPM se conformó por un 62% de leucoplasias, un 35% de LVP y un 2% de lesiones eritro-leucoplasias.

En cuanto a la localización anatómica de las lesiones observadas en cada grupo de estudio, el lugar más frecuente fue el borde de la lengua como se muestra en la figura 17. Por otra parte, se compararon las frecuencias de lesiones en borde lengua en relación a los otros sitios anatómicos, y se observó que las lesiones de CCEB se presentan con tres veces más posibilidad en la lengua que las lesiones de UTC ($p=0,0284$; $OR=2,77$ IC95% [1,12; 6,86]). Las lesiones de CCEB tienen, además tres veces y media más posibilidad de observarse en el borde de lengua que DPM ($p=0,0074$; $OR=3.67$ IC95% [1,41; 9,51]). Figuras 18, 19 y 20

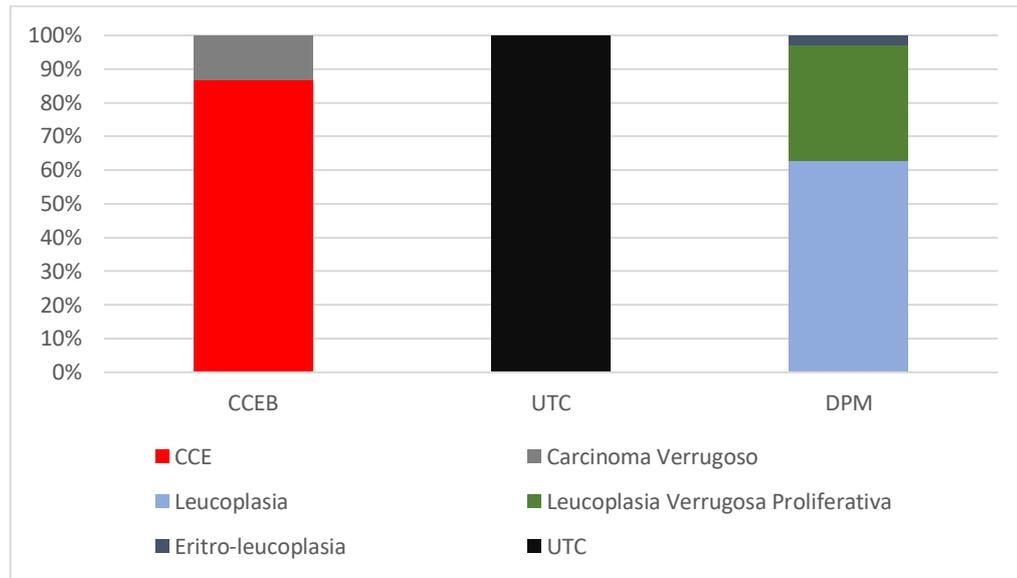


Figura 16 Frecuencia de diagnósticos clínicos-histopatológicos en cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos).

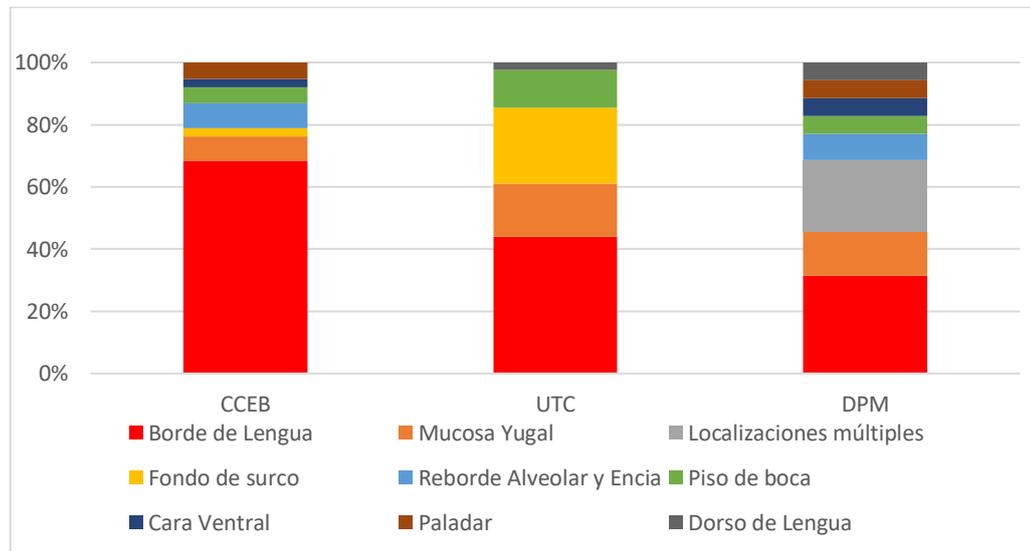


Figura 17: Localizaciones de las lesiones según los diferente subsitios de la mucosa bucal y su distribución en cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos)

Del grupo de CCEB (n=38), en cuanto a la estadificación clínica de TNM, se observaron las siguientes frecuencias según su estadio: T1: 9/38 (23,68%), T2:13/38 (24,20%), T3 y T4 8/38 cada grupo (21,05%).



Figura 18 A) UTC ubicada en borde de lengua izquierdo. Paciente 75 años, sin otros factores de riesgo relevantes, con la presencia de IMCO asociada a interposición lingual y deglución disfuncional sobre elementos dentarios 33, 34 y 35 con superficies ásperas y traumatizantes. Lesión de tres meses de evolución, sin tendencia a la curación. B) UTC de mucosa yugal, tercio anterior. El paciente relató antecedentes de exodoncia de elemento 15, catorce días antes de la consulta inicial. El elemento dentario extraído retenía una prótesis parcial removible superior, no habiéndose removido el gancho generando la lesión traumática sobre la mucosa yugal. C) Lesión ulcerada en fondo de surco inferior asociada a un flanco vestibular sobreextendido y una prótesis completa inferior desadaptada. D) Restos radiculares de elementos póstero-inferiores que generaban IMCO dentaria sobre mucosa yugal y una lesión ulcerada con una zona leucoedematosa, dolorosa a las maniobras de inspección.



Figura 19 Lesión úlcerovegetante de borde izquierdo de lengua, indurada a la palpación, con un área necrótica central y zonas periféricas con una marcada red angiogénica. Paciente de género masculino, 76 años, fumador y bebedor crónico, con deficiente salud buco-dental y factores traumatizantes asociados a restos radiculares del lado de la lesión. VPH-PCR negativo. El diagnóstico fue de Carcinoma de Células Escamosas. Estadificación T3N1M0.



Figura 20 Arriba: Paciente Femenina, fumadora, no bebedora, de 48 años. Sin otros antecedentes de relevancia, presentaba esta lesión de aspecto leucoplasiforme que ocupaba tercio posterior de mucosa yugal del lado izquierdo. La lesión llegaba a involucrar fondo de surco, reborde alveolar en zona de elemento dentario 38 y se extendía hasta parte de paladar blando y pilar anterior. La lesión fue PCR-VPH negativa. Diagnóstico vinculable a Leucoplasia Verrugosa Proliferativa ó Multifocal. Abajo: Paciente Femenina, sin ningún factor de riesgo o hábito tóxico. Residente de zona arsenical del interior de Córdoba. La paciente tomó por más de 10 años agua de pozo. Sin otros antecedentes de relevancia, presentaba esta lesión de aspecto leucoplasiforme amplia en superficie que llegaba a extenderse desde la región de reborde residual de elemento 47 llegando a involucrar piso de boca y mucosa yugal. La lesión fue PCR-VPH negativa. El caso reúne los criterios diagnósticos para Leucoplasia Verrugosa Proliferativa ó Multifocal. Histopatológicamente, mostró áreas de hiperqueratosis, acantosis, papilomatosis con displasia moderada.

Factores de Riesgo

A continuación, se muestran los resultados para cada factor de riesgo estudiado:

Consumo de Agua contaminada con Arsénico por más de 10 años:

Si bien no hubo una asociación significativa ($p > 0,05$) entre los grupos de estudio, los pacientes con CCEB mostraron una tendencia a presentar mayor porcentaje de consumo de agua contaminada con As (31,6%). Figura 21

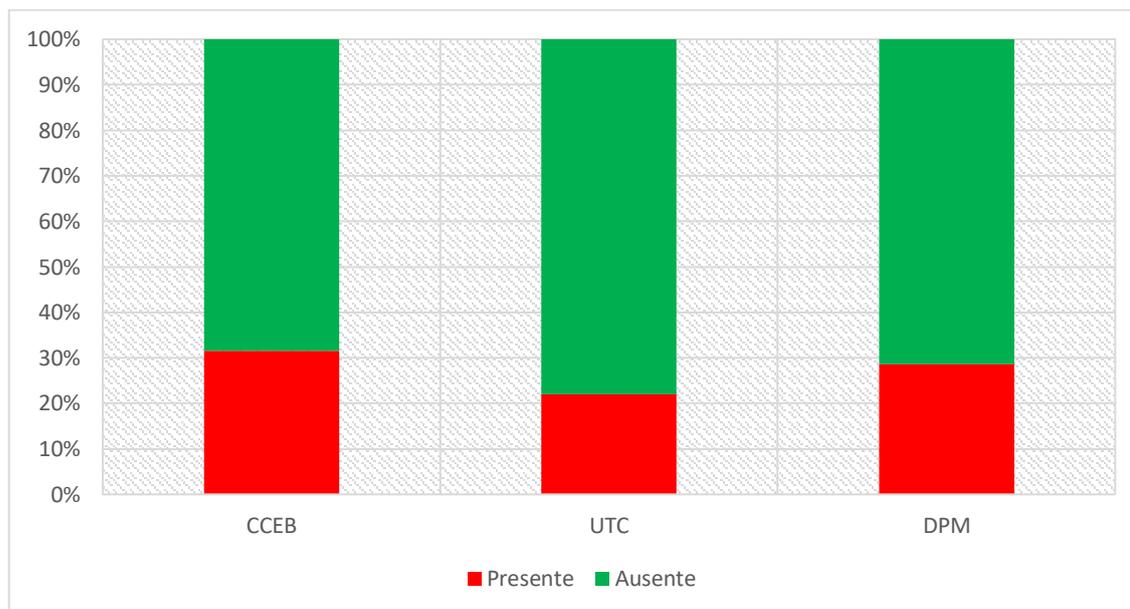


Figura 21: Distribución de los pacientes que consumieron agua de zonas arsenicales por más de 10 años. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos) $p > 0,05$

Herencia mórbida de cáncer

Con relación a la variable Herencia Mórbida de Cáncer, el registro de cada grupo de estudio fue homogéneo, encontrando un 23% de los pacientes del grupo de CCEB con antecedentes de familiares con diagnóstico de cáncer de tracto aero-digestivo superior. Sin embargo, el grupo de DPM mostró un 31% de pacientes que declararon tener herencia mórbida de cáncer y solo un 12% de los pacientes con UTC tuvieron esta condición.

Consumo de tabaco

No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,174$) en la distribución de los grupos según la variable tabaco. Sin embargo, el grupo de CCEB fue el que obtuvo mayor porcentaje de pacientes no fumadores (55,26%). En el grupo de DPM, la mayoría

de los pacientes eran fumadores, observándose que un 45,71% de estos pacientes fumaron más de 100.000 cigarrillos (Figura 22).

Cuando se consideró el número de cigarrillos fumados, el grupo de CCEB fue el que presentó mayor promedio: 308.000 cigarrillos fumados (rango 328 a 992.800 cigarrillos fumados), en relación con pacientes con DPM (176.000 cigarrillos fumados) y pacientes con UTC (130.000 cigarrillos fumados).

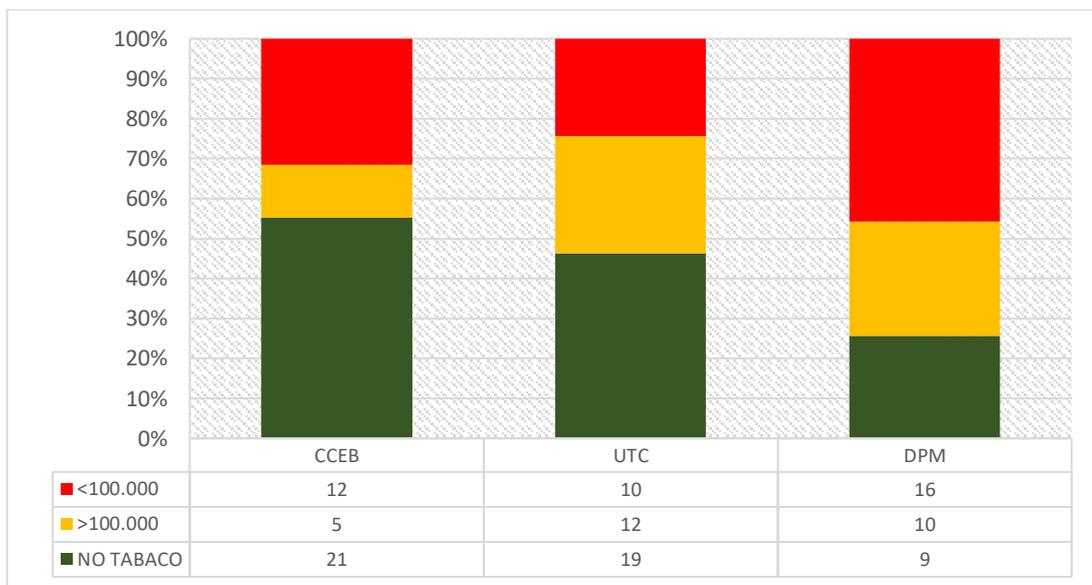


Figura 22: Distribución de Pacientes No fumadores, Fumadores menores y mayores de 100.000 cigarrillos, según cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos). P=0,174

Marihuana

Con relación al consumo de marihuana, del total de los pacientes estudiados, 7/114 consumieron en forma habitual marihuana. De esos 7 pacientes, 4 correspondieron al grupo de CCEB (10%), 2 al grupo de UTC (4%) y 1 al grupo de DPM (2%). No hubo diferencias estadísticamente significativas.

Consumo de alcohol

Los pacientes con mayor consumo crónico-habitual de bebidas alcohólicas correspondieron al grupo de CCEB (28,94%). Sin embargo, no se observó una asociación significativa entre los tipos de consumo de alcohol y los grupos de estudio (p=0,503).
Figura 23

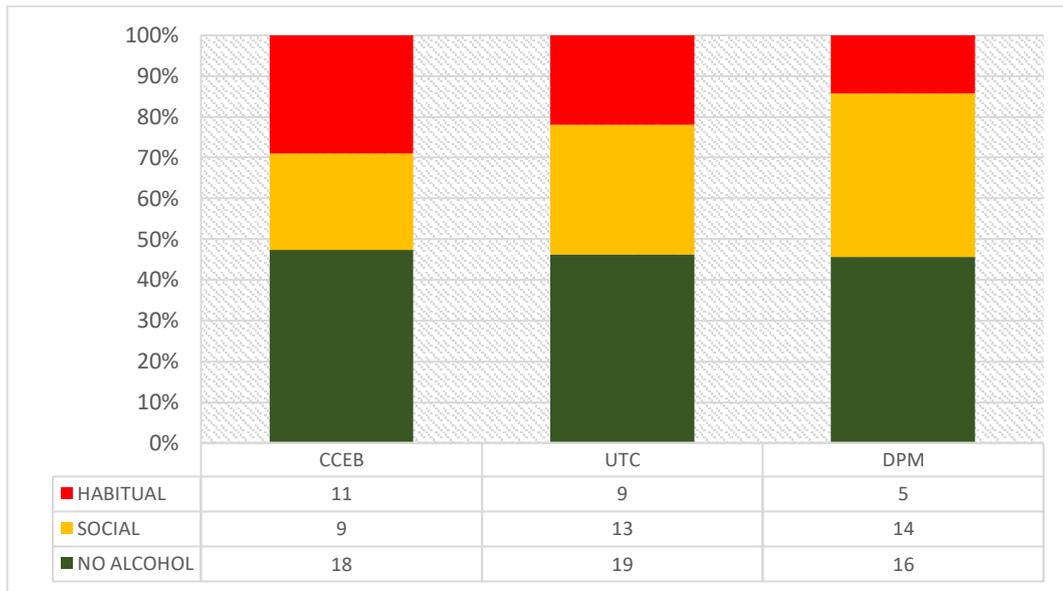


Figura 23: Distribución de pacientes que no consumieron nunca alcohol o que consumieron en forma social y habitual o crónica según cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos) $p=0,503$

Consumo de Mate

Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,657$), los pacientes con diagnóstico de CCEB fueron los que mostraron mayor porcentaje de consumo de mate con agua muy caliente (36,85%) y en menor proporción el grupo de UTC (19,50%) y DPM (20%). El mayor porcentaje de pacientes no consumidores de mate (39,02%), perteneció al grupo de UTC. Figura 24

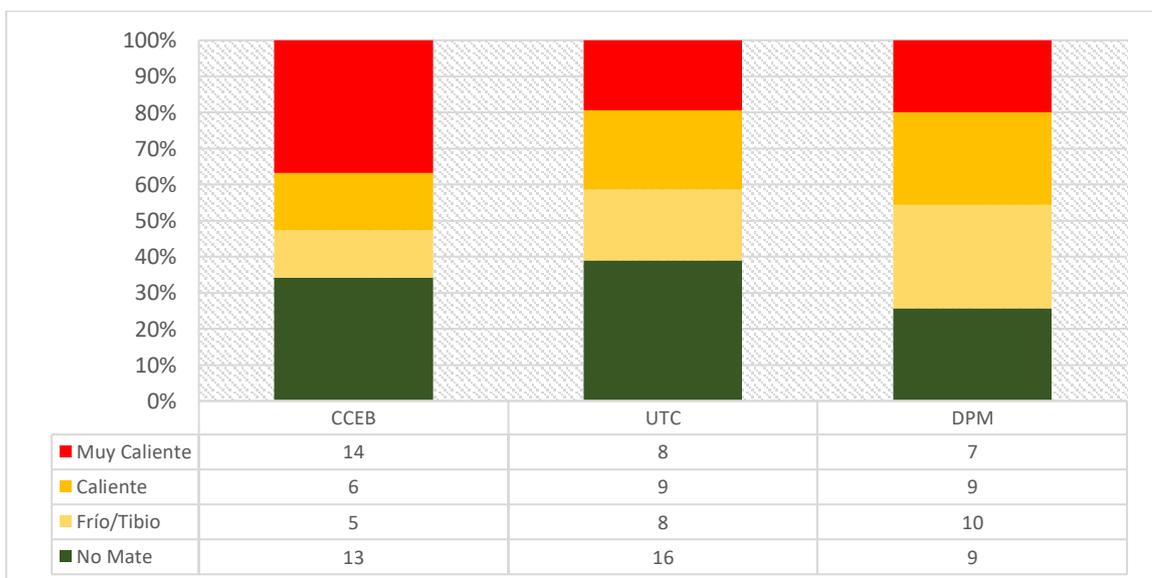


Figura 24. Distribución de pacientes que nunca consumieron mate o que consumieron la infusión categorizados según temperatura: frío-tibio, caliente, muy caliente en cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos) $p=0,657$

IMCO

En relación con IMCO, se observó un alto porcentaje de IMCO en los pacientes con CCEB (80%) y con DPM (70%). los pacientes con UTC mostraron en un 12,19% lesiones asociadas a factor traumático dentario, 41,46% a factor protético y un 46,34% de los casos asociados a un factor combinado (un factor dentario o protético más un hábito parafuncional). La IMCO dentaria asociada a una para función y la IMCO protética fueron los tipo de IMCO más frecuentes en las UTC. En el grupo de CCEB, el trauma combinado fue el más prevalente (60%) seguido por el protético (13,15%) y el dentario (5,26%). Con igual tendencia que en el grupo de CCEB, los DPM mostraron que la fuente de IMCO más frecuente fue la combinada en un 40% de los pacientes, seguido por el protético (20%) y el dentario (8,57%). Al considerar IMCO combinada, la mayor parte de los factores parafuncionales estuvieron asociados a un factor dentario, más que a uno protético. Las diferencias de frecuencias de subtipo de IMCO entre los grupos de estudio fueron estadísticamente significativas ($p=0,001$). Figura 25.

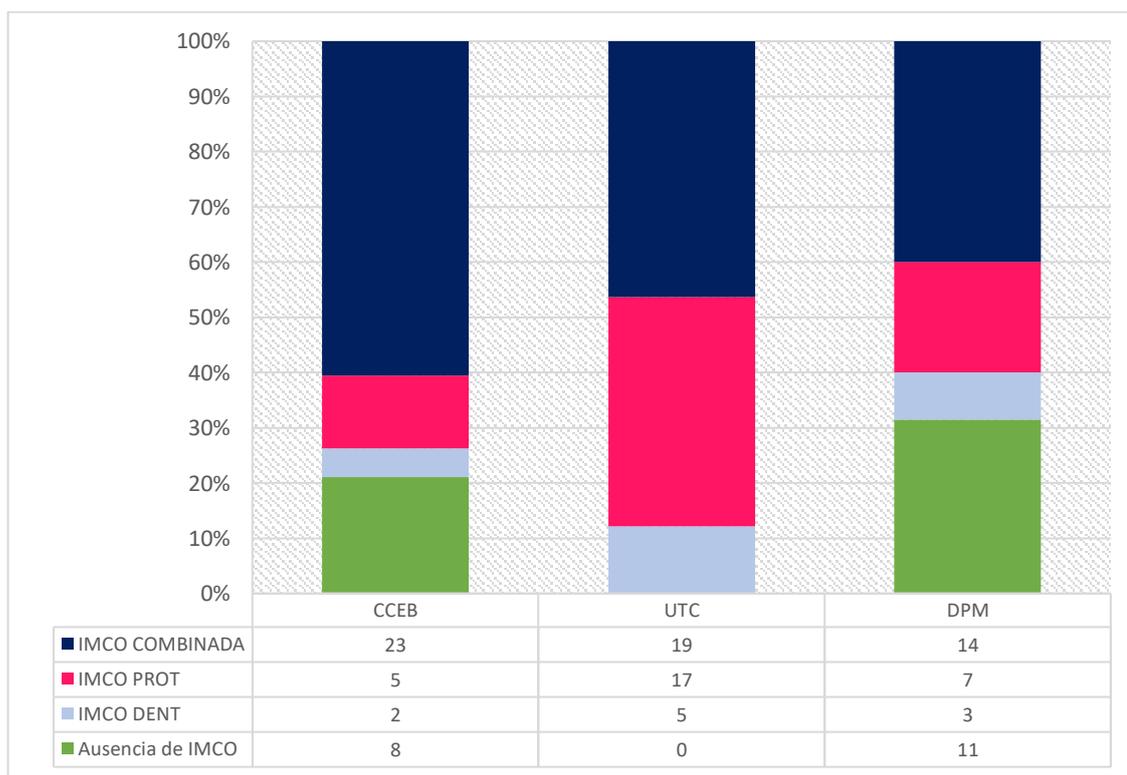


Figura 25. Presencia de IMCO y subtipo de IMCO según cada grupo de estudio. Cabe destacar que el grupo de UTC es una condición sin e-quanon la presencia de algún agente traumatizante por lo que la totalidad de los pacientes tuvieron dicha condición. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos), IMCO (Irritación Mecánica Crónica Oral) $p=0,001$

La Figura 26 muestra un caso donde se puede evidenciar una lesión clásica de UTC y la IMCO vinculada a un factor traumatizante dentario y a su para función asociada. La Figura 27 muestra hacia la izquierda, algunas lesiones con diagnóstico histopatológico de CCEB y a la derecha, el factor traumatizante asociado.



Figura 26. Paciente, género masculino 60 años. No se registraron factores de riesgo como consumo de tabaco y alcohol. A y C muestran la oclusión del paciente, con una mordida cruzada anterior, bordes dentarios filosos, superficies abrasionadas a causa del bruxismo. B Se observa lesión ulcerada firme a la palpación, con un fondo necrobiótico y un rodete leucoeдематoso. En D se muestra la posición baja de la lengua en reposo, asociada a una para función de interposición lingual, superponiéndose con el plano oclusal del sector ántero-inferior. Además, es evidenciable la presencia de indentaciones asociadas a las cúspides linguales. La úlcera fue diagnosticada mediante anatomía patológica como úlcera crónica.

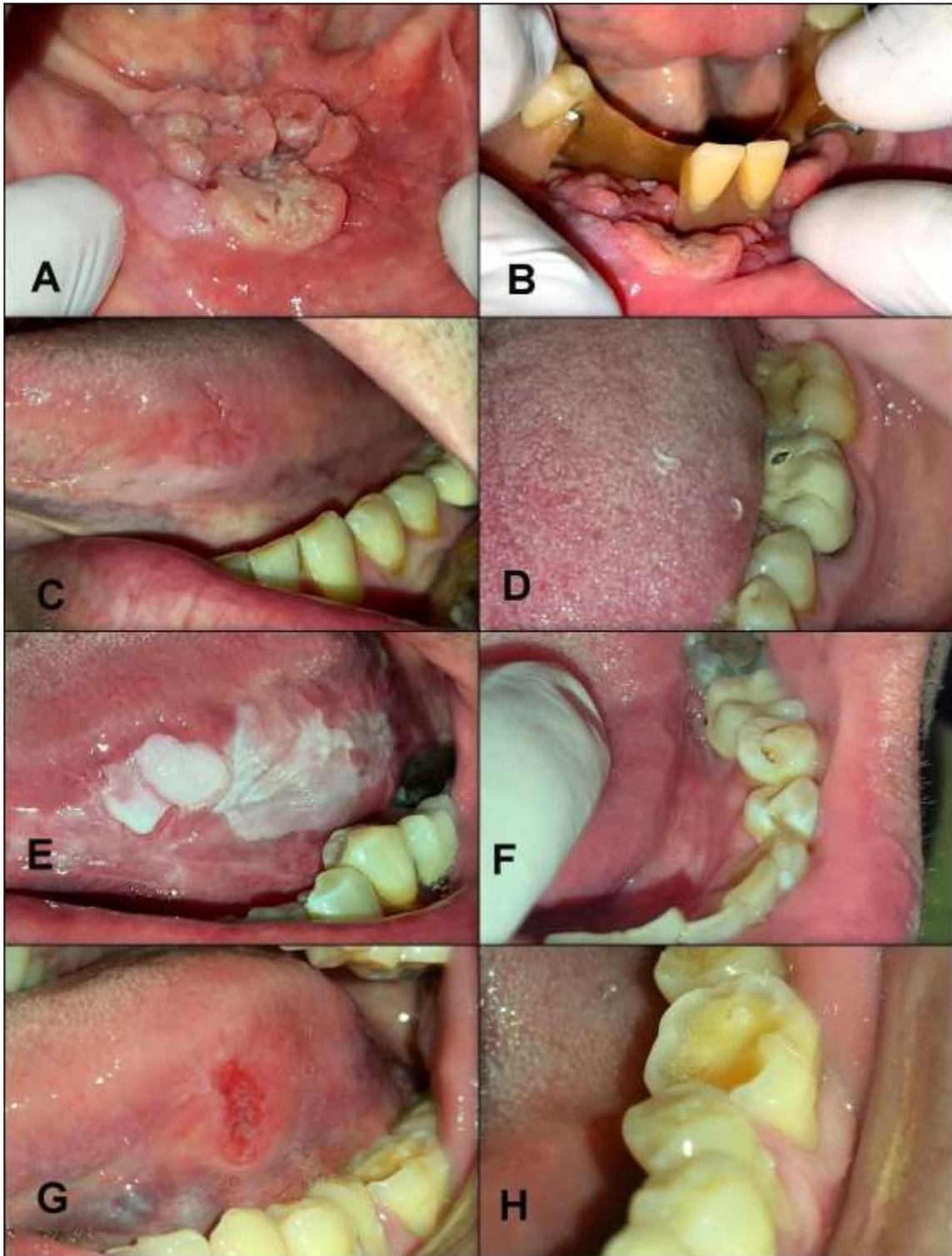


Figura 27. Relación CCEB (Imagen izquierda) asociados a IMCO (Imagen Derecha). Imagen A-B. Paciente 83 años con la presencia de lesión indurada úlcero vegetante que ocupa mucosa labial inferior, llegando a comprometer reborde desdentado. El paciente había sido sometido meses anteriores a la primera consulta a las exodoncias de los elementos ántero-inferiores y su aparato protético no había sido reparado. El paciente continuó utilizándolo, desarrollando en primera instancia según su relato una úlcera que luego aumentó su tamaño. Paciente proveniente de zona arsenical, con consumo moderado de alcohol y tabaco. IMCO de origen protético, por la presencia de prótesis desadaptada y flancos vestibulares sobreextendidos. Diagnóstico Carcinoma de Células Escamosas Diferenciado. T3N2M0. Imagen C-D. Paciente masculino, 40 años, derivado por Otorrinolaringólogo por úlcera de borde lingual asociada a placa queratótica. Tabaquista, enolista y consumidor de marihuana. VPH positivo. Durante la anamnesis se evidenció una deglución disfuncional, y además en decúbito a la lesión ulcerada, se observaron los premolares

lingualizados y una corona metalo-cerámica fracturada con una superficie metálica rugosa. Diagnóstico Carcinoma de Células Escamosas Semidiferenciado. T1N0M0. Imagen E-F Paciente masculino, 50 años, concurrió derivado por su Odontólogo particular por lesión blanca en borde izquierdo de lengua. Lesión tumoral de superficie verrugosa consistente a la palpación en el contexto de una lesión de mancha y placa blanca con tendencia a hacerse verrugosa por focos. Paciente sin hábitos de riesgo, VPH Negativo. Durante la inspección se evidenció interposición lingual durante los movimientos deglutorios y la presencia de elementos 34 y 35 extruidos y discretamente lingualizados con un quiebre del plano oclusal. Diagnóstico: Carcinoma Verrugoso sobre Leucoplasia Verrugosa Proliferativa. T1N0M0. Imagen G-H. Paciente masculino, 31 años, deportista, sin hábitos de riesgo. El paciente relató lesión de seis meses de evolución que previamente generaba un discreto dolor cuando friccionaba el borde lingual sobre molar inferior izquierdo abrasionado por bruxismo. Se observó una úlcera con zonas eritoplásicas indurada a la palpación en contacto directo con elemento traumatizante. Diagnóstico Carcinoma de Células Escamosas Semidiferenciado. T1N0M0.

Virus del Papiloma Humano

Los resultados de la detección del genoma de VPH se observan en la Figura 28. Del grupo de CCEB, encontramos carcinomas de células escamosas (clásico) con un 15% de asociados a VPH y CV con una positividad del 40%. Es decir, que en totalidad el grupo de CCEB, obtuvo un 18,42% de casos asociados a VPH entre los casos de Carcinomas Clásicos de Células Escamosas y los Verrugosos. Del grupo de DPM, las leucoplasias mostraron un 45% de positividad, mientras que las LVP mostraron un 41% de relación con VPH. Un solo paciente presentó diagnóstico de eritroleucoplasia o leucoplasia moteada, cuya PCR fue positiva.

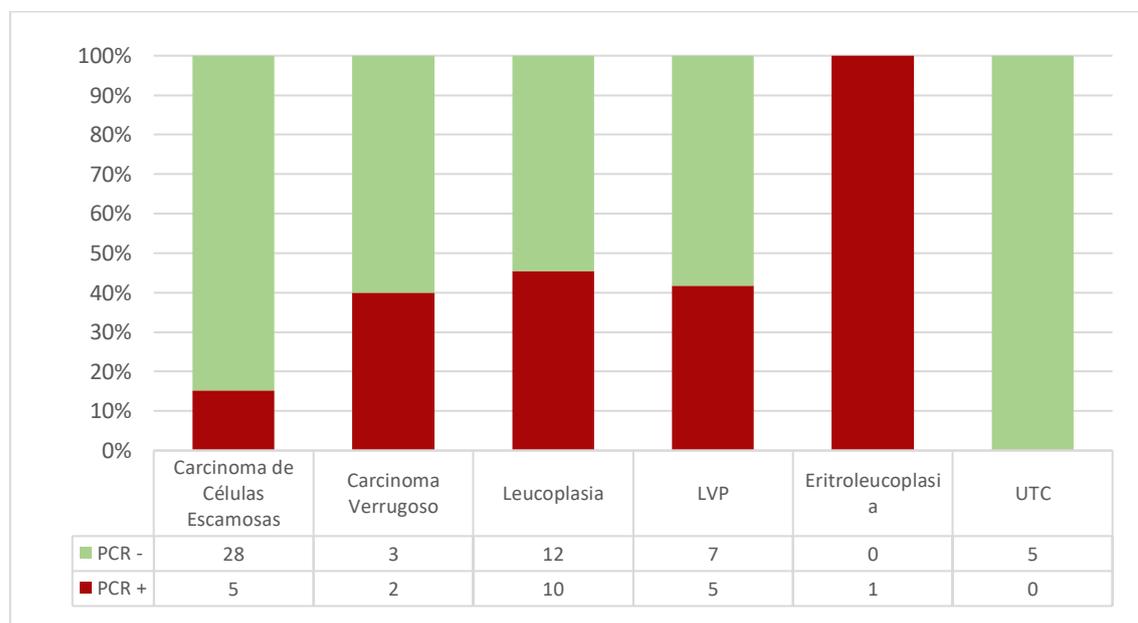


Figura 28. Se observan en las barras los diferentes diagnósticos incluidos en el trabajo: Carcinoma de Células Escamosas y Verrugoso, Leucoplasia, LVP y Eritroleucoplasia y UTC. En rojo oscuro, se observan los casos PCR positiva y en verde claro, los casos donde PCR resultó negativa. UTC (Úlcera Traumática Crónica), LVP (Leucoplasia Verrugosa Proliferativa), PCR (Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La Figura 29 muestra los genomas virales encontrados en DPM y CCEB, siendo el HPV16 el más frecuente en ambos grupos. Se pudo observar que en el grupo de DPM,

hubo mayor diversidad de genomas virales hallados. Sin embargo, en ambos grupos se encontraron VPH de alto y bajo grado.

Las mujeres con DPM mostraron mayor porcentaje de infección por VPH (10/16), mientras que los varones diagnosticados con CCEB fueron los que mostraron mayor porcentaje de VPH positivo (4/7).

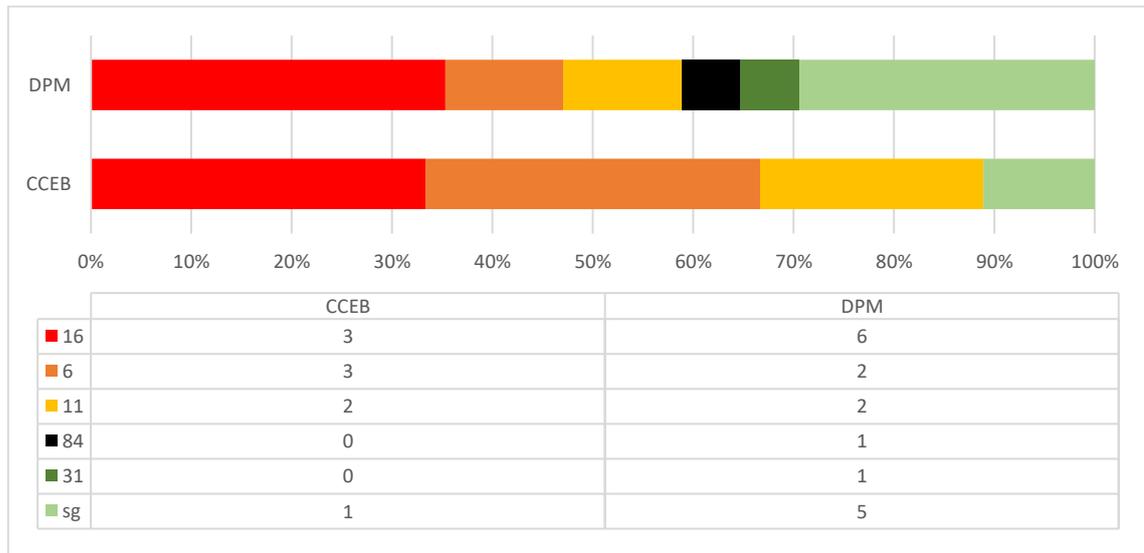


Figura 29 Distribución de genotipos virales según cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas Bucal) DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos).



Figura 30. Paciente Masculino, que se presentó a la consulta con lesiones multifocales. En la imagen puede observarse la lesión ubicada en el borde de la lengua a modo de placa queratótica con tendencia a hacerse verrugosa con límites bien delimitados en el sector posterior, pero difusos en el polo anterior. En el sector anterior, satélite a la lesión más importante se pudo evidenciar

una lesión que se disponía a modo de puntillado queratótico sobre una base discretamente eritematosa. El diagnóstico final fue de LVP con displasia moderada asociada a genotipo VPH 16. El paciente, presentaba, además una prótesis removible inferior, desadaptada cuyo basculamiento generaba IMCO sobre el borde de la lengua.



Figura 31 Paciente de género femenino, octogenaria, la cual se presentó a la consulta con lesión de tres meses de evolución. La lesión era una placa queratótica ubicada en borde y cara ventral de lengua, con límites bien definidos y una superficie áspera por zonas tendientes a hacerse exofítica, firme a la palpación. En las imágenes de abajo, se observa el procedimiento de recolección de células por medio de Cytobrush estéril y la colocación de material en medio de transporte para VPH y su posterior procesamiento. La paciente no era ni fumadora, ni bebedora. La PCR para VPH fue positiva, pero en este caso no pudo genotipificarse el subtipo viral.

Las localizaciones de las lesiones de CCEB-VPH+ y DPM-VPH+, mostraron diferencia en sus frecuencias, siendo en ambos grupos el borde de la lengua la localización más frecuente. Además, en el grupo de DPM-VPH+, las “localizaciones múltiples” de

lesiones, se encontraron en segundo lugar de frecuencia, después del borde de la lengua.

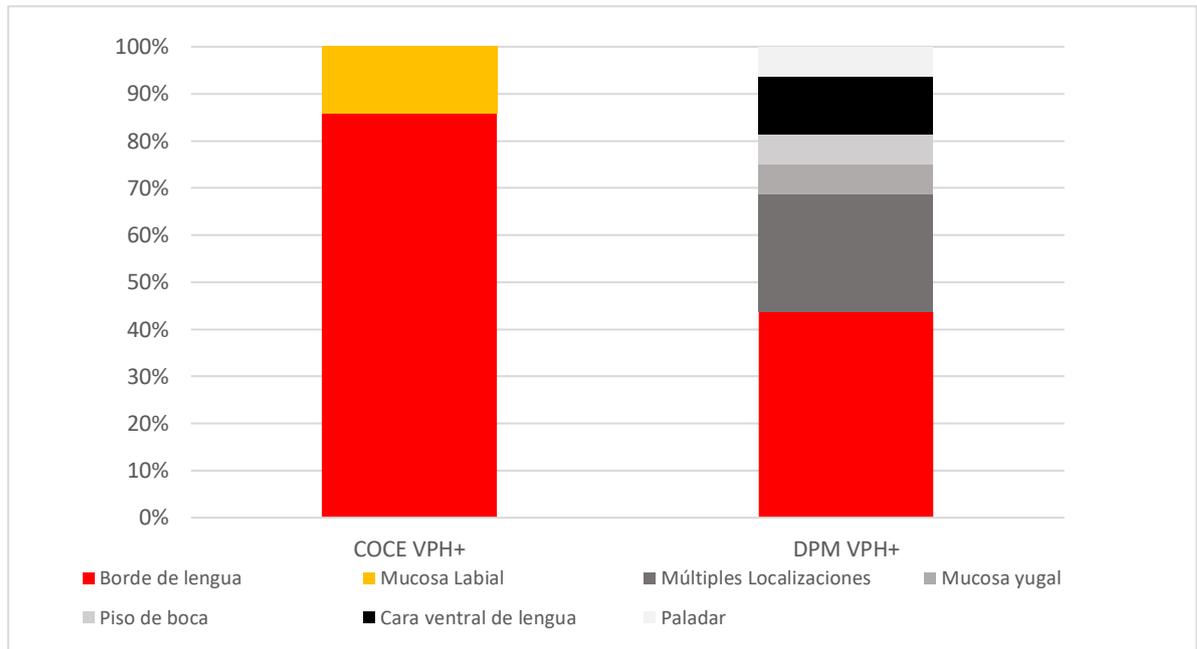


Figura 32: Localizaciones más frecuentes de las lesiones VPH+ entre los grupos de DPM y CCEB. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos), VPH (Virus Papiloma Humano), PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

También se realizó, sobre tacos parafinados de los especímenes biopsiados en el grupo de DPM, técnica de inmunohistoquímica con p16, subclasificando las lesiones en: PCR+/p16-, PCR-/p16-, PCR+/p16+ y PCR+/p16-. (Figura 33). De la combinación de estos cuatro subgrupos, se obtuvieron los siguientes resultados: se pudo analizar el binomio PCR/p16 de 32 pacientes (de los 35 del grupo DPM)¹. El 50% de estos casos fueron PCR-/p16-. Del 50% restante, casi un 30% de los pacientes (9/32) fueron PCR+/p16-, 13% (4/32) fueron PCR+/p16+ y el 9% restante (3/32) fueron PCR-/p16+. (Figura 34)

¹ De los 35 casos, se perdieron tres casos: dos por alteraciones en la técnica y un paciente que fue PCR positiva pero al momento de realizar la biopsia de diagnóstico, la lesión involucionó.

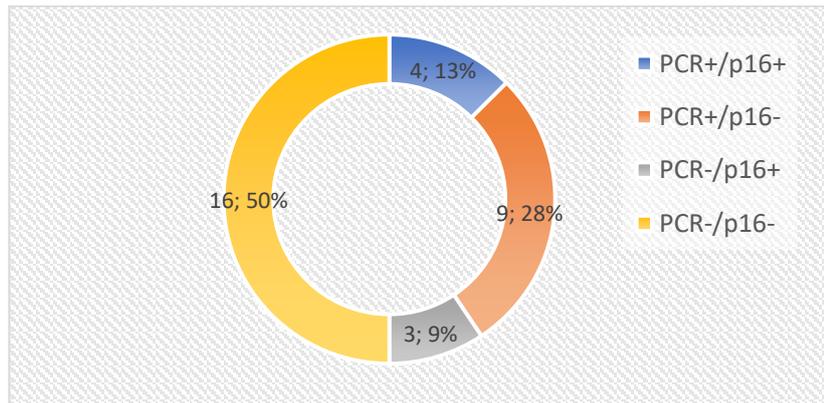


Figura 33 Subdivisión en cuatro grupos de DPM según técnica de detección de VPH: PCR+/p16+; PCR+/p16-; PCR-/p16+ y PCR-/p16- . DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos), PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), p16 (proteína p16).

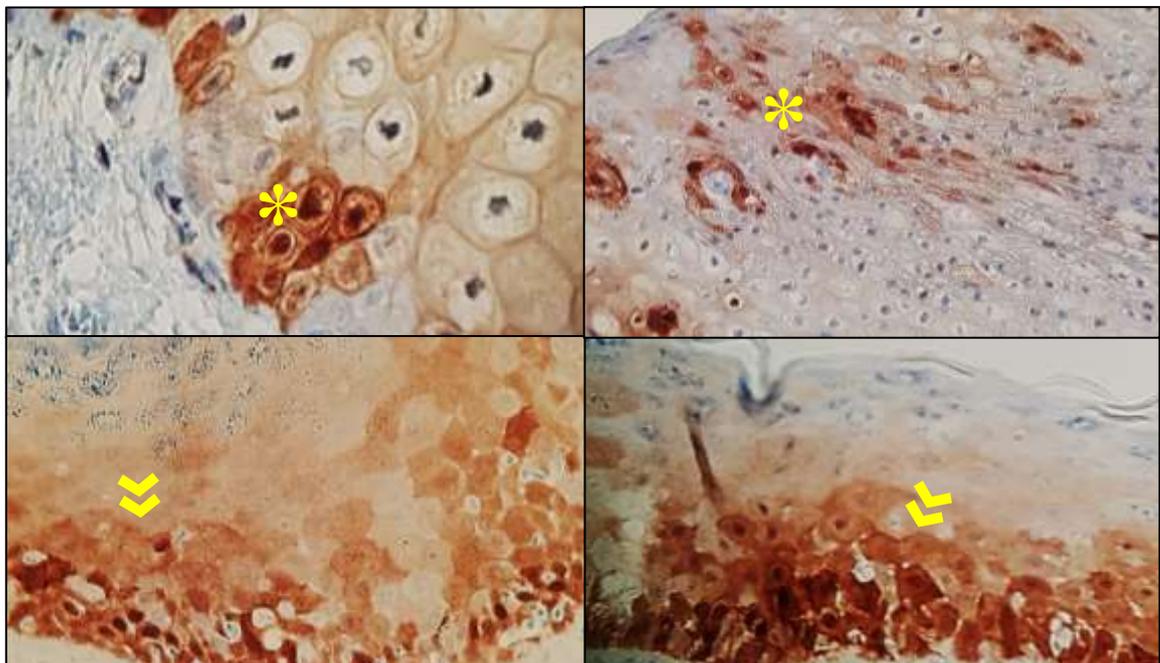


Figura 34 Arriba Izquierda: los indicadores amarillos, señalan queratinocitos agrupados en sector basal, p16 positivos (40X). Arriba(10X) Derecha: sectores epiteliales p16 positivos, pero sin continuidad. Abajo: (20X) Las flechas amarillas indican p16 positivas en bloque en estratos epiteliales basales y suprabasales. Ambos casos fueron leucoplasias asociadas a VPH por PCR.

En los casos de CCEB y DPM asociados a VPH, hubo una alta proporción de relación con algún factor traumatizante, independientemente a la lesión subyacente. En los casos de CCEB, el 100% de los tumores VPH positivos estuvieron asociados a IMCO, mientras que en el grupo de DPM, el 82% de las lesiones asociadas a VPH estuvieron asociadas a algún factor traumatizante (Figura 35). La figura 36 ilustra un caso de CCEB asociado a IMCO y VPH16.

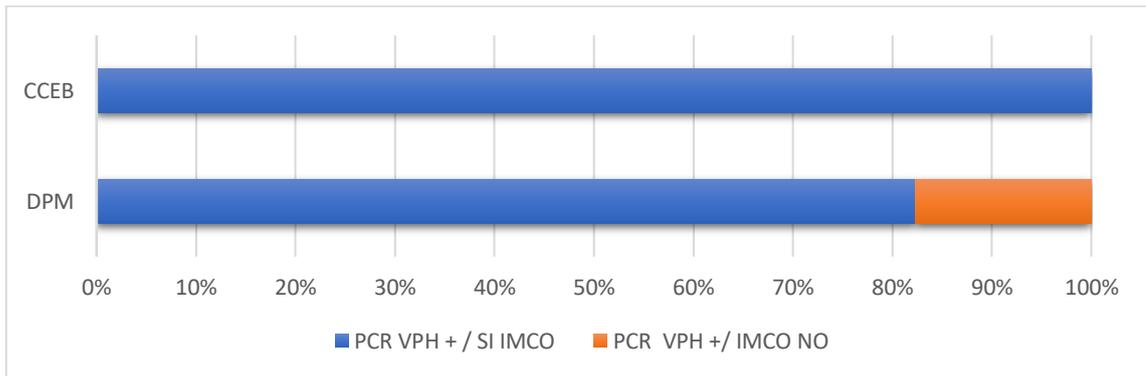


Figura 35. CCEB / DPM asociados a VPH según presencia o no de IMCO. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos), IMCO (Irritación Mecánica Crónica Oral), VPH (Virus Papiloma Humano), PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

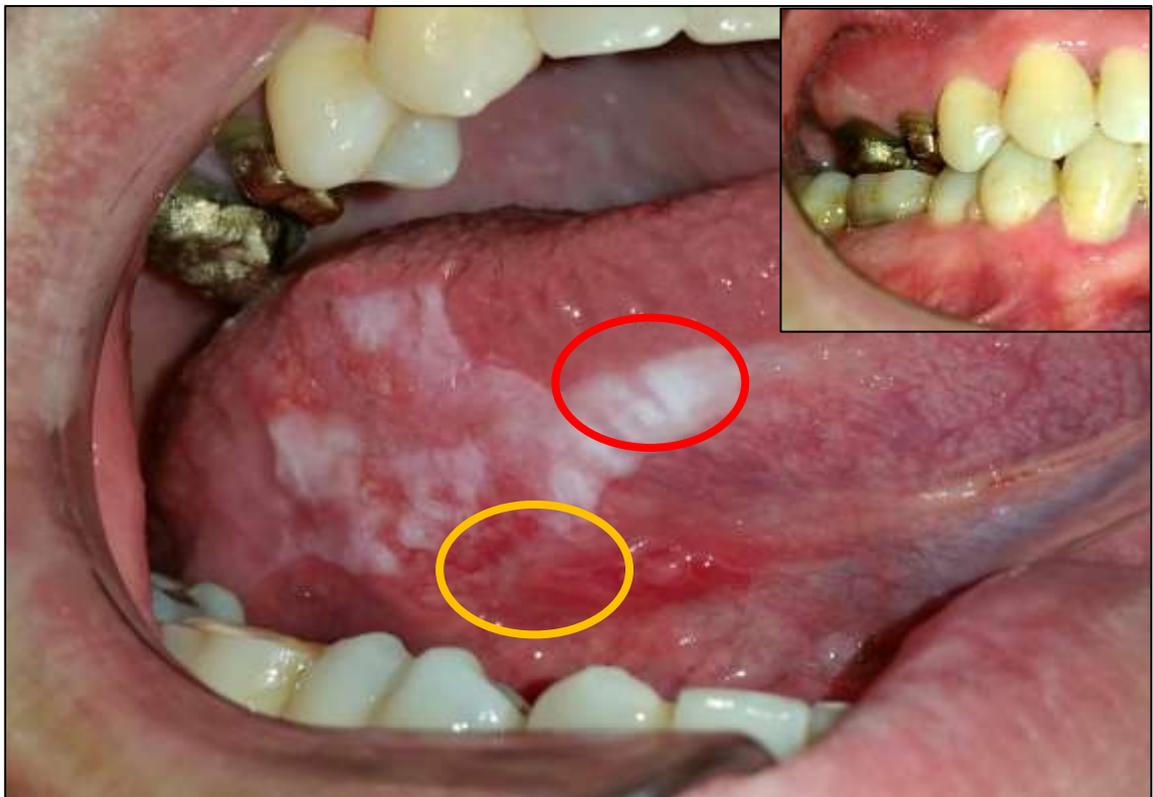


Figura 36. Paciente masculino, sin hábitos de consumo de tabaco o alcohol, consumidor de marihuana. El paciente relató haber comenzado una rehabilitación protética con pernos metálicos en elementos 15 y 16 pero nunca haber concluido la restauración con coronas cerámicas. Además, presentó elemento 46 con restauración deficiente. Se registró la presencia de IMCO combinada (Dentaria más deglución disfuncional) y el genotipo VPH16. Diagnóstico: Carcinoma de células escamosas en el contexto de leucoplasia asociada a VPH16. Se realizaron dos tomas biópsicas para arribar a estos diagnósticos. Círculo amarillo: zona de CCEB, círculo rojo: leucoplasia. T2N1M0

Biomarcadores

Citoqueratinas

Ck19

La marcación con Ck19 se observó asociada significativamente ($p=0,049$) al diagnóstico de los pacientes. El 78,9% de los pacientes con DPM y el 50% con UTC mostraron inmunomarcación negativa comparado con un 33% de los casos de CCEB (Figura 38). Considerando los puntajes o scores establecidos para establecer la inmunomarcación negativa/baja/medio/alta, solamente las muestras de pacientes con CCEB presentaron scores altos (11%). Las figuras 39, 40 y 41 ilustran las inmunomarcaciones anteriormente descritas.

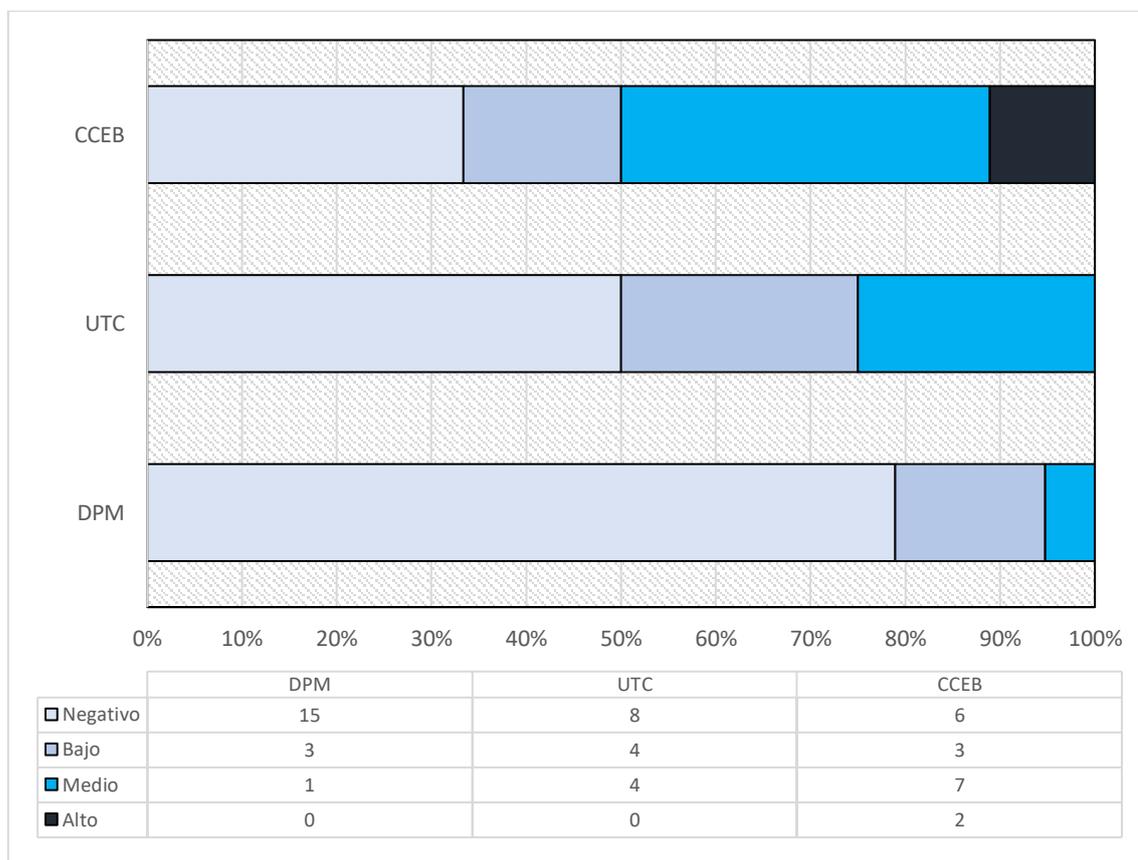


Figura 37 Scores de Inmunomarcación con Ck19 según cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos). $p=0,049$. $p<0,05$ indica significación estadística para la prueba de Kruskal Wallis.

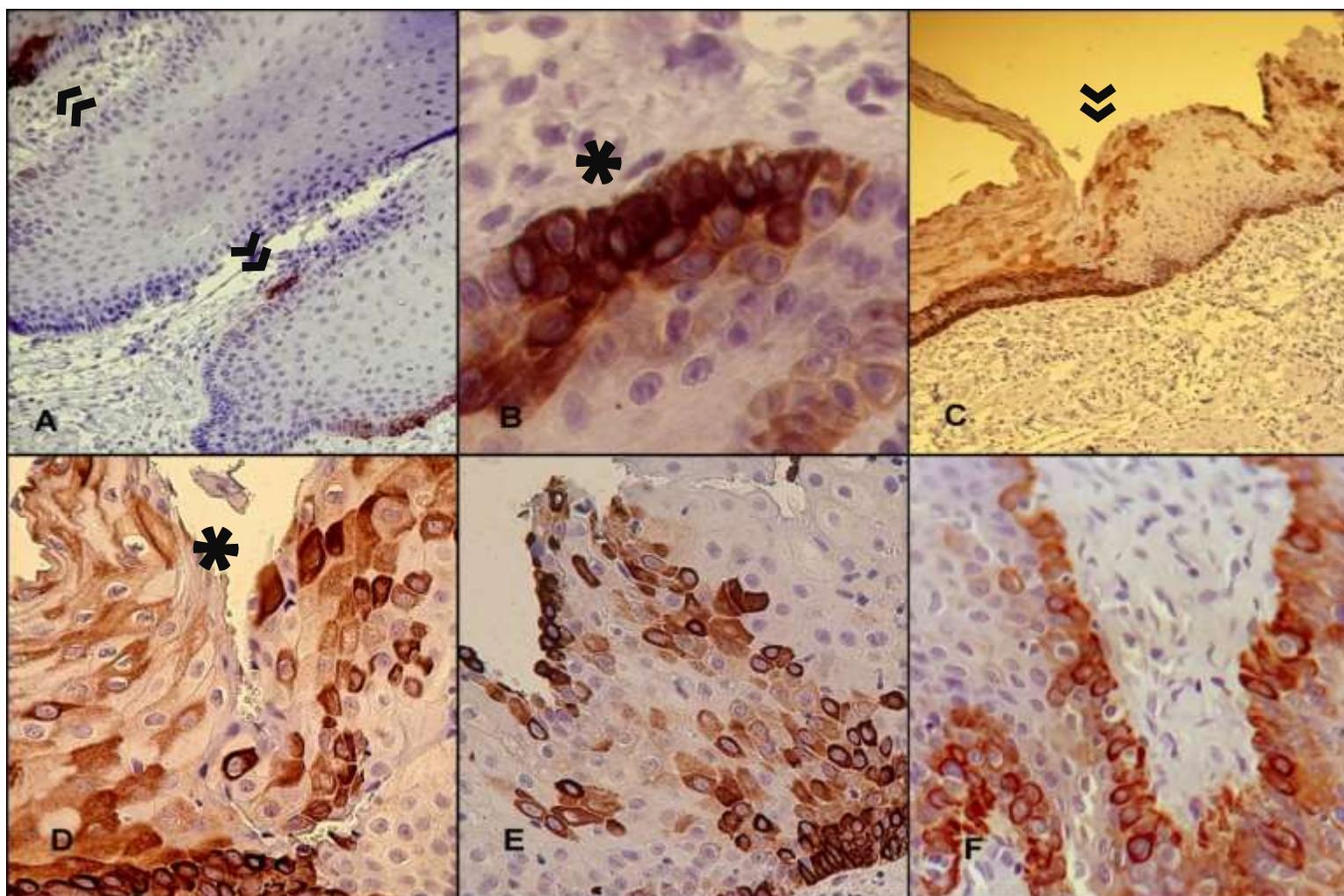


Figura 38. Inmunomarcación Ck19 Grupo Úlcera Traumática Crónica. A)20X Las flechas negras indican células con el citoplasma con inmunomarcación Ck19 positivas aisladas con un patrón en focos dispersas en la región basal de los bordes hiperplásicos de UTC. B) 40X más zoom digital de microfotografía A, en sector Ck19 El asterisco negro indica células que tienden a agruparse dispuestas focalmente en el estrato basal y algunas en disposición parabasal. C)10x Imagen panorámica de epitelio de bordes de UTC, observando en la zona de la flecha, una inmunomarcación en estrato basal, suprabasal y también superficial. D) El asterico negro muestra a mayor aumento la zona inmunomarcada en C. E) 40X inmunomarcación positiva con scores medianos de queratinocitos en estratos basales y suprabasales. F)40X. Ck19 positiva con scores bajos, ubicados solamente en queratinocitos basales.

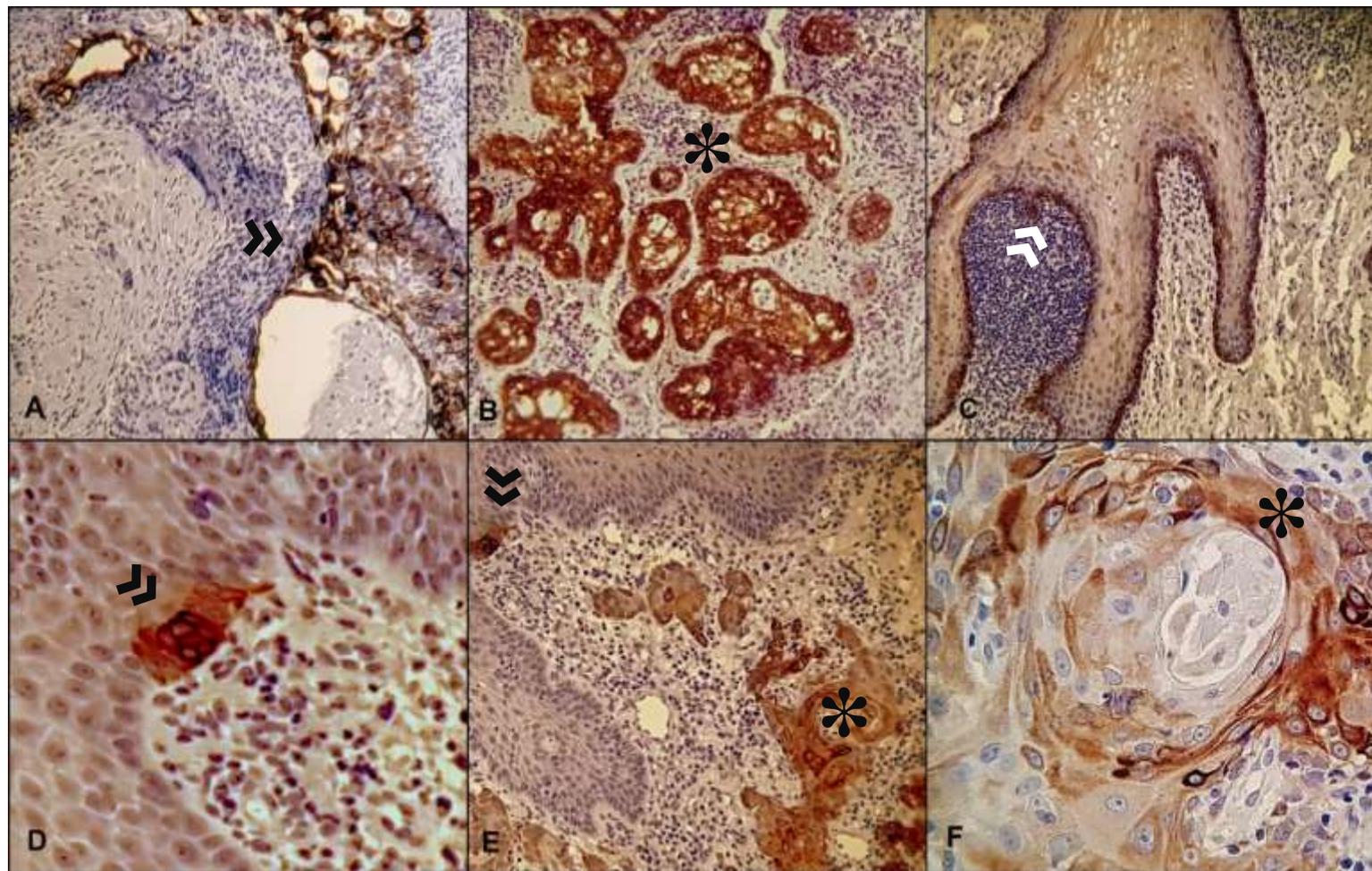


Figura 39 A)10X Ck19 score Medio. Las flechas negras indican células neoplásicas que infiltran el tejido conectivo de CCEB. B)20X Ck19 positiva con scores altos ubicados en islotes de queratinocitos malignos invadiendo el estroma en forma de islotes (asterisco negro). C)20X Ck19 positiva. Las flechas blancas indican un sector con epitelio morfológicamente conservado con Ck19 positiva, ubicación basal, observándose una reacción estromal del tejido conectivo periférica al CCEB. D y E) Corresponden al mismo caso donde en D (flechas negras), se puede observar un patrón de queratinocitos basales y parabasales Ck19 positivos que se disponen agrupándose en nidos celulares similares al observado en UTC y que, en E (asterisco y flecha negra), se observan células neoplásicas Ck19 positivas invadiendo el conectivo subyacente. Ck19 positiva Scores Altos F)40x Células neoplásicas Ck19 positivas rodeando células Ck19 negativas.

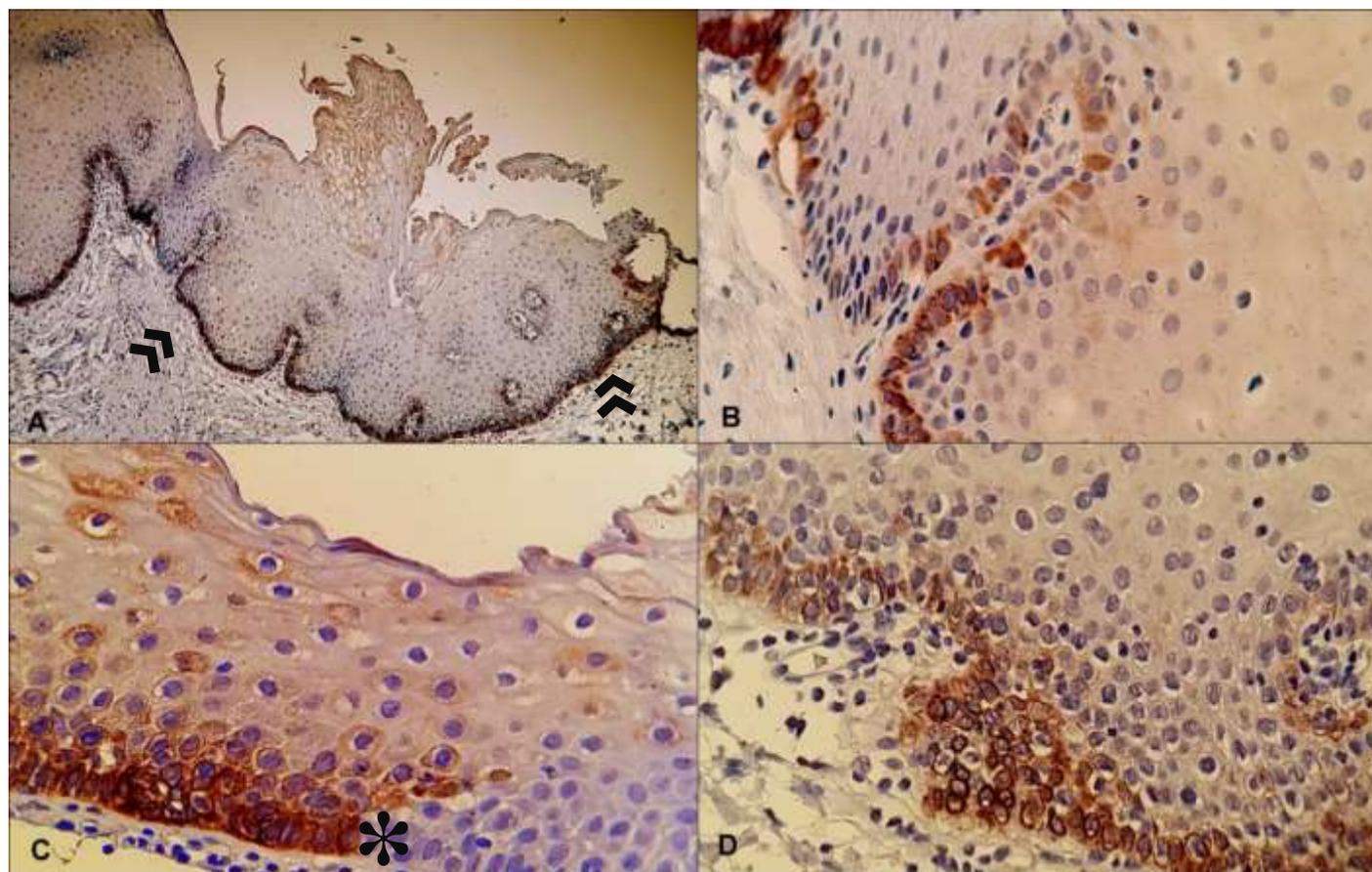


Figura 40. A)10X Ck19 positiva en DPM con un patrón lineal (indicado por flechas negras) a lo largo de los queratinocitos basales del epitelio. Por sectores mostró una marcación de scores medianos y débiles. El caso se correspondía a una leucoplasia de piso de boca VPH positivo. B)20X Ck19 débilmente positiva son scores bajos en DPM, solo inmunomarcación de células basales. C) 20X Ck19 positiva en células basales y algunas suprabasales en caso de leucoplasia de cara ventral de lengua. Interesantemente puede observarse que el límite entre las células Ck19 positivas y las negativas (asterisco negro) se encuentra bien delimitado, destacándose que en los estratos suprabasales el patrón de inmunomarcación tiende a persistir, aunque con menos intensidad y se amplía hacia estratos más superficiales. Caso clínico correspondiente a Leucoplasia de cara ventral de lengua D)20X. Ck19 positiva en queratinocitos basales y en forma más dispersa en parabasales. Score medio.

Ck5/6

La marcación con Ck5/6 se observó asociada significativamente ($p=0,001$) al diagnóstico de los pacientes. Los *scores altos* de Ck5/6, se presentaron en el grupo de CCEB con mayor frecuencia, representando el 66% de los pacientes de este grupo. El grupo de DPM mostró un 15% de *scores* significativamente más altos y el de UTC un 6%. Los *scores medios* también se presentaron en los tres grupos, siendo el grupo de DPM el que presentó mayor proporción de inmunomarcación media con un 63% de los casos, diferenciándose del grupo de UTC que mostró un 36,8% de *scores* medios y CCEB solo un 11%. Los *scores bajos* se mostraron con mayor porcentaje en el grupo de las UTC con un 37,5%, seguido por el grupo de DPM con un 15% y el grupo de CCEB con un 11%. La inmunomarcación de Ck 5/6 fue negativa en 2/18 (11%) de los casos de CCEB, en un 5% de los DPM y en un 12% de las UTC. Figura 41.

Las figuras 42, 43 y 44 muestran las inmunomarcaciones de Ck5/6 en cada grupo de estudio.

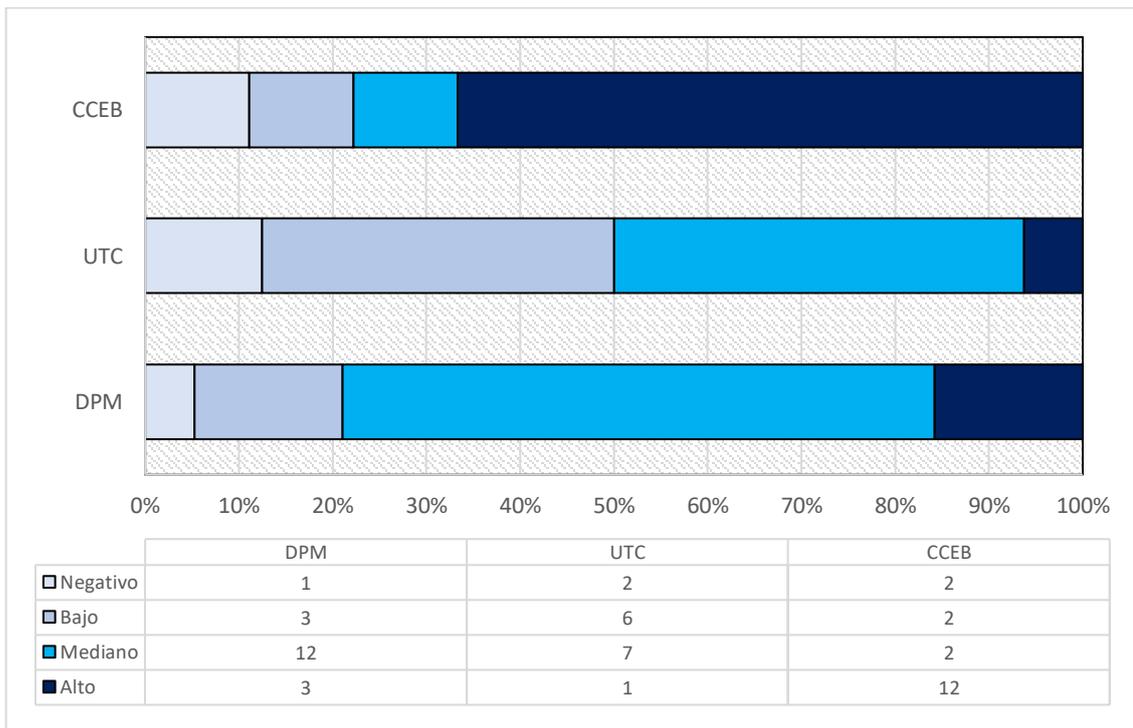


Figura 41 Scores de Inmunomarcación con Ck5/6 según cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos) - $p=0,001$. $p<0,05$ indica significación estadística para la prueba de Kruskal Wallis.

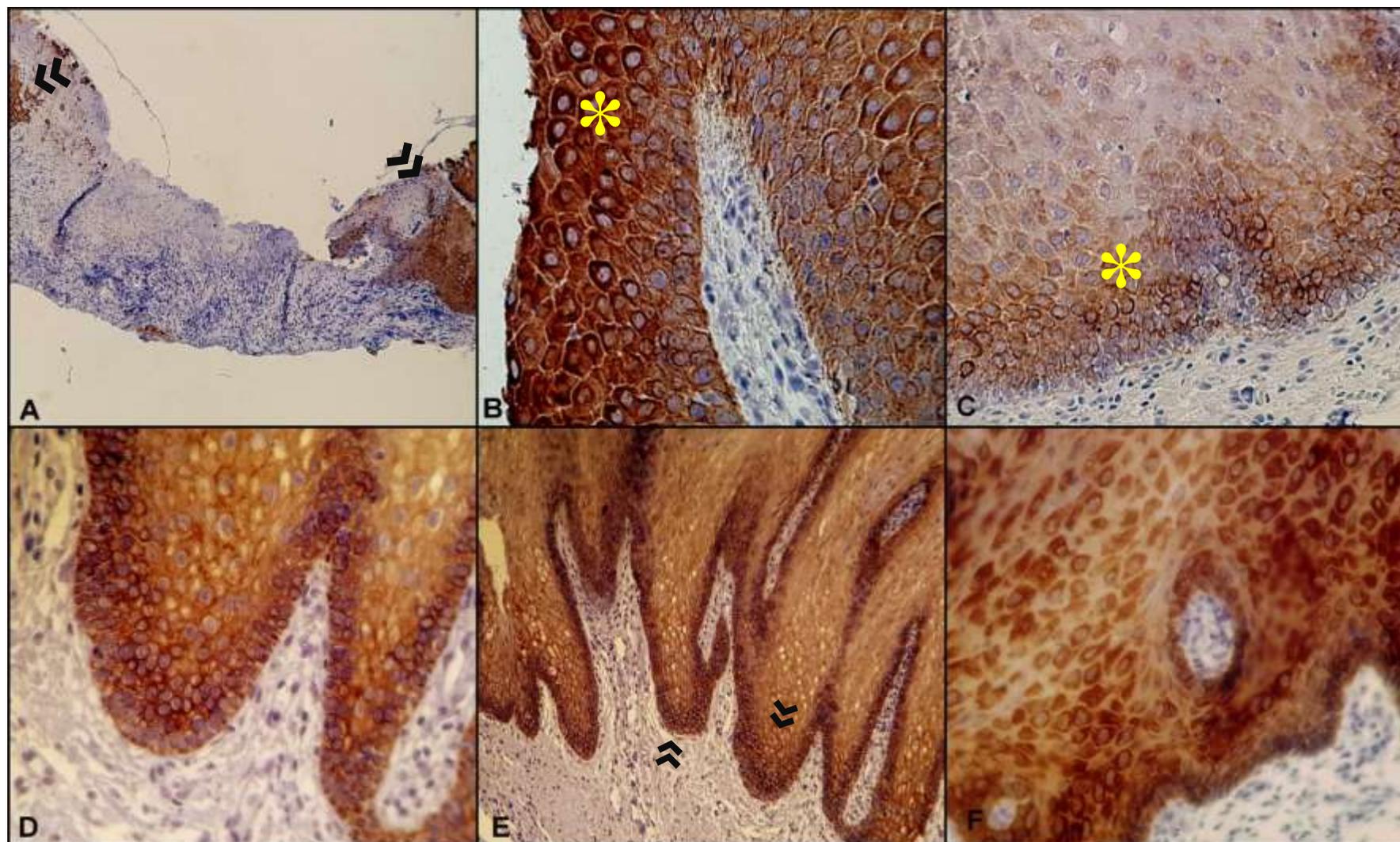


Figura 42- Inmunomarcación de Ck5/6 en UTC. A)10X. Lecho ulcerado y membrana fibrino-leucocitaria, los asteriscos indican los bordes del epitelio de la úlcera Ck5/6 intensamente positivos en todos sus estratos. B) 40x Borde hiperplásico de UTC de fotografía "A", el asterisco amarillo indica Ck5/6 intensamente positiva, score alto. C) El asterisco amarillo indica score medio Ck5/6 UTC en áreas basales y parabasales. D, E, F: Ck5/6 intensamente positiva scores altos en queratinocitos de UTC. Las flechas negras en E permiten observar que a niveles basales se intensifica la inmunomarcación con Ck5/6.

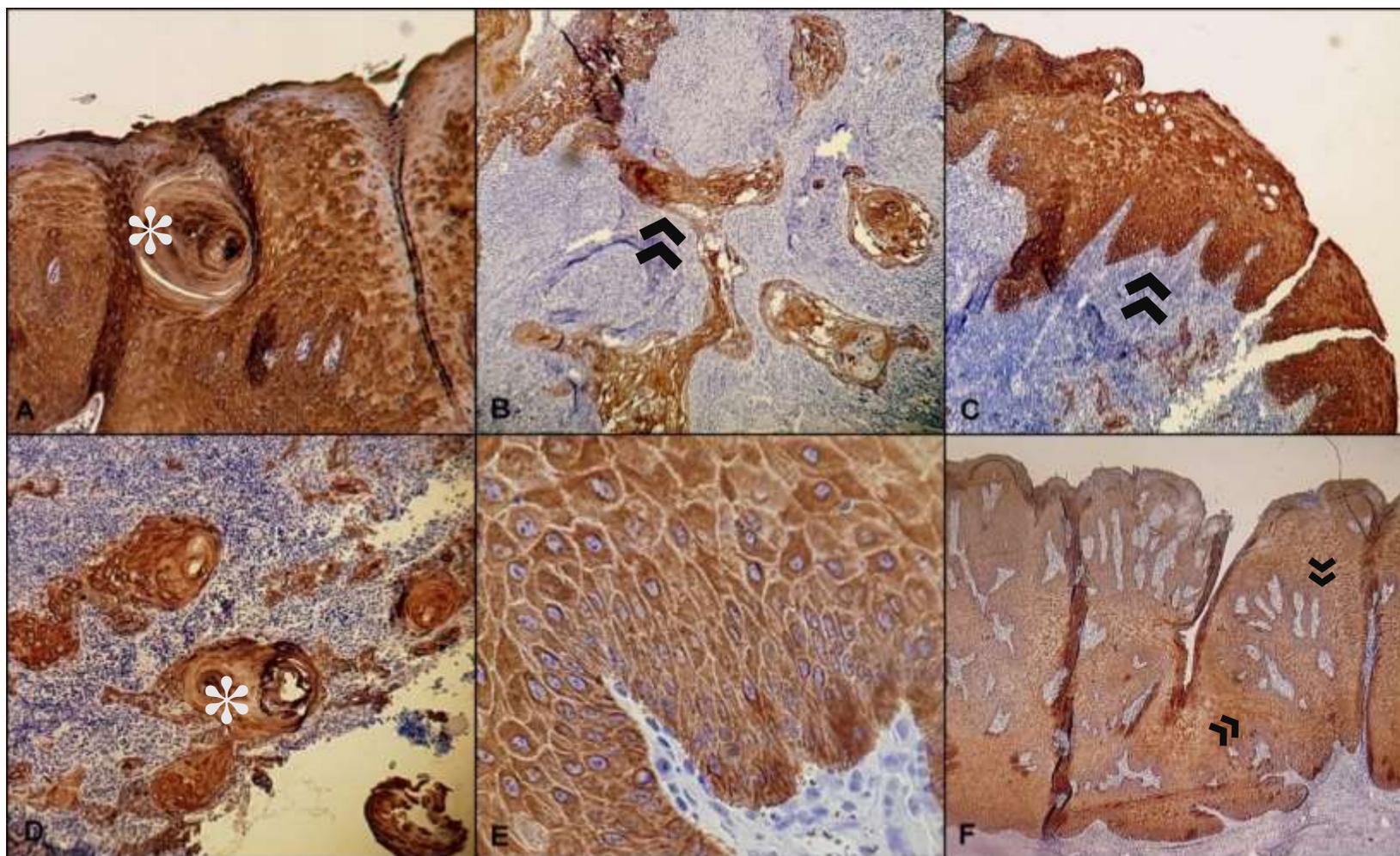


Figura 43 – Inmunomarcación Ck5/6 CCEB. A) 10X Ck5/6 intensamente positivo CCEB observando aumento de la intensidad por zonas e incluso rodeando áreas de disqueratosis (asterisco blanco) y queratinocitos malignos Ck5/6 positivos en áreas de perlas córneas. B)10X. Las flechas negras indican islotes neoplásicos Ck5/6 intensamente positivos infiltrando el estroma. C) Flechas negras indican epitelio displásico peritumoral con intensa inmunomarcación Ck5/6. D y E) 20X Invasión tumoral mediante áreas de globos córneos (asterisco blanco en D) y células epiteliales malignas con intensa marcación Ck5/6. F) 10X Carcinoma verrugoso Ck5/6 positivo con Score Alto en todos los estratos como muestran las flechas negras (a diferencia de la inmunomarcación con Ck19, que siempre resultó negativa en este tipo de carcinoma). En todos los casos, Scores altos.

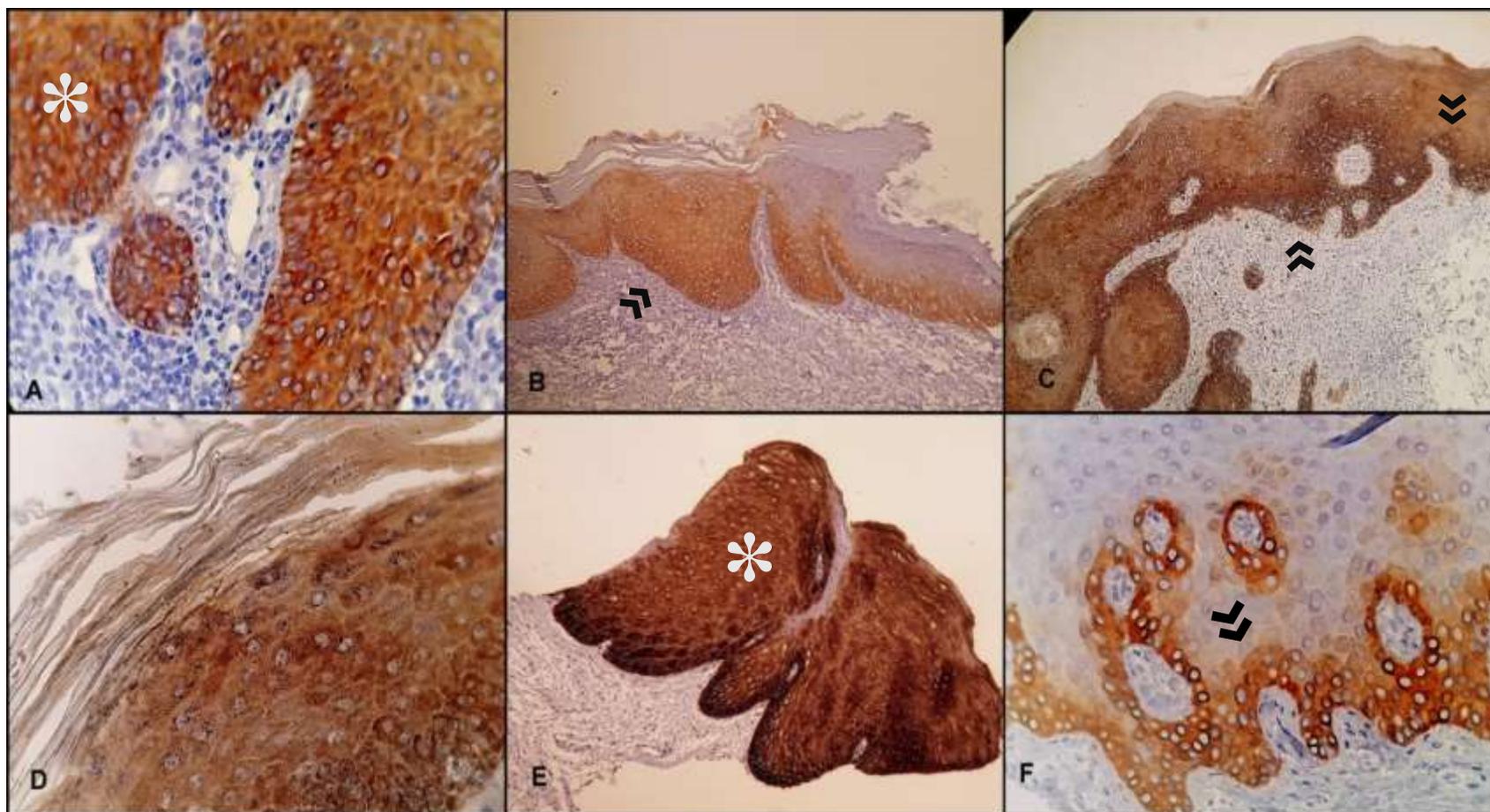


Figura 44– Inmunomarcación Ck5/6 en DPM. A) 20X El asterisco blanco indica Ck5/6 intensamente positivo. Score alto. B y C)10X Ck5/6 intensamente en epitelios hiperqueratóticos, obsérvese que la intensidad de inmunomarcación aumenta a medida que aumenta la diferenciación celular (desde basal a estratos más superficiales, como indican las flechas negras). D)20X Ck5/6 positivo, estratos superficiales, obsérvese la hiperortoqueratinización superficial. Espécimen obtenido de leucoplasia de piso de boca. E)10X Epitelio acantósico intensamente marcado con Ck5/6 (asterisco blanco) en todo su espesor. Score alto. Lesión correspondiente a LVP asociada a VPH-16. F)20X Ck5/6, las flechas indican expresión confinada a región basal y parabasal en epitelio normal periférico a una leucoplasia de borde de lengua.

Ki 67

La Figura 45 muestra la inmunomarcación positiva con Ki67 de acuerdo a cada grupo estudiado. Un solo paciente evidenció un *score alto*, el cual pertenecía al grupo de CCEB (5,5%). Los *scores medios* se mostraron con mayor porcentaje en el grupo de CCEB (61% de los tumores), seguido por DPM (57,9%), mientras que solo el 18% de las UTC (3/16) mostraron un *score medio* de Ki67. Los *scores bajos* predominaron en el grupo de UTC, representando el 81% de los especímenes marcados. Las diferencias de proporciones entre scores de inmunomarcación de Ki67 y los tres grupos resultaron estadísticamente significativas con un $p=0,037$.

Las figuras 46, 47 y 48 muestran las inmunomarcaciones de Ki67, indicando los diferentes patrones de proliferación celular encontrados.

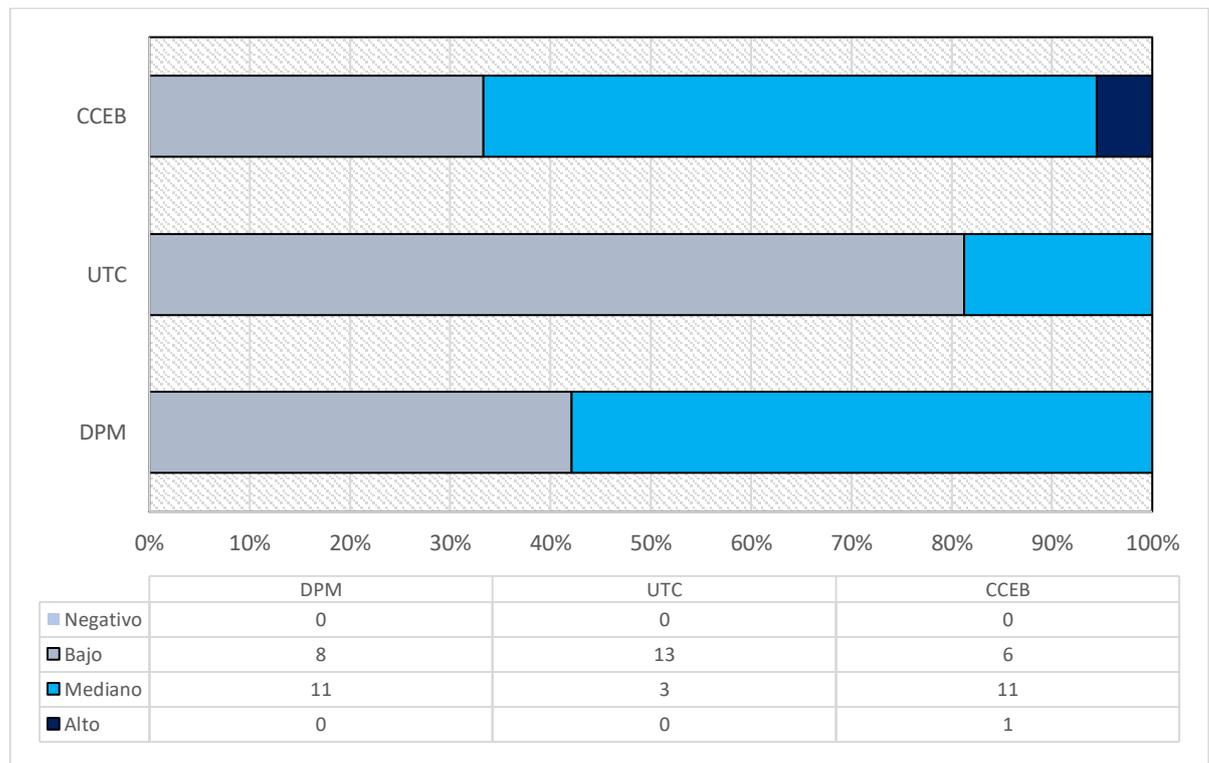


Figura 45. Inmunomarcación con Ki67 según cada grupo de estudio. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlcera Traumática Crónica), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos) $p=0,037$. $p<0,05$ indica significación estadística para la prueba de Kruskal Wallis.

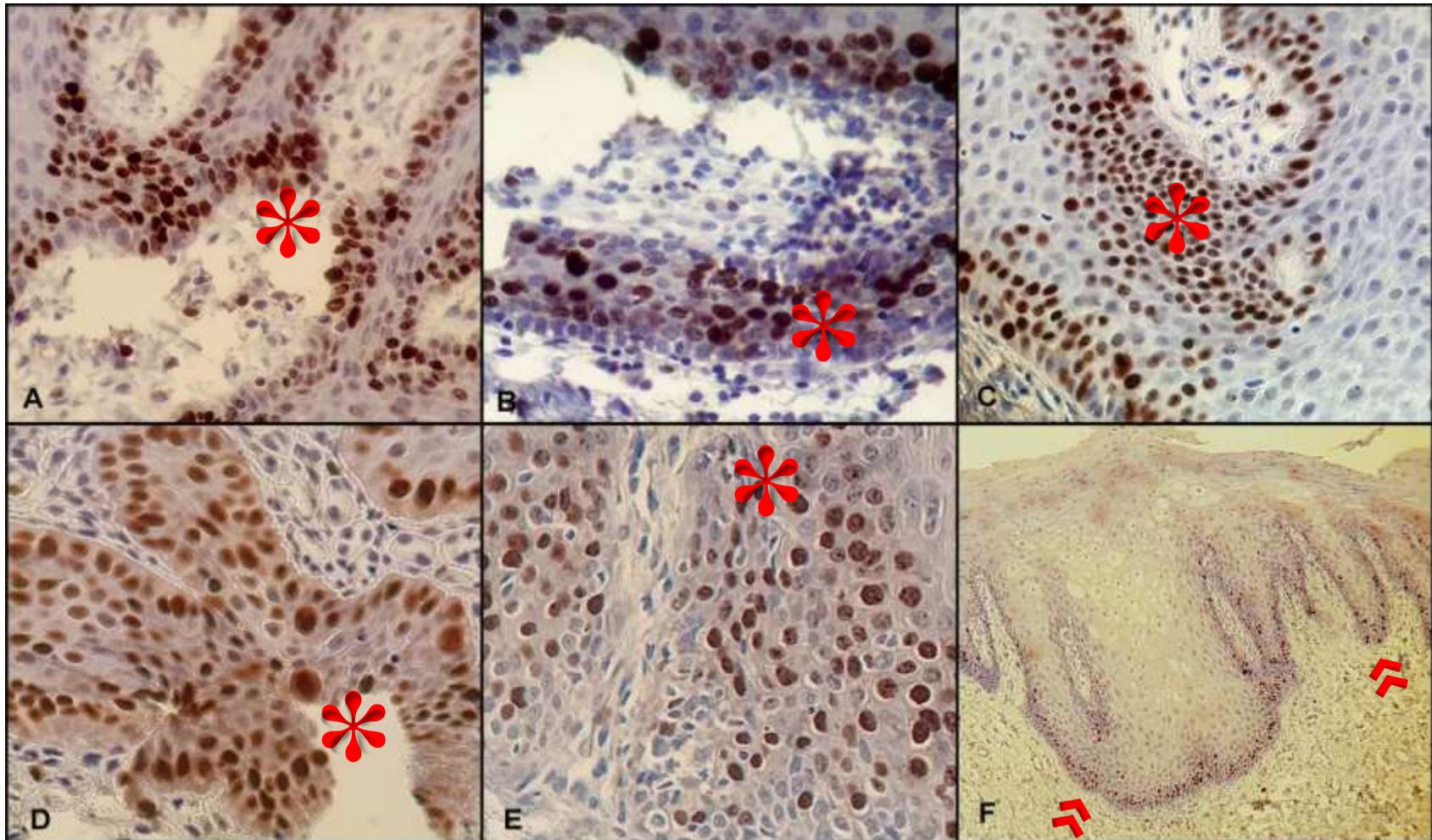


Figura 46 – Ki67 en UTC. A y B) 40x Scores Medios de Ki67 marcado con intensidad de expresión en núcleos de queratinocitos basales y para basales de los borde de UTC (asterisco rojo). C y D) Los asteriscos rojos marcan la inmunoposición de Ki67 con score medio y presencia de queratinocitos basales y suprabasales con intensa actividad proliferativa. Se observan núcleos con intensa inmunoposición e incluso alteraciones nucleares en un contexto clínico de úlceras crónicas sin sentencia a cicatrización. E) Ki67 son scores medios en UTC en estratos suprabasales. F) 10X. Epitelio hiperplásico observando la marcación de Ki67 indicadas por las flechas rojas con un patrón lineal a lo largo del estrato germinativo y por sectores extendiéndose a queratinocitos parabasales. Score bajo.

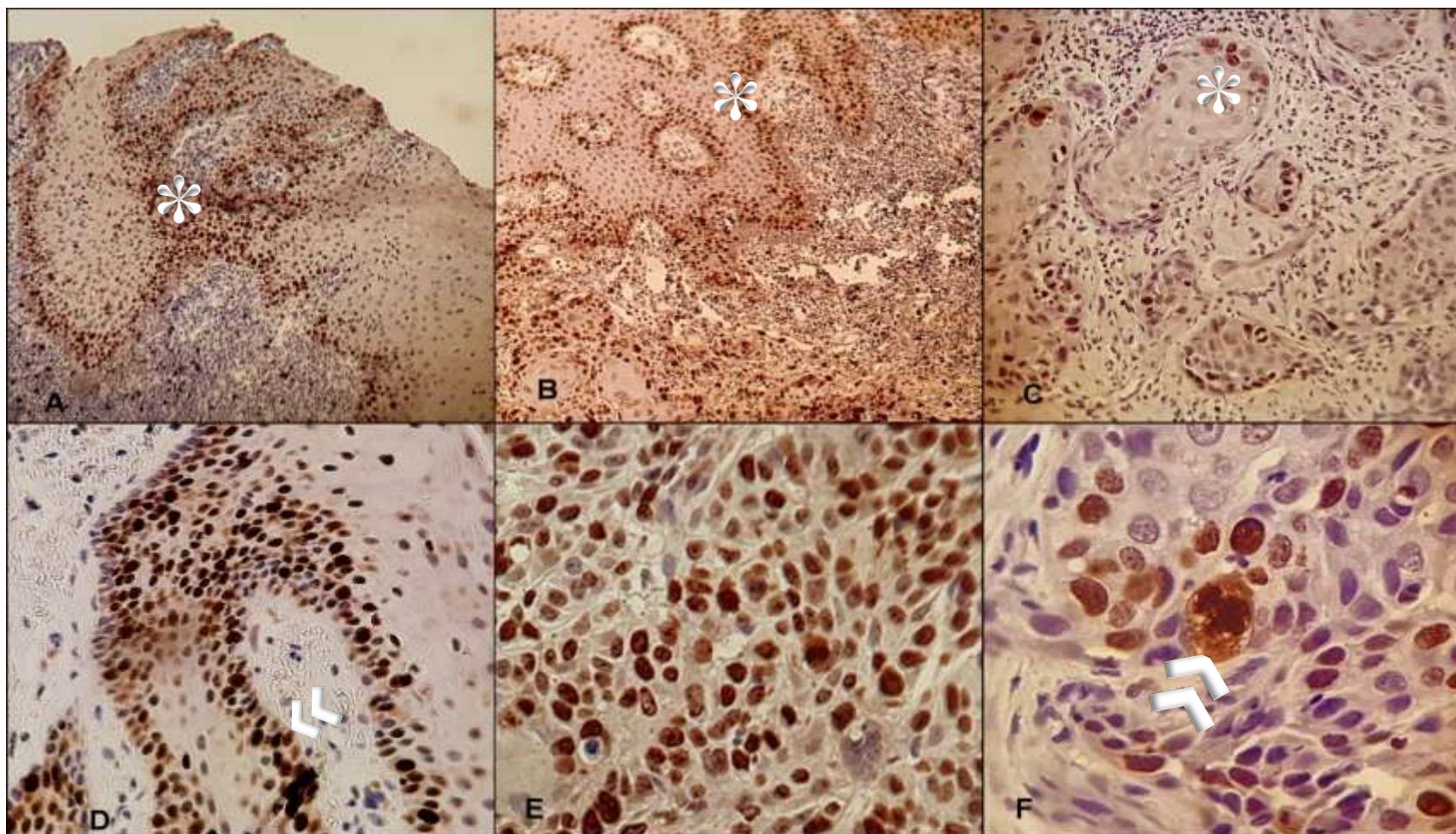


Figura 47 – Ki67 en CCEB. A y B) 20X Ki67 intensamente positivo en todos los campos observados (indicados por asteriscos blancos) y en todos los estratos epiteliales. Scores Altos. C) 20X Células Ki67 positivas invadiendo el estroma y rodeando globos córneos y áreas con disqueratosis (asterisco blanco). D)20X Epitelio peritumoral con células y núcleos Ki67 positivos en queratinocitos basales y parabasales, en algunos sectores similares a los patrones observados en UTC, indicados con las flechas blancas. Score Medio. E)20X CCEB Indiferenciado. Score Alto de Ki67 F)40X con zoom digital. El asterisco blanco indica alteraciones nucleares intensamente marcadas con Ki67 en queratinocitos malignos que invaden el estroma.

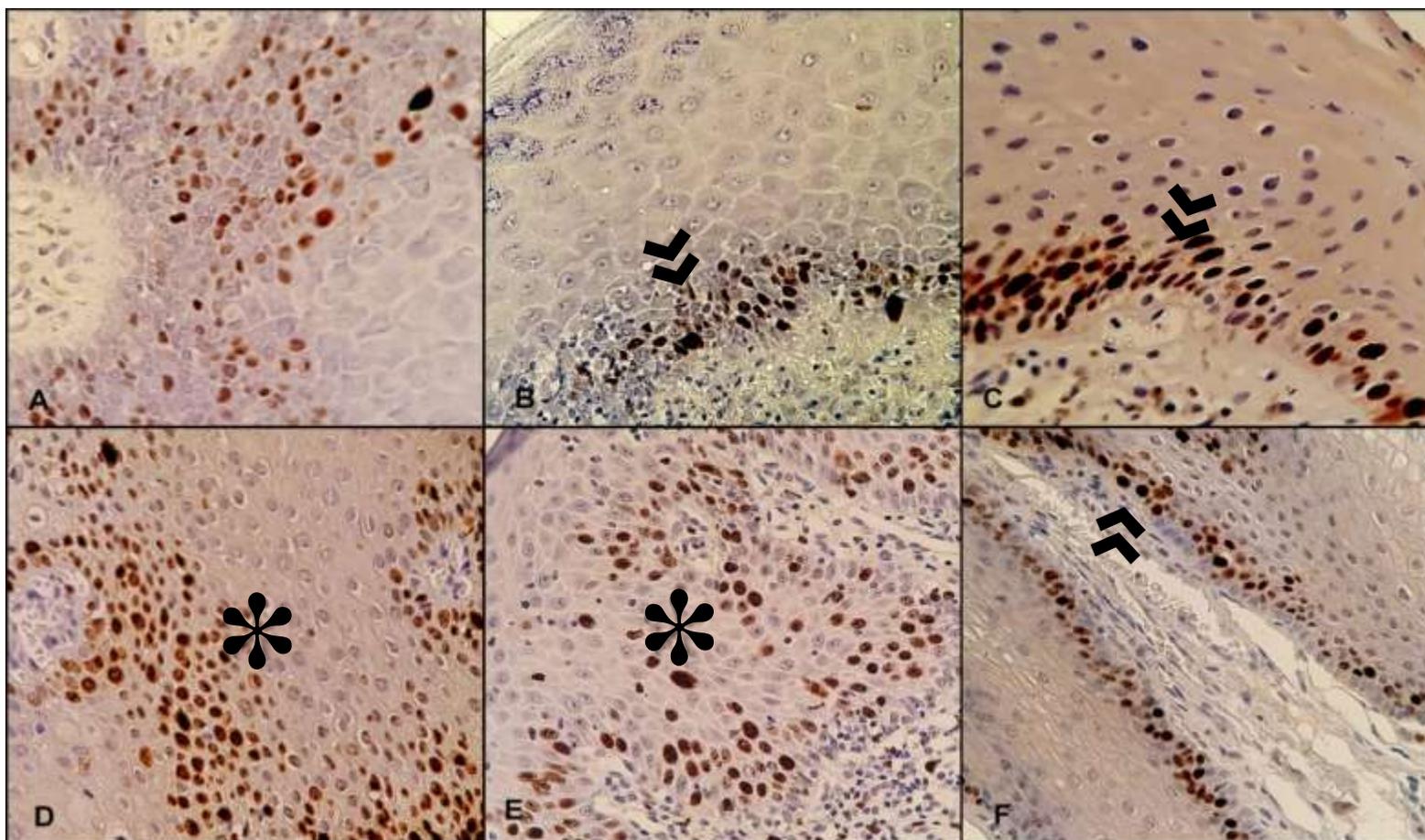


Figura 48 - Ki67 en DPM: A) 20X Ki67 distribuida en forma no-homogénea en región basal y parabasal de un epitelio acantótico asociado a una Leucoplasia. Score Medio. B y C) 20X Las flechas negras indican queratinocitos basales y parabasales con un patrón continuo en epitelios de leucoplasias. Score Medio. D y E) El asterisco negro indica queratinocitos basales y parabasales en epitelios con displasia leve y moderada cuyos núcleos muestran intensa inmunomarcación con Ki67 en lesiones clínicamente compatibles con Leucoplasias. La fotografía "D", donde se muestra además un aumento de la proliferación epitelial, scores medios, se trataba clínicamente de una eritroleucoplasia asociada a VPH16. F) Las flechas negras indican Ki67 dispuesto en forma continua en células basales en paciente con Leucoplasia Verrugosa Proliferativa. Score Bajo.

En la Figura 49, se muestran las combinaciones de marcadores estudiados para cada tipo de lesión bucal. Las tres patologías presentaron una elevada marcación de Ki67 con scores medios y solo el CCEB scores altos; al igual, los porcentajes marcación positiva de Ck5/6 fueron similares en los tres grupos de estudios. Sin embargo, la marcación positiva de Ck19 fue menor en las lesiones DPM en comparación con CCEB y UTC, aunque no se observó significancia estadística (p valor=0,9991), indicando que los tres marcadores se expresaron de modo similar en los tres grupos de estudio.

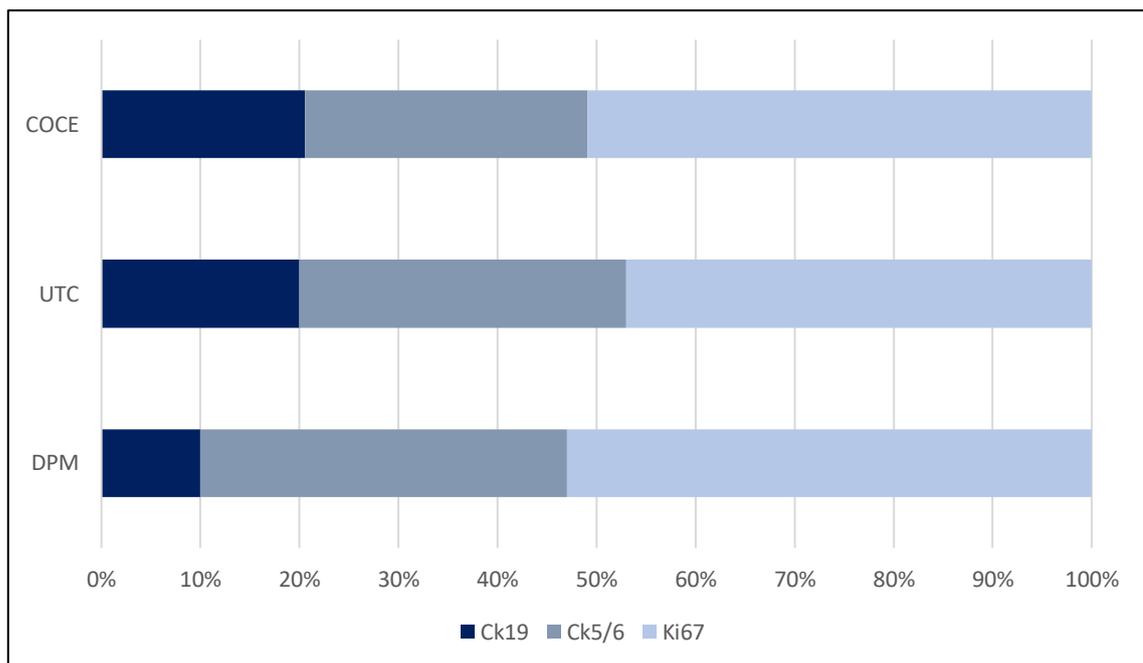


Figura 49 – Combinación de los distintos marcadores en los grupos. CCEB (Carcinoma de Células Escamosas), UTC (Úlceras Traumáticas Crónicas), DPM (Desórdenes Potencialmente Malignos).

Además, se observó una correlación positiva entre las Ck19 y Ck5/6 ($CS=0,57$; $p=0,0136$) en las muestras de pacientes con CCEB y correlaciones positivas entre las Cks entre sí y con Ki67 en las muestras de pacientes con UTC (Tabla 3,4 y 5).

Tabla 3 – Grupo CCEB. Coeficiente de Spearman y p-valores de correlación entre los marcadores estudiados

Marcador		n	Spearman	p-valor
Ck19	Ck 5/6	18	0,57	0,0136
Ck19	KI67	18	0,09	0,7246
CK5/6	KI67	18	0,22	0,3750

Tabla 4 – Grupo DPM. – Coeficiente de Spearman y p-valores de correlación entre los marcadores estudiados

Marcador		n	Spearman	p-valor
Ck19	Ck 5/6	19	0,29	0,2271
Ck19	KI67	19	0,19	0,4318
Ck5/6	KI67	19	0,29	0,2223

Tabla 5 Grupo UTC. - Coeficiente de Spearman y p-valores de correlación entre los marcadores estudiados

Marcador		n	Spearman	p-valor
Ck19	Ck5/6	16	0,77	0,0004
Ck19	KI67	16	0,53	0,0354
Ck5/6	KI67	16	0,53	0,0302

Correlación de biomarcadores inmunohistoquímicos con condiciones clínicas

La relación de los resultados de Ck19 y las condiciones clínicas de los pacientes, se pueden observar en la siguiente tabla comparativa. Tabla 6

En cuanto a la edad, el grupo de CCEB con Ck19 medios-altos mostró un promedio de 55,91 años vs un promedio de 66,12 años en el grupo de UTC y 63 en el grupo de DPM. El género mostró proporciones opuestas, el grupo de CCEB mostró un 75% de pacientes varones y un 25% de pacientes mujeres, mientras que el grupo de UTC mostró los mismos valores, pero en forma opuesta. El 100% del grupo DPM con Ck19 medios-altos fueron del género femenino. El borde de la lengua fue el subsitio de mayor localización siendo el 83% en el grupo de CCEB y el 75% en el grupo de UTC. En el grupo de DPM, fue el 33% de los casos. En cuanto a las formas clínicas de las lesiones, los CCEB con mayor inmunomarcación se correspondieron a formas ulceradas en un 91% de los casos, mientras que por los mismos criterios de inclusión el 100% del grupo de UTC se correspondió con esta forma clínica.

En cuanto a los hábitos de riesgo o factores de riesgo clásicos: consumo de tabaco y alcohol, el 66% de los casos con inmunomarcación positiva de Ck19 en el grupo de CCEB correspondieron a pacientes no fumadores y el 75% en el grupo de UTC, siendo la estimación de promedio de cigarrillos fumados mayor en el grupo de CCEB (243.204 vs 162.487 cigarrillos fumados). En cuanto al consumo de alcohol, el 50% de los pacientes del grupo de CCEB fueron bebedores y solo un 25% de los pacientes con UTC con scores medios-altos de Ck19 registraron un consumo habitual de alcohol. Además, solo 2 pacientes (17%) del grupo de CCEB con scores altos de Ck19 presentaron PCR-VPH positivas. El grupo DPM no mostró resultados relevantes en relación a los factores de riesgo clásicos. Sin embargo, el 66% pacientes de DPM/Ck19 con scores medios-altos fueron VPH positivos.

Todos los pacientes con inmunomarcación positiva de Ck19 pertenecientes al grupo de UTC, registraron algún tipo de IMCO, distribuyéndose de la siguiente forma: solo un paciente con IMCO dentaria pura (12%), un solo paciente con IMCO protética pura (12%) y el resto con IMCO combinada (76%), siendo siempre esta última dentaria + Funcional. En el grupo de CCEB, solo un paciente no presentó IMCO, y el resto se distribuyó de la siguiente forma: un solo paciente con IMCO dentaria pura (8%), y el resto IMCO combinada (84%), siempre siendo esta última también al igual que en el otro grupo, IMCO dentaria + funcional. En el grupo de CCEB, se obtuvo un promedio de historia de IMCO de 59 meses, o sea aproximadamente casi 5 años con la presencia de algún agente irritativo. En el grupo DPM, la mayoría no estuvo asociado a IMCO. En el grupo de UTC el promedio de historia de IMCO fue de 30 meses, lo que equivaldría a 2 años y medio con la presencia de un agente irritativo. Al correlacionar las inmunomarcaciones de Ck19 con las de Ki67 en los mismos pacientes, el 83% de los pacientes con Ck19 positiva, tenían sobreexpresión de Ki67 en el grupo de CCEB, con porcentajes similares (87%) en los pacientes con UTC y 100% de los casos en el grupo de DPM, lo que indica que en estos grupos existe un patrón paralelo de sobreexpresión de marcadores de diferenciación celular (Ck19) y proliferación celular (Ki67).

Tabla 6 Tabla comparativa entre los grupos de CCEB y UTC con Ck19 positiva y condiciones clínicas de los pacientes

Variable/Grupo	CCEB (N=12)	UTC (N=8)	DPM(N=3)
Promedio de Edad	55,91	66,12	63
Género			
Femenino	25% (3)	75% (6)	100%
Masculino	75% (9)	25% (2)	-
Localización			
Borde de lengua	83% (10)	75% (6)	33% (1)
Otros sitios	17% (2)	25% (2)	66% (2)
Formas Clínicas			
Úlceras	11 (91%)	8 (100%)	100% placas queratóticas y verrugosidad
Úlcera más Eritroleucoplasia	1 (9%)		
Consumo de tabaco			
No Fumadores	66% (8)	75% (6)	100%
Fumadores	34% (4)	25% (2)	-
Promedio de cigarrillos	243.204	162.487	-
Consumo de Alcohol			
Presente	6 (50%)	25% (2)	-
Ausente	6 (50%)	75% (6)	100%
PCR-VPH			
Positiva	17% (2)	0	66% (2)
Negativa	83% (10)	0	33% (1)
IMCO			
Ausente	8% (1)	0	66% (2)
Dentaria	8% (1)	12% (1)	
Protética	0	12% (1)	33% (1)
Combinada	84% (10)	76% (6)	
Historia de IMCO	59 meses	30 meses	5 meses
Sobreexpresión de Ki67	83% (10)	87% (7)	100% (3)

DISCUSIÓN

A pesar de los avances a nivel molecular, la comprensión de los mecanismos fisiopatogénicos subyacentes de la UTC y su relación con la carcinogénesis bucal es incompleta y todavía existen muchas áreas a dilucidar. La evaluación de marcadores diagnósticos e inmunohistoquímicos como así también el análisis de las diferentes variables clínicas permiten generar nuevas evidencias que colaboren al entendimiento de estos temas. El cáncer es una patología compleja y muchas de las características asociadas a él, están estrechamente relacionadas a componentes socioculturales y de salud.

Factores biodemográficos

En las últimas décadas, los estudios que abordan la epidemiología de CCEB no tienen en cuenta a la edad como un factor de riesgo, sino que se la registra como una variable para caracterizar los diferentes grupos de estudio, tal como corresponden a los estudios clínicos o epidemiológicos. En este trabajo, la **edad** de los pacientes presentó un valor medio de 63 años. Los valores medios de edad, en cada grupo de estudio, fueron de 66 años para CCEB, 63 años para UTC y 56 años para DPM, no observándose una diferencia significativa entre ellos. En general, las investigaciones muestran que CCEB se presenta con una edad promedio entre 55 y 62 años[423]. Sin embargo, en los últimos años, algunos estudios sobre CCEB, mostraron una mayor frecuencia en los pacientes menores de 45 años. La gran mayoría de los autores, consideran como pacientes jóvenes con CCEB a los menores de 40 o 45 años, ya que, en general, el porcentaje de mayores de 45 años con CCEB varía entre los 86 a 91%[53]. En este trabajo, se observó en el grupo de CCEB un mayor porcentaje de pacientes menores de 45 años (22%) del género masculino. Estos pacientes, en general, presentaron tumores en el borde lingual y ausencia de exposición a factores de riesgo como tabaco o alcohol. La ausencia de factores de riesgo clásicos en estos pacientes con tumores del borde de la lengua, fue una característica importante también identificada en casos reportados en la literatura similares a los observados en este estudio[251,252,256,424–427].

Los perfiles clínicos y de factores de riesgo de los pacientes jóvenes, menores de 45 años con CCEB observados aquí, coinciden con los reportados a nivel mundial [63] ya que en los pacientes menores de 45 años incluidos fue característico la presencia de irritación persistente e infección con VPH. Algunos estudios sugirieron previamente que

el desarrollo de CCEB en pacientes jóvenes podría estar asociado a la inflamación crónica, VPH, inmunosupresión y factores genéticos propios del paciente o hereditarios [63].

La importancia del tiempo de latencia que podría llevar la carcinogénesis bucal estaría en relación también con la acumulación del efecto nocivo de los carcinógenos sobre la mucosa. En concordancia con nuestras observaciones, un estudio mostró que estos pacientes frecuentemente no son fumadores ni bebedores[428], por lo que siempre deberían registrarse factores de riesgo emergentes o con escasa evidencia científica en este grupo. Algunos autores sostienen que la capacidad para metabolizar productos carcinogénicos de la exposición al tabaco ambiental y una predisposición genética, podrían jugar un rol en el desarrollo de carcinomas en algunos pacientes jóvenes no fumadores[429,430]. Además, ninguno de los tumores en menores de 45 años mostró asociación con la presencia de DPM previa al tumor.

Por otra parte, se observó un número no significativo de pacientes jóvenes con UTC similar al grupo de pacientes jóvenes con CCEB. Las UTC de los pacientes jóvenes respondieron rápidamente al tratamiento de eliminación de factores traumatizantes, excepto en un solo caso. Esto podría deberse a que la edad condiciona los mecanismos de cicatrización, ya que, con el paso del tiempo, se genera una disminución de la densidad del colágeno, de fibroblastos, disminuye el turnover del epitelio el cual se hace más fino y se altera la vascularización y la celularidad de los tejidos[431,432]. Se han encontrado algunos marcadores moleculares y anomalías cromosómicas que difieren entre pacientes con CCEB mayores y menores a 45 años. Sin embargo, las diferencias no son significativas y los resultados inconsistentes. Es por eso, que debido a las limitaciones metodológicas de los diferentes estudios, la fisiopatología de CCEB en pacientes jóvenes no está totalmente dilucidada[433].

Esta investigación demostró un mayor porcentaje con diferencias significativas de individuos del **género** masculino en el grupo de CCEB (60.5%) en relación con DPM (34.3%). Históricamente, el CCEB ha sido considerado una patología de varones [52]. En los últimos años, la diferencia entre géneros ha disminuido también a una relación que se aproxima cada vez más a 1:1[54,55,434]. En un estudio de nuestro medio que abordó CCEB, la relación fue de 1,2:1[152]. En el presente trabajo la relación fue de 1,5:1 a favor del género masculino. En concordancia con otros autores, los pacientes de este estudio, que registraron mayor índice de consumo acumulado de tabaco y alcohol, fueron del

género masculino. Contrariamente, las mujeres con CCEB presentaron relación con otros factores de riesgo como la presencia de IMCO. Es por eso, que el género podría, en la actualidad, no ser un factor determinante para el desarrollo de CCEB [435].

En el grupo de pacientes con DPM, se observó una asociación significativa con el género femenino. Esta asociación podría deberse a la presencia de patologías que se han observado más frecuentemente en las mujeres como LVP y QPI[148,309,436,437].

Localización Anatómica

En el presente estudio, el borde de la lengua fue siempre el sitio más frecuente de **localización** de las lesiones en los tres grupos (CCEB, DPM y UTC). En el grupo de CCEB, la localización del borde lingual llegó a ser casi del 70% de los casos, mientras que en los otros grupos fue notablemente menor pero siempre observándose como el sitio de mayor frecuencia. En general, hay consenso entre los trabajos donde se registran los subsitios, siendo el borde de la lengua el sitio de mayor prevalencia [4,435,438–440].

En países de Europa como España, Croacia, Portugal e Italia[441] o en países de Oceanía (Australia, Nueva Zelanda y pequeñas naciones insulares), el CCEB de lengua fue el más prevalente de los tumores intrabucales, destacando un incremento en las últimas décadas de la mortalidad asociada a este sitio[442]. En Sudamérica, según estudios multicéntricos, la frecuencia del CCEB del borde lingual sería similar a otras partes del mundo, así como también el sitio que genera más muertes por año[7,434,443,444].

En un estudio que comparó los sitios de aparición del CCEB en relación con diferentes factores de riesgo, se determinó que el borde de la lengua fue el sitio más prevalente tanto en pacientes fumadores como no fumadores. Para el autor, existirían diferentes factores confundentes que podrían llevar a condicionar una absorción diferenciada de los carcinógenos de acuerdo con las diferentes partes de la mucosa bucal. La concentración de carcinógenos en la saliva, la irritación mecánica local, los diferentes espesores de la mucosa bucal, entre otros factores podrían ser algunos aspectos condicionantes del sitio de aparición de CCEB. El efecto de concentración carcinogénica y su acumulación en algunos sitios específicos, explicaría por qué los fumadores tienen más tendencia a tumores en el piso de la boca. La preferencia de localización del CCEB en el borde de la lengua, asociado o no al consumo de tabaco, estaría asociada a la relación

anatómica con la superficies dentarias y en consecuencia al trauma dental crónico. La cercanía también con la mucosa yugal de las superficies oclusales y el efecto irritante sobre la mucosa, también explicaría la prevalencia de tumores en esas zonas[46]. Con relación a estos postulados, en este estudio los tumores de piso de boca se asociaron a pacientes muy fumadores y los tumores de borde de lengua y mucosa yugal estuvieron en su mayoría asociados a IMCO.

En el grupo de UTC, el borde de la lengua fue la localización anatómica de mayor frecuencia por la presencia de lesiones traumáticas, al igual que en el grupo de CCEB. Estas observaciones, coinciden con el trabajo de Perry y cols [46]. Este autor sugiere que en algunos casos los factores de riesgo condicionarían el sitio de ubicación de las lesiones. La presencia de tumores de borde lingual en pacientes fumadores podría estar asociada a la presencia de IMCO como un facilitador de la absorción de otros carcinógenos. Además, el vínculo entre la prevalencia de IMCO y CCEB de borde de lengua (y no de mucosa yugal), podría estar asociado a que la lengua es un órgano que presenta multiplicidad de movimientos durante funciones estomatognáticas como la masticación y la fonación lo que permite mayor contacto y persistencia entre superficies defectuosas y la misma mucosa bucal[46,445].

El segundo lugar de mayor frecuencia de localización del CCEB difiere según los estudios. En Estados Unidos es el piso de la boca[438], mientras en las regiones del Sudeste Asiático, específicamente en la India es la mucosa yugal debido a la alta frecuencia de FOS. Mummudi y cols, mostró en su estudio que la región gíngivoyugal fue el sitio de mayor frecuencia de tumores de CCEB [446,447].

Dentro del grupo de pacientes con UTC, la ubicación del fondo de surco fue el segundo lugar más prevalente debido a la asociación de este sitio con IMCO de origen protético (flancos sobreextendidos de prótesis desadaptadas).

En el grupo de DPM, fue notable la gran variabilidad de sitios de localización de estas lesiones. La presencia de múltiples localizaciones así como la diversidad de las mismas obedece a la inclusión de pacientes con LVP, cuyas lesiones tienden a ser multifocales[329,339].

Hábitos de riesgo, Irritación Mecánica Crónica y VPH

En relación con los factores de riesgo estudiados, se pudo determinar que el **consumo de tabaco e IMCO**, estuvieron asociados a los grupos de estudio establecidos en esta investigación.

El **hábito de fumar tabaco** es el principal factor de riesgo conocido para el CCEB y el desarrollo de DPM, lo que se ha evidenciado en numerosos estudios epidemiológicos y constituye un factor de riesgo clásico para CCEB, siendo el más frecuentemente registrado[50]. En general, se ha demostrado que las personas que fuman presentan mayor riesgo de desarrollar CCEB que aquellos que no fuman. El rol del tabaco en la carcinogénesis bucal ha sido también identificado en diferentes estudios donde se aborda la relación no solo con CCEB sino con DPM [230,298,448]. En este estudio, el grupo de DPM fue el que mostró más porcentaje de pacientes fumadores (75%). Sin embargo, individualmente mostraron menos consumo acumulado que los individuos de la misma subcategoría del grupo de CCEB. Coincidentemente con los resultados obtenidos, diferentes trabajos, como el de Balsaraf y cols, han demostrado que el tabaco, el alcohol y algunos otros hábitos nocivos como la masticación de betel son frecuentes en pacientes con DPM y a medida que el hábito perdura en el tiempo, aumenta la severidad clínica de las lesiones[449,450].

En los últimos años, el CCC, y entre ellos el CCEB asociado a VPH mostró un aumento de la incidencia, mientras que el CCEB asociado a factores clásicos mostró disminución en sus cifras[3]. En el trabajo de Al Feghali y cols, en una cohorte de pacientes con CCEB, se observó que el 66% eran fumadores y con tumores de características histopatológicas de mal pronóstico en comparación con los pacientes no fumadores[451]. En este estudio solo un tercio de los pacientes del grupo de CCEB presentó asociación con factores de riesgo clásicos. La importancia del tabaco como factor de riesgo de CB varía entre países de acuerdo a los hábitos locales de consumo, de manera que la fracción de riesgo atribuible al tabaco varía también según la localización geográfica donde se haya realizado la investigación [185,452]. En un estudio de tesis doctoral realizado sobre la misma población que el presente estudio, mostró que casi la mitad de los pacientes con CCEB no fumaron nunca[51].

A través de estudios de casos y controles, se ha demostrado que el **consumo de alcohol** representa un riesgo de presentar CCEB, observándose que los pacientes bebedores presentan entre 1,8 y 3,46 veces más posibilidad de desarrollo de CCEB que no bebedores o ex bebedores[90,453]. En esta investigación, los pacientes no bebedores estuvieron presentes en porcentajes homogéneos en los tres grupos de estudio (un promedio de 45%), mientras que el grupo de CCEB fue el que más individuos registró en la categoría de bebedores usuales o crónicos. En el estudio de Gupta y cols, se demostró que el consumo de tabaco y alcohol, en conjunto con mal estado periodontal y escasas visitas a la consulta odontológica, estuvo asociado a un riesgo incrementado de CCEB [454].

Es de destacar que las UTC, en pacientes alcoholistas, se localizaron en sitios similares a los tumores observados en pacientes bebedores, como son el piso de boca, borde de lengua y mucosa yugal. La similitud de distribuciones de las lesiones de UTC y CCEB en pacientes alcoholistas podría deberse, entre otras cosas, al efecto solvente y atrofiante que genera el alcohol sobre la mucosa bucal. La mayoría de los estudios sugieren que el alcohol tiene un efecto especial en zona ventro-lateral de lengua y piso de boca[96,97], generando un incremento de la permeabilidad de la mucosa [49,96] asociada a atrofia epitelial y efecto solvente sobre la membrana fosfolipídica celular. Además, frente a una mucosa atrófica y al ser subsitios proclives a IMCO, podría facilitarse el daño generado durante la fricción mecánica. La disminución del espesor del epitelio de la mucosa bucal facilitaría la penetración de carcinógenos hacia la capa basal del mismo en donde se ubican las células con capacidad mitótica, y por lo tanto más susceptibles a la acción de éstos. La alteración de las células basales asociadas a la facilitación de la penetración de otros carcinógenos al interior epitelial por efecto del alcohol podría generar minusvalía en los procesos de reepitelización y cicatrización de las heridas.

En relación con las otras variables estudiadas, como el **consumo de agua arsenical** o la **herencia mórbida de cáncer**, no se mostraron asociaciones significativas. Los resultados en la literatura científica sobre la historia familiar de cáncer y su asociación con CCEB, no son concluyentes, ya que algunos estudios indican exceso de riesgo, para otros el riesgo es leve pero significativo y otros no detectan aumentos significativos del riesgo[152]. Al ser el HACRE una condición frecuente en nuestro medio[198], debería ser siempre una variable estudiada en investigaciones que abordan CCEB y DPM.

El **consumo de mate caliente** ha sido considerado por la OMS como un probable factor de riesgo de cáncer bucal[105]. En Argentina, un estudio de casos y controles realizado por Castelletto y cols., encontró una relación positiva entre riesgo de cáncer de esófago y consumo de tabaco y alcohol, pero no con la ingesta de mate. Sin embargo, el riesgo se incrementó para los individuos donde se registró el consumo de mate con agua a temperatura caliente o muy caliente [115]. En el presente estudio, el dato que resultó diferente fue la temperatura del consumo de la infusión: el 36% de los pacientes con CCEB consumían mate a temperatura muy caliente (mayor a 80°C). El registro de la temperatura suele ser un dato arbitrario y subjetivo que está determinado por una percepción individual relacionada al umbral de sensibilidad térmica de cada paciente.

La presencia de **IMCO** ha sido un factor de riesgo de CCEB escasamente estudiado en comparación con otros factores como tabaco y alcohol. Sin embargo, en los últimos años se han generado más estudios que abordan posibles factores como los dentarios que podrían ser causa de IMCO y del desarrollo de CB[152]. En este trabajo se observó una asociación significativa entre la presencia de IMCO y CCEB.

Como cualquier investigación donde se aborda la IMCO, existen implicancias éticas en donde la primer medida terapéutica más allá de los propósitos de la investigación es la supresión del estímulo traumatizante que origina la lesión[179]. En el tratamiento de las úlceras traumáticas de piel con potencial de transformación maligna (UM), la toma de biopsia es aconsejada en forma inicial, con el objetivo de descartar un carcinoma[295,296]. Estas medidas preventivo-terapéuticas fueron aplicadas al grupo de UTC, y específicamente a aquellas UTC sin tendencia a cicatrizar una vez removido las fuentes de IMCO.

La mayoría de los pacientes que presentaron UTC y que fueron sometidos a biopsias de diagnóstico, tuvieron factores traumatizantes dentarios y/o combinados con algún hábito parafuncional y de ubicación en el borde de la lengua. La no respuesta a la eliminación y control del factor traumatizante podría estar ligada a la imposibilidad de controlar factores parafuncionales. Estos factores funcionales (deglución disfuncional, interposición lingual, etc.) son difícilmente controlables en forma inmediata y a veces requieren un tratamiento de reeducación muscular fono-estomatológico que puede llevar más tiempo. Los factores dis o parafuncionales asociados a IMCO descriptos en el trabajo de Lazos y cols, fueron los mismos que los observados en este estudio. Para estos autores, el factor funcional facilita la invasión del plano mucoso sobre el plano dentario,

aumentando la intensidad del contacto entre estas superficies y en consecuencia permitiendo la persistencia de la injuria mecánica[241]. Además, Kim y cols, observaron que la posición del eje lingual del segundo molar inferior y un espacio lingual reducido podrían aumentar el riesgo de cáncer de borde de lengua en un grupo de pacientes jóvenes [425]. En relación con los factores funcionales se ha descrito que el sistema motor orofacial puede afectarse con la edad: aumento de movimientos orofaciales y movimientos disfuncionales de la lengua durante la deglución. La causa estaría asociada a una atrofia que sufren los fascículos musculares de la lengua con el paso del tiempo[455].

En concordancia con lo expuesto hasta el momento, en una revisión[456] se concluyó que IMCO podría ser considerada un factor de riesgo para el desarrollo de CCEB, conjuntamente con otros factores como localizaciones de alto riesgo como borde de lengua y asociación con el género femenino. Como anteriormente se mencionó, en las últimas décadas el CCEB se ha incrementado en menores de 45 años. En los trabajos de investigación que abordan esta problemática, la IMCO no es registrada; sin embargo, en este trabajo fue el factor de riesgo más frecuente en estos casos.

Existen escasos trabajos epidemiológicos en el área de CCEB, donde se registran sistemáticamente los factores parafuncionales asociados a una mayor persistencia y posibilidad de irritación de un elemento traumatizante sobre la mucosa bucal. En el trabajo de Lazos y cols, como así también en esta investigación, los factores funcionales (asociados a un factor dentario) fueron prevalentes en el grupo de UTC y CCEB [241].

Los resultados de los estudios de Lockhart, Rosenquist, Vacarezza, Rotundo, Piemonte, Lazos y Behnoud, sugieren que la IMC del epitelio escamoso bucal, puede promover, con el tiempo, cambios a nivel tisular como displasia y, en conjunto con otros factores de riesgo, ser causante de malignización celular de lesiones bucales [151,153,160,241,457,458]. Este efecto puede producirse sobre la mucosa bucal con mayor facilidad si está previamente iniciada por algún otro factor carcinógeno[51]. Además, cuando IMCO actúa sobre una mucosa previamente iniciada o con modificaciones clínicas asociadas a DPM, aumenta significativamente la presencia de displasia epitelial, facilitando la concentración de carcinógenos y su penetración a la mucosa[459].

Uno de los mecanismos propuestos sobre el rol de la IMCO en la carcinogénesis bucal, es la permisibilidad para el ingreso de carcinógenos (tabaco, alcohol, etc.) al epitelio de la mucosa bucal[179]. Se ha observado que IMCO genera en estudios experimentales, un estado hiperproliferativo epitelial y un microambiente inflamatorio que promueve el crecimiento de células germinativas[239,460]. Además de permitir la absorción de carcinógenos con capacidad mutagénica, IMCO puede condicionar la historia natural de **la infección por VPH**[129], la cual se da en forma exitosa cuando se produce la unión del virus con la célula epitelial del estrato basal, caracterizadas por ser células indiferenciadas con alta capacidad mitótica[121,132,409,461–466]. El VPH infecta las células basales o SC a través de micro erosiones o microinjurias epiteliales, para luego poner en marcha diferentes mecanismos de evasión inmunológica, los cuales permiten que el sistema inmune permanezca en forma remota y lejana a esta situación. Sin embargo, el 90% de las infecciones por VPH son «cleared» (resueltas) a los dos años a partir de una respuesta celular [118].

Una vez que el virus ingresa al epitelio favorecido por IMCO, la unión del VPH a las superficies epiteliales de las células basales se da en forma preferencial con proteínas de membrana. Las más estudiadas hasta el momento son los receptores syndecan-1, los cuales conforman los receptores epiteliales de una familia proteoglicanos de heparán-sulfato (PGsHS)[467,468]. Syndecan 1 es la PGsHS más predominante de los epitelios de mamíferos y su expresión aumenta durante la diferenciación epitelial y la cicatrización de heridas. También fueron propuestas algunas integrinas estudiadas in vitro: $\alpha 6$, $\beta 1$ y $\beta 6$. Muchos de estos receptores son sobreexpresados en respuesta a estímulos mecánicos sobre la superficie epitelial[129,469], lo que soportaría la necesidad de la existencia de IMCO previa a la infección viral. Las células blanco del VPH serían células basales con un fenotipo de SC, posiblemente reclutadas a partir de los mecanismos pro-cicatrizales puestos en marcha luego de una injuria tisular[470].

En un estudio sobre conejos, la herida creada tres días antes de la inoculación con ADN viral de Papiloma Virus, aumentó significativamente la eficiencia de la infección, ayudando a comprender que el microambiente que se forma en torno a traumatismo facilitaría los mecanismos infecciosos[471]. Una vez que el virus es internalizado, puede generar una infección activa o bien permanecer latente en las células basales del epitelio bucal. Existen condiciones locales que pueden generar la reactivación viral a expensas de

la estimulación de la proliferación celular de las células infectadas. Las limitaciones que genera estudiar la latencia de VPH en humanos, llevó a los investigadores a poner en marcha modelos experimentales sobre animales[472]. La reactivación viral de un VPH latente a partir de IMCO, pudo detectarse en el cáncer de vejiga del ganado asociado al BVP4 (Virus del Papiloma Bovino), tumores de piel equina asociados al BVP 1 y 2, el ROPV (Virus del Papiloma Oral de Conejo), COPV (Virus del Papiloma Oral del Canino) y el CRPV (Cotton Tail Rabbit Papiloma Virus). En experimentos realizados en ratones *Mastomys natalensis* se pudo observar, luego de repetidas irritaciones mecánicas de la piel del ratón, un marcado incremento de copias virales en estas zonas en comparación con las zonas no irritadas mecánicamente[122]. Estos hallazgos sugirieron que la estimulación celular y la inducción mecánica de la irritación traumática sobre el epitelio son suficientes para activar al papiloma virus latente. Esto también se demostró en el CRPV[123,473]. La evidencia científica de la latencia del VPH y del posible rol de los diferentes factores capaces de generar la reactivación están basadas en observaciones clínicas y siempre son anecdóticas debido a aspectos éticos sustentados en la imposibilidad de la toma de biopsias de mucosa clínicamente sana, en nuestro país, pero que molecularmente pueda llegar a albergar ADN viral.

En el presente trabajo, se registró una marcada frecuencia de IMCO en CCEB y DPM VPH positivos. Todos los casos de CCEB -VPH positivo y un 82% de los casos de DPM-VPH positivo estuvieron asociados a IMCO, siendo en la mayoría de estos casos lesiones ubicadas en el borde de la lengua. Si bien no existe evidencia clínica sobre humanos al respecto, y sería dificultoso poder demostrarlo, un traumatismo agudo podría ser suficiente para facilitar el ingreso del virus a células basales expuestas al microambiente bucal. Sin embargo, la irritación mecánica como reactivador del virus latente, debería darse de forma más prolongada y persistente permitiendo la generación de un microambiente replicativo asociado a un aumento de la proliferación de células germinativas que albergan el ADN viral. Este mismo escenario fue planteado en la carcinogénesis del cuello de útero ligada al VPH [128].

En este trabajo, la frecuencia de VPH (por PCR) encontrado en CCEB fue del 18%, siendo los genotipos 16, 6 y 11 los de mayor prevalencia entre estos pacientes. El genotipo 16 fue el más frecuente de todos. Algunos estudios originarios de América del Sur (Chile y Colombia específicamente) informan tasas similares: 11% y 23%

respectivamente[474,475]. En un trabajo realizado en nuestro medio, Criscuolo y cols, informó un 42% de CCEB -VPH positivo (30/72) siendo el VPH16 el más frecuente[476]. En relación con los genotipos, el VPH16, en concordancia con la mayoría de los autores, fue el más frecuente. Es de destacar el hallazgo de CCEB asociados a genotipo 6 y 11, informados como de bajo riesgo. Este mismo hallazgo fue reportado por autores como Syrjänen y cols, los cuales destacaron que frente a la presencia de VPH de bajo riesgo en DPM y CCEB, estos genotipos no serían completamente benignos, más aún cuando se trata de carcinogénesis del epitelio de cabeza y cuello[130]. La multiplicidad de interacciones del VPH con otros factores de riesgo e inflamación crónica presentes en la mucosa bucal podría contemplar la posibilidad que el VPH de bajo riesgo pueda, bajo ciertas condiciones, comportarse de forma diferente. Las tasas de detección de VPH por PCR en CCEB, son muy diferentes entre las publicaciones, debido a distribución geográfica del virus, factores de riesgo diferentes entre las poblaciones estudiadas, mecanismos virales como la teoría del Hit & Run, técnica de obtención del material y la inclusión de casos en localizaciones orofaríngeas [465].

En la relación de la infección por VPH y otros factores de riesgo, Venezuela y cols describieron que los pacientes fumadores tenían tres veces más posibilidades de una infección por VPH [477]. Este riesgo incrementado estaría asociado a un aumento de la persistencia viral por disminución de células de Langerhans[478]. En un estudio realizado en la India se encontró un considerable porcentaje de CCEB asociados a VPH en pacientes residentes en zonas arsenicales, sugiriendo un vínculo entre estas condiciones y un posible sinergismo durante los procesos de carcinogénesis bucal[203,479]. En relación a lo anteriormente expuesto, en este trabajo se evidenció que los pacientes con DPM-VPH positivos, fueron frecuentemente fumadores, mientras que no se pudo obtener algún vínculo entre la presencia de VPH en aquellos pacientes provenientes de zonas arsenicales como en la experiencia de la India.

En el grupo de DPM, aún con signos histopatológicos y sospecha clínica de infección por VPH, solo 16 casos demostraron albergar ADN viral (PCR positiva). Algunos autores determinaron que, durante la infección por VPH de la mucosa bucal, existe menos cantidad de copias virales en comparación con la infección de la mucosa de cuello de útero. El mecanismo de “hit & run” propuesto por diferentes autores[480], sugiere que un virus puede infectar su órgano blanco, gatillar en el huésped una respuesta

inmunológica, actividad mutagénica y activación o silenciamiento de genes supresores de tumor o de reparación de ADN. De esta forma, las células pueden transformarse, independientemente a la presencia viral[481,482]. Este mecanismo, también descrito en la carcinogénesis mediada por VPH, podría explicar que las tasas de detección viral sean más altas en los DPM que en el CCEB.

La ventaja por la cual PCR es la técnica de detección mayormente utilizada para la búsqueda de ADN viral en DPM y CCEB, es la alta sensibilidad. Sin embargo, esta técnica se remite a detectar solo el genoma viral, pudiendo ser biológicamente intrascendente a la carcinogénesis. Las ventajas del uso de p16 para estudiar la infección por VPH, se basa en la evidencia que avala a la sobreexpresión de esta proteína como un marcador alternativo de una infección por VPH biológicamente relevante, aunque menos específico [483,484]. La utilización simultánea de dos técnicas de detección de VPH podría permitir un mejor análisis de los resultados. Weinberger y cols, clasificaron en cuatro grupos: Grupo I: VPH- / p16-, Grupo II: VPH+ / p16-, Grupo III: VPH+/p16+, Grupo IV: VPH- / p16+[483,485]. Esta última clasificación fue utilizada en este trabajo para subdividir al grupo de DPM, observando que el 50% de las lesiones de DPM fueron VPH-/p16- y solo un 13% de los casos fueron VPH+/p16+. La expresión de p16 y VPH+ se asoció a lesiones de cara ventral de lengua y a mujeres sin otros factores de riesgo. En consonancia con Woo y cols, la localización fue similar, no así el género[148].

Biomarcadores

Citoqueratinas

Desde hace más de tres décadas las citoqueratinas han sido utilizadas como marcadores de integridad, estabilidad y diferenciación del epitelio, y en condiciones patológicas la expresión de sus 20 subtipos pueden ser modificados permitiendo identificar cambios en el epitelio afectado[486]. En este estudio, cuyo objetivo principal estuvo centrado en identificar marcadores de diferenciación y proliferación celular, se seleccionaron como marcadores a las **Cks 5, 6 y 19**. La elección de estas se realizó a través de una búsqueda en la literatura científica identificando Cks con potencial implicancia clínica, y que pudieran ser indicadoras de cambios tempranos de malignidad. La expresión de Ck19 en estratos suprabasales de mucosa bucal se correlaciona con cambios displásicos premalignos; sin embargo su significancia clínica para detección de

CCEB no ha sido confirmada aún[487]. La Ck 5 ha sido identificada como un marcador diagnóstico de carcinomas; igualmente que la Ck 6; que presenta una inmunexpresión fuerte en CCEB de diferentes sitios anatómicos. Es por eso, que Ck5/6 son utilizados como marcadores de carcinomas escamosos[488].

La detección de Ck19 en CCEB y DPM respondería a la presencia de células inmaduras y por lo tanto, algunos autores la consideran un marcador de SC epiteliales *in vivo* e *in vitro*[398,400–402], como también un biomarcador de carcinogénesis bucal temprana[399] ya que fue detectado en estratos suprabasales de lesiones displásicas y en cánceres ya establecidos. Kale y cols, encontró una expresión suprabasal de Ck19 en mucosa clínicamente normal adyacente a CCEB, sugiriendo que Ck19 podría estar asociada a la cancerización de campo, reflejando no solo un estado hiperproliferativo, sino un marcador asociado a premalignidad [489]. Es por eso que las muestras de pacientes con CCEB. fueron las únicas que evidenciaron scores altos de **Ck19**. Esto también pudo ser observado por Safadi y cols [490]. Un estudio realizado en carcinomas bucales y orofaríngeos mostró una relación directa entre el aumento de la expresión de Ck19 y estadios tumorales más avanzados, así como también con mayor profundidad de invasión tumoral. Además, los scores más altos de Ck19, estuvieron asociados a la presencia de DEO adyacente al tumor [486]. En otra investigación, en carcinomas de células escamosas en lengua, la inmunomarcación positiva de Ck19 se observó relacionada a una peor tasa de supervivencia en comparación con los tumores negativos a Ck19[491]. Asimismo, otras investigaciones han mostrado que un aumento en la inmunexpresión de Ck19 estaba relacionada a CCEB semi o indiferenciados, sugiriendo un peor pronóstico[492].

Cuando se compararon los grados de inmunomarcación entre los diferentes grupos de estudio, la expresión de Ck19 observada en CCEB correspondió con *scores* medianos y altos y se localizó en los estratos suprabasales. Contrariamente, los *scores* fueron significativamente menores en el grupo de DPM. Esta diferencia se debería principalmente a la escasa presencia de lesiones displásicas severas y/o moderadas en el grupo de DPM ya que la expresión de Ck19 aumenta en relación al grado de displasia [402,405,487,493,494].

Es relevante destacar que la mayoría de los casos de DPM Ck19 positivos con scores medianos, estuvieron asociados a infección por VPH. Algunos estudios han

encontrado resultados similares, sugiriendo que este vínculo podría estar mediado por un mecanismo de immortalización de queratinocitos (células más indiferenciadas) que ejerce el virus sobre las células epiteliales infectadas. Santoro y cols, encontró patrones suprabasales de Ck19 en áreas peritumorales asociadas a infección con VPH, similares a los patrones encontrados en los pacientes de este trabajo del grupo de DPM-VPH-Ck19 positivos. Además, Ck19 cuando aparece en estratos suprabasales sugiere una demora en el proceso de diferenciación terminal, probablemente indicando un estado hiperproliferativo y la adquisición de cambios premalignos[493,495]. Este status per se de mayor recambio celular de la mucosa bucal, al igual que en la mucosa del cuello de útero, estaría asociado a la exposición frecuente a irritaciones y fricciones locales. Kellokoski y cols observaron una asociación entre tumores bucales asociados a VPH y Ck19 [496].

En relación con el **patrón inmunohistoquímico de Ck19** en niveles suprabasales de UTC con *scores* medianos, similares a los observados en el grupo de CCEB, podría estar asociado a la migración de células inmaduras con un fenotipo proliferativo similar a los patrones observados en el grupo de CCEB. La fase de cicatrización de una injuria crónica involucra la migración y la generación de un estado hiperproliferativo de los queratinocitos en los márgenes de la herida, que conlleva finalmente al cubrimiento total de la región dañada con un epitelio sano. La reepitelización en heridas crónicas, involucra procesos similares a los que se suscitan durante la embriogénesis humana, donde las células epiteliales adquieren un estado hiperproliferativo para migrar hacia la zona dañada y así lograr la cicatrización[258]. Este mecanismo también pudo evidenciarse de manera exagerada e incontrolada en el desarrollo de algunos carcinomas [497]. Si bien las SC se encuentran presentes durante la autorrenovación epitelial, estas células podrían ser el blanco de carcinógenos ambientales llevando a la acumulación de cambios genéticos, pudiendo generarse condiciones que alteren las vías biológicas de regulación de esta renovación[407].

Las SC son necesarias para comenzar cualquier proceso cicatrizal y Ck19 ha sido previamente propuesta como un marcador, aunque inespecífico, de SC[401,498], estudiada en relación a lesiones de CCEB [408], DPM y DEO [402–405]. En un estudio de SC utilizando como marcador CD44, se encontró que las células xenoimplantadas en lenguas de animales provenientes de cultivos celulares de CCEB CD44 positivos,

tuvieron una marcada inmunomarcación con Ck19, sugiriendo su empleo como marcador de SCC[406].

La Ck5 es parte del citoesqueleto de células basales normales de la mucosa bucal, y que a medida que se va diferenciando, va modificando el componente del citoesqueleto a citoqueratinas con otro peso molecular y en consecuencia distintas a Ck5. En este trabajo, fue relevante encontrar a niveles suprabasales, células que expresan Ck5/6 en las tres patologías, reflejando el grado de alteración de la diferenciación de los epitelios. Además, se encontraron discrepancias marcadas en el mismo grupo de CCEB, cuando se comparó la expresión de Ck19 y Ck5/6 entre CCEB clásicos y CV. Esta diferencia significativa de inmunoexpresión de Cks 19-5/6, permitió destacar la naturaleza de considerar al CV como una variante absolutamente diferenciada del CCEB. Estos hallazgos coinciden con otros trabajos como el de Frohwitter y cols [499]. Estos autores sugieren la presencia de dos patrones de marcación de Cks diferentes del CCEB: de bajo peso molecular (Ck19) y de alto peso molecular (Ck5/6). Ellos observaron que los tumores Ck19 positivos, eran más indiferenciados, hipóxicos y con un alto grado de desregulación del ciclo celular, mientras que los Ck5/6 positivos, eran más diferenciados, escasamente hipóxicos y con bajo grado de desregulación del ciclo celular[499]. Los resultados de la inmunoexpresión de este marcador permitieron advertir que la sobreexpresión evidenciada en la mayoría de los grupos está en consonancia con la marcada alteración en la diferenciación epitelial de la mucosa bucal cuando está asociada con cambios de premalignidad o malignidad.

En el grupo de UTC, el 50% de los casos mostraron *scores* medianos y altos de Ck5/6 y en algunos casos se observaron células en estratos suprabasales y superficiales positivas. Teniendo en cuenta que las células mitóticamente activas del estrato basal o germinativo presentan marcación incrementada de Ck5, podría sugerirse que esta expresión observada en los estratos suprabasales de los bordes de las UTC, podría asociarse a la migración de queratinocitos en un contexto de reparación y cicatrización. La mayoría de los casos de UTC Ck5/6 positivas también fueron Ck19 positivas, por lo que, en esa migración de células basales con función posiblemente reparativa del daño, también pueden estar incluidas células más indiferenciadas que expresan Ck19, quizás SC. Este patrón epitelial de alteración en la distribución normal de citoqueratinas en un epitelio sometido a IMCO, refleja el grado de alteración en la diferenciación epitelial.

Ki67

Ki67 es el marcador de elección para proliferación, ya que su expresión nuclear durante el ciclo celular representa una ventaja como marcador biológico de la actividad mitótica[412,415]. Ki67 es utilizado como un marcador predictivo en el monitoreo de DPM ya que destaca a las células activamente implicadas en fenómenos proliferativos [416,500]. Este marcador de proliferación ha demostrado ser identificador de progresión de malignización en pacientes con CCEB o DPM. El aumento del índice proliferativo y la distribución de dichas células dentro del tejido, pueden revelar algunos mecanismos regulatorios que se desequilibran durante la carcinogénesis[413]. También Ki67 ha sido ampliamente utilizado en diferentes investigaciones para evaluar el grado de proliferación epitelial en displasias epiteliales bucales y CCEB [501,502].

Los queratinocitos basales de la mucosa bucal son capaces de migrar y regenerar el epitelio después de una lesión, y en normalidad, son positivos para algunos marcadores de proliferación epitelial. Dicha proliferación incluye SC asociadas a la cicatrización de heridas epiteliales[410]. El aumento de la proliferación celular generada por IMCO, podría ser uno de los tantos mecanismos que vinculan la inflamación crónica y el cáncer[411]. Nuestras observaciones determinaron que los *scores bajos* de Ki67 predominaron en el grupo de UTC (81%), mientras que los *scores medios* se mostraron con mayor porcentaje en el grupo de CCEB (61% de los tumores) y en el grupo de DPM (57,9%). Contrariamente solo el 18% de las UTC mostraron un score medio de inmunomarcación con Ki67. En el presente trabajo, solo el grupo de CCEB mostró los *scores* más altos de Ki67, y el grupo de DPM, presentó más de la mitad de las inmunomarcaciones Ki67 con scores medianos y similares al CCEB. En la mayoría de los casos de DPM Ck19 positivo, pudo observarse ese patrón proliferativo suprabasal (Ki67 positivo) y una correlación con la forma clínica.

En relación con otros DPM, los diferentes trabajos concuerdan con un aumento de Ki67 en LPB[418], leucoplasias[413,416] y lesiones displásicas[503]. Kövesi y Szende reportaron en su estudio que a medida que el aspecto clínico de leucoplasias se agravaba, también se registraba un aumento de la marcación de Ki67[504]. En el trabajo de Mandal y cols [505], la única variable clínica que tuvo correlación estadísticamente significativa con un aumento del índice de Ki67 fue el consumo de tabaco, mientras que la edad, el género, la localización, el tamaño de la lesión, y la clínica no tuvieron

correlación estadística con las tasas de proliferación celular [505]. Dwivedi y cols, en consonancia con los resultados de Takeda y cols, reportó que las células que proliferan en lesiones displásicas evaluadas con Ki67, se encuentran principalmente en los estratos parabasales más que en los basales, pudiendo ser células derivadas de SC presentes en epitelios normales, que hayan experimentado fenómenos de divisiones celulares asimétricas. Los hallazgos de Dwivedi y cols, demostraron que las marcaciones de Ki67 se distribuyeron en estratos suprabasales en concordancia con la gravedad de las lesiones. Estos hallazgos, permitieron hipotetizar que existiría un pool de células parabasales altamente proliferativas con capacidad de dar origen a subclones celulares con capacidad invasiva y que el aumento de la proliferación de estas células sería importante en la generación de un nicho precanceroso tumorigénico[503]. En este trabajo el aumento de Ki67 en estratos suprabasales y en concordancia, el aumento de los scores de proliferación celular en el grupo de DPM, estuvieron correlacionados a la severidad de la lesión clínica.

Existen trabajos que evaluaron índices proliferativos mediante la utilización de Ki67 en la FOS, condición de precáncer prevalente en la India[506,507]. Independientemente del contenido carcinogénico de los productos masticados (nuez de betel) durante el hábito, la IMCO que se genera, fue indicada como otro posible mecanismo carcinogénico[459,508]. En el trabajo de Ranganathan, la expresión de Ki67 fue significativamente mayor en FOS que en la mucosa normal, pero menor que en CCEB, similar a lo informado por otros autores cuando evaluaron otros DPM[509] y a los resultados de este trabajo.

En el grupo de UTC, Ki67 fue expresado con scores medios en casi el 20%, siendo los scores bajos los más frecuentes. Es esperable encontrar aumento de la proliferación celular en los márgenes de un tejido dañado en proceso de reepitelización y cicatrización. Sin embargo, estos hallazgos en relación con la evidencia disponible demostraron la presencia un patrón suprabasal de células Ki67/Ck19 positivas en los márgenes de aquellas UTC sin tendencia a la cicatrización. La expresión aumentada de estos biomarcadores, aun habiendo eliminado previamente los estímulos mecánicos que generaron las lesiones, podrían estar asociada a mecanismos exagerados de replicación celular y reepitelización en respuesta a un evento traumático y la consecuente instalación de un microambiente inflamatorio persistente e incontrolado o incluso una alteración en los mecanismos de autolimitación del daño. Algunos de estos eventos descriptos en

situaciones de cicatrización (angiogénesis, fibrogénesis, etc) son similares a los observados en procesos neoplásicos [258]. El hallazgo de este perfil proliferativo en UTC sin cicatrizar, fue también reportado en estudios experimentales, donde destacaron que la UTC podría reunir los requerimientos para actuar como cofactor promotor de la transformación maligna [152,239].

Es relevante, la correlación positiva entre las Ck19 y Ck5/6 (CS=0,57; p=0,0136) en las muestras de pacientes con CCEB; y correlaciones positivas entre las Cks entre sí y con Ki67 en las muestras de pacientes con UTC. Este patrón inmunohistoquímico podría reflejar mecanismos moleculares de una replicación celular exagerada en un contexto de inflamación crónica persistente e inmadurez epitelial. Aunque este trabajo no incluyó marcadores de inflamación crónica y stress oxidativo, algunos estudios demostraron correlación entre la intensidad de la respuesta inflamatoria y el desarrollo de CCEB, encontrando intensa inmunomarcación de áreas de CCEB con un proceso inflamatorio peritumoral[412].

En un reciente trabajo de revisión de DEO, Müller reportó que el tejido epitelial hiperplásico e inflamado en los bordes de UTC, puede mostrar atipías reactivas, difíciles de diferenciar de “atipías verdaderas” aunque la autora enfatizó la escasez de trabajos que aborden este tema [238]. Ki67 y Ck19 podrían ser utilizados inicialmente para evaluar la severidad de estos hallazgos histológicos en los bordes de úlceras sin tendencia a la cicatrización ya que pueden generarse dificultades a la hora de interpretar atipías reactivas o verdaderas en tejidos intensamente sometidos a estímulos inflamatorios. Además, recientemente Safadi, indicó que Ck19 podría ser un marcador de utilidad para disminuir la discrepancia interobservador en el diagnóstico de displasias de alto y de bajo grado[510].

Inmunomarcación y condiciones clínicas

La mayoría de las UTC que mostraron los scores más altos de Ck19, se ubicaron en el borde de la lengua y en relación con un factor traumático dentario y funcional. En todos estos casos, además se encontró un patrón suprabasal de Ki67. Estos datos, nos llevan a proponer y relacionar dos postulados, vinculados a la frecuencia de CCEB en el borde de la lengua:

- a) El primero de ellos justifica la prevalencia de CCEB en el borde de lengua debido a un estado hiperproliferativo *per sé* que presenta esta región en condiciones normales.

A propósito, el piso de boca, la cara ventral y el borde de la lengua han sido reportados como los sitios que fisiológicamente tienen mayor tasa proliferativa y períodos prolongados de replicación de ADN[511] y que además, en ausencia de queratina, podrían tener mayor permeabilidad a los productos carcinogénicos del tabaco y el alcohol. Otra teoría que apoya una condición predisponente del borde de la lengua, sería considerarlo como un *epitelio o zona de transición (ZT)*. En 1990, Andersen y cols, publicaron un estudio descriptivo de la lengua en relación a la leucoplasia vellosa por el VEB y determinaron hallazgos macro y microscópicos de la cara dorsal y ventral de la superficie lingual. En el mismo estudio, explicaron que los bordes de la lengua presentan características propias y diferenciales al dorso y a la cara ventral y en consecuencia constituiría un *epitelio o zona de transición (ZT)*[512]. Las zonas de transición en los humanos son definidas como la unión de dos epitelios diferentes. Por ejemplo, la unión entre el esófago y el estómago, la unión entre el estómago y el duodeno, la unión ileocecal, la unión del endocérvix y el ectocérvix, la córnea y la conjuntiva ocular y la unión entre el canal anal y el recto[513]. Las ZT son sitios que presentan condiciones que facilitan la instalación de procesos neoplásicos. Los epitelios escamosos estratificados poseen más reservas de SC con capacidad regenerativa del tejido dañado debido a una actividad celular incrementada. El microambiente en el que está inserto una ZT es importante, ya que puede condicionar la regulación del crecimiento celular y controlar la diferenciación celular[514]. El epitelio de las ZT naturalmente tendría las mismas características que se encuentran en una epidermis afectada por una herida, por lo que fisiológicamente estas áreas transicionales se encuentran en continua desregulación homeostática[515]. Para otros autores, las ZT representan un epitelio prelesional debido a la variedad de señales presentes en el sitio donde dos epitelios diferentes se unen. Por último, constituirían un nicho de SC con capacidad de autorrenovación y de dar lugar a células amplificadoras que actúan como progenitoras para la reparación de daños y mantenimiento epitelial. La presencia de SC en un lugar frecuentemente asociado a tumores sugiere que las ZT podrían ser un blanco de stress microambiental (VPH, inflamación, carcinógenos químicos, etc). Este estado natural de mayor vulnerabilidad, podría llevar a la acumulación de cambios genéticos desencadenando transformación celular[513]. Aunque todavía no exista evidencia científica del borde de la lengua como una ZT en relación a la evidencia disponible para otras áreas anatómicas mencionadas anteriormente, en un estudio reciente, se encontró que CD44, un marcador

de SC, se expresó en mucosa sana de borde de lengua próximo a tumores, sugiriendo que el borde de la lengua podría albergar nichos de SC descritos en otras ZT[516]. Todas estas investigaciones justificarían la alta frecuencia de CCEB en el borde de la lengua.

b) El segundo supuesto, y en relación con diversos trabajos, la frecuencia de CCEB en borde de la lengua podría estar asociada a la relación de cercanía anatómica que existe con las arcadas dentarias y en consecuencia con la IMCO. La incidencia de CCEB en el borde de la lengua, asociado o no a otros factores de riesgo, estaría vinculada a la proximidad con superficies dentarias y al trauma dental crónico [46,456]. Para Lazos y cols, la presencia de hábitos parafuncionales asociados a IMCO como la interposición lingual explicaría también porqué el borde de la lengua es el sitio más prevalente de CCEB [241]. En un trabajo iraní, se encontró que el 100% de las UTC se encontraron en el borde de la lengua, así como también fue el sitio de mayor prevalencia de CCEB, sugiriendo por un lado el vínculo entre estas variables (IMCO, UTC y CCEB) y la consideración de esta región como un sitio de riesgo[517]. A su vez, en un reciente metaanálisis se destacó que las leucoplasias que más transformación carcinomatosa mostraron fueron aquellas ubicadas en el borde de la lengua en comparación con las de otras localizaciones. Esta mayor tasa de transformación de leucoplasias en este sitio, estaría asociada a la presencia de IMCO la cual generaría un incremento en la tasa de recambio celular[518].

Los resultados de este trabajo permiten considerar que estas dos teorías de la frecuente localización de CCEB en borde de la lengua, lejos de ser antagónicas son absolutamente complementarias. La presencia de inmunomarcación intensa con Ck19 en UTC en pacientes con o sin otros factores de riesgo, es un hallazgo, hasta el momento no estudiado en la literatura. IMCO podría actuar como un estímulo de proliferación de células inmaduras, con características fenotípicas de SC, en un sitio donde en condiciones normales ya exista *per se*, un estado replicativo aumentado.

La presencia de scores medianos de Ck19/Ki67 suprabasal en un grupo de UTC ubicadas en el borde de la lengua, sin tendencia a cicatrizar y con similitudes al patrón encontrado en CCEB estaría en relación con lo expresado en 2018 por Panta y cols. Este grupo de la India propuso que las mutaciones al azar tienden a aumentar frente a la replicación de SC y que, en la lengua, existe un compartimento activo de SC donde fisiológicamente hay mayor turnover que en otros subsitios. La IMCO de baja intensidad puede iniciar la proliferación de este compartimento[250]. A su vez, la inestabilidad

genómica de SC en este sitio podría estar condicionada por otros productos carcinogénicos provenientes del consumo de tabaco y alcohol o ROS asociada a inflamación crónica.

En resumen, partiendo de un concepto multifactorial de CCEB, la frecuencia de carcinomas de borde de la lengua podría deberse al sinergismo existente entre estos postulados: la presencia en condiciones de normalidad de un nicho de SC en el borde de la lengua, su estado natural hiper replicativo y la proximidad anatómica a diferentes fuentes de IMCO.

En el vínculo fisiopatogénico de IMCO como modificador de la historia natural de la infección por VPH es importante el análisis de los siguientes hallazgos. Algunos trabajos mostraron que el VPH tiene capacidad de infectar células suprabasales y queratinocitos del estrato espinoso ya diferenciados. En estos casos, la infección es solo transitoria ya que por sus características estas células se descaman fisiológicamente[519]. Este estudio permitió encontrar células inmaduras (conocidas por ser blancos del VPH)[409], Ck19 positivas ligadas a IMCO en estratos suprabasales. El análisis de las variables clínicas sobre IMCO y VPH permitió establecer que el 100% de los CCEB - VPH+ y el 80% de los DPM-VPH+ estuvieron asociados a IMCO explicando el vínculo anteriormente descrito. Sin embargo, la baja frecuencia de scores de Ck19 en DPM no permitió reflejar esta relación mediante los marcadores inmunohistoquímicos. Esta observación sugiere que existen otras variables no registradas en este trabajo, que podrían estar interviniendo en la infección bucal por VPH. Tezal propuso que luego de un evento traumático que resulta ser facilitador para el acceso del virus hacia los estratos basales, la presencia de un microambiente asociado a la liberación de citoquinas inflamatorias jugaría un rol clave para la persistencia del virus. La evidencia actual determinó que algunas bacterias periodontales pueden viajar por medio de la saliva, desde los tejidos afectados, generando injuria tisular en sitios distantes y de esta forma promover condiciones permisivas a la infección por VPH[520–522]. En los trabajos que abordan el estudio de la biología de la infección por VPH de la mucosa bucal, además de registrarse la presencia de IMCO, deberían utilizarse variables periodontales con el fin de evaluar el microbioma bucal y su papel en la infección por VPH.

Las principales limitaciones de este trabajo están asociadas a las restricciones éticas que implica cualquier trabajo que aborde trauma dentario (IMCO) en humanos y su relación con CCEB y precáncer. No sería concebible dejar factores traumáticos asociados a una lesión estomatológica, solo para estudiar su evolución. Cuando el factor causal de una lesión traumática es eliminado, las lesiones tienden a cicatrizar suprimiendo las señales inflamatorias y otras condiciones asociadas a la carcinogénesis bucal. Es por eso, que existen trabajos que abordan la UTC como factor promotor de la carcinogénesis multietápica en animales de experimentación. Estos estudios tratan de recrear los mecanismos fisiopatogénicos implicados y dan un sustento biológico a los resultados de los trabajos epidemiológicos[179].

En este trabajo, la eliminación de los agentes irritativos asociados a la patogenia de la UTC en los diferentes casos, llevaron a la curación de más de la mitad de los pacientes de este grupo, imposibilitando el análisis inmunohistoquímico de esos casos. Además, la intervención terapéutica podría haber modificado parcialmente el estado genuino e inicial del tejido y en consecuencia modificar la inmunoexpresión de los marcadores celulares de las UTC biopsiadas.

CONCLUSIONES

- Los patrones obtenidos mediante el análisis de los scores de inmunomarcación de los biomarcadores celulares, permitieron evidenciar alteraciones en la diferenciación y proliferación los bordes epiteliales de úlceras crónicas asociadas a un agente traumatizante y sin tendencia a la curación, aún con una intervención terapéutica previa. El CCEB y una parte de los DPM estudiados, mostraron patrones inmunohistoquímicos similares. La alteración de la diferenciación celular y el establecimiento de un microambiente proliferativo en UTC serían dos eventos importantes en la carcinogénesis bucal, siendo aún de mayor relevancia si se considera que éstos se generan en un contexto de inflamación crónica.
- Los casos de mayor expresión de los marcadores estudiados estuvieron asociados a lesiones ubicadas en el borde de la lengua, por lo que debe ser un sitio rutinariamente examinado por profesionales del área. Además, los resultados del presente estudio destacan la consideración del borde de la lengua como un sitio de alto riesgo de CCEB.
- La asociación clínica entre IMCO y VPH fue registrada en CCEB y DPM, por lo cual IMCO podría ser una condición facilitadora de la persistencia del VPH en la cavidad bucal. Además, la presencia de IMCO debería ser siempre registrada en cualquier trabajo de investigación que aborde CCEB, DPM e infección por VPH.
- El presente trabajo es el primer estudio de biomarcadores celulares en UTC vinculables con el proceso multifactorial y multietápico de la carcinogénesis bucal. En este contexto, un epitelio inmaduro e hiperproliferativo de una úlcera sin tendencia a la curación, podría ser un escenario indicativo de cambios neoplásicos tempranos. Sin embargo, se deben realizar más estudios que aborden el rol de IMCO en la carcinogénesis bucal para considerar la posibilidad de incluir a la UTC como un DPM. Los hallazgos aquí obtenidos, podrían ser el punto de partida de diferentes trabajos que investiguen los mecanismos fisiopatogénicos que podrían vincular a la IMCO y el desarrollo de CCEB.

Perspectivas futuras

Los resultados de este trabajo permiten establecer pautas iniciales para investigaciones futuras que aborden el rol de IMCO en la carcinogénesis bucal. El rol de la investigación clínica y su articulación con los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos obtenidos es fundamental cuando se abordan mecanismos patogénicos tan complejos y dinámicos como es IMCO.

La investigación de UTC mediante bloques celulares (obtenidos de células mediante frotis o raspado para luego ser incluidas en parafina), podrían ser alternativas de investigación no invasivas en estas condiciones patológicas. A partir de ellas, se podrían desarrollar estudios con otros biomarcadores de riesgo implicados en la carcinogénesis bucal. La obtención de material biológico mediante técnicas no invasivas permitiría obtener el material en la primer sesión, reflejando el estado genuino de los marcadores.

El estudio de la relación entre IMCO y VPH en el contexto de la carcinogénesis bucal, debe seguir generando aportes ya que son dos factores de riesgo emergentes. Su investigación permitirá promover medidas preventivas de mantenimiento de la salud bucal en la población, sobre todo en pacientes jóvenes. Por un lado, el control profesional de las fuentes de inflamación crónica presentes en la mucosa bucal, minimizarían el riesgo de la instalación de una infección viral persistente.

La generación de mayor evidencia científica y su utilización en la docencia de grado y posgrado permitirá mejorar la capacitación de profesionales en la detección precoz de DPM y CCEB. Además, podría enriquecer la confección de protocolos de seguimiento y diagnóstico temprano de DPM y CCEB y la posibilidad de intervenciones tempranas en el control de las fuentes de IMCO y la prevención de patologías asociadas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Brunotto M, Zarate AM. [Predictive models for complex diseases]. *Rev Fac Cienc Medicas Cordoba Argent* 2012;69:33–41.
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- [3] Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.06.001>.
- [4] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [5] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309–16. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>.
- [6] Cheong SC, Vatanasapt P, Yi-Hsin Y, Zain RB, Kerr AR, Johnson NW. Oral cancer in South East Asia: Current status and future directions. *Transl Res Oral Oncol* 2017;2:2057178X1770292. <https://doi.org/10.1177/2057178X17702921>.
- [7] Curado MP, Johnson NW, Kerr AR, Silva DRM e, Lanfranchi H, Pereira DL, et al. Oral and oropharynx cancer in South America: Incidence, mortality trends and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Transl Res Oral Oncol* 2016;1:2057178X1665376. <https://doi.org/10.1177/2057178X16653761>.
- [8] Ministerio de Salud, Gobierno de la Provincia de Córdoba. Registro de Tumores. Cáncer: Incidencia y Mortalidad en Córdoba. 2004-2013. Provincia de Córdoba 2017.
- [9] Hollows P, McAndrew PG, Perini MG. Delays in the referral and treatment of oral squamous cell carcinoma. *Br Dent J* 2000;188:262–5.
- [10] Morelato RA, Herrera MC, Fernández EN, Corball AG, López de Blanc SA. Diagnostic delay of oral squamous cell carcinoma in two diagnosis centers in Córdoba Argentina. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2007;36:405–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00547.x>.
- [11] Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 2008;87:14–32.
- [12] Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol* 2011;2011:603740. <https://doi.org/10.1155/2011/603740>.
- [13] Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol MP* 2000;53:165–72.
- [14] Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:776–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0334858100>.
- [15] Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001;345:1890–900. <https://doi.org/10.1056/NEJMra001375>.
- [16] Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent* 2002;9:369–78. <https://doi.org/10.1177/107327480200900502>.

- [17] Wang SS, Samet JM. Tobacco smoking and cancer: the promise of molecular epidemiology. *Salud Publica Mex* 1997;39:331–45.
- [18] Dey P. Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. *J Clin Pathol* 2004;57:1245–9. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.018952>.
- [19] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
- [20] Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:11884–94.
- [21] Panta, P. Oral cancer detection: novel strategies and clinical impact. 2019.
- [22] Farah CS, Kujan O. Chapter 3 Oral Carcinogenesis and Malignant Transformation. *Premalig. Cond. Oral Cavity*, 2019.
- [23] Martin CL, Reshmi SC, Ried T, Gottberg W, Wilson JW, Reddy JK, et al. Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma. Examination of 31 cell lines and review of the literature. *Oral Oncol* 2008;44:369–82. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.05.003>.
- [24] van Oijen MG, Slootweg PJ. Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2000;9:249–56.
- [25] Thomson PJ. Field change and oral cancer: new evidence for widespread carcinogenesis? *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:262–6. <https://doi.org/10.1054/ijom.2002.0220>.
- [26] Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963–8.
- [27] Thode C, Bilde A, Von Buchwald C, Dabelsteen E. TP53 mutations in clinically normal mucosa adjacent to oral carcinomas. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2010;39:662–6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00916.x>.
- [28] Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003;63:1727–30.
- [29] Simple, M, Amritha Suresh, Debashish Das, Moni Kuriakose. Cancer stem cells and field cancerization of Oral squamous cell carcinoma - ScienceDirect. *Oral Oncol* 2015;51:643–51.
- [30] Major AG, Pitty LP, Farah CS. Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem Cells Int* 2013;2013:319489. <https://doi.org/10.1155/2013/319489>.
- [31] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:973–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610117104>.
- [32] González-Moles MA, Scully C, Ruiz-Ávila I, Plaza-Campillo JJ. The cancer stem cell hypothesis applied to oral carcinoma. *Oral Oncol* 2013;49:738–46. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.04.002>.
- [33] Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. *Cancer Res* 2006;66:1883–90. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3153>.
- [34] Shakib K, Schrattenholz A, Soskic V. Stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2011;49:503–6. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2010.07.016>.

- [35] Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:4827–33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3557>.
- [36] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106–10. <https://doi.org/10.1038/nature05372>.
- [37] Sell S, Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 1994;70:6–22.
- [38] Rodini CO, Lopes NM, Lara VS, Mackenzie IC. Oral cancer stem cells - properties and consequences. *J Appl Oral Sci* 2017;25:708–15. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0665>.
- [39] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Conference IA for R on C, World Health Organization, editors. *A review of human carcinogens*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012.
- [40] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Place of Publication Not Identified: International Agency for Research on Cancer; 2013.
- [41] Radoi L, Luce D. A review of risk factors for oral cavity cancer: the importance of a standardized case definition. *Community Dent Oral Epidemiol* 2013;41:97–109, e78-91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2012.00710.x>.
- [42] Mills CA, Porter MM. Tobacco Smoking Habits and Cancer of the Mouth and Respiratory System. *Cancer Res* 1950;10:539–42.
- [43] Moore GE, Bissinger LL, Proehl EC. Tobacco and intra-oral cancer. *Surg Forum* 1953:685–8.
- [44] Silverman S, Griffith M. Smoking Characteristics of Patients with Oral Carcinoma and the Risk for Second Oral Primary Carcinoma. *J Am Dent Assoc* 1972;85:637–40. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1972.0363>.
- [45] Bastiaan RJ, Reade PC. The effects of tobacco smoking on oral and dental tissues*. *Aust Dent J* 1976;21:308–15. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1976.tb01038.x>.
- [46] Perry BJ, Zammit AP, Lewandowski AW, Bashford JJ, Dragovic AS, Perry EJ, et al. Sites of origin of oral cavity cancer in nonsmokers vs smokers: possible evidence of dental trauma carcinogenesis and its importance compared with human papillomavirus. *JAMA Otolaryngol-- Head Neck Surg* 2015;141:5–11. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2014.2620>.
- [47] Sujatha D, Hebbar PB, Pai A. Prevalence and correlation of oral lesions among tobacco smokers, tobacco chewers, areca nut and alcohol users. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2012;13:1633–7.
- [48] Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2001;2:239–51. <https://doi.org/10.2165/00128071-200102040-00005>.
- [49] Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther* 2016;12:458–63. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.186696>.
- [50] Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. *Br Dent J* 2009;207:471–5. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2009.1009>.
- [51] Piemonte ED. *Cancer bucal: diseño y evaluación de un índice de riesgo multifactorial*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba. 2015.

- [52] Negri E, La Vecchia C, Franceschi S, Tavani A. Attributable risk for oral cancer in northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 1993;2:189–93.
- [53] Silverman S. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* 1939 2001;132 Suppl:7S-11S.
- [54] Hernández-Guerrero J-C, Jacinto-Alemán L-F, Jiménez-Farfán M-D, Macario-Hernández A, Hernández-Flores F, Alcántara-Vázquez A. Prevalence trends of oral squamous cell carcinoma. Mexico City's General Hospital experience. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal* 2013;18:e306-311.
- [55] Pires FR, Ramos AB, Oliveira JBC de, Tavares AS, Luz PSR da, Santos TCRB dos. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci Rev FOB* 2013;21:460–7. <https://doi.org/10.1590/1679-775720130317>.
- [56] Sheno R, Devrukhkar V, Chaudhuri, Sharma BK, Sapre SB, Chikhale A. Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma patients: a retrospective study. *Indian J Cancer* 2012;49:21–6. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.98910>.
- [57] Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-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;36:170–4.
- [58] Lansdorp PM. Major cutbacks at chromosome ends. *Trends Biochem Sci* 2005;30:388–95. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.05.004>.
- [59] Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5258–65.
- [60] Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol* 2004;40:304–13.
- [61] El-Mofty Sk. Histopathologic risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma variants: An update with special reference to HPV-related carcinomas. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal* 2014:e377–85. <https://doi.org/10.4317/medoral.20184>.
- [62] Syrjänen S, Rautava J, Syrjänen K. HPV in Head and Neck Cancer—30 Years of History. In: Golusiński W, Leemans CR, Dietz A, editors. *HPV Infect. Head Neck Cancer*, vol. 206, Cham: Springer International Publishing; 2017, p. 3–25. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43580-0_1.
- [63] Liu X, Gao X, Liang X, Tang Y. The etiologic spectrum of head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oncotarget* 2016;7:66226–38. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11265>.
- [64] Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008;26:612–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.1713>.
- [65] Deschler DG, Richmon JD, Khariwala SS, Ferris RL, Wang MB. The “new” head and neck cancer patient—young, nonsmoker, nondrinker, and HPV positive: evaluation. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg* 2014;151:375–80. <https://doi.org/10.1177/0194599814538605>.

- [66] 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.
- [67] Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk J, Bardin-Mikolajczak A, et al. Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP* 2003;12:25–33. <https://doi.org/10.1097/01.cej.0000043735.13672.78>.
- [68] Zheng T, Holford T, Chen Y, Jiang P, Zhang B, Boyle P. Risk of tongue cancer associated with tobacco smoking and alcohol consumption: a case-control study. *Oral Oncol* 1997;33:82–5.
- [69] Talamini R, Vaccarella S, Barbone F, Tavani A, La Vecchia C, Herrero R, et al. Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *Br J Cancer* 2000;83:1238–42. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1398>.
- [70] Marshall JR, Graham S, Haughey BP, Shedd D, O’Shea R, Brasure J, et al. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B:9–15.
- [71] Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, et al. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol* 2004;40:207–13.
- [72] Husgafvel-Pursiainen K. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutat Res* 2004;567:427–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.06.004>.
- [73] Rubin H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 2001;22:1903–30.
- [74] Tobacco addiction: implications for treatment and cancer prevention. - PubMed - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414173> (accessed May 1, 2019).
- [75] Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000;36:256–63.
- [76] Warnakulasuriya K a. a. S, Ralhan R. Clinical, pathological, cellular and molecular lesions caused by oral smokeless tobacco--a review. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2007;36:63–77. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00496.x>.
- [77] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2004;83:1–1438.
- [78] Phillips DH. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* 2002;23:1979–2004.
- [79] Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker–never drinkers: A descriptive epidemiologic study. *Head Neck* 2008;30:75–84. <https://doi.org/10.1002/hed.20664>.
- [80] Melamed R. Cannabis and tobacco smoke are not equally carcinogenic. *Harm Reduct J* 2005;2:21.
- [81] Gillison ML, D’Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16-Positive and Human Papillomavirus Type 16-Negative Head and Neck Cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2008;100:407–20. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn025>.
- [82] Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* 2010;215:588–97. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.12.005>.

- [83] Berdyshev EV. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem Phys Lipids* 2000;108:169–190.
- [84] Warnakulasuriya S, Straif K. Carcinogenicity of smokeless tobacco: Evidence from studies in humans & experimental animals. *Indian J Med Res* 2018;148:681–6. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_149_18.
- [85] Mehta FS, Gupta PC, Daftary DK, Pindborg JJ, Choksi SK. An epidemiologic study of oral cancer and precancerous conditions among 101,761 villagers in Maharashtra, India. *Int J Cancer* 1972;10:134–41.
- [86] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2012;100:1–538.
- [87] Stich HF, Parida BB, Brunneemann KD. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of “reverse” smokers, Khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int J Cancer* 1992;50:172–6.
- [88] Grinspan D. *Enfermedades de la boca*. Buenos Aires: Mundi; 1970.
- [89] Jafarey NA, Mahmood Z, Zaidi SH. Habits and dietary pattern of cases of carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *JPMA J Pak Med Assoc* 1977;27:340–3.
- [90] Zavras AI, Douglass CW, Joshipura K, Wu T, Laskaris G, Petridou E, et al. Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. *Oral Oncol* 2001;37:28–35.
- [91] Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* 2001;85:1700–5. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2140>.
- [92] Feng L, Wang L. Effects of alcohol on the morphological and structural changes in oral mucosa. *Pak J Med Sci* 2013;29:1046–9.
- [93] Figuero Ruiz E, Carretero Peláez MA, Cerero Lapiedra R, Esparza Gómez G, Moreno López LA. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. *Med Oral Organo Of Soc Espanola Med Oral Acad Iberoam Patol Med Bucal* 2004;9:14–23.
- [94] Salaspuro MP. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:679–94.
- [95] Salaspuro M. Interrelationship between alcohol, smoking, acetaldehyde and cancer. *Novartis Found Symp* 2007;285:80–9; discussion 89–96, 198–9.
- [96] 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;63:2522–7.
- [97] Mashberg A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA Cancer J Clin* 1995;45:328–51.
- [98] Riedel F, Goessler U, Hörmann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:543–55.
- [99] Badger TM, Ronis MJJ, Seitz HK, Albano E, Ingelman-Sundberg M, Lieber CS. Alcohol metabolism: role in toxicity and carcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:336–47. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000052583.87673.37>.
- [100] Homann N, Tillonen J, Meurman JH, Rintamäki H, Lindqvist C, Rautio M, et al. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:663–8.
- [101] Muto M, Hitomi Y, Ohtsu A, Shimada H, Kashiwase Y, Sasaki H, et al. Acetaldehyde production by non-pathogenic *Neisseria* in human oral microflora:

- implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract. *Int J Cancer* 2000;88:342–50.
- [102] Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol* 2007;43:181–6. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2006.02.005>.
- [103] Calderón-Montaña JM, Jiménez-Alonso JJ, Guillén-Mancina E, Burgos-Morón E, López-Lázaro M. A 30-s exposure to ethanol 20% is cytotoxic to human keratinocytes: possible mechanistic link between alcohol-containing mouthwashes and oral cancer. *Clin Oral Investig* 2018;22:2943–6. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2602-z>.
- [104] Caciva, Ricardo. Marcadores de malignidad relacionados con el consumo de tabaco, alcohol y mate. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, 2016.
- [105] IARC. Drinking Coffee, Mate, and Very Hot Beverages. n.d.
- [106] Goldenberg D, Lee J, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D, et al. Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg* 2004;131:986–93. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2004.02.035>.
- [107] Goldenberg D. Maté: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2002;38:646–9.
- [108] al de BS et. [High temperature “matè” infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus]. - PubMed - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=High+temperature+%C2%ABmat%C3%A8%C2%BB+infusion+drinking+in+a+population+at+risk+for+squamous+cell+carcinoma+of+the+esophagus.+Arq+Gastroenterol+2000%3B+37%3A25-30> (accessed May 2, 2019).
- [109] Loria D, Barrios E, Zanetti R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. *Rev Panam Salud Publica Pan Am J Public Health* 2009;25:530–9.
- [110] Fagundes RB, Abnet CC, Strickland PT, Kamangar F, Roth MJ, Taylor PR, et al. Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking maté in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *BMC Cancer* 2006;6:139. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-139>.
- [111] Kamangar F, Schantz MM, Abnet CC, Fagundes RB, Dawsey SM. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2008;17:1262–8. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0025>.
- [112] Golozar A, Fagundes RB, Etemadi A, Schantz MM, Kamangar F, Abnet CC, et al. Significant variation in the concentration of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in yerba maté samples by brand, batch, and processing method. *Environ Sci Technol* 2012;46:13488–93. <https://doi.org/10.1021/es303494s>.
- [113] Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci* 2007;72:R138-151. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>.
- [114] De Stefani E, Muñoz N, Estève J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50:426–31.
- [115] Castelletto R, Castellsague X, Muñoz N, Iscovich J, Chopita N, Jmelnitsky A. Alcohol, tobacco, diet, mate drinking, and esophageal cancer in Argentina. *Cancer*

- Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol 1994;3:557–64.
- [116] Mello FW, Scotti FM, Melo G, Warnakulasuriya S, Guerra ENS, Rivero ERC. Maté consumption association with upper aerodigestive tract cancers: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2018;82:37–47. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.04.023>.
- [117] zur Hausen H. Papovaviruses and human tumors. *Haematol Blood Transfus* 1983;28:289–92.
- [118] Costa S, Simone PD, Venturoli S, Cricca M, Zerbini ML, Musiani M, et al. Factors predicting human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia lesions treated by conization. *Gynecol Oncol* 2003;90:358–65. [https://doi.org/10.1016/S0090-8258\(03\)00268-3](https://doi.org/10.1016/S0090-8258(03)00268-3).
- [119] Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, van de Wijert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis* 2010;10:862–874.
- [120] Cladel NM, Hu J, Balogh K, Mejia A, Christensen ND. Wounding prior to challenge substantially improves infectivity of cottontail rabbit papillomavirus and allows for standardization of infection. *J Virol Methods* 2008;148:34–39.
- [121] Maglennon GA, Doorbar J. The biology of papillomavirus latency. *Open Virol J* 2012;6:190–197.
- [122] Eberhard Amtmann MS. Activation of latent papillomavirus genomes by chronic mechanical irritation. *J Gen Virol* 1991;72, 2787–2789:2787.
- [123] Amella CA, Lofgren LA, Ronn AM, Nouri M, Shikowitz MJ, Steinberg BM. Latent infection induced with cottontail rabbit papillomavirus. A model for human papillomavirus latency. *Am J Pathol* 1994;144:1167.
- [124] Syrjänen S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci* 2018;126 Suppl 1:49–66. <https://doi.org/10.1111/eos.12538>.
- [125] Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006;24 Suppl 1:S16–22. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.002>.
- [126] Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol* 2003;77:8378–85.
- [127] Benitez MB. Detección del virus del papiloma humano en lesiones precancerosas y cancerosas de la mucosa bucal: Evaluación de diferentes métodos, diagnósticos y de técnicas de obtención del material. Asociación de los resultados con otros factores carcinogénicos. 2014.
- [128] Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest* 2011;121:4593–9. <https://doi.org/10.1172/JCI57149>.
- [129] Gilligan GM, Costa MFFG, Moine L, Panico RL, Piemonte ED. Could chronic mechanical irritation facilitate entry of human papillomavirus (HPV) facilitating oral HPV infection? *Transl Res Oral Oncol* 2017. <https://doi.org/10.1177/2057178X17746799>.
- [130] Syrjanen S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol* 2010;21:vii243–5. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq454>.
- [131] Syrjänen S, Syrjänen K. HPV in Head and Neck Carcinomas: Different HPV Profiles in Oropharyngeal Carcinomas - Why? *Acta Cytol* 2019;63:124–42. <https://doi.org/10.1159/000495727>.

- [132] Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2017;772:3–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002>.
- [133] Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2017;772:23–35. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.08.001>.
- [134] Strati K, Pitot HC, Lambert PF. Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:14152–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606698103>.
- [135] Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2490–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409883102>.
- [136] Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2005;14:467–75. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>.
- [137] Ndiaye IC, Diom ES, Diop F, Tall A, Ndiaye M, Essalki I, et al. Squamous carcinoma of the hypopharynx in children in Sénégal: between disarray and enigma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73:357–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2008.10.032>.
- [138] Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* 2016;108:djv403. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv403>.
- [139] Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis* 2011;17 Suppl 1:58–72. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01792.x>.
- [140] Anantharaman D, Muller DC, Lagiou P, Ahrens W, Holcátová I, Merletti F, et al. Combined effects of smoking and HPV16 in oropharyngeal cancer. *Int J Epidemiol* 2016;45:752–61. <https://doi.org/10.1093/ije/dyw069>.
- [141] Gilligan GM, Piemonte ED, Talavera AD, Panico RL. Displasia Epitelial Oral asociada al VPH: serie de casos. *Rev Fac Odontol* 2018;28:23–30.
- [142] Venezuela RF, Talavera AD, Frutos MC, Kiguen AX, Monetti MS, Sollazo M, et al. Human Papillomavirus (HPV) in oral cavity lesions: comparison with other oral cancer risk factors 2013. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20130306.06>.
- [143] Koss LG. Cytologic and histologic manifestations of human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Cancer Detect Prev* 1990;14:461–4.
- [144] Mooren JJ, Gültekin SE, Straetmans JMJA, Haesevoets A, Peutz-Kootstra CJ, Huebbers CU, et al. P16(INK4A) immunostaining is a strong indicator for high-risk-HPV-associated oropharyngeal carcinomas and dysplasias, but is unreliable to predict low-risk-HPV-infection in head and neck papillomas and laryngeal dysplasias. *Int J Cancer* 2014;134:2108–17. <https://doi.org/10.1002/ijc.28534>.
- [145] Gültekin SE, Sengüven B, Klusmann JP, Dienes HP. P16(INK 4a) and Ki-67 expression in human papilloma virus-related head and neck mucosal lesions. *Invest Clin* 2015;56:47–59.
- [146] Woo S. *Oral pathology: a comprehensive atlas and text*. 2017.

- [147] Lerman MA, Woo S-B. Histopathologic features of high risk human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;117:120. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.05.024>.
- [148] Woo S-B, Cashman EC, Lerman MA. Human papillomavirus-associated oral intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2013;26:1288–97. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.70>.
- [149] Lerman MA, Almazrooa S, Lindeman N, Hall D, Villa A, Woo S-B. HPV-16 in a distinct subset of oral epithelial dysplasia. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2017;30:1646–54. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.71>.
- [150] Gibson JS. Nucleic acid-based assays for the detection of high-risk human papillomavirus: a technical review. *Cancer Cytopathol* 2014;122:639–45. <https://doi.org/10.1002/cncy.21451>.
- [151] Piemonte ED, Lazos JP, Brunotto M. Relationship between chronic trauma of the oral mucosa, oral potentially malignant disorders and oral cancer. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2010;39:513–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00901.x>.
- [152] Piemonte E, Lazos J, Belardinelli P, Secchi D, Brunotto M, Lanfranchi-Tizeira H. Oral cancer associated with chronic mechanical irritation of the oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cirurgia Bucal* 2018;23:e151–60. <https://doi.org/10.4317/medoral.22017>.
- [153] Behnoud F, Torabian S, Zargaran M. Relationship between oral poor hygiene and broken teeth with oral tongue squamous cell carcinoma. *Acta Med Iran* 2011;49:159–62.
- [154] Mathur R, Singhavi HR, Malik A, Nair S, Chaturvedi P. Role of Poor Oral Hygiene in Causation of Oral Cancer-a Review of Literature. *Indian J Surg Oncol* 2019;10:184–95. <https://doi.org/10.1007/s13193-018-0836-5>.
- [155] Balaram P, Sridhar H, Rajkumar T, Vaccarella S, Herrero R, Nandakumar A, et al. Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. *Int J Cancer* 2002;98:440–5.
- [156] 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 CCC* 1990;1:235–41.
- [157] Bundgaard T, Wildt J, Frydenberg M, Elbrønd O, Nielsen JE. Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. *Cancer Causes Control CCC* 1995;6:57–67.
- [158] Velly AM, Franco EL, Schlecht N, Pintos J, Kowalski LP, Oliveira BV, et al. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 1998;34:284–91.
- [159] Lockhart PB, Norris CM, Pulliam C. Dental factors in the genesis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol* 1998;34:133–9.
- [160] Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt E-B, Bladström A, Göran Hansson B, Andersson G. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 2005;125:1327–36. <https://doi.org/10.1080/00016480510012273>.
- [161] Garrote LF, Herrero R, Reyes RMO, Vaccarella S, Anta JL, Ferbeye L, et al. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer* 2001;85:46–54. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1825>.

- [162] Tezal M, Sullivan MA, Hyland A, Marshall JR, Stoler D, Reid ME, et al. Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2009;18:2406–12. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0334>.
- [163] Tezal M, Grossi SG, Genco RJ. Is periodontitis associated with oral neoplasms? *J Periodontol* 2005;76:406–10. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.3.406>.
- [164] Sasaki M, Yamaura C, Ohara-Nemoto Y, Tajika S, Kodama Y, Ohya T, et al. *Streptococcus anginosus* infection in oral cancer and its infection route. *Oral Dis* 2005;11:151–6. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2005.01051.x>.
- [165] Hormia M, Willberg J, Ruokonen H, Syrjänen S. Marginal Periodontium as a Potential Reservoir of Human Papillomavirus in Oral Mucosa. *J Periodontol* 2005;76:358–63. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.3.358>.
- [166] Tezal M, Sullivan MA, Reid ME, Marshall JR, Hyland A, Loree T, et al. Chronic periodontitis and the risk of tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:450–4. <https://doi.org/10.1001/archotol.133.5.450>.
- [167] Oji C, Chukwunke F. Poor oral Hygiene may be the Sole Cause of Oral Cancer. *J Maxillofac Oral Surg* 2012;11:379–83. <https://doi.org/10.1007/s12663-012-0359-5>.
- [168] Gholizadeh P, Eslami H, Yousefi M, Asgharzadeh M, Aghazadeh M, Kafil HS. Role of oral microbiome on oral cancers, a review. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2016;84:552–8. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.082>.
- [169] Colombo APV, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Comparisons of Subgingival Microbial Profiles of Refractory Periodontitis, Severe Periodontitis, and Periodontal Health Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. *J Periodontol* 2009;80:1421–32. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090185>.
- [170] Cordero OJ, Varela-Calviño R. Oral hygiene might prevent cancer. *Heliyon* 2018;4:e00879. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00879>.
- [171] Berkovits C, Tóth A, Szenzenstein J, Deák T, Urbán E, Gácsér A, et al. Analysis of oral yeast microflora in patients with oral squamous cell carcinoma. *SpringerPlus* 2016;5:1257. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2926-6>.
- [172] Nagy KN, Sonkodi I, Szöke I, Nagy E, Newman HN. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol* 1998;34:304–8. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(98\)80012-2](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(98)80012-2).
- [173] Dwivedi PP, Mallya S, Dongari-Bagtzoglou A. A novel immunocompetent murine model for *Candida albicans*-promoted oral epithelial dysplasia. *Med Mycol* 2009;47:157–67. <https://doi.org/10.1080/13693780802165797>.
- [174] Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog* 2014;10:e1003933. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003933>.
- [175] Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2018;99:883–93. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146>.
- [176] Karpiński TM. Role of Oral Microbiota in Cancer Development. *Microorganisms* 2019;7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010020>.
- [177] Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S. Oral Mucosa as a Reservoir of Human Papillomavirus: Point Prevalence, Genotype Distribution, and Incident Infections Among Males in a 7-year Prospective Study. *Eur Urol* 2012;62:1063–70. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.06.045>.

- [178] Piemonte ED, Lazos JP, Brunotto M. Relationship between chronic trauma of the oral mucosa, oral potentially malignant disorders and oral cancer: Chronic trauma of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2010;no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00901.x>.
- [179] Piemonte ED, Lazos J. Evidence for chronic mechanical irritation as a causative factor in oral cancer: application of Bradford Hill criteria. *Transl Res Oral Oncol* 2018;3:2057178X18791034. <https://doi.org/10.1177/2057178X18791034>.
- [180] Álvarez Cantoni H. *Fundamentos, técnicas y clínica en rehabilitación bucal*. Buenos Aires: Hacheace; 1999.
- [181] Rakoff-Nahoum S. Why Cancer and Inflammation? *Yale J Biol Med* 2006;79:123–30.
- [182] Lee W-H, Chen H-M, Yang S-F, Liang C, Peng C-Y, Lin F-M, et al. Bacterial alterations in salivary microbiota and their association in oral cancer. *Sci Rep* 2017;7:16540. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16418-x>.
- [183] Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Lo Muzio L, Bucci E. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence? *Oral Oncol* 2004;40:120–30.
- [184] Wünsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002;38:737–46.
- [185] Radoï L, Sylla F, Matrat M, Barul C, Menvielle G, Delafosse P, et al. Head and neck cancer and occupational exposure to leather dust: results from the ICARE study, a French case-control study. *Environ Health* 2019;18. <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0469-3>.
- [186] Straif K, Weiland SK, Bungers M, Holthenrich D, Taeger D, Yi S, et al. Exposure to high concentrations of nitrosamines and cancer mortality among a cohort of rubber workers. *Occup Environ Med* 2000;57:180–7. <https://doi.org/10.1136/oem.57.3.180>.
- [187] Awan KH, Hegde R, Cheever VJ, Carroll W, Khan S, Patil S, et al. Oral and pharyngeal cancer risk associated with occupational carcinogenic substances: Systematic review. *Head Neck* 2018;40:2724–32. <https://doi.org/10.1002/hed.25486>.
- [188] Puñal-Riobóo J, Varela-Lema L, Barros-Dios JM, Juiz-Crespo MA, Ruano-Raviña A. [Occupation as a risk factor for oral and pharyngeal cancer]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2010;61:375–83. <https://doi.org/10.1016/j.otorri.2009.03.009>.
- [189] Maier H, Tisch M, Enderle G, Dietz A, Weidauer H. [Occupational exposure to paint, lacquer and solvents, and cancer risk in the area of the upper aero-digestive tract]. *HNO* 1997;45:905–8.
- [190] Brasil VLM, Ramos Pinto MB, Bonan RF, Kowalski LP, da Cruz Perez DE. Pesticides as risk factors for head and neck cancer: A review. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2018;47:641–51. <https://doi.org/10.1111/jop.12701>.
- [191] Cardoso APF, Al-Eryani L, States JC. Arsenic-Induced Carcinogenesis: The Impact of miRNA Dysregulation. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2018;165:284–90. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy128>.
- [192] Mukherjee A, Sengupta MK, Hossain MA, Ahamed S, Das B, Nayak B, et al. Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. *J Health Popul Nutr* 2006;24:142–63.

- [193] Carrica V. [Oral multiple carcinomatosis in a patient from an area with endemic regional chronic hydroarsenicism (ERCH)]. *Rev Fac Cienc Medicas Cordoba Argent* 2006;63:20–4.
- [194] Carabantes AG, Fernicola NAGG de. Arsénico en el agua de bebida: un problema de salud pública. *Rev Bras Ciênc Farm* 2003;39:365–72. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000400003>.
- [195] Banerjee N, Giri AK. Arsenic Induced Health Effects, Genetic Damage and Genetic Variants in the Population Exposed to Arsenic through Drinking Water in West Bengal. *Proc Indian Natl Sci Acad* 2014;80:547. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i3/55130>.
- [196] Mondal D, Banerjee M, Kundu M, Banerjee N, Bhattacharya U, Giri AK, et al. Comparison of drinking water, raw rice and cooking of rice as arsenic exposure routes in three contrasting areas of West Bengal, India. *Environ Geochem Health* 2010;32:463–77. <https://doi.org/10.1007/s10653-010-9319-5>.
- [197] Grinspan D, Biagini R. [Chronic endemic regional hydroarsenicism. The manifestations of arsenic poisoning caused by drinking water]. *Med Cutan Ibero Lat Am* 1985;13:85–109.
- [198] Carrica V, Prof. Dr. Hector Lanfranchi, Prof. Dr. Hector Gendelman. Contribución al estudio de lesiones cancerizables de la mucosa bucal en pacientes de zonas de hidroarsenicismo cronico regional endemico (H.A.C.R.E.). Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba, 1999.
- [199] States JC. Disruption of Mitotic Progression by Arsenic. *Biol Trace Elem Res* 2015;166:34–40. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0306-7>.
- [200] Zhou X, Sun X, Mobarak C, Gandolfi AJ, Burchiel SW, Hudson LG, et al. Differential binding of monomethylarsonous acid compared to arsenite and arsenic trioxide with zinc finger peptides and proteins. *Chem Res Toxicol* 2014;27:690–8. <https://doi.org/10.1021/tx500022j>.
- [201] Park S, Bae J, Nam B-H, Yoo K-Y. Aetiology of cancer in Asia. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2008;9:371–80.
- [202] Rossman TG, Uddin AN, Burns FJ, Bosland MC. Arsenite cocarcinogenesis: an animal model derived from genetic toxicology studies. *Environ Health Perspect* 2002;110 Suppl 5:749–52. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s5749>.
- [203] Pal P, Halder A. Is There Any Role of Arsenic Toxicity in HPV Related Oral Squamous Cell Carcinoma? *Biol Trace Elem Res* 2018. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1419-6>.
- [204] Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:157–60.
- [205] Mork J, Møller B, Glatte E. Familial risk in head and neck squamous cell carcinoma diagnosed before the age of 45: a population-based study. *Oral Oncol* 1999;35:360–7.
- [206] Brown LM, Gridley G, Diehl SR, Winn DM, Harty LC, Otero EB, et al. Family cancer history and susceptibility to oral carcinoma in Puerto Rico. *Cancer* 2001;92:2102–8.
- [207] Li X, Hemminki K. Familial upper aerodigestive tract cancers: incidence trends, familial clustering and subsequent cancers. *Oral Oncol* 2003;39:232–9.
- [208] de Andrade M, Amos CI, Foulkes WD. Segregation analysis of squamous cell carcinoma of the head and neck: evidence for a major gene determining risk. *Ann Hum Genet* 1998;62:505–10. <https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.1998.6260505.x>.

- [209] Secchi DG, Aballay LR, Galíndez MF, Piccini D, Lanfranchi H, Brunotto M. RED MEAT, MICRONUTRIENTS AND ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF ARGENTINE ADULT PATIENTS. *Nutr Hosp* 2015;32:1214–21. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.3.9277>.
- [210] Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2003;78:559S–569S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.559S>.
- [211] Pavia M, Pileggi C, Nobile CGA, Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1126–34. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.5.1126>.
- [212] Toporcov TN, Antunes JLF, Tavares MR. Fat food habitual intake and risk of oral cancer. *Oral Oncol* 2004;40:925–31. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.04.007>.
- [213] Secchi, Dante Gustavo. Carcinoma de células escamosas bucal y su relación con el consumo de carnes rojas y otros factores de riesgo. Universidad Nacional de Córdoba, 2016.
- [214] Soler M, Bosetti C, Franceschi S, Negri E, Zambon P, Talamini R, et al. Fiber intake and the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancer. *Int J Cancer* 2001;91:283–7.
- [215] Toporcov TN, Znaor A, Zhang Z-F, Yu G-P, Winn DM, Wei Q, et al. Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int J Epidemiol* 2015;44:169–85. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu255>.
- [216] De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H. Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract--II. *Nutrients*. *Oral Oncol* 1999;35:22–6.
- [217] Gupta PC, Ray CS, Papke RL, Stepanov I, Khariwala SS, Chaturvedi P, et al. Perspectives on areca nut with some global implications: Symposium report: *Transl Res Oral Oncol* 2018. <https://doi.org/10.1177/2057178X18814068>.
- [218] Hassanin AA, Idris AM. Attribution of oral cancer in the Sudan to Toombak dipping. *Transl Res Oral Oncol* 2017;2:2057178X16685729. <https://doi.org/10.1177/2057178X16685729>.
- [219] Ahmed HG. Aetiology of oral cancer in the Sudan. *J Oral Maxillofac Res* 2013;4:e3. <https://doi.org/10.5037/jomr.2013.4203>.
- [220] Dunham LJ. A Geographic Study of the Relationship between Oral Cancer and Plants 1968:4.
- [221] Langsjoen OM. Dental effects of diet and coca-leaf chewing on two prehistoric cultures of northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 1996;101:475–89. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199612\)101:4<475::AID-AJPA3>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199612)101:4<475::AID-AJPA3>3.0.CO;2-V).
- [222] Pezo-Lanfranco L, Peralta A, Guillén S, Eggers S. Oral pathology patterns in late farmers of the Central Andes: A comparative perspective between coastal and highland populations. *Homo Int Z Vgl Forsch Am Menschen* 2017;68:343–61. <https://doi.org/10.1016/j.jchb.2017.08.003>.
- [223] Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Iwamasa T, Hamada T, Iyama K. Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. *J Clin Pathol* 2002;55:414–23. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.6.414>.

- [224] She Y, Nong X, Zhang M, Wang M. Epstein-Barr virus infection and oral squamous cell carcinoma risk: A meta-analysis. *PloS One* 2017;12:e0186860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186860>.
- [225] Gall F, Colella G, Di Onofrio V, Rossiello R, Angelillo IF, Liguori G. *Candida* spp. in oral cancer and oral precancerous lesions. *New Microbiol* 2013;36:283–8.
- [226] Sanjaya PR, Gokul S, Gururaj Patil B, Raju R. *Candida* in oral pre-cancer and oral cancer. *Med Hypotheses* 2011;77:1125–8. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.09.018>.
- [227] Shukla K, Vun I, Lov I, Laparidis G, McCamley C, Ariyawardana A. Role of *Candida* infection in the malignant transformation of oral leukoplakia: A systematic review of observational studies. *Transl Res Oral Oncol* 2019;4:2057178X19828229. <https://doi.org/10.1177/2057178X19828229>.
- [228] Dancyger A, Heard V, Huang B, Suley C, Tang D, Ariyawardana A. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. *J Investig Clin Dent* 2018;9:e12343. <https://doi.org/10.1111/jicd.12343>.
- [229] Warnakulasuriya S. Significant oral cancer risk associated with low socioeconomic status. *Evid Based Dent* 2009;10:4–5. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6400623>.
- [230] Porter S, Gueiros LA, Leão JC, Fedele S. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018;125:603–11. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.008>.
- [231] Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2007;36:575–80. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x>.
- [232] Derk CT, Rasheed M, Spiegel JR, Jimenez SA. Increased incidence of carcinoma of the tongue in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2005;32:637–41.
- [233] Furquim CP, Pivovar A, Amenábar JM, Bonfim C, Torres-Pereira CC. Oral cancer in Fanconi anemia: Review of 121 cases. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018;125:35–40. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.02.013>.
- [234] Wayli HA. Xeroderma pigmentosum and its dental implications. *Eur J Dent* 2015;9:145–8. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.149664>.
- [235] Bongiorno M, Rivard S, Hammer D, Kentosh J. Malignant transformation of oral leukoplakia in a patient with dyskeratosis congenita. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2017;124:e239–42. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.08.001>.
- [236] Grinspan D. *Enfermedades de la boca*. Argentina: Mundi; 1976.
- [237] Woo S-B. Oral Epithelial Dysplasia and Premalignancy. *Head Neck Pathol* 2019. <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01020-6>.
- [238] Müller S. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018;125:591–602. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.02.012>.
- [239] Pérez MA, Raimondi AR, Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2005;34:17–22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2004.00249.x>.
- [240] Sato T. [A study on effect of mechanical irritation in development and progression of tongue cancer]. *Kōkūbyō Gakkai Zasshi J Stomatol Soc Jpn* 1995;62:532–50.

- [241] Lazos JP, Piemonte ED, Lanfranchi HE, Brunotto MN. Characterization of Chronic Mechanical Irritation in Oral Cancer. *Int J Dent* 2017;2017:6784526. <https://doi.org/10.1155/2017/6784526>.
- [242] Argyris PP, Koutlas IG. Oral Fibroma With HPV-Associated Epithelial Dysplasia: Even in Fibromas You Should Expect the Unexpected. *Int J Surg Pathol* 2013;1066896913509013.
- [243] Aguas, SC, Lanfranchi Tizeira, HE. Lesiones premalignas o cancerizables de la mucosa bucal. *Rev Fac Odontol* 2004;19:10.
- [244] Regezi JA, Jordan RCK, Sciubba JJ. Oral pathology: clinical pathologic correlations. St. Louis, MS: Saunders/Elsevier; 2017.
- [245] Lester DR, Thompson MD. Oral Traumatic Ulcer. *Ear Nose Throat ENT* 2011;90:518–34.
- [246] Chavan SS, Reddy P. Traumatic ulcerative eosinophilic granuloma with stromal eosinophilia of tongue. *South Asian J Cancer* 2013;2:144. <https://doi.org/10.4103/2278-330X.114128>.
- [247] Lingaraju N, Gaddelingiah YB, Shivalingu MM, Khanum N. Eosinophilic ulcer of the tongue: a rare and confusing clinical entity. *BMJ Case Rep* 2015;2015. <https://doi.org/10.1136/bcr-2015-210107>.
- [248] Sah K, Chandra S, Singh A, Singh S. Eosinophilic ulcer of the tongue masquerading as malignant ulcer: An unexplored distinct pathology. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP* 2017;21:321. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_93_16.
- [249] Sharma B, Koshy G, Kapoor S. Traumatic Ulcerative Granuloma with Stromal Eosinophilia: A Case Report and Review of Pathogenesis. *J Clin Diagn Res JCDR* 2016;10:ZD07–9. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/22265.8657>.
- [250] Panta P, Sarode SC, Sarode GS, Patil S. ‘Chronic traumatic ulcer of lateral tongue’- An underestimated ‘oral potentially malignant disorder’? *Oral Oncol* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.08.019>.
- [251] Carvalho KM, Sawant PR, Dhupar A, Spadigam A. A Case of Oral Squamous Cell Carcinoma in a Nontobacco Habitué. *Int J Appl Basic Med Res* 2017;7:278–80. https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_417_16.
- [252] Randhawa T, Shameena P M, Sudha S, Nair R G. Squamous cell carcinoma of tongue in a 19-year-old female. *Indian J Cancer* 2008;45.
- [253] Bombeccari GP, Guzzi G, Pallotti F, Porrini M, Gianni AB, Spadari F. Large oral ulcer of tongue related to dental trauma. *Stomatologija* 2017;19:51–4.
- [254] Gallego L, Junquera L, Llorente S. Oral carcinoma associated with implant-supported overdenture trauma: a case report. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 2009;25:e3-4. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2008.00721.x>.
- [255] Valente VB, Takamiya AS, Ferreira LL, Filipini RC, Biasoli ÉR, Miyahara GI, et al. Oral squamous cell carcinoma misdiagnosed as a denture-related traumatic ulcer: A clinical report. *J Prosthet Dent* 2016;115:259–62. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2015.08.024>.
- [256] Jayalekshmy R, Balan A. Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Indian Women -A Growing Concern. *J Dent Oral Disord* 2016;2.
- [257] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [258] Schäfer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:628–38. <https://doi.org/10.1038/nrm2455>.

- [259] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883–99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.
- [260] Feller L, Altini M, Lemmer J. Inflammation in the context of oral cancer. *Oral Oncol* 2013;49:887–92. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.07.003>.
- [261] Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30:1073–81. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>.
- [262] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436–44. <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
- [263] Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:351–69. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.020>.
- [264] Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2005;23:254–66. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.112>.
- [265] Lalier L, Pedelaborde F, Braud C, Menanteau J, Vallette FM, Olivier C. Increase in intracellular PGE2 induces apoptosis in Bax-expressing colon cancer cell. *BMC Cancer* 2011;11:153. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-153>.
- [266] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–7. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.
- [267] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549–55.
- [268] Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF. The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14800–3.
- [269] Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* 2018;10:239–48. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S149619>.
- [270] IARC Monographs- Classifications n.d. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (accessed May 1, 2018).
- [271] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013;339:1546–58. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.
- [272] Brücher BL, Jamall IS. Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm. *BMC Cancer* 2014;14:331. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-331>.
- [273] Choi Y, Chung H, Jung H, Couchman JR, Oh E-S. Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol* 2011;30:93–9. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2010.10.006>.
- [274] Olsson MG, Nilsson EJC, Rutardóttir S, Paczesny J, Pallon J, Akerström B. Bystander cell death and stress response is inhibited by the radical scavenger $\alpha(1)$ -microglobulin in irradiated cell cultures. *Radiat Res* 2010;174:590–600. <https://doi.org/10.1667/RR2213.1>.
- [275] Khan S, Chatra L, Prashanth SK, Veena KM, Rao PK. Pathogenesis of oral submucous fibrosis. *J Cancer Res Ther* 2012;8:199–203. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.98970>.
- [276] Bag S, Conjeti S, Das RK, Pal M, Anura A, Paul RR, et al. Computational analysis of p63(+) nuclei distribution pattern by graph theoretic approach in an oral

- pre-cancer (sub-mucous fibrosis). *J Pathol Inform* 2013;4:35.
<https://doi.org/10.4103/2153-3539.124006>.
- [277] Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton ENg, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>.
- [278] Haddow A. Molecular repair, wound healing, and carcinogenesis: tumor production a possible overhealing? *Adv Cancer Res* 1972;16:181–234.
- [279] Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650–9. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>.
- [280] Weiss RA, Vogt PK. 100 years of Rous sarcoma virus. *J Exp Med* 2011;208:2351–5. <https://doi.org/10.1084/jem.20112160>.
- [281] Sieweke MH, Stoker AW, Bissell MJ. Evaluation of the Cocarcinogenic Effect of Wounding in Rous Sarcoma Virus Tumorigenesis 1989:7.
- [282] Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75–81.
- [283] Grose R, Hutter C, Bloch W, Thorey I, Watt FM, Fässler R, et al. A crucial role of beta 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair. *Dev Camb Engl* 2002;129:2303–15.
- [284] Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>.
- [285] Sano S, Chan KS, DiGiovanni J. Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J Dermatol Sci* 2008;50:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.05.016>.
- [286] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438:967–74. <https://doi.org/10.1038/nature04483>.
- [287] Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 2004;25:387–95. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.05.003>.
- [288] Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835–70. <https://doi.org/10.1152/physrev.2003.83.3.835>.
- [289] Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem* 2007;101:830–9. <https://doi.org/10.1002/jcb.21186>.
- [290] Novick M, Gard DA, Hardy SB, Spira M. Burn scar carcinoma: a review and analysis of 46 cases. *J Trauma* 1977;17:809–17.
- [291] Marjolin J. *Dictionnaire de Medicine.*, 1828.
- [292] Bazaliński D, Przybek-Mita J, Barańska B, Więch P. Marjolin's ulcer in chronic wounds – review of available literature. *Contemp Oncol* 2017;21:197–202. <https://doi.org/10.5114/wo.2017.70109>.
- [293] Pekarek B, Buck S, Osher L. A Comprehensive Review on Marjolin's Ulcers: Diagnosis and Treatment. *J Am Coll Certif Wound Spec* 2012;3:60–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcws.2012.04.001>.
- [294] Trent JT, Kirsner RS. Wounds and malignancy. *Adv Skin Wound Care* 2003;16:31–4.

- [295] Iqbal FM, Sinha Y, Jaffe W. Marjolin's ulcer: a rare entity with a call for early diagnosis. *BMJ Case Rep* 2015;2015. <https://doi.org/10.1136/bcr-2014-208176>.
- [296] Fairbairn NG, Hamilton SA. Management of Marjolin's ulcer in a chronic pressure sore secondary to paraplegia: a radical surgical solution. *Int Wound J* 2011;8:533–6. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2011.00831.x>.
- [297] Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018;125:582–90. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.011>.
- [298] Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018;125:612–27. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.12.011>.
- [299] Villa A, Woo SB. Leukoplakia—A Diagnostic and Management Algorithm. *J Oral Maxillofac Surg* 2017;75:723–34. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2016.10.012>.
- [300] van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 2009;45:317–23. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.016>.
- [301] Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol* 2003;39:770–80. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(03\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(03)00102-7).
- [302] Bánóczy J, Gintner Z, Dombi C. Tobacco use and oral leukoplakia. *J Dent Educ* 2001;65:322–7.
- [303] Granero Fernandez M, Lopez-Jornet P. Association between smoking, glycaemia, blood lipoproteins and risk of oral leukoplakia. *Aust Dent J* 2017;62:47–51. <https://doi.org/10.1111/adj.12431>.
- [304] Fisher MA, Bouquot JE, Shelton BJ. Assessment of risk factors for oral leukoplakia in West Virginia. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33:45–52. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2004.00195.x>.
- [305] Feller L, Lemmer J. Oral Leukoplakia as It Relates to HPV Infection: A Review. *Int J Dent* 2012;2012:1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/540561>.
- [306] Nagao T, Ikeda N, Warnakulasuriya S, Fukano H, Yuasa H, Yano M, et al. Serum antioxidant micronutrients and the risk of oral leukoplakia among Japanese. *Oral Oncol* 2000;36:466–70.
- [307] Johnson JE, Ringsdorf WM, Cheraskin E. RELATIONSHIP OF VITAMIN A AND ORAL LEUKOPLAKIA. *Arch Dermatol* 1963;88:607–12.
- [308] Woo, SB, Grammer, RL, Lerman, MA. Keratosis of unknown significance and leukoplakia: a preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;118:713–24.
- [309] Fornatora M, Jones AC, Kerpel S, Freedman P. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia): an entity of unknown biologic potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:47–56.
- [310] Siebers TJH, Bergshoeff VE, Otte-Höller I, Kremer B, Speel EJM, van der Laak JAWM, et al. Chromosome instability predicts the progression of premalignant oral lesions. *Oral Oncol* 2013;49:1121–8. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.006>.
- [311] Graveland AP, Bremmer JF, de Maaker M, Brink A, Cobussen P, Zwart M, et al. Molecular screening of oral precancer. *Oral Oncol* 2013;49:1129–35. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.005>.
- [312] Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med Off*

- Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol 2016;45:155–66.
<https://doi.org/10.1111/jop.12339>.
- [313] Farah CS, Woo S-B, Zain RB, Sklavounou A, McCullough MJ, Lingen M. Oral cancer and oral potentially malignant disorders. *Int J Dent* 2014;2014:853479.
<https://doi.org/10.1155/2014/853479>.
- [314] Patton LL, Epstein JB, Kerr AR. Adjunctive Techniques for Oral Cancer Examination and Lesion Diagnosis: A Systematic Review of the Literature. *J Am Dent Assoc* 2008;139:896–905. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0276>.
- [315] Awan K, Yang Y, Morgan P, Warnakulasuriya S. Utility of toluidine blue as a diagnostic adjunct in the detection of potentially malignant disorders of the oral cavity--a clinical and histological assessment. *Oral Dis* 2012;18:728–33.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2012.01935.x>.
- [316] Yang EC, Tan MT, Schwarz RA, Richards-Kortum RR, Gillenwater AM, Vigneswaran N. Noninvasive diagnostic adjuncts for the evaluation of potentially premalignant oral epithelial lesions: current limitations and future directions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018;125:670–81.
<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.02.020>.
- [317] Lee J-J, Hung H-C, Cheng S-J, Chiang C-P, Liu B-Y, Yu C-H, et al. Factors associated with underdiagnosis from incisional biopsy of oral leukoplakic lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:217–25.
<https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.02.012>.
- [318] Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2008;37:63–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00575.x>.
- [319] Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD001829.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD001829.pub3>.
- [320] Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent* 2010;2010:186018.
<https://doi.org/10.1155/2010/186018>.
- [321] Mogedas-Vegara A, Hueto-Madrid J-A, Chimenos-Küstner E, Bescós-Atín C. Oral leukoplakia treatment with the carbon dioxide laser: A systematic review of the literature. *J Cranio-Maxillofac Surg* 2016;44:331–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.01.026>.
- [322] Vohra F, Al-Kheraif AA, Qadri T, Hassan MIA, Ahmed A, Warnakulasuriya S, et al. Efficacy of photodynamic therapy in the management of oral premalignant lesions. A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2015;12:150–9.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.10.001>.
- [323] Warnakulasuriya S, Dietrich T, Bornstein MM, Casals Peidró E, Preshaw PM, Walter C, et al. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. *Int Dent J* 2010;60:7–30.
- [324] Martin GC, Brown JP, Eifler CW, Houston GD. Oral leukoplakia status six weeks after cessation of smokeless tobacco use. *J Am Dent Assoc* 1939 1999;130:945–54.
- [325] Shibly O, Cummings KM, Zambon JJ. Resolution of oral lesions after tobacco cessation. *J Periodontol* 2008;79:1797–801.
<https://doi.org/10.1902/jop.2008.070544>.
- [326] Hansen LS, Olson JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60:285–98.

- [327] Grinspan D, Abulafia J. Oral florid papillomatosis (verrucous carcinoma). *Int J Dermatol* 1979;18:608–22.
- [328] van der Waal I, Reichart PA. Oral proliferative verrucous leukoplakia revisited. *Oral Oncol* 2008;44:719–21. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.09.010>.
- [329] Aguirre-Urizar JM. Proliferative multifocal leukoplakia better name than proliferative verrucous leukoplakia. *World J Surg Oncol* 2011;9:122. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-9-122>.
- [330] Cerero-Lapiedra R, Baladé-Martínez D, Moreno-López L-A, Esparza-Gómez G, Bagán JV. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal* 2010;15:e839-845.
- [331] Villa A, Menon RS, Kerr AR, De Abreu Alves F, Guollo A, Ojeda D, et al. Proliferative leukoplakia: Proposed new clinical diagnostic criteria. *Oral Dis* 2018;24:749–60. <https://doi.org/10.1111/odi.12830>.
- [332] Capella DL, Gonçalves JM, Abrantes AAA, Grando LJ, Daniel FI. Proliferative verrucous leukoplakia: diagnosis, management and current advances. *Braz J Otorhinolaryngol* 2017;83:585–93. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.12.005>.
- [333] Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, Capra G, Colella G, Di Liberto C, et al. Proliferative verrucous vs conventional leukoplakia: no significantly increased risk of HPV infection. *Oral Oncol* 2004;40:835–40. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.02.007>.
- [334] Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Li J, Lloyd M, Casto BC, et al. Frequent alterations of p16INK4a and p14ARF in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2008;17:3179–87. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0574>.
- [335] Garcia-Pola M-J, Llorente-Pendás S, González-García M, García-Martín J-M. The development of proliferative verrucous leukoplakia in oral lichen planus. A preliminary study. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal* 2016;21:e328-334.
- [336] Lopes MA, Feio P, Santos-Silva AR, Vargas PA. Proliferative verrucous leukoplakia may initially mimic lichenoid reactions. *World J Clin Cases WJCC* 2015;3:861–3. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i10.861>.
- [337] Cabay RJ, Morton TH, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2007;36:255–61. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00506.x>.
- [338] Morton T, Cabay R, Epstein J. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: Report of three cases. *J Oral Path Med* 2007;36.
- [339] Munde A, Karle R. Proliferative verrucous leukoplakia: An update. *J Cancer Res Ther* 2016;12:469–73. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.151443>.
- [340] Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J, et al. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2003;32:379–82.
- [341] Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia--a review. *Oral Oncol* 2005;41:551–61. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.12.003>.
- [342] Rosemberg SK, Fuller TA. Carbon dioxide rapid superpulsed laser treatment of erythroplasia of queyrat. *Urology* 1980;16:181–2. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(80\)90078-3](https://doi.org/10.1016/0090-4295(80)90078-3).
- [343] Mashberg A, Garfinkel L. Early diagnosis of oral cancer: the erythroplastic lesion in high risk sites. *CA Cancer J Clin* 1978;28:297–303.

- [344] Hashibe M, Mathew B, Kuruvilla B, Thomas G, Sankaranarayanan R, Parkin DM, et al. Chewing tobacco, alcohol, and the risk of erythroplakia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2000;9:639–45.
- [345] Pindborg, JJ, Reichart PA, Smith, Van der Waal, and pathologies in 9 countries. *Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa -WHO*. 2nd ed. New York, USA - Tokyo. Japan: Springer; 1997.
- [346] Bouquot JE, Ephros H. Erythroplakia: the dangerous red mucosa. *Pract Periodontics Aesthetic Dent PPAD* 1995;7:59–67; quiz 68.
- [347] Holmstrup P. Oral erythroplakia-What is it? *Oral Dis* 2018;24:138–43. <https://doi.org/10.1111/odi.12709>.
- [348] Bouquot JE, Weiland LH, Kurland LT. Leukoplakia and carcinoma in situ synchronously associated with invasive oral/oropharyngeal carcinoma in Rochester, Minn., 1935-1984. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;65:199–207.
- [349] Nielsen H, Norrild B, Vedtofte P, Praetorius F, Reibel J, Holmstrup P. Human papillomavirus in oral premalignant lesions. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B:264–70.
- [350] Awadallah M, Idle M, Patel K, Kademani D. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018;125:628–36. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.010>.
- [351] Cheng Y-SL, Gould A, Kurago Z, Fantasia J, Muller S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016;122:332–54. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2016.05.004>.
- [352] Rivers JK, Jackson R, Orizaga M. Who Was Wickham and What Are His Striae? *Int J Dermatol* 1986;25:611–3. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1986.tb04716.x>.
- [353] Shklar G. Lichen planus as an oral ulcerative disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;33:376–88. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(72\)90467-7](https://doi.org/10.1016/0030-4220(72)90467-7).
- [354] Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103 Suppl:S25.e1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.11.001>.
- [355] Sultan A, Stojanov IJ, Lerman MA, Kabani S, Haber J, Freedman J, et al. Oral lichen planus pemphigoides: a series of four cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2015;120:58–68. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2015.03.012>.
- [356] De Rossi SS, Ciarrocca K. Oral Lichen Planus and Lichenoid Mucositis. *Dent Clin North Am* 2014;58:299–313. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2014.01.001>.
- [357] Gorouhi F, Davari P, Fazel N. Cutaneous and Mucosal Lichen Planus: A Comprehensive Review of Clinical Subtypes, Risk Factors, Diagnosis, and Prognosis. *Sci World J* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/742826>.
- [358] Schifter M, Fernando SL, Li J. Oral Lichen Planus. *Skin Biopsy - Diagn Treat* 2013. <https://doi.org/10.5772/56482>.
- [359] Parashar P. Oral Lichen Planus. *Otolaryngol Clin North Am* 2011;44:89–107. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2010.09.004>.
- [360] Au J, Patel D, Campbell JH. Oral Lichen Planus. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am* 2013;25:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2012.11.007>.

- [361] Morrison LH. Direct immunofluorescence microscopy in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses. *Clin Dermatol* 2001;19:607–13. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(00\)00179-6](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(00)00179-6).
- [362] Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2005;100:164–78. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.06.076>.
- [363] Müller S. Oral Manifestations of Dermatologic Disease: A Focus on Lichenoid Lesions. *Head Neck Pathol* 2011;5:36–40. <https://doi.org/10.1007/s12105-010-0237-8>.
- [364] Issa Y, Duxbury AJ, Macfarlane TV, Brunton PA. Oral lichenoid lesions related to dental restorative materials. *Br Dent J* 2005;198:361. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4812176>.
- [365] Cerqueira JDM, Moura JR, Arsati F, Lima-Arsati YB de O, Bittencourt RA, Freitas VS. Psychological disorders and oral lichen planus: A systematic review. *J Investig Clin Dent* 2018;9:e12363. <https://doi.org/10.1111/jicd.12363>.
- [366] Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000;142:449–56. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03355.x>.
- [367] Vincenza Calvaruso AC. Immunological alterations in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2013;19:8916–23. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i47.8916>.
- [368] Pol CA, Ghige SK, Gosavi SR. Role of human papilloma virus-16 in the pathogenesis of oral lichen planus--an immunohistochemical study. *Int Dent J* 2015;65:11–4. <https://doi.org/10.1111/idj.12125>.
- [369] Goyal L, Gupta ND, Gupta N. Grinspan syndrome with periodontitis: Coincidence or correlation? *J Indian Soc Periodontol* 2018;22:263–5. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_142_18.
- [370] Meij EHVD, Waal IVD. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med* 2003;32:507–12. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2003.00125.x>.
- [371] Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Mignogna C, de Rosa G, Porter SR. Field cancerization in oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol EJSO* 2007;33:383–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.09.028>.
- [372] Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. *Med Oral Organo Of Soc Espanola Med Oral Acad Iberoam Patol Med Bucal* 2003;8:2–9.
- [373] Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, et al. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 1995;80:188–91. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(05\)80201-X](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(05)80201-X).
- [374] Tilakaratne WM, Sherriff M, Morgan PR, Odell EW. Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features. *J Oral Pathol Med* 2011;40:533–40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2011.01033.x>.
- [375] Gale N, Blagus R, El-Mofty SK, Helliwell T, Prasad ML, Sandison A, et al. Evaluation of a new grading system for laryngeal squamous intraepithelial lesions—

- a proposed unified classification. *Histopathology* 2014;65:456–64.
<https://doi.org/10.1111/his.12427>.
- [376] Sanfrancesco J, Jones JS, Hansel DE. Diagnostically challenging cases: what are atypia and dysplasia? *Urol Clin North Am* 2013;40:281–93.
<https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.01.006>.
- [377] Karag'ozov I, Makaveeva V. [Koilocytic dysplasia of the cervix uteri]. *Akush Ginekol (Sofia)* 1984;23:66–71.
- [378] Mithani S, Mydlarz W, Grumbine F, Smith I, Califano J. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis* 2007;13:126–33. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01349.x>.
- [379] Lingen MW, Pinto A, Mendes RA, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne WM, et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research*. *Oral Dis* 2011;17:7–22. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01789.x>.
- [380] Warnakulasuriya. Prognostic and predictive markers for oral squamous cell carcinoma: The importance of clinical, pathological and molecular markers 2014.
- [381] Nikitakis NG, Pentenero M, Georgaki M, Poh CF, Peterson DE, Edwards P, et al. Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018;125:650–69.
<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.012>.
- [382] Chimenos Küstner E, Font Costa I, López López J. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal Ed Impresa* 2004;9:377–84.
- [383] Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31:11–24.
- [384] Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat* 2009;214:516–59.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>.
- [385] Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* 2009;119:1772–83.
<https://doi.org/10.1172/JCI38214>.
- [386] Rodriguez ML, McGarry PM, Sniadecki NJ. Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches, 2013. <https://doi.org/10.1115/1.4025355>.
- [387] Nanci, A. Ten Cate's Oral Histology - 8th Edition. Mosby; 2012.
- [388] Rao RS, Patil S, Ganavi BS. Oral cytokeratins in health and disease. *J Contemp Dent Pract* 2014;15:127–36.
- [389] Oral Cells and Tissues n.d.
http://www.quintpub.com/display_detail.php3?psku=B4292#.XN4UichKjIU
(accessed May 16, 2019).
- [390] Dale BA, Salonen J, Jones AH. New Approaches And Concepts in The Study of Differentiation of Oral Epithelia. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990;1:167–90.
<https://doi.org/10.1177/10454411900010030201>.
- [391] Lindberg K, Rheinwald JG. Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. *Differ Res Biol Divers* 1990;45:230–41.
- [392] Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 1998;353:831–7.

- [393] Narisawa Y, Hashimoto K, Kohda H. Immunohistochemical demonstration of keratin 19 expression in isolated human hair follicles. *J Invest Dermatol* 1994;103:191–5.
- [394] Ueda M. Telomerase in cutaneous carcinogenesis. *J Dermatol Sci* 2000;23:S37–40. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(99\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(99)00075-4).
- [395] Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991;256:271–82.
- [396] Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev* 2003;17:1189–200. <https://doi.org/10.1101/gad.1086903>.
- [397] Rao RS, Patil S, Ganavi B. Oral Cytokeratins in Health and Disease. *J Contemp Dent Pract* 2014;15:127–36. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1502>.
- [398] Xu XC, Lee JS, Lippman SM, Ro JY, Hong WK, Lotan R. Increased expression of cytokeratins CK8 and CK19 is associated with head and neck carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 1995;4:871–6.
- [399] Nie M, Zhong L, Zeng G, Li B. The changes of cytokeratin 19 during oral carcinogenesis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi Chin J Stomatol* 2002;37:187–90.
- [400] Bose A, Teh M-T, Mackenzie IC, Waseem A. Keratin k15 as a biomarker of epidermal stem cells. *Int J Mol Sci* 2013;14:19385–98. <https://doi.org/10.3390/ijms141019385>.
- [401] Michel M, Török N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 5):1017–28.
- [402] Bombeccari GP, Gianni AB, Spadari F. Immunoexpression of cytokeratin-19 in the oral lichen planus and related oral squamous cell carcinoma. *Ann Stomatol (Roma)* 2018;8:104–9. <https://doi.org/10.11138/ads/2017.8.3.104>.
- [403] Barakat SMM, Siar CH. Differential expression of stem cell-like proteins in normal, hyperplastic and dysplastic oral epithelium. *J Appl Oral Sci* 2015;23:79–86. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140245>.
- [404] Jiang R, Gu X, Moore-Medlin TN, Nathan C-A, Hutt-Fletcher LM. Oral dysplasia and squamous cell carcinoma: correlation between increased expression of CD21, Epstein-Barr virus and CK19. *Oral Oncol* 2012;48:836–41. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.03.017>.
- [405] Fillies T, Jogschies M, Kleinheinz J, Brandt B, Joos U, Buerger H. Cytokeratin alteration in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007;18:639–43.
- [406] de Andrade NP, Rodrigues MFSD, Rodini CO, Nunes FD. Cancer stem cell, cytokeratins and epithelial to mesenchymal transition markers expression in oral squamous cell carcinoma derived from orthotopic xenotransplantation of CD44^{high} cells. *Pathol Res Pract* 2017;213:235–44. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.12.009>.
- [407] Papagerakis S, Pannone G, Zheng L, About I, Taqi N, Nguyen NPT, et al. Oral epithelial stem cells - implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res* 2014;325:111–29. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.04.021>.
- [408] Zhong L, Chen W, Zhang C, Zhang Z. Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma

- patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:377–84. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.07.019>.
- [409] Kranjec C, Doorbar J. Human papillomavirus infection and induction of neoplasia: a matter of fitness. *Curr Opin Virol* 2016;20:129–36. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.011>.
- [410] Ishii A, Muramatsu T, Lee J-M, Higa K, Shinozaki N, Jung H-S, et al. Expression of p75(NGFR), a Proliferative and Basal Cell Marker, in the Buccal Mucosa Epithelium during Re-epithelialization. *Acta Histochem Cytochem* 2014;47:145–53. <https://doi.org/10.1267/ahc.14011>.
- [411] Moore MM, Chua W, Charles KA, Clarke SJ. Inflammation and cancer: causes and consequences. *Clin Pharmacol Ther* 2010;87:504–8. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.254>.
- [412] Vieira FLD, Vieira BJ, Guimaraes MAM, Aarestrup FM. Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. *BMC Oral Health* 2008;8:25. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-8-25>.
- [413] Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol* 2000;36:145–51.
- [414] Guillaud P, du Manoir S, Seigneurin D. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumour cell lines (MCF-7). *Anal Cell Pathol J Eur Soc Anal Cell Pathol* 1989;1:25–39.
- [415] Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayasadok S, Jittidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:84–8. <https://doi.org/10.1054/ijom.2003.0503>.
- [416] Chandak AR, Gadbaile AR, Chaudhary MS, Chandak SA, Wadhvani R. Actual proliferating index in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia. *J Investig Clin Dent* 2011;2:176–83. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2011.00057.x>.
- [417] HABIBA U, KITAMURA T, YANAGAWA-MATSUDA A, HIDA K, HIGASHINO F, OHIRO Y, et al. Cytoplasmic expression of HuR may be a valuable diagnostic tool for determining the potential for malignant transformation of oral verrucous borderline lesions. *Oncol Rep* 2014;31:1547–54. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3017>.
- [418] Pigatti FM, Taveira LA de A, Soares CT. Immunohistochemical expression of Bcl-2 and Ki-67 in oral lichen planus and leukoplakia with different degrees of dysplasia. *Int J Dermatol* 2015;54:150–5. <https://doi.org/10.1111/ijd.12279>.
- [419] Rivarola de Gutierrez E, Innocenti A-C, Cippitelli M-J, Salomón S, Vargas-Roig L-M. Determination of cytokeratins 1, 13 and 14 in oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cirurgia Bucal* 2014;19:e359-365.
- [420] Lydiatt WM, Patel SG, O’Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 2017;67:122–37. <https://doi.org/10.3322/caac.21389>.
- [421] Vasca V, Vasca E, Freiman P, Marian D, Luce A, Mesolella M, et al. Keratin 5 expression in squamocellular carcinoma of the head and neck. *Oncol Lett* 2014;8:2501–4. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2591>.

- [422] Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* 2015;476:341–4. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.028>.
- [423] Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:546–52. <https://doi.org/10.1016/S1079210404000605>.
- [424] Yesensky JA, Hasina R, Wroblewski KE, Bellairs J, Gooi Z, Saloura V, et al. Role of dental hardware in oral cavity squamous cell carcinoma in the low-risk nonsmoker nondrinker population. *Head Neck* 2018. <https://doi.org/10.1002/hed.25059>.
- [425] Kim Y, Okuyama K, Michi Y, Ohyama Y, Uzawa N, Yamaguchi S. Potential factors influencing the development of oral tongue squamous cell carcinoma in young mature patients: Lingual position of the mandibular second molar and narrow tongue space. *Oncol Lett* 2017;14:7339–43. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7135>.
- [426] Bektas-Kayhan K, Karagoz G, Kesimli MC, Karadeniz AN, Meral R, Altun M, et al. Carcinoma of the tongue: a case-control study on etiologic factors and dental trauma. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2014;15:2225–9. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.5.2225>.
- [427] Kumar M, Pal Singh P, Saxena D, Singl N. Chronic Trauma As Precipitating Factor Of Squamous Cell Carcinoma Of Tongue – 3 Case Reports. *Indian J Dent Sci* 2014;6:29–31.
- [428] Farquhar DR, Tanner AM, Masood MM, Patel SR, Hackman TG, Olshan AF, et al. Oral tongue carcinoma among young patients: An analysis of risk factors and survival. *Oral Oncol* 2018;84:7–11. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.06.014>.
- [429] Paderno A, Morello R, Piazza C. Tongue carcinoma in young adults: a review of the literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital Organo Uff Della Soc Ital Otorinolaringol E Chir Cerv-Facc* 2018;38:175–80. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-1932>.
- [430] Ambele MA, Pepper MS, van Heerden MB, van Heerden WFP. Molecular profile of tongue cancer in an 18-year-old female patient with no recognizable risk factor. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2019;4:310–3. <https://doi.org/10.1002/lio2.266>.
- [431] Gantwerker EA, Hom DB. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Facial Plast Surg Clin N Am* 2011;19:441–53. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.06.009>.
- [432] Fan H, Yoon K-Y, Kim S-M, Myoung H, Lee J-H, Kim M-J. Relationship between squamous cell carcinoma of the tongue and the position of dental prosthesis. *J Adv Prosthodont* 2015;7:129–37. <https://doi.org/10.4047/jap.2015.7.2.129>.
- [433] Dos Santos Costa SF, Brennan PA, Gomez RS, Fregnani ER, Santos-Silva AR, Martins MD, et al. Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: Is it any different from older patients? *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2018;47:541–6. <https://doi.org/10.1111/jop.12642>.
- [434] Perea LME, Peres MA, Boing AF, Antunes JLF. Trend of oral and pharyngeal cancer mortality in Brazil in the period of 2002 to 2013. *Rev Saúde Pública* 2018;52. <https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2018052000251>.

- [435] Sundermann BV, Uhlmann L, Hoffmann J, Freier K, Thiele OC. The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *J Cranio-Maxillofac Surg* 2018;46:177–82. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.10.019>.
- [436] McCord C, Xu J, Xu W, Qiu X, McComb RJ, Perez-Ordóñez B, et al. Association of high-risk human papillomavirus infection with oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;115:541–9. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.01.020>.
- [437] Khanal S, Trainor PJ, Zahin M, Ghim S-J, Joh J, Rai SN, et al. Histologic variation in high grade oral epithelial dysplasia when associated with high-risk human papillomavirus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2017;123:566–85. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.01.008>.
- [438] Jacobs CD, Barbour AB, Mowery YM. The relative distribution of oral cancer in the United States by subsite. *Oral Oncol* 2019;89:56–8. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.12.017>.
- [439] Ettinger Kyle. Oral Cavity Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2019;31:13–29.
- [440] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018;68:7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>.
- [441] Diz P, Meleti M, Diniz-Freitas M, Vescovi P, Warnakulasuriya S, Johnson NW, et al. Oral and pharyngeal cancer in Europe: Incidence, mortality and trends as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Transl Res Oral Oncol* 2017;2:2057178X17701517. <https://doi.org/10.1177/2057178X17701517>.
- [442] Pollaers K, Kujan O, Johnson NW, Farah CS. Oral and oropharyngeal cancer in Oceania: Incidence, mortality, trends and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Transl Res Oral Oncol* 2017;2:2057178X17726455. <https://doi.org/10.1177/2057178X17726455>.
- [443] Riera S P, Martínez R B. Morbidity and mortality for oral and pharyngeal cancer in Chile. *Rev Médica Chile* 2005;133:555–63. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872005000500007>.
- [444] Prado da Fonseca E, Cristina do Amaral R, Carlos Pereira A, Martins Rocha C, Tennant M. Geographical Variation in Oral and Oropharynx Cancer Mortality in Brazil: A Bayesian Approach. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15. <https://doi.org/10.3390/ijerph15122641>.
- [445] Tsunori M, Mashita M, Kasai K. Relationship between facial types and tooth and bone characteristics of the mandible obtained by CT scanning. *Angle Orthod* 1998;68:557–62. [https://doi.org/10.1043/0003-3219\(1998\)068<0557:RBFTAT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(1998)068<0557:RBFTAT>2.3.CO;2).
- [446] Mummudi N, Agarwal JP, Chatterjee S, Mallick I, Ghosh-Laskar S. Oral Cavity Cancer in the Indian Subcontinent - Challenges and Opportunities. *Clin Oncol R Coll Radiol G B* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2019.05.013>.
- [447] de Camargo Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck* 2010;32:357–67. <https://doi.org/10.1002/hed.21193>.
- [448] Kadashetti V, Shivakumar KM, Chaudhary M, Patil S, Gawande M, Hande A. Influence of risk factors on patients suffering from potentially malignant disorders and oral cancer: A case-control study. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP* 2017;21:455–6. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_236_14.

- [449] Balsaraf S, Bhambal A, Chole R. Study of oral potentially malignant disorders related to various risk factors amongst the patients attending hospitals in Bhopal, India. *Med Pharm Rep* 2019;92:66–71. <https://doi.org/10.15386/cjmed-906>.
- [450] Chung C-H, Yang Y-H, Wang T-Y, Shieh T-Y, Warnakulasuriya S. Oral precancerous disorders associated with areca quid chewing, smoking, and alcohol drinking in southern Taiwan. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2005;34:460–6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2005.00332.x>.
- [451] Al Feghali KA, Ghanem AI, Burmeister C, Chang SS, Ghanem T, Keller C, et al. Impact of smoking on pathological features in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther* 2019;15:582–8. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_641_16.
- [452] Moura MA de S, Bergmann A, Aguiar SS de, Thuler LCS. The magnitude of the association between smoking and the risk of developing cancer in Brazil: a multicenter study. *BMJ Open* 2014;4:e003736. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003736>.
- [453] Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004;108:741–9. <https://doi.org/10.1002/ijc.11627>.
- [454] Gupta B, Bray F, Kumar N, Johnson NW. Associations between oral hygiene habits, diet, tobacco and alcohol and risk of oral cancer: A case-control study from India. *Cancer Epidemiol* 2017;51:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2017.09.003>.
- [455] Namasivayam-MacDonald AM, Barbon CEA, Steele CM. A review of swallow timing in the elderly. *Physiol Behav* 2018;184:12–26. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.023>.
- [456] Singhvi HR, Malik A, Chaturvedi P. The Role of Chronic Mucosal Trauma in Oral Cancer: A Review of Literature. *Indian J Med Paediatr Oncol Off J Indian Soc Med Paediatr Oncol* 2017;38:44–50. <https://doi.org/10.4103/0971-5851.203510>.
- [457] Rotundo LDB, Toporcov TN, Biazevic GH, de Carvalho MB, Kowalski LP, Antunes JLF. Are recurrent denture-related sores associated with the risk of oral cancer? A case control study. *Rev Bras Epidemiol Braz J Epidemiol* 2013;16:705–15.
- [458] Vaccarezza GF, Antunes JLF, Michaluart-Júnior P. Recurrent sores by ill-fitting dentures and intra-oral squamous cell carcinoma in smokers. *J Public Health Dent* 2010;70:52–7. <https://doi.org/10.1111/j.1752-7325.2009.00143.x>.
- [459] Sharma M, Shetty SS, Radhakrishnan R. Oral Submucous Fibrosis as an Overhealing Wound: Implications in Malignant Transformation. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2018;13:272–91. <https://doi.org/10.2174/1574892813666180227103147>.
- [460] Cavalcante GM, Paula RJS de, Souza LP de, Sousa FB, Mota MRL, Alves APNN. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cir Bras* 2011;26:227–34. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502011000300012>.
- [461] Sand L, Jalouli J. Viruses and oral cancer. Is there a link? *Microbes Infect* 2014;16:371–8. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.02.009>.
- [462] Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia: NATURAL HISTORY OF HPV INFECTIONS AND PATHOLOGY. *APMIS* 2010;118:422–49. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02625.x>.

- [463] Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association: Human papillomavirus. *Rev Med Virol* 2015;25:2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>.
- [464] Groves IJ, Coleman N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J Pathol* 2015;235:527–38. <https://doi.org/10.1002/path.4496>.
- [465] Miller DL, Puricelli MD, Stack MS. Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus) associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Biochem J* 2012;443:339–53. <https://doi.org/10.1042/BJ20112017>.
- [466] Aksoy P, Gottschalk EY, Meneses PI. HPV entry into cells. *Mutat Res Mutat Res* 2017;772:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.004>.
- [467] Bienkowska-Haba M, Sapp M. The Cytoskeleton in Papillomavirus Infection. *Viruses* 2011;3:260–71. <https://doi.org/10.3390/v3030260>.
- [468] Horvath CAJ, Boulet GAV, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers J-PJ. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J* 2010;7:11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-11>.
- [469] Rautava J, Syrjänen S. Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 2012;6:3–15. <https://doi.org/10.1007/s12105-012-0367-2>.
- [470] Stanley MA. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:215–22. <https://doi.org/10.1128/CMR.05028-11>.
- [471] Cladel NM, Hu J, Balogh K, Mejia A, Christensen ND. Wounding prior to challenge substantially improves infectivity of cottontail rabbit papillomavirus and allows for standardization of infection. *J Virol Methods* 2008;148:34–39.
- [472] Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 2002;89:249–61. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00193-4).
- [473] Maglennon, Ga, McIntosh, P, Doorbar, J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011;414:153–63.
- [474] Reyes M, Rojas-Alcayaga G, Pennacchiotti G, Carrillo D, Muñoz JP, Peña N, et al. Human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas from Chilean patients. *Exp Mol Pathol* 2015;99:95–9. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.06.001>.
- [475] Quintero K, Giraldo GA, Uribe ML, Baena A, Lopez C, Alvarez E, et al. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013;79:375–81. <https://doi.org/10.5935/1808-8694.20130065>.
- [476] Criscuolo MI. Estudio del virus del papiloma humano en pacientes con cáncer bucal. Relación con factores de riesgo. Universidad Nacional de Córdoba, 2016.
- [477] Venezuela RF, Talavera Á, Frutos MC, Kiguen AX, Monetti MS, Sollazo M, et al. Human Papillomavirus (HPV) in Oral Cavity Lesions: Comparison with Other Oral Cancer Risk Factors. *J Microbiol Res* 2013;3:228–33.
- [478] Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Willberg J, Grenman S, Syrjänen S. Smoking increases oral HPV persistence among men: 7-year follow-up study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:123–33. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1938-1>.
- [479] Pal P, Raychowdhury R, Dolai TK, Roy S, Dastidar R, Halder A. Study of arsenic exposure in oral/oropharyngeal carcinoma in West Bengal. *Int J Occup Med Environ Health* 2017;30:271–9. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00806>.
- [480] Accardi R, Gheit T. Cutaneous HPV and skin cancer. *Presse Medicale Paris Fr* 1983 2014;43:e435-443. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.08.008>.

- [481] Niller HH, Wolf H, Minarovits J. Viral hit and run-oncogenesis: genetic and epigenetic scenarios. *Cancer Lett* 2011;305:200–17. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.08.007>.
- [482] Gheit T. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Front Oncol* 2019;9:355. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00355>.
- [483] Robinson M, Sloan P, Shaw R. Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. *Oral Oncol* 2010;46:492–6. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.02.013>.
- [484] Cunningham LL, Pagano GM, Li M, Tandon R, Holm SW, White DK, et al. Overexpression of p16INK4 is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:77–81. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.11.028>.
- [485] Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2006;24:736–47. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.00.3335>.
- [486] Safadi RA, Abdullah NI, Alaaraj RF, Bader DH, Divakar DD, Hamasha AA, et al. Clinical and histopathologic prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* 2019;99:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.12.007>.
- [487] Safadi RA, Musleh AS, Al-Khateeb TH, Hamasha AA-H. Analysis of immunohistochemical expression of k19 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma using color deconvolution-image analysis method. *Head Neck Pathol* 2010;4:282–9. <https://doi.org/10.1007/s12105-010-0210-6>.
- [488] Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008;129:705–33. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>.
- [489] Kale AD, Mane DR, Babji D, Gupta K. Establishment of field change by expression of cytokeratins 8/18, 19, and MMP-9 in an apparently normal oral mucosa adjacent to squamous cell carcinoma: A immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP* 2012;16:10–5. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.92966>.
- [490] Safadi RA, Abdullah NI, Alaaraj RF, Bader DH, Divakar DD, Hamasha AA, et al. Clinical and histopathologic prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* 2019;99:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.12.007>.
- [491] Ernst J, Ikenberg K, Apel B, Schumann DM, Huber G, Studer G, et al. Expression of CK19 is an independent predictor of negative outcome for patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncotarget* 2016;7. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12691>.
- [492] Siriwardena SBSM, Tsunematsu T, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Invasion-Related Factors as Potential Diagnostic and Therapeutic Targets in Oral Squamous Cell Carcinoma-A Review. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19051462>.
- [493] Crowe DL, Milo GE, Shuler CF. Keratin 19 downregulation by oral squamous cell carcinoma lines increases invasive potential. *J Dent Res* 1999;78:1256–63. <https://doi.org/10.1177/00220345990780061001>.

- [494] Su L, Morgan PR, Lane EB. Keratin 14 and 19 expression in normal, dysplastic and malignant oral epithelia. A study using in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 1996;25:293–301.
- [495] Santoro A, Pannone G, Ninivaggi R, Petruzzi M, Santarelli A, Russo GM, et al. Relationship between CK19 expression, deregulation of normal keratinocyte differentiation pattern and high risk-human papilloma virus infection in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Infect Agent Cancer* 2015;10. <https://doi.org/10.1186/s13027-015-0041-x>.
- [496] Kellokoski J, Syrjanen S, Tosi P, Cintonino M, Leoncini P, Syrjanen K. Cytokeratin pattern in normal and HPV infected oral mucosa in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med* 1991;20:26–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1991.tb00883.x>.
- [497] Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 2007;101:816–29. <https://doi.org/10.1002/jcb.21215>.
- [498] Chen S, Takahara M, Kido M, Takeuchi S, Uchi H, Tu Y, et al. Increased expression of an epidermal stem cell marker, cytokeratin 19, in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2008;159:952–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08731.x>.
- [499] Frohwitter G, Buerger H, Van Diest PJ, Korsching E, Kleinheinz J, Fillies T. Cytokeratin and protein expression patterns in squamous cell carcinoma of the oral cavity provide evidence for two distinct pathogenetic pathways. *Oncol Lett* 2016;12:107–13. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4588>.
- [500] Gissi DB, Gabusi A, Servidio D, Cervellati F, Montebugnoli L. Predictive Role of p53 Protein as a Single Marker or Associated with ki67 Antigen in Oral Leukoplakia: A Retrospective Longitudinal Study. *Open Dent J* 2015;9:41–5. <https://doi.org/10.2174/1874210601509010041>.
- [501] Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, Hirano M, Tanuma J-I, Semba I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2006;35:369–75. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2006.00444.x>.
- [502] Kushner J, Bradley G, Jordan RCK. Patterns of p53 and Ki-67 protein expression in epithelial dysplasia from the floor of the mouth. *J Pathol* 1997;183:418–23. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199712\)183:4<418::AID-PATH946>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199712)183:4<418::AID-PATH946>3.0.CO;2-T).
- [503] Dwivedi N, Chandra S, Kashyap B, Raj V, Agarwal A. Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Contemp Clin Dent* 2013;4:7–12. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.111586>.
- [504] Kövesi G, Szende B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology* 2003;65:331–6. <https://doi.org/10.1159/000074646>.
- [505] Mondal K, Mandal R, Sarkar BC. A study of Ki-67 expression and its clinicopathological determinants in nondysplastic oral leukoplakia. *Contemp Clin Dent* 2016;7:493–9. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.194106>.
- [506] Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Pindborg JJ, Mehta FS. Etiology of oral submucous fibrosis with special reference to the role of areca nut chewing. *J*

- Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol 1995;24:145–52.
- [507] Gupta PC, Ray CS. Epidemiology of betel quid usage. *Ann Acad Med Singapore* 2004;33:31–6.
- [508] Dayal null, Reddy R, Anuradha Bhat K. Malignant potential of oral submucous fibrosis due to intraoral trauma. *Indian J Med Sci* 2000;54:182–7.
- [509] Ranganathan K, Kavitha R. Proliferation and apoptosis markers in oral submucous fibrosis. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP* 2011;15:148–53. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.84478>.
- [510] Safadi RA, AlRomaizan A, Alshagroud RS, Divakar DD, Alshieban S. Cytokeratin 19 Immunostain Reduces Variability in Grading Epithelial Dysplasia of the Non-Keratinized Upper Aerodigestive Tract Mucosa. *Head Neck Pathol* 2019. <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01038-w>.
- [511] Thomson PJ, Potten CS, Appleton DR. Mapping dynamic epithelial cell proliferative activity within the oral cavity of man: a new insight into carcinogenesis? *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:377–83. <https://doi.org/10.1054/bjom.1999.0130>.
- [512] Andersen L, Philipsen HP, Reichart PA. Macro- and microanatomy of the lateral border of the tongue with special reference to oral hairy leukoplakia. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 1990;19:77–80.
- [513] McNairn AJ, Guasch G. Epithelial transition zones: merging microenvironments, niches, and cellular transformation. *Eur J Dermatol EJD* 2011;21 Suppl 2:21–8. <https://doi.org/10.1684/ejd.2011.1267>.
- [514] Barrandon Yan. Crossing boundaries: Stem cells, holoclones, and the fundamentals of squamous epithelial renewal | *Cornea* 2007;26.
- [515] Schäfer M, Werner S. Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:69–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123609>.
- [516] Rodrigues MFSD, Xavier FC de A, Andrade NP, Lopes C, Miguita Luiz L, Sedassari BT, et al. Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2018;40:1759–73. <https://doi.org/10.1002/hed.25158>.
- [517] Shamloo N, Lotfi A, Motazadian HR, Mortazavi H, Baharvand M. Squamous Cell Carcinoma as the Most Common Lesion of the Tongue in Iranians: a 22-Year Retrospective Study. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2016;17:1415–9. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.3.1415>.
- [518] Narayan TV, Shilpashree S. Meta-analysis on clinicopathologic risk factors of leukoplakias undergoing malignant transformation. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP* 2016;20:354–61. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.190900>.
- [519] Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. *J Virol* 2003;77:13125–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.24.13125-13135.2003>.
- [520] Tezal M. Interaction between Chronic Inflammation and Oral HPV Infection in the Etiology of Head and Neck Cancers. *Int J Otolaryngol* 2012;2012:575242. <https://doi.org/10.1155/2012/575242>.
- [521] Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol* 2001;6:125–37. <https://doi.org/10.1902/annals.2001.6.1.125>.

- [522] Reznick AZ, Hershkovich O, Nagler RM. Saliva – a pivotal player in the pathogenesis of oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* 2004;91:111–8.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601869>.

ANEXO

HISTORIA CLÍNICA

HISTORIA CLÍNICA N°

I.DATOS FILIATORIOS

Nombre y Apellido

Edad:..... Sexo:..... DNI:..... Tel:.....

Domicilio:.....

Fecha y Lugar de Nacimiento:..... Residencia Actual:.....

Ocupación:.....

II.MOTIVO DE LA CONSULTA

“.....”

III.1 Lesiones estomatológicas

Breve descripción de la lesión:

REGISTRO FOTOGRÁFICO: **SI / NO** **Cámara:**

III. ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICO

.....
.....Medicación:

HERENCIA MÓRBIDA DE CÁNCER

HACRE

IV. HÁBITOS TÓXICOS

	Edad de comienzo	Promedio Diario	Años de fumador	ESTIMACIÓN
Tabaco				
THC				
	Tipo de bebida		Tipo de Alcoholista (Crónico/Social)	
Alcohol				

MATE:

V. IRRITACIÓN CRÓNICA DE LA MUCOSA ORAL

	DENTARIO	PROTÉTICO	FUNCIONAL	OBSERVACIONES
TIPO DE TRAUMA				
HISTORIA DE TRAUMA (EN MESES) OBSERVACIONES				

OBSERVACIONES:

.....

.....

.....

.....

.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACION Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO PARA EL PACIENTE DEL ESTUDIO

Título del Estudio: **BIOMARCADORES DE DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN IRRITACIÓN CRÓNICA DE LA MUCOSA ORAL Y SU RELACIÓN CON FACTORES BIOLÓGICOS POTENCIALMENTE CARCINOGENICOS**

Investigadores responsables del estudio: Dra. Mgter. Mabel N Brunotto, Dr. Eduardo Piemonte, Od. Gerardo Marcelo Gilligan. Números de telefono: 3543-15538594; 351-156740744; 351-155118419.

Se lo invita a participar de un estudio de investigación. Este formulario describe el estudio para ayudarlo a que decida si desea participar. Antes de decidir si desea participar en el estudio, es importante que entienda por qué se realiza la investigación, cómo se utilizará la información sobre usted, los posibles beneficios, riesgos e inconvenientes que implica. Lea atentamente la información de este cuestionario; también puede leer la información disponible en el Ministerio de Salud (INFORMACIÓN PARA LA PERSONA QUE HA SIDO INVITADA A PARTICIPAR EN UNA INVESTIGACIÓN).

Disponible en el sitio web: <http://www.cba.gov.ar/vercanal.jsp?idCanal=65473>. O bien solicitar leer el protocolo de investigación y los datos de los profesionales involucrados en el estudio.

¿CUALES SON LOS ANTECEDENTES Y EL OBJETIVO DEL ESTUDIO? Se solicita que participe en este estudio porque presenta síntomas que presumen que tiene una enfermedad que es crónica y compleja. Estas enfermedades tienen compromiso de muchas variables: clínicas, bioquímicas y socio culturales; y en ocasiones no permiten un diagnóstico temprano y/o preciso. El objetivo de este estudio es recabar información que permita establecer el conjunto de variables que pueden diagnosticar con mayor exactitud o tempranamente la enfermedad; y permitir que se establezcan las pautas adecuadas de tratamiento (protocolos de atención), que conduzcan a mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por estas patologías.

Este estudio **no está relacionado directamente, ni afecta, al tratamiento o diagnóstico que haga su médico u odontólogo**, sólo recogerá material biológico mediante técnicas indoloras por cepillado; datos clínicos médicos u odontológicos (por examen y ficha clínica recabados por el médico u odontólogo) y datos sobre hábitos u factores considerados de riesgo (mediante encuesta). Las muestras biológicas serán almacenadas en condiciones adecuadas hasta su procesamiento, el tiempo que se estima es de un año aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser utilizados con fines educativos para capacitar a otros profesionales en la identificación temprana de signos y síntomas de las patologías bajo estudio. A los efectos de promocionar el beneficio directo o indirecto de participar en una investigación, en el caso que durante la recopilación de los datos, se advirtiera de una enfermedad severa, se le pondrá en conocimiento, salvo que expresamente indique que prefiere no conocer acerca de ello.

En caso, que durante el transcurso de la investigación, se detecten enfermedades graves, relacionadas al campo en estudio, Ud será debidamente notificado y la atención médica y los estudios para diagnóstico serán gratuitos, ya que se encuentran incluidos dentro de los protocolos de diagnóstico de la Cátedra de Estomatología "A".

Es importante que Ud tenga conocimiento que este Trabajo de Investigación cuenta con un seguro SMG Póliza n°: 424930-0.

¿CÓMO SE USARÁN MIS DATOS PERSONALES? Al firmar este formulario de consentimiento informado, usted autoriza al Od. Gerardo Gilligan y al personal del estudio "BIOMARCADORES DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN IRRITACIÓN MECÁNICA CRÓNICA DE LA MUCOSA ORAL Y SU RELACIÓN CON FACTORES BIOLÓGICOS POTENCIALMENTE CARCINOGENICOS" a recolectar y utilizar su información personal. La confidencialidad de los archivos en los que se identifique al participante será resguardada, asignándole un N° a cada historia clínica y encuesta y a los datos del participante ("código"), eliminando nombres y direcciones. El responsable del estudio o cualquier persona asignada por éste tendrá control de acceso al código, el cual es necesario para relacionar los datos del estudio con UD. Si se le presenta alguna duda en relación al estudio en el que consiente participar UD puede comunicarse con:

Od. Gerardo M. Gilligan – Cátedra de Estomatología "A". Facultad de Odontología UNC Hayas de la Torre SN. Ciudad Universitaria. Tel: 0351-4333032.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO Y AUTORIZACIÓN DEL PACIENTE He recibido información verbal acerca del estudio mencionado y he leído la información adjunta. He tenido la posibilidad de hablar acerca del estudio y hacer preguntas. Doy mi consentimiento voluntario para participar en el estudio. Acepto voluntariamente permitir que el personal del estudio recopile, use y comparta mis datos de salud según se especifica en este formulario y autorizar el acceso por parte de cualquier persona designada por el responsable de este estudio. Comprendo que yo o mi representante legal, si corresponde, recibiremos un original firmado y fechado de esta información y este formulario de consentimiento y de cualquier otra información que se me proporcione. Al firmar este formulario, no renuncio

VPH – por PCR en CCEB

Autores	Año	Casos	PCR+	%	Genotipos frecuentes
Maitland y cols	1980	50	25/50	50%	16
Chang y cols	1990	40	11/40	28%	16,18,6
Palefsky y cols	1991	25	8/25	32%	-
Watts y cols	1991	23	16/23	70%	6/11, 16/18
Shroyer y cols	1993	49	27/49	55%	16/18
Brachman y cols	1992	11	1/11	9%	-
Noble-Topham y cols	1993	25 (CV)	12/25	48%	6/11, 16/18
Woods y cols	1993	18	14/18	78%	6,11,16,18
Ostwald y cols	1994	26	16/26	62%	16,18,6,11
Balaram y cols	1995	91	67/91	74%	6,11,16,18
Gonzales Moles y cols	1996	37	11/37	30%	-
Snijd y cols	1996	32	7/32	22%	16
Cruz y cols	1996	35	19/35	55%	16
Mineta y cols	1998	14	3/14	21%	16
Wilezynsky y cols	1998	21	14/21	64%	16, 33, 59
Miguel y cols	1998	27	2/27	8%	16
Elawin y cols	1998	28	14/28	50%	16,6
D'Costa y cols	1998	100	15/100	15%	-
Kojima y cols	2002	53	35/53	66%	38
Sugiyama y cols	2003	86	30/86	35%	16
Kanksy y cols	2003	59	5/59	8%	11,16,31
Chang y cols	2003	103	52/103	50%	16,18,33
Hansson y cols	2005	131	47/131	36%	16,6,11
Da Silva y cols	2007	50	37/50	74%	16
Araya-Saavedra y cols	2008	62	26/62	43%	16,18
Llamas-Martínez y cols	2008	33	13/33	39%	16
Tachezy et añ	2009	86	37/86	43%	(Alto Riesgo)
Angiero y cols	2010	11	3/11	27%	(Alto y Bajo Riesgo)
Mathew y cols	2011	45	33/45	73%	16,18
Elango y cols	2011	60	29/60	40%	16
Kaminagakura y cols	2012	47	22/47	19%	16,18
Jalouli y cols	2012	155	54/55	35%	-
Reuschenbach y cols	2013	275	69/275	25%	-
Akhter y cols	2013	34	1/34	3%	16 ó 18
Quintero, y cols	2013	175	42/175	23,9%	16,18

Patel y cols	2014	97	0/97	0%	-
Krüger y cols	2014	88	5/88	6%	16, 18
Gan y cols	2014	200	55/200	27%	16,18,6
Ramshankar y cols	2014	167	85/167	51%	16
Nasher y cols	2014	60	0/60	0%	-
Reyes y cols	2015	80	9/80	11%	16,18
Liu y cols	2015	185	73/185	39%	(Alto Riesgo)
Rodriguez-Santamarta y cols	2016	125	0/125	0%	-
Götz y cols	2016	201	7/201	3%	-
Phusinghe y cols	2017	80	14/80	17%	16
Zil-E-Rubab y cols	2018	100	46/100	46%	16,18
de Abreu y cols	2018	101	3/101	3,9%	16
Emmett y cols	2018	40	2/40	5%	-
Palve y cols	2018	153	9/153	6%	-
Sundberg y cols	2019	13	5/13	38%	16
Gilligan	2019	38	7/38	18%	16,6,11

Trabajos de Ck19 en CCEB y DPM

Autor	Año	Conclusiones
Lindberg	1989	CK19 SB no es solo un estado hiperproliferativo, sino también un marcador de premalignidad.
Kellokoski	1991	Descripción de un patrón suprabasal CK19+ asociada a infección con VPH. Sugiere que el virus ejerce un potencial proliferativo en las células basales.
Xiao-Chumxu	1995	Ck19 podría ser un marcador temprano de Carcinogénesis.
Crowe	1999	Ck19 jugaría un rol clave en la reorganización del citoesqueleto de los queratinocitos con capacidad migratoria
Fillies	2007	En concordancia con otros autores, Ck19 + es un evento frecuente en las displasias y es un marcador de diferenciación celular anómala.
Lai-ping Zhong	2007	La marcación suprabasal en tejido distante al tumor, podría ser predictivo de recurrencia tumoral.
Ning Li	2008	Ck19 negativa en FOS indicando una disminución de la renovación epitelial mediada por stem cells asociada al Areca Nut y su irritación química.

Safadi	2010	Cuanto más indiferenciados los tumores, más proliferación, más expresión de Ck de células progenitoras como Ck19. Ck19 aumenta en relación al grado de displasia
Kyoko Yoshida	2015	Ck 19 como marcador de transformación de displasia a cáncer, aunque las opiniones estén divididas.
Santoro	2015	Ck19+ fue interpretado como un signo morfológico de una desregulación de la diferenciación epitelial e inmortalización de los queratinocitos suprabasales ligada a VPH+.
Frohwitter Gesche	2016	Existen interacciones complejas aun no dilucidadas entre: Citoqueratinas – Grado de diferenciación tumoral – Subsitio de localización.
Bombeccari	2018	La expresión aberrante y localización suprabasal en Ck19 es una progresión aumentada en relación a la distribución de Stem Cells. Resultados consistentes en el aumento de Ck19 en relación al grado de diferenciación y su frecuencia en borde de lengua.

Producciones Científicas

Publicaciones

- **Could chronic mechanical irritation facilitate entry of Human Papilloma Virus (HPV) facilitating Oral HPV infection? Gilligan, G;** Galindez Costa, MF, Moine, L; Panico, R; Piemonte, E. **TROO (Translational Res in Oral Oncology) Dec 2017 Volume 2:1-6.**
- **Displasia Epitelial Oral asociada a VPH: serie de casos. Gilligan, G;** Piemonte, E; Talavera, A; Panico, R. **Rev. Fac. Odont Marzo 2018. Vol 28 N°1:23-30.**
- **Comment on Chronic traumatic ulcer of lateral tongue – an underestimated oral potentially malignant disorder? Lazos, J;** Panico, R; **Gilligan, G;** Piemonte, E. **Oral Oncol. Feb 2019 Vol 89:155-156.**

Presentaciones de Resultados preliminares y trabajos afines en Congresos

Hallazgos inmunohistoquímicos en lesión asociada a irritación mecánica.

Autores: Gilligan, G; Di Tada, C; Pánico, R. 39° Jornadas Internacionales de Asociación Odontológica Argentina. Buenos Aires, 2017.

Irritación Mecánica Crónica y VPH en pacientes adultos con Cáncer Bucal.

Autores: Gilligan, G; Panico, R; Lucca, A; Di Tada, C; Brunotto, M; Piemonte, ED. 50° Reunión Científica Anual de SAIO. San Nicolás, Bs. As. 2017.

Oral carcinogenesis biomarkers in Oral Chronic Mechanical Irritation- associated lesions.

Autores: Gilligan, G; Piemonte, E; Panico, R; Di Tada, C; Brunotto, M. 44° Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral – XV Reunión de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal – XII Congresso Brasileiro de Cancer Bucal. Río de Janeiro,

Brasil. 2018.

HPV-associated epithelial dysplasia: series of cases with clinical features.

Autor/es: Panico, R; Piemonte, E; Talavera, A; **Gilligan, G.** Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral – XV Reunión de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal – XII Congresso Brasileiro de Cancer Bucal. Río de Janeiro, Brasil. 2018.

Diferenciación y Proliferación epitelial en lesiones asociadas a Irritación Mecánica Crónica Oral y cáncer bucal.

Autores: **Gilligan, G;** Panico, R; Di Tada, C; Brunotto, M, Piemonte E. 51° Reunión Científica Anual SAIO. Los Cocos, Pcia de Córdoba, 2018.

Infección por Virus de Papiloma Humano en leucoplasias bucales de pacientes adultos de Córdoba.

Autores: **Gilligan, G;** Panico, R; Lucca, A; Moine, L; Galindez-Costa, MF; Lazos, J; Piemonte, E; Brunotto, M. 51° Reunión Científica Anual SAIO. Los Cocos, Pcia de Córdoba, 2018.

Carcinomas de Células Escamosas de la mucosa oral asociados a Irritación Mecánica Crónica Oral y VPH: serie de casos.

Autores: **Gilligan, G;** Pánico R; Lucca, A, Piemonte, E.

Congreso Internacional de Oral Pathology of the oral mucosa. Santiago de Chile, Chile. 2019

Immunohistochemical biomarker profile in Chronic Traumatic Ulcers could be associated with early carcinogenesis.

Autores: **Gilligan, G;** Panico, R; Di Tada, C; Piemonte, E; Brunotto, M.

International Academy of Oral Oncology. Roma, Italia. 2019

Clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma in young adults of Cordoba, Argentina: a retrospective study.

Autores: Gilligan, G; Moine, L; Panico, R; Brunotto, M; Piemonte, E.
International Academy of Oral Oncology. Roma, Italia. 2019

<i>Financiación Científica</i>

“IRRITACIÓN MECÁNICA CRÓNICA Y HPV DE LA MUCOSA BUCAL: BIOMARCADORES DE RIESGO DE CARCINOGENESIS” PROYECTO CATEGORÍA “B” SECYT UNC 2016-2017. Director: Prof. Dr. Eduardo Piemonte. Miembro del equipo de trabajo como Investigador.

“EVALUACIÓN DE MODELOS DE PREDICCIÓN DE RIESGO DE CÁNCER BUCAL EN PACIENTES ADULTOS DE ARGENTINA” Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica 2016. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. FONCYT. Miembro del equipo de trabajo como Investigador. Investigadora Responsable del Proyecto: Prof. Dra. Mabel Brunotto.

BECA DE DOCTORADO – CONVOCATORIA 2016. SECRETARIA DE CIENCIA Y TÉCNICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA por la Facultad de Odontología, UNC. **Disciplina: Ciencias de la Salud.** Código: 39220160100046CB. Renovación Año 2018, 2019.