



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA CON  
MARCADORES DE LIPOPEROXIDACIÓN Y SUSTANCIAS  
ANTIOXIDANTES EN DESÓRDENES POTENCIALMENTE  
MALIGNOS Y CÁNCER DE LA MUCOSA BUC”**

TESISTA:

**OD. EVELIN BACHMEIER**

DIRECTOR:

**PROF. DRA. SILVIA LÓPEZ DE BLANC**

**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  
Escuela de Posgrado**



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

**“Correlación de la Actividad Telomerasa con marcadores de lipoperoxidación y sustancias antioxidantes en desórdenes potencialmente malignos y cáncer de la mucosa bucal”.**

**Tesista: Od. Evelin Bachmeier  
Directora: Prof. Dra. Silvia López de Blanc**

**- Año 2020 -**

## **Comisión de Tesis**

Prof. Dra. Ana B. Finkelberg (Facultad de Odontología, UNC)

Prof. Dra. Silvia López de Blanc (Facultad de Odontología, UNC)

Prof. Dra. Adela Sembaj (Facultad de Ciencias Médicas, UNC)

## **Jurado de tesis**

Prof. Dra. Ana B. Finkelberg (Facultad de Odontología, UNC)

Prof. Mgter. M. Mercedes González (Facultad de Odontología, UNNE)

Prof. Dra. Adela Sembaj (Facultad de Ciencias Médicas, UNC)

*A mi esposo Marcelo y a nuestros hijos: Mariano, Lorenzo,  
Stefanía, Valentina y Agustina.*

*A mi mamá Bibí.*

“Aunque yo hablara todas las lenguas de los hombres, aunque tuviera el don de la ciencia y la profecía y conociera todos los misterios, si no tengo amor, no soy nada... En nuestro mundo, hoy por hoy, existen tres cosas esenciales: la fe, la esperanza y el amor, pero la más grande de todas es el amor. El amor verdadero no pasará jamás.

*Primera Carta de San Pablo a los Corintios, Capítulo 13.*

## Agradecimientos

- A Dios y a la Virgen María, por acompañarme en cada paso de mi vida, por inspirarme y hacer que, a fin de cuentas, todo tenga sentido más allá de esta vida.

- A mi mamá Bibí, por su enorme sacrificio, por sus enseñanzas y por todo el amor y dedicación para conmigo, mi hermano y mis hijos. Sin su fuerza, sin su estímulo, jamás podría haber llegado hasta aquí.

- Al amor de mi vida, mi esposo Marcelo, gracias por nuestra vida juntos y por la hermosa familia que formamos. Gracias por apoyarme en cada paso, en lo profesional y personal, por creer en mí y por ser mi gran amor, mi mejor compañero y confidente en esta vida. Muchas cosas no hubiesen tenido el mismo significado si no hubieses estado a mi lado.

- Al mayor motor, el mejor regalo, que me han dado Dios y la vida: mis hijos. Gracias por cederme parte del tiempo juntos para que pudiera desarrollar esta tesis. Gracias Mariano, por haber llegado como un torbellino de sorpresa e ilusión a nuestras vidas, gracias por tus sonrisas cada mañana, gracias por dormir en mis brazos y hacerme sentir acompañada algunas noches mientras terminaba de escribir esta tesis. Gracias Lorenzo por tu sensibilidad especial, por tu cariño, por tu forma de demostrarnos tu amor en cada gesto. Gracias Stefanía por entenderme siempre a pesar de tu corta edad, por tus ocurrencias, por tu sentido común y fundamentalmente por ser mi niñita, mi cómplice, mi compañera y por todo el amor que nos das. Gracias Valentina y Agustina, por aceptarme desde el primer momento como su mamá del corazón, por enseñarme y despertar en mí el instinto maternal, por las risas, las lágrimas y todos los momentos compartidos. Gracias por nuestras charlas, nuestros secretos y confidencias.

- A mi hermano Axel y mi cuñada Agustina. Por su cariño, apoyo y las mil y una historias compartidas. Por estar siempre, por su incondicionalidad, por la complicidad.

- A mi tía Silvina (Ghighi), por estar en mi vida desde siempre. Por ocuparte y preocuparte por nosotros. Gracias por el amor y por los juegos que día a día compartís con mis hijos.

- A mi bisabuela Pola, mis tíos Nito, Elena y Pety, y mis abuelos Lucila y Oscar. Por haber sido la mejor familia que pude tener. Estarán en mi corazón por siempre.
- A mis amigas y amigos del colegio, de la facultad, de la vida... Gracias por acompañarme y estar siempre ahí, con un mensaje, un encuentro, un chiste, una juntada...
- Al Dr. Natalio Brakin, por haber sido como un padre para mí. Gracias infinitas por sus consejos académicos, profesionales y humanos. Gracias por su incondicionalidad.
- A mi directora de tesis, Dra Silvia López de Blanc, gracias por estar omnipresente. Gracias por enseñarme, por tenerme paciencia, por guiarme y compartir su conocimiento. Gracias por ser un modelo de trabajo serio y honesto, por su perseverancia y constancia. Pero más allá de eso, gracias por su calidad y calidez humana.
- A las Dras. Adela Sembaj, Ana Beatriz Finkelberg y Ma. Mercedes González, por sus siempre valiosos aportes, correcciones y sugerencias. Muchas gracias por su compromiso y por ayudarme a crecer.
- A la Dra Cecilia Cuffini, a la Dra. Ana Ximena Kiguen y a la Licenciada en Genética Jéssica P. Mosmann del Laboratorio de Chlamydias y HPV del Instituto de Virología "Dr. José M. Vanella" de la Facultad de Ciencias Médicas (UNC) por haber realizado las determinaciones moleculares de este trabajo. Gracias por su generosidad y por su paciencia infinita.
- A las Dras. Anabel Azcurra, Silvina Barembaum, Ma. Gabriela Scatena y a toda la cátedra de Química Biológica "B" de la Facultad de Odontología (UNC) por haber realizado las determinaciones micológicas de las muestras de los pacientes de esta tesis. Gracias, además, por la calidez de su trato, por el respeto y por toda su ayuda.
- Al Bioq. Jorge A. Linares, por haber realizado las determinaciones bioquímicas de este trabajo, por haberme explicado, enseñado y ayudado con infinita paciencia y dedicación. Pero más allá de eso, gracias por su valiosa amistad.

- A la Dra. Ana M. Baruzzi, por asesorarme y ayudarme en cada oportunidad que se lo pedí. Mil gracias por sus aportes, que fueron de una riqueza extraordinaria para mejorar este trabajo.

- A la Dra. Mariana Maccioni, por sus meticulosas correcciones y los valiosos aportes realizados.

- A mi querida amiga y maestra Fofi Morelatto, por estar siempre, en lo profesional y humano. Por ser fuente de inspiración. Por ser ejemplo de trabajo incansable, serio y responsable.

- A mis queridísimos amigos, compañeros y colegas, mis “ángeles de la guarda” en esta tesis: Paola Belardinelli, Ricardo C. Caciva, Dante G. Secchi y Ángel D. Talavera. Nada de esto hubiera sido posible sin su ayuda, su experiencia y su generosidad para conmigo. Gracias por participar activamente en cada paso de esta tesis, gracias por aconsejarme, por ayudarme a reunir las muestras, corregir mis escritos, darme fuerzas y divertirme en el camino... Gracias muy especialmente a Ricardo, quien fue mi primer profesor de Estomatología, y que con su exigencia y amor por la docencia me inspiró para amar esta especialidad y, además, a seguir sus pasos. A los cuatro, gracias por acompañarme en el camino.

- Al Prof. Dr. Victoriano Carrica, por haber creído, por haber confiado siempre en mí. Gracias por el tiempo compartido. Gracias por sus enseñanzas, por sus correcciones, por su voto de confianza.

- A la Prof. Dra. Ana Beatriz Finkelberg, no sólo por haberme enseñado Fisiología, sino por ser una de las primeras personas en apoyarme al iniciar mi camino en la docencia y en la investigación. Gracias por sus consejos, sus palabras y por el tiempo compartido. No sólo en lo profesional, sino fundamentalmente en lo humano. Gracias también, por haber abierto las puertas del laboratorio de la cátedra de Fisiología para que pudiésemos llevar adelante las determinaciones bioquímicas de esta tesis.

- A mi maestra y querida amiga Od. María Marcela López, por tantos años y experiencias compartidas. Gracias por haber estado siempre en los momentos más importantes de mi vida personal y profesional. Y gracias por ser un ejemplo de docente para mí, una de las mejores de nuestra querida Facultad.

- A mis ex profesores Prof. Dra. Mgter. Mabel N. Brunotto, Bioq. Inés A. Cismondi, Prof. Dr. Alberto O. Lenta, Dra. Catalina M. Francia, Dr. Jorge I. Navarro, Prof. Dra. Ma. Laura Irazuzta y Dr. Pablo Gigena, por haber sido los mejores docentes que pude tener. Gracias por brindarse sin mezquindades, por dar lo mejor en cada clase, por su trato humano, por hacerme amar sus materias y especialidades y por ser un modelo de docencia para mí.

- A la mejor profesora de Química que puede existir, Dra. Raquel Gallará. Muchísimas gracias por sus enseñanzas, por trato cercano y humano, y por haberme acercado a la Fisiología para dar mis primeros pasos en la docencia. Sin tu ayuda, probablemente no estaría aquí. Gracias totales.

- Al Prof. Dr. René Panico, por creer en mí, por haberme invitado a agregarme a la cátedra en aquel lejano año 2001. De no haber ocurrido, no estaría aquí. Gracias por ayudarme a afianzar mi compromiso y mi amor por la Estomatología.

- A Dr. Eduardo Piemonte, por la riqueza de sus aportes a mis trabajos presentados en Jornadas y Congresos.

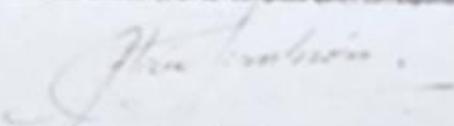
- A mis compañeros de las cátedras "A" y "B", con quienes compartimos el mismo amor por la Estomatología.

- A mis compañeros de la cátedra de Fisiología de nuestra Facultad, por todo el apoyo, la comprensión y por acompañarme en los momentos más importantes de mi vida y de mi carrera.

- A la Dra. Delia Caminos, gracias por esas tardes compartidas estudiando el Grinspan, viendo diapositivas, practicando clases antes de los concursos, preparando café y también retándome un poco (mucho)...

- A mi querida amiga y colega Susana “Cacha” Morales, por todas y cada una de las experiencias compartidas, por la buena onda, por ayudarme a veces a descontracturar y desdramatizar un poco. Y por motivarme siempre.
- A las secretarias de la cátedra Carina Juárez y Marina Gigena por colaborar siempre conmigo de la mejor manera, por su buen trato, por su cordialidad y excelente predisposición.
- A una de las mejores secretarias que una cátedra y una Facultad pueden tener, Mónica Bornancini, mi agradecimiento desde lo personal y lo humano. Gracias por estar siempre.
- A las secretarias de la Escuela de Graduados, Liliana Dajruch y Sofía Arach por su inestimable ayuda a cada paso, por su constante colaboración para resolver los obstáculos que se presentaban en algunas ocasiones y por ser tan buenas personas. Sin uds, este trabajo tampoco hubiese llegado a buen puerto.
- Al Od. Nicolás Peralta, por su inestimable ayuda para llevar adelante la defensa de esta tesis vía virtual.
- Al Área de Informática de la Facultad de Odontología por poner en marcha los medios necesarios para que la presentación de este trabajo fuese posible.
- A la Prof. Dra. María Elsa Gómez de Ferraris y al Prof. Dr. Guillermo De Leonardi por su inestimable ayuda en la organización de la defensa de esta tesis doctoral.
- A las autoridades de la Facultad de Odontología y de la Escuela de Graduados.
- A nuestros pacientes y alumnos, por ser el motor para trabajar más y mejor cada día.
- A todos los que de una manera u otra me ayudaron en la concreción de este trabajo.

# Certificado del Comité de Ética

	<b>COMITÉ INSTITUCIONAL DE ETICA EN INVESTIGACION EN SALUD (CIEIS)</b> <b>FACULTAD DE ODONTOLOGIA, UNC</b>	
<b>Título del Proyecto</b> <b>N° de CIEIS- ODO-</b> <b>PSI. Otros</b>	Correlación de la actividad telomerasa (AT) con marcadores de stress oxidativo y actividad antioxidante en lesiones potencialmente malignas (LPM) y carcinomas de la mucosa oral.  Proyecto ODO-CIEIS N° 76	
<b>Autor responsable</b>	Evelin Bachmeier	
<b>Director responsable</b>	Silvia López de Blanc	
<b>Trabajo Patrocinado</b>	Describir brevemente:	
<b>Investigación en personas vulnerables</b> (niños, ancianos, pacientes psiquiátricos, discapacitados, personas privadas de su libertad, pacientes oncológicos)	Describir brevemente:  Se propone: a) determinar la AT en lesiones potencialmente malignas y en carcinomas de la mucosa bucal, b) determinar el estrés oxidativo en LPM y cáncer de la mucosa bucal utilizando Malondialdehído como marcador de lipoperoxidación lipídica tisular, y c) determinar la capacidad de defensa antioxidante mediante la determinación de Superóxido Dismutasa y ácido úrico en dichos pacientes.	Fecha de pase de resumen de protocolo, consentimiento informado e informe con fundamentos al CIEIS: 04/11/14.  Decisión:
<b>APROBADO</b>	Firma Coordinador (o en su reemplazo quien corresponda)    Dra. Alicia del V. Simbrón Subcoordinadora Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud Facultad de Odontología UNC	Lugar y Fecha  Córdoba, 04/11/2014
"Se recuerda que el CIEIS sólo realiza la validación ética de protocolos de investigación y quedan fuera de su decisión otras cuestiones metodológicas"		

# ÍNDICE GENERAL

	Página
- <i>Comisión de Tesis</i>	1
- <i>Jurado de Tesis</i>	1
- <i>Dedicatoria</i>	2
- <i>Agradecimientos</i>	3
- <i>Certificado del Comité de Ética (CIEIS, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba)</i>	8
<b>1. ABREVIATURAS</b>	12
<b>2. RESUMEN</b>	13
<b>3. SUMMARY</b>	15
<b>4. INTRODUCCIÓN</b>	17
<b>4.1. TELÓMEROS</b>	18
<b>4.1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS TELÓMEROS</b>	18
4.1.2. Problema asociado a la replicación celular: el acortamiento telomérico	21
4.1.2.1. Hipótesis del reloj mitótico celular. El límite de Hayflick	21
<b>4.2. MECANISMOS DE REPLICACIÓN TELOMÉRICA</b>	22
<b>4.3. TELOMERASA</b>	22
4.3.1. Estructura de la enzima telomerasa	22
4.3.2. Funciones de la enzima telomerasa	27
4.3.3. Actividad telomerasa en células humanas	33
4.3.4. Regulación de la actividad telomerasa	35
4.3.5. Inflamación crónica y telomerasa	39
4.3.6. Stress oxidativo, actividad telomerasa y cáncer	40
4.3.7. Actividad telomerasa y estilo de vida	46

	Página
<b>4.4. CÁNCER BUCAL, DESÓRDENES POTENCIALMENTE MALIGNOS Y ACTIVIDAD TELOMERASA</b>	47
<b>5. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	63
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b>	63
<b>7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	63
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	65
<b>8.1. POBLACIÓN</b>	66
8.2. Criterios de exclusión	68
8.3. Metodología y protocolo de trabajo	69
<b>9. RESULTADOS</b>	78
9.1. Descripción de la población estudiada	79
9.1.1. Características clínicas de los pacientes	79
9.1.1.1. Distribución de patologías estomatológicas según grupo	79
9.1.1.2. Caracterización de la muestra según hábitos y factores de riesgo	86
9.2. Determinaciones Microbiológicas	91
9.2.1. Estudios Micológicos:	91
9.2.2. Estudios virológicos	92
9.3. Determinación de la actividad telomerasa	94
9.3.1. Relación entre actividad telomerasa, hábitos tóxicos y factores de riesgo	96
9.3.2. Relación entre actividad telomerasa y parámetros histopatológicos (grado de displasia y presencia de infiltrado)	98

	Página
9.4. Determinación de marcadores de stress oxidativo y sustancias antioxidantes	98
9.4.1. Determinación de la concentración de malondialdehído salival y tisular	99
9.4.2. Determinación de la actividad de superóxido dismutasa salival	101
9.4.3. Determinación de la concentración de ácido úrico salival	102
9.4.4. Correlación entre la concentración de malondialdehído salival y tisular	103
9.4.5. Correlación entre la concentración de malondialdehído y la actividad de superóxido dismutasa salivales	104
9.4.6. Correlación entre las concentraciones de malondialdehído y ácido úrico salivales	105
9.4.7. Correlación entre la actividad de superóxido dismutasa y la concentración de ácido úrico a nivel salival	106
9.5. Relación entre la actividad telomerasa y las concentraciones de malondialdehído salival y tisular	107
9.6. Relación entre la actividad telomerasa y la actividad de superóxido dismutasa salival	109
9.7. Relación entre la actividad telomerasa y la concentración de ácido úrico salival	110
9.8. Relación entre los marcadores de stress oxidativo y sustancias antioxidantes y la presencia de factores de riesgo.	111
<b>10. DISCUSIÓN</b>	<b>116</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b>	<b>130</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>133</b>
<b>13. ANEXOS</b>	<b>160</b>

## **ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**AT:** Actividad Telomerasa

**AU:** Ácido Úrico

**CCEB:** Carcinoma a Células Escamosas de la Mucosa Bucal

**DPM:** Desórdenes Potencialmente Malignos

**GC:** Grupo Control

**GE:** Grupo de Estudio

**VPH:** Virus del Papiloma Humano

**IMC:** Irritación Mecánica Crónica

**LB:** Leucoplasia Bucal

**LBNI:** Lesiones Benignas no Inflamatorias

**LLO:** Lesiones Liquenoides Orales

**LP:** Liquen Plano

**LVP:** Leucoplasia Verrugosa proliferativa

**MCS:** Mucosa Clínicamente Sana

**MDA:** Malondialdehido

**ROS:** Radicales Libres de Oxígeno

**SOD:** Superóxido Dismutasa

**TRAP:** Telomerase Repeat Amplification Protocol

## **RESUMEN**

**Introducción:** Los **telómeros** constituyen la porción terminal de los cromosomas eucariotas y consisten en repeticiones hexaméricas de nucleótidos, su función es crítica en el mantenimiento de la integridad del genoma. La telomerasa es una enzima transcriptasa reversa generalmente no detectable en tejidos somáticos normales, pero altamente expresada en células germinales, cuya función es la de mantener la longitud telomérica. Es detectable en la mayoría de los cánceres humanos, entre ellos, el carcinoma a células escamosas (**CCEB**) y los desórdenes potencialmente malignos (**DPM**) de la mucosa bucal, y estaría implicada en la carcinogénesis. Numerosos factores intervienen en la regulación de su actividad. Algunos estudios dan cuenta de la influencia de los hábitos tóxicos en la reactivación de la enzima. Del mismo modo, el stress oxidativo podría actuar modulando la actividad de la enzima.

### **Objetivos:**

- Determinar la Actividad Telomerasa (**AT**) en **DPM** y en **CCEB** de la mucosa bucal.
- Determinar el estrés oxidativo en **DPM** y cáncer de la mucosa bucal a través de la utilización de malondialdehído (**MDA**) como marcador de lipoperoxidación tisular.
- Determinar la capacidad de defensa antioxidante a través del dosaje de la enzima superóxido dismutasa (**SOD**) y de ácido úrico (**AU**) en pacientes con diagnóstico de las patologías antes mencionadas.

**Material y métodos:** se realizó un estudio tipo caso- control, con pacientes que asistieron a las Cátedras de Estomatología "A" y "B" durante el período 2017- 2019, apareados por sexo y edad. El Grupo de Estudio (**GE**) estuvo integrado por 50 pacientes con diagnóstico de **CCE**, Liquen plano bucal+Lesiones Liquenoides Orales (**LP+LLO**) y Leucoplasia Bucal (**LB**), mientras que el Grupo Control (**GC**) estuvo integrado por pacientes con mucosa clínicamente sana. Se completó Historia Clínica con factores de riesgo, se realizó la toma de saliva basal y toma biopsica. La biopsia se dividió en tres fragmentos: para análisis histopatológico, para determinación de **AT** y virus del papiloma humano (**HPV**) y para determinación de **MDA** tisular. A todos los pacientes se les realizó estudio micológico directo y por cultivo. La saliva se utilizó para la determinación de **MDA** salival, **SOD** y

**AU.** Se analizó la presencia de factores generadores de irritación mecánica crónica (**IMC**) de la mucosa bucal.

**Resultados:** se observaron diferencias estadísticamente significativas en la determinación de **AT** de los pacientes del **GE** comparado con el **GC**. La **AT** más intensa se detectó en los pacientes portadores de **CCEB**, seguidos por el grupo **LP+ LLO** y luego el grupo **LB**. No se encontró relación entre los hábitos de fumar, beber alcohol y tomar mate y la **AT**. Se observó relación entre la presencia de **IMC** y la intensidad de **AT**. Los niveles de **MDA** salival y tisular y de **SOD** se encontraron elevados en el **GE** comparado con **GC**. El **AU** disminuyó significativamente en los pacientes del **GE**. La **AT** se correlacionó con los niveles de **MDA** salival y tisular, **SOD** y **AU**.

**Conclusiones:** la **AT** estaría aumentada en los pacientes con lesiones malignas y premalignas de la mucosa bucal. Dicha actividad no estaría relacionada con la presencia de hábitos tóxicos pero sí con la **IMC**. Los marcadores de stress oxidativo analizados (**MDA, SOD, AU**) modularían la **AT**.

## **SUMMARY**

**Introduction:** Telomeres constitute the terminal portion of eukaryotic chromosomes and consist of hexameric nucleotide repeats, their function is critical in genome integrity maintenance. Telomerase is a reverse transcriptase enzyme generally not detectable in normal somatic tissues, but highly expressed in germ cells, and its function is to maintain telomeric length. It is detectable in most human cancers, including squamous cell carcinoma (**SCC**) and potentially malignant disorders (**PMD**) of the oral mucosa, and would be involved in carcinogenesis. Numerous factors are involved in the regulation of their activity. Some studies show the influence of toxic habits on the reactivation of the enzyme. Similarly, oxidative stress could modulate telomerase activity (**TA**).

### **Objectives:**

- To determine **TA** in **PMD** and **SCC** of the oral mucosa.
- To determine oxidative stress in **PMD** and cancer of the oral mucosa through the use of malondialdehyde (**MDA**) as a marker of tissue lipoperoxidation
- .- To determine the antioxidant defense capacity through measurement of salivary superoxide dismutase (**SOD**) and uric acid (**UA**) in patients diagnosed with the afore mentioned pathologies.

**Material and methods:** a case-control study was carried out, with patients attending the Chairs of Stomatology “A” and “B” during the 2017-2019 period, matched by sex and age. Study Group (**SG**) consisted of 50 patients with a diagnosis of **SCC**, lichen planus+oral lichenoid lesions (**LP + LLO**) and oral leucoplakia (**OL**), while the Control Group (**GC**) was composed of patients with clinically healthy mucosa. Clinical history was completed with risk factors, basal saliva was taken and biopsy was performed. The biopsy was divided into three fragments: for histopathological analysis, for determination of **AT** and human papilloma virus (**HPV**) and for determination of tissue **MDA**. All patients underwent direct mycological study and culture. Saliva was used for the determination of salivary **MDA**, **SOD** and **UA**. The presence of chronic mechanical irritation (**CMI**) of the oral mucosa was determined.

**Results:** Statistically significant differences were observed in the **TA** determination of the patients of the **SG** compared to the **CG**. The most intense **TA** was detected in patients with diagnostic of **SCC**, followed by **LP+LLO** group and then **OL** group. No relationship was found between the habits of smoking, drinking alcohol and drinking mate and **TA**. Relationship between the presence of **CMI** and the intensity of **TA** was observed. Salivary and tissue **MDA** and **SOD** concentration were elevated in the **SG** compared to **CG**. **UA** decreased significantly in **SG** patients compared to **CG**. **TA** correlated with concentrations of salivary and tissue **MDA**, **SOD** and **UA**.

**Conclusions:** **TA** would be increased in patients with malignant and premalignant lesions of the oral mucosa. This reactivation would not be related to the presence of toxic habits but to the **CMI**. The oxidative stress markers analyzed (**MDA**, **SOD**, **UA**) would modulate **TA**.

# INTRODUCCIÓN

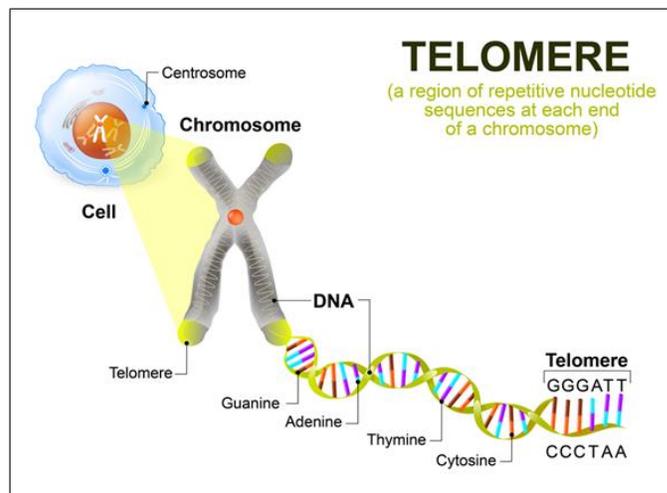
## TELÓMEROS

Los **telómeros** constituyen la porción terminal de los cromosomas eucariotas y consisten en repeticiones hexaméricas de nucleótidos, siendo su función crítica en el mantenimiento de la integridad del genoma. <sup>(1-3)</sup> Desde hace tiempo se conoce que están presentes en todos los cromosomas lineales, tanto eucariotas (nucleares y mitocondriales) como procariontas. La importancia del mantenimiento de la integridad telomérica fue enunciada en la década del '50 por Muller y Mc Clintock, quienes describieron que los cromosomas que habían perdido un telómero eran altamente inestables. <sup>(4,5)</sup> La pérdida de alguno de los telómeros lleva a la fusión cromosómica, ya sea entre dos cromosomas distintos o entre cromátidas hermanas. Esta situación origina cromosomas dicéntricos, los cuales sufren sucesivos ciclos de ruptura y fusión y eventualmente se pierden en las sucesivas divisiones celulares. <sup>(6)</sup>

Los cromosomas que han perdido alguno de sus dos telómeros sólo serán mantenidos si son “reparados” agregando un nuevo telómero, fenómeno conocido como “chromosome healing”.

### 1-Estructura y función de los telómeros

Los telómeros están constituidos por ADN repetitivo y proteínas asociadas. Se trata de un gran complejo núcleo-proteico que se encuentra en los extremos de los cromosomas, donde su estructura es diferente del resto de la cromatina. <sup>(7)</sup> **(FIGURA 1).**



*Fig.1. Estructura de los telómeros en la especie humana. Secuencias de ADN telomérico.*



Sin embargo, en la estructura de los telómeros no sólo está involucrada una secuencia repetitiva de ADN, sino que existe un complejo de proteínas asociadas a los telómeros, de gran importancia estructural y funcional. A pesar de que la función de los telómeros se conserva en diferentes organismos, la arquitectura de las proteínas con las que interactúan es muy variada y parece haber cambiado rápidamente a lo largo de la evolución. En el ser humano, este complejo está formado por seis proteínas y se denomina shelterina o complejo protector, compuesto por TRF1 Y TRF2 que a su vez interactúan con RAP1, TIN2, TPP1 y POT1 para asociarse al ADN telomérico de doble y simple cadena. <sup>(10)</sup> La shelterina impide la activación de un mecanismo de reparación del ADN (MRA) y actúa en la regulación de la holoenzima encargada de la extensión de los telómeros, la telomerasa, en cuya estructura y función profundizaremos más adelante. **(FIGURA 2).**

La proteína TRF1 (Telomeric Repeat Binding Factor 1) regula negativamente la longitud de los telómeros. Su sobreexpresión determina el acortamiento telomérico, mientras que su delección lleva al alargamiento de los mismos. TRF2 (Telomeric Repeat Binding Factor 2) resulta esencial para la protección del ADN y su ausencia lleva a la activación de la vía p53, induciéndose senescencia y apoptosis. La proteína POT1 (Protector of Telomeres 1) se encarga de la represión del sistema de reparación del ADN, encontrándose su sobreexpresión desde etapas tempranas de la carcinogénesis. Finalmente, las proteínas TIN2 (TRF1-Interacting Nuclear Factor 2) y TPP1 (Tripeptidyl-peptidase 1 Preproprotein) y RAP1 (Represor/Activator 1) se encargan de las interacciones proteína-proteína que mantienen interconectado al complejo. <sup>(11-13)</sup>

Otro factor estructural que determina la función del telómero es la presencia de ARNs, llamados TERRAs (Telomere Repeat Containing RNAs) <sup>(14)</sup>. Estos ARN se crean a partir de los telómeros, y se cree que la transcripción de TERRAs está mediada por TRF1, a partir de una interacción con la ARN polimerasa II. Funcionalmente los TERRAs están implicados en la formación de heterocromatina telomérica, la protección de los telómeros y la regulación negativa de la telomerasa.

La función de cobertura o “capping” que llevan adelante los telómeros es indispensable para la vida celular, desde el momento en que están implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Resultan esenciales tanto para la estabilidad como para la correcta segregación cromosómica en la mitosis y en el apareamiento y recombinación de los

cromosomas homólogos durante la meiosis, <sup>(14)</sup> protegiendo los extremos cromosómicos. En ese sentido, ofrecen mecanismos de protección frente a la acción de exonucleasas celulares, protección frente a la unión de extremos no homólogos, permiten a las células diferenciar entre los extremos naturales de los cromosomas y el ADN dañado y mantener la integridad de los cromosomas permitiendo la replicación sin pérdida de secuencias codificantes. Por otra parte, los telómeros mantienen un registro del número de divisiones celulares, determinando el ciclo de vida celular y el momento de ocurrencia de la senescencia replicativa. Y resuelve un problema fundamental de la dinámica celular molecular al suministrar los mecanismos para replicar los extremos del ADN, como veremos más adelante. <sup>(15,16)</sup>

En síntesis, los telómeros forman una estructura en bucle que se comporta de manera protectora contra la fusión y degradación de los cromosomas. El acortamiento o daño a los telómeros y la apertura del bucle inducen un estado “no cubierto” que desencadena una respuesta de daño al ADN que resulta en senescencia o apoptosis. <sup>(17)</sup>

## **Problema asociado a la replicación celular: el acortamiento telomérico**

### **Hipótesis del reloj mitótico celular. El límite de Hayflick**

En 1961 Hayflick demostró que todas las células presentan una capacidad de reproducción limitada en el tiempo, es decir, que no son inmortales, definiendo lo que hoy se conoce como “Límite de Hayflick”. <sup>(18)</sup> En ese momento se hablaba de la existencia de un mecanismo capaz de contar cuántas veces una célula puede dividirse. En 1975 Hayflick y Wright demuestran que la estructura encargada de definir la cantidad de veces que una célula se iba a dividir, era el núcleo. <sup>(19)</sup> Para entonces ya se conocía que los telómeros eran estructuras vitales para asegurar la estabilidad genómica y que, no obstante eso, las ADN polimerasas eran incapaces de replicar los extremos de las moléculas lineales de ADN. Por tanto, la longitud de los telómeros en las células de tejidos normales se acortaría luego de cada división mitótica. Todo ello llevó a Olovnicov <sup>(20)</sup> a proponer que el acortamiento telomérico en cada ronda de replicación celular podría ser el mecanismo que definía el número de veces que la célula se iba a dividir, determinando entonces su reloj biológico. Asimismo, sugiere que, dado que es inconcebible que la célula pierda secuencias importantes de los cromosomas, los telómeros

estarían constituidos por secuencias repetitivas que no tendrían ninguna información genética relevante. Los estudios que mostraron la veracidad de esta hipótesis fueron llevados adelante más de quince años después. <sup>(21-23)</sup>

La tasa de acortamiento telomérico en cada replicación no es constante y está regulada por factores tales como el tipo de célula, estrés oxidativo y sustancias antioxidantes, la edad del paciente, hábitos como fumar, beber alcohol, etc. Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, la célula entra en estado de senescencia y pierde su potencial mitótico.

No obstante, y a pesar de los avances en el campo de la Biología Molecular en los últimos años, resulta aún insuficiente el conocimiento de algunos aspectos de la dinámica de los telómeros.

### **Mecanismos de replicación telomérica**

Como resultado de la incapacidad de las ADN polimerasas convencionales para copiar todas las bases de la hebra de ADN, en cada ciclo de replicación el cromosoma no puede ser resintetizado por completo y en consecuencia se pierde el extremo 3'. De no resolverse este problema replicativo, el contenido genético completo no podrá transferirse de generación en generación. Por esta razón, todas las especies deben tener, a nivel de las células germinales, algún mecanismo que permita la replicación completa de sus genomas. <sup>(8)</sup>

Con este objetivo, la mayoría de los mamíferos utilizan una enzima retrotranscriptasa inversa específica para tal fin, denominada **telomerasa**.

Existen líneas celulares humanas que carecen de actividad telomerasa, pero que tienen la capacidad de mantener o alargar sus telómeros mediante mecanismos alternativos, a los que se denomina ALT (alternative lengthening of telomeres). <sup>(24)</sup>

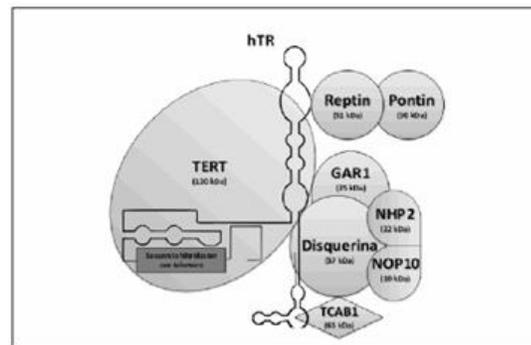
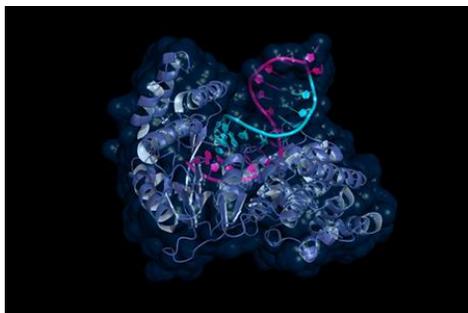
## **2-TELOMERASA**

### **Estructura de la enzima telomerasa**

La telomerasa es una enzima transcriptasa reversa generalmente no detectable en tejidos somáticos normales, pero altamente expresada en células germinales. <sup>(25,26)</sup> Algunos estudios de muestras provenientes de tejidos humanos han revelado bajos niveles de **Actividad**

**Telomerasa (AT)** en tejidos proliferativos normales con alto potencial de renovación tales como la médula ósea, piel, tracto gastrointestinal y testículos, así como en linfocitos activados. <sup>(27- 29)</sup> **(FIGURAS 3a y 3b)**

La holoenzima telomerasa humana considerada una ribonucleoproteína (RNP) ya que está compuesta por la subunidad catalítica hTERT, un componente de ARN (hTR) que actúa como molde para la adición de la secuencia corta repetitiva d(TTAGGG) en el extremo 3' del ADN telomérico y, además, por proteínas accesorias específicas de gran importancia funcional. Por definición, la telomerasa es una enzima transcriptasa reversa dado que sintetiza el ADN telomérico usando como molde la estrecha región del ARN que forma parte de su estructura. <sup>(30,31)</sup> El descubrimiento de esta enzima constituyó un hito, ya que resolvió en principio el problema de la replicación de los extremos de las moléculas lineales de ADN.



*Fig. 3.a. Estructura tridimensional de la enzima telomerasa obtenida mediante software Chimera versión 1.13.1. win 64. Fig 3.b. Estructura funcional del complejo telomerasa, integrada por la subunidad catalítica (hTERT), su ARN y las proteínas asociadas.*

## **2.a- Subunidad Catalítica, TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) o hTERT (en humanos)**

Las características funcionales de la telomerasa difieren de otras polimerasas en que utilizan un molde interno en lugar de un molde externo, lo cual impone limitaciones específicas para la elongación del iniciador y la catálisis. La telomerasa alarga el ADN iniciador por la adición a uno de los desoxinucleósidos trifosfatados y así genera las repeticiones en tándem de los telómeros. <sup>(32)</sup>

Actualmente se propone la existencia de dos sitios enzimáticos independientes de interacción con el ADN iniciador. Uno de ellos contiene el molde de ARN y tiene por función alinear el extremo 3' del iniciador para su elongación en el centro catalítico. El otro se une al ADN

iniciador hacia el lado 5' del molde y de esta manera proporciona una vía de salida para la hebra en crecimiento. Por medio de este modelo se explica la adición de varias repeticiones sin que la enzima se disocie del ADN iniciador. Este sitio catalítico único debe moverse en relación con el ARN que sirve de molde. Esta enzima también presenta una actividad endonucleasa que probablemente esté relacionada con una función de corrección. <sup>(33)</sup>

En síntesis, hTERT comprende sitios de anclaje para el ADN telomérico y también contribuye a la catálisis de los telómeros.

Diversos estudios han encontrado una mutación del gen que codifica para hTERT en diversos tipos de cánceres tales como el de pulmón, páncreas, ovario y mucosa bucal, entre otros <sup>(34-37)</sup>. Se ha reportado que la expresión de hTERT es regulada por varios factores epigenéticos, tales como promotores de metilación o factores remodeladores de cromatina, y por varios factores activadores y represores tales como p53, Rb, Sp1, NF-*kappa*B, USF, factor CTCF y c-myc entre otros. Sin embargo, su regulación in vivo aún tiene aspectos controversiales y no estudiados. <sup>(38,39)</sup>

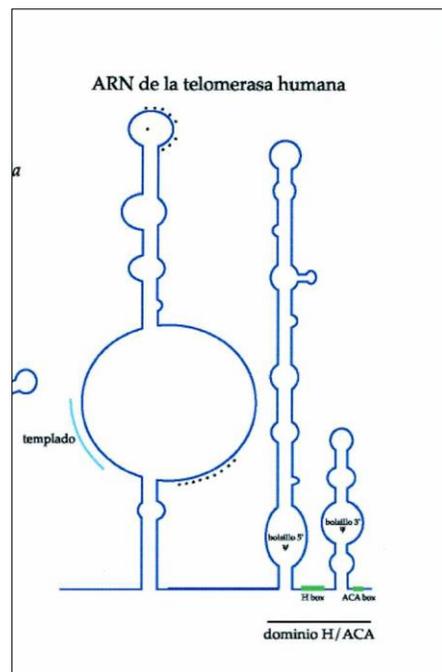
La localización subcelular de TERT es principalmente a nivel del núcleo y mitocondrias, aunque bajo ciertas circunstancias la enzima puede translocarse también al citoplasma o incluso estar presente a nivel de los nucleolos.

## **2.b- ARN, TERC, TR (Telomerase RNA) o hTERC (en seres humanos)**

Los genes codificantes de esta subunidad de la telomerasa fueron identificados en más de 50 organismos, entre ellos mamíferos y específicamente, en la especie humana. <sup>(40)</sup> La longitud de esta molécula varía enormemente entre los distintos organismos. Comúnmente la región de la molécula de ADN que sirve como molde para la síntesis de los telómeros corresponde a una repetición telomérica y media.

Este componente de la telomerasa contiene tres dominios conservados: el dominio central con actividad catalítica que actúa como plantilla, el dominio CR4 /CR5 que se requiere para la actividad telomerasa y el dominio H / ACA, conservados en todos los vertebrados. El dominio central y el dominio CR4/CR5 interactúan directamente con la subunidad hTERT. <sup>(41)</sup> **(FIGURA 4)**. HTERC tiene localización nuclear y citoplasmática.

Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la función del resto de la molécula de ARN, más allá de la porción destinada a proveer el templado para la síntesis de las repeticiones teloméricas. Ni siquiera se tiene aún un conocimiento acabado respecto de las razones por las cuales existe la gran diversidad evolutiva en tamaño y tipo de secuencias de la molécula entre los diferentes organismos.



*Fig. 4. ARN de la Telomerasa humana. Autor: Muñoz DP. Detección de actividad telomerasa en distintos trypanosomátidos: Caracterización bioquímica y clonado de los genes (subunidad catalítica y ARN) de la telomerasa de Trypanosoma cruzi. www.digital.bl.fcen.uba.ar.*

### 2.c- Complejo de Proteínas Asociadas a Telomerasa

La presencia de proteínas accesorias específicas en el complejo telomerasa, es de vital importancia para el correcto funcionamiento de la misma. Estas proteínas, entre otras funciones, regulan la biogénesis de la telomerasa, su localización subcelular y su función in vivo.

Mientras que las telomerasas de los distintos organismos comparten los dos componentes básicos explicados anteriormente, el resto de proteínas asociadas a esta enzima, difieren notablemente entre las distintas especies. En este sentido, el análisis de la telomerasa

purificada ha permitido identificar como componentes integrales de la telomerasa humana a varias proteínas, entre ellas: disquerina, NHP2, NOP10, pontina/reptina, GAR1 y TCAB1. <sup>(41-43)</sup> **(FIGURA 5)**

Disquerina, NHP2 y NOP10 son necesarias para la estabilidad y acumulación in vivo del ARN de la telomerasa humana (hTR). <sup>(44)</sup> La asociación de las tres proteínas antes mencionadas y GAR1 a hTR permite contar con una ribonucleoproteína biológicamente funcional. Pontina y reptina son dos ATPasas que interactúan con hTERT en la fase S del ciclo celular, lo que hace pensar en una regulación dinámica de hTERT, dependiente del ciclo celular. Se cree que estas dos proteínas jugarían un papel esencial en el ensamblado de la telomerasa in vivo.

El modelo actual contempla a disquerina, pontina y reptina como un andamio que recluta y estabiliza a hTR, y a su vez permite el ensamblado de la ribonucleoproteína telomerasa. Una vez formado este complejo, se considera que pontina y reptina se disociarían del complejo y liberarían la enzima catalíticamente activa. <sup>(45)</sup> Así también pontina y reptina tienen otras múltiples funciones, incluyendo la regulación transcripcional, reparación de daños en el ADN y la actividad de la telomerasa. También pueden interactuar con los principales actores oncogénicos tales como  $\beta$ -catenina y c-myc y regular su función oncogénica. Finalmente, la ubicación subcelular de la telomerasa parece estar regulada por el factor TCAB1. <sup>(46)</sup>

Las células normales diploides humanas que expresan transitoriamente hTERT adquieren AT, lo que demuestra que hTERT podría ser el componente limitante necesario para la restauración de la actividad de la telomerasa. <sup>(47)</sup>

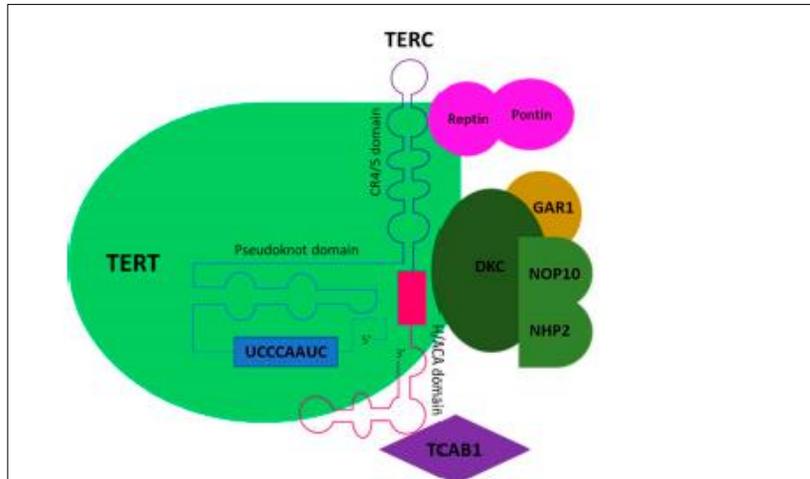


Fig. 5. Complejo de proteínas asociadas a telomerasa. Obtenido de Ventura A, Pellegrini C, Cardelli L, Rocco T, Ciciarelli V, Peris K, Fargnoli MC. *Telomeres and telomerase in cutaneous squamous cell carcinoma. Int J Mol Sci* 2019 Mar 16; 20(6)

### 3-Funciones de la enzima telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína retrotranscriptasa específica encargada de la replicación de los telómeros. Como expresamos anteriormente, su descubrimiento permitió explicar el dilema de la replicación de los extremos de moléculas lineales de ADN (“problema de la replicación final”, donde la copia de los extremos de los cromosomas se veía comprometida al no existir un soporte estable para la unión de la polimerasa) y el mecanismo molecular de protección de los extremos cromosomales. La actividad de la misma fue detectada por primera vez en *Tetrahymena* y después en otros organismos eucariotas. <sup>(31,48)</sup> Para la actividad de la telomerasa son necesarios tanto el componente proteico con actividad catalítica como el ARN.

Esta enzima alarga el ADN iniciador a través de la adición uno a uno de los desoxinucleósidos trifosfatados y así genera las repeticiones en tándem de los telómeros. <sup>(32)</sup> Así hTERT reconoce el terminal 3’ en el extremo de los cromosomas y añade repeticiones TTAGGG sintetizadas *de novo* utilizando RNA como molde.

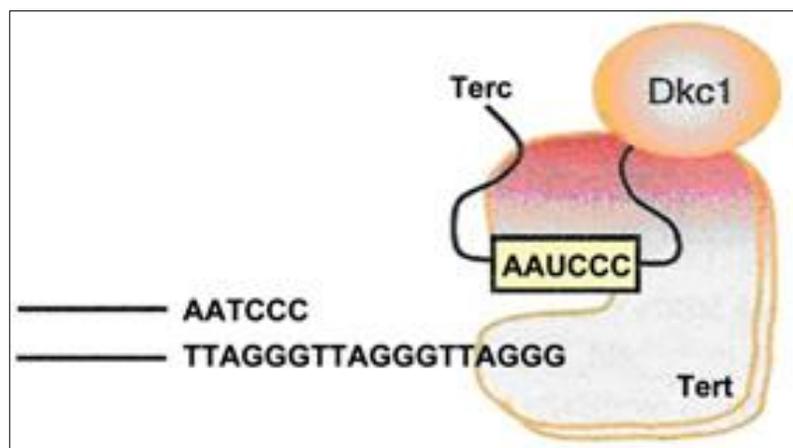
Los organismos eucariotas unicelulares presentan cantidades ilimitadas de telomerasa y mantienen su longitud telomérica constante, mientras tanto, la mayoría de los organismos multicelulares, entre ellos el ser humano), poseen cantidades limitadas de telomerasa por lo que el acortamiento telomérico se verifica acoplado a la división celular, debido a la

incapacidad de las ADN polimerasas normales de copiar los extremos terminales de los cromosomas. El acortamiento de los telómeros se observa en todos los tejidos humanos a medida que transcurre la edad. Esto refleja el acúmulo de divisiones celulares asociado a la renovación tisular. La pérdida progresiva de los telómeros es uno de los mecanismos que impone un límite al crecimiento de células normales en cultivo, fenómeno que se denomina senescencia replicativa. <sup>(49)</sup>

El acortamiento de los telómeros induce la apoptosis y la parada del ciclo celular *in vivo*, lo que conlleva la pérdida celular, la disfunción tisular y la alteración de la capacidad regenerativa de las células madre.

El alargamiento de los telómeros por la telomerasa es un proceso multietápico. El primer paso consiste en la hibridación de los nucleótidos del extremo 3' con el extremo del ARN molde en el interior del dominio ARN del complejo telomerasa. La secuencia que sirve como molde consta de 11 nucleótidos y es complementaria a casi dos secuencias teloméricas. Posteriormente, la brecha en el extremo del molde se completa mediante un proceso de síntesis, para lo cual se utilizan nucleótidos trifosfato a nivel del sitio catalítico de la enzima (hTERT). Finalmente, la nueva cadena sintetizada se transloca en dirección 5' con el fin de permitir la formación de una nueva brecha y la repetición del ciclo. <sup>(8)</sup> **(FIGURA 6)**

Una vez que el sustrato fue elongado, el mismo puede seguir tres caminos: 1) permanecer unido a la telomerasa, 2) disociarse de la misma o 3) liberarse sin disociarse totalmente, y reposicionarse para volver a ser copiado, permitiendo de esta manera que se produzca otro ciclo de polimerización.



*Fig. 6. Elongación de los telómeros por la telomerasa. De Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. Nature Rev Gen 2007; 8: 299-301. (Modificado).*

Además de la actividad de polimerización, la telomerasa tiene la capacidad de clivar los sustratos de ADN. Comúnmente esto genera que se vean productos de ADN que son más cortos que el sustrato de ADN utilizado en estudios de actividad telomerasa in vitro. Se supone que in vivo, esta actividad estaría relacionada con funciones de corrección y que ayudaría a procesar sustratos para mejorar su elongación. <sup>(50)</sup>

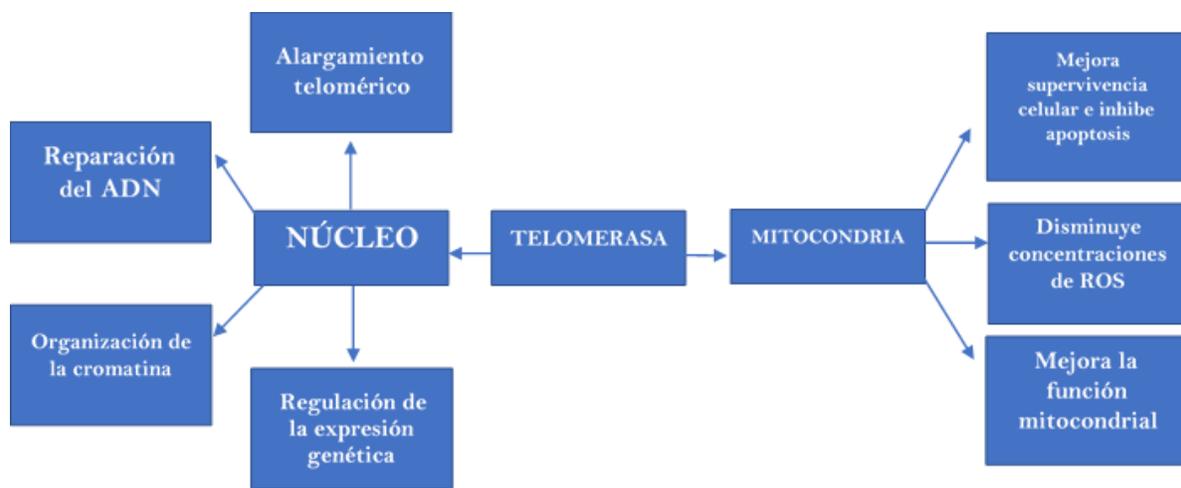
Sin embargo, más allá de las reconocidas funciones de la telomerasa en relación al mantenimiento de la longitud telomérica, es reconocido el hecho de que se encarga de la regulación del metabolismo celular a través de diferentes mecanismos tales como: prolongar la supervivencia, mejorar la tasa de crecimiento y proliferación celular reduciendo la apoptosis, la expresión de determinados genes, la biogénesis de p53, la reestructuración de la cromatina y reparación de daños en el ADN, la participación en vías de transducción de señales intracelulares, el metabolismo mitocondrial y, en consecuencia, la respuesta frente al stress oxidativo, entre otros mecanismos. <sup>(51)</sup> Estas funciones dependerían en gran medida de la subunidad TERT de la telomerasa, tanto en su localización nuclear como mitocondrial, así como también al momento de translocarse a nivel citoplasmático y/o nucleolar. <sup>(52)</sup> **(FIGURA 7)**

En relación al efecto de la AT sobre el crecimiento y proliferación tisular, se ha observado que esta enzima modularía la expresión de distintos genes promotores del crecimiento celular, como por ejemplo EGFR (epidermal growth factor receptor) entre otros. <sup>(53)</sup>

Varios estudios describen una función reguladora de la telomerasa a través de la expresión de los genes implicados en diversos procesos celulares tales como las diferentes fases del ciclo, la diferenciación y señalización celular, la supervivencia de las células y la angiogénesis. <sup>(53)</sup> Se ha demostrado que la expresión TERT podría promover el crecimiento y la proliferación celular a través de mecanismos dependientes o independientes del alargamiento de los telómeros, induciendo o inhibiendo la expresión de genes pro y antiproliferativos, respectivamente. De hecho, la actividad de la telomerasa aumenta en la mayoría de los tipos de cáncer, principalmente por regulación de su subunidad catalizadora hTERT. <sup>(54)</sup>

Oh y colaboradores <sup>(55)</sup> demostraron que la sobreexpresión de TERT también contribuyó a la supresión de la apoptosis en células miocárdicas, lo que podría indicar la asociación de la actividad telomerasa con la proliferación celular.

Así también distintos reportes han dado cuenta de que la sobreexpresión de telomerasa en queratinocitos basales estaría relacionada con un incremento en la incidencia de tumores de piel inducidos por diferentes carcinógenos, en ratas. <sup>(55)</sup> No se encontraron estudios sobre este comportamiento en queratinocitos de la mucosa bucal.



*Fig.7. Funciones de la telomerasa. Funciones típicas (dependientes del alargamiento telomérico) y funciones no típicas (no dependientes de la longitud telomérica).*

Se ha demostrado experimentalmente que la telomerasa desempeña un importante papel en la regulación de la apoptosis. Estas observaciones sugieren una actividad proapoptótica de hTERT en la mitocondria. En este sentido, los roles de TERT en la mitocondria son consistentes con los informes que muestran que el estrés oxidativo desencadena la exportación nuclear de hTERT. <sup>(56)</sup> Otros autores refieren que la sobreexpresión de hTERT hace que las células sean resistentes a la apoptosis. Este efecto antiapoptótico del TERT se produce en una fase previa a su exportación mitocondrial como paso anterior a la liberación de citocromo c y factor inductor de apoptosis. <sup>(57)</sup>

Numerosos informes indican que la subunidad hTERT es capaz de llevar adelante una contribución a las vías de señalización celular, por ejemplo, la Wnt /  $\beta$ -catenina o NF $\kappa$ B. Estas vías de señalización constituyen un control para la supervivencia y proliferación, la polaridad celular y la diferenciación durante la embriogénesis. Asimismo, estarían implicadas<sup>861</sup> en etapas tempranas de la carcinogénesis, migración y regeneración tisular. (58- 60)

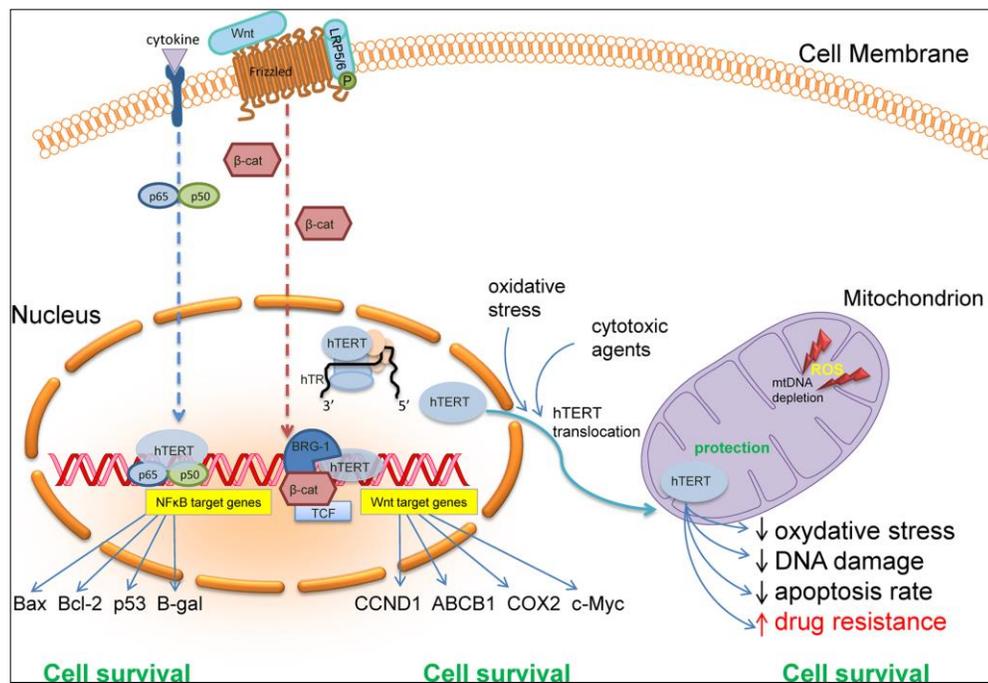
Park y col. <sup>(61)</sup> han revelado que hTERT actúa como un cofactor en la transcripción del complejo  $\beta$ -catenina. Se demostró que hTERT interactuaba con BRG1, un factor de remodelación de la cromatina, para regular la vía de señalización Wnt /  $\beta$ -catenina. Dado que ambas, la vía Wnt y la telomerasa, están comprometidas en el desarrollo embrionario y la homeostasis tisular, se sugiere un vínculo entre estos dos factores.

Por otra parte, el factor nuclear de transcripción kappa B (NF- $\kappa$ B) regula la expresión de múltiples genes diana implicados en la inflamación, en respuestas inmunes, proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La activación de NF- $\kappa$ B está estrechamente controlada tanto en el núcleo, como en el citoplasma. La vía NF- $\kappa$ B puede ser activada por varios estímulos incluyendo las citocinas, la radiación ionizante y el estrés oxidativo. Con frecuencia, la vía NF- $\kappa$ B, se activa durante la génesis tumoral, donde regula la expresión de genes implicados en la proliferación, supervivencia, metástasis, angiogénesis, así como la resistencia a los fármacos y la radiación. <sup>(62)</sup> Akiyama y col. <sup>(62)</sup> fueron los primeros en demostrar que la proteína hTERT interactúa directamente con la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. Ellos encontraron que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) induce la translocación de la proteína hTERT unida a NF- $\kappa$ B p65 desde el citoplasma hasta el núcleo. TNF es una citoquina conectada a la inflamación y se utiliza a menudo en entornos experimentales ya que también induce la formación de ROS (radicales libres de oxígeno).

La telomerasa también podría desempeñar un papel en la reparación del ADN independientemente de su función de alargamiento de los telómeros. Se ha demostrado experimentalmente que la hTERT también está asociada con primasa, <sup>(57)</sup> una proteína bien conocida que participa en la replicación y la reparación del ADN, lo que indica un papel para la telomerasa en la corrección de errores en el ADN. Además, los estudios indican que la expresión ectópica de hTERT provoca un aumento en el nivel de expresión de los genes involucrados en la respuesta de daño al ADN, y esto se cree que está asociado con una

disminución del daño cromosómico espontáneo en las células G1 y una mejora en la cinética de reparación del ADN. <sup>(63)</sup> También se demostró que hTERT está asociado físicamente con muchas proteínas reparadoras del ADN y con el telómero, lo que mejora la estabilidad del genoma y las funciones de reparación del ADN. <sup>(57)</sup> Sin embargo, cada vez hay más pruebas que indican que el papel de la telomerasa en la respuesta al daño del ADN no se limita a la reparación de roturas de doble cadena del ADN, sino que también se asocia con muchos otros tipos de reparación del ADN, incluso a través de la escisión de nucleótidos. <sup>(64)</sup>

En relación a la localización mitocondrial de hTERT, es posible que ésta pueda afectar la señalización en las mitocondrias, favoreciendo la supervivencia celular sobre la muerte celular inducida por estrés. Los datos experimentales sugieren que la sobreexpresión de hTERT disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular, mejora la función mitocondrial e inhibe la apoptosis mediada por ROS en células cancerosas. Sin embargo, otras funciones de la telomerasa en la función mitocondrial permanecen sin dilucidar. <sup>(65)</sup> **(FIGURA 8)**



*Fig. 8. Efectos de la telomerasa en la función y metabolismo mitocondrial. Romasniuk A. The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off. Molecular Biology Reports 2019; 46: 1401- 1411.*

Sin embargo, la subunidad hTERT no es la única responsable de cumplir con funciones de la telomerasa a las comúnmente descritas. Hace tiempo se conoce que hTERT también puede tener cierto control sobre la expresión genética. Blackburn y col. <sup>(7)</sup> demostraron que la hTERT en células de cáncer de colon humano resultó en la supresión de la angiogénesis y los genes asociados a la metástasis.

Todo lo estudiado abre el panorama en relación a la actividad de una enzima cuyo espectro de funciones excede ampliamente su función primigenia de mantener la longitud telomérica.

### **Actividad Telomerasa (AT) en células humanas**

La actividad de la telomerasa es altamente regulada a lo largo del desarrollo humano. Los tejidos embrionarios tempranos y células madre adultas conservan telomerasa activa, pero la actividad de la enzima se reprime durante la diferenciación embrionaria y está ausente en la mayoría de los tipos de células somáticas humanas normales con capacidad proliferativa limitada. Sin embargo, la enzima permanece activa en algunos tejidos, como las células germinales masculinas, las poblaciones de células madre y los linfocitos activados, y se activa en más del 90% de las células cancerosas a través de alteraciones genéticas y epigenéticas durante el proceso de inmortalización y transformación celular. <sup>(66)</sup> El mantenimiento de la longitud e integridad de los telómeros es un determinante crucial de la vida útil de la célula normal y la inmortalidad replicativa de las células cancerosas. La reactivación de la telomerasa es considerada uno de los eventos clave comunes al desarrollo del cáncer. <sup>(67,68)</sup>

#### **a-Células madre adultas**

Las células madre adultas o somáticas son la fuente regeneradora de los distintos tejidos del organismo. Se activan cuando se produce un daño tisular y emigran desde sus nichos hasta el lugar que tienen que reparar o restaurar. Sin embargo, si se multiplican en exceso, o demasiado poco, pueden ser origen de cáncer o de enfermedades degenerativas, respectivamente. El comportamiento de las células madre está determinado por sus telómeros y la cantidad de telomerasa que contienen. Mantener los extremos de los cromosomas en buen estado permite que las células madre funcionen eficazmente. Los defectos en la longitud

de los telómeros en dichas células preceden en el tiempo a la aparición de los primeros síntomas visibles de envejecimiento prematuro o de cáncer.

Por lo tanto, la medida de la longitud telomérica o de la AT en células madre, puede considerarse uno de los parámetros utilizables en el pronóstico. <sup>(49)</sup>

### **b-Tejidos con alta capacidad replicativa**

Kim y col demostraron hace varias décadas que todas las células germinales conservan AT. Esta característica es condición suficiente para el mantenimiento de su longitud telomérica constante a lo largo de la vida y de las generaciones. <sup>(26)</sup>

La telomerasa está presente también en tejidos fetales (a las 20 semanas de desarrollo) con excepción del cerebro, pero la expresión de la misma es reprimida a medida que los tejidos se van diferenciando a lo largo del desarrollo. Poco después del nacimiento no se detecta más en la mayoría de los tejidos somáticos y permanece en este estado en el organismo adulto <sup>(69)</sup>. Como consecuencia los telómeros comienzan a acortarse desde muy temprano en la vida del ser humano.

Las únicas excepciones a esta regla la constituyen los tejidos que poseen una alta capacidad replicativa, en donde la continua división celular demanda un mantenimiento de la longitud telomérica constante. Entre ellos podemos nombrar a las células germinales masculinas y a las células madre de la médula ósea y de la sangre periférica, como mencionamos en el apartado anterior. <sup>(70)</sup> La actividad de esta enzima también está presente en las células epiteliales de la capa basal de la piel y de la mucosa bucal, <sup>(71-72)</sup> de las vellosidades del intestino, tejido endometrial y en la glándula mamaria. <sup>(73-75)</sup> La característica en común de todos estos tejidos es que están continuamente sujetos a renovación celular.

Aunque la telomerasa es detectada en estas células el nivel de actividad es mucho menor que la que se encuentra por ejemplo en células tumorales. <sup>(76)</sup>

### **c- Células tumorales**

Las células cancerígenas presentan AT desde estadios tempranos de la carcinogénesis, tanto in vivo como in vitro. Kim y col. desarrollaron en el año 1994 una técnica sumamente sensible para la detección de AT, denominada **TRAP** (Telomeric Repeat Amplification Protocol), la cual se basa en la extensión de un oligonucleótido no telomérico por la

telomerasa (presente en extractos celulares) y luego estos productos son amplificados por PCR. Con este método los autores hallaron que la telomerasa estaba presente en un 98% en líneas celulares inmortales y aproximadamente en un 90% en tumores primarios humanos. <sup>(68)</sup> Este fue el primer trabajo en el que se evidenció de manera sorprendente la relación que existe entre la presencia de AT y la inmortalidad celular.

Posteriormente, se han publicado numerosos estudios que dan cuenta de la reactivación de esta enzima en distintos tipos de cáncer tales como el de mama, pulmón, riñón, intestino, vejiga, piel y mucosa oral, entre otros. <sup>(77-82)</sup>

Dado que la telomerasa parece reactivarse en etapas muy tempranas de la carcinogénesis, esta enzima se ha convertido en un atractivo marcador para el diagnóstico del cáncer y como posible blanco de ataque para nuevos tratamientos oncológicos. De hecho, se ha propuesto la utilización de la AT para la detección temprana de lesiones cancerígenas, incluso en momentos previos a la progresión maligna, ya que muchas lesiones premalignas ya evidencian actividad de la enzima, como ocurre en el caso de algunos desórdenes potencialmente malignos de la mucosa bucal, tal como profundizaremos más adelante.

#### **4- Regulación de la actividad telomerasa**

El fenómeno de la regulación de actividad de esta enzima se lleva a cabo a varios niveles incluyendo la transcripción, la maduración, modificación, transporte y localización subcelular de cada componente, el ensamble de la enzima, la accesibilidad y la función de la telomerasa sobre los telómeros. Así también características propias de los telómeros, tales como su longitud, y el complejo de proteínas asociadas a los mismos, constituirían un importante mecanismo regulador de esta enzima.

Algunos autores dan cuenta de que la regulación de la AT in vivo es un proceso multifactorial que involucra la regulación de la transcripción, interacciones proteína-proteína y también modificaciones postranscripcionales y postraduccionales. Se trata de un proceso sumamente complejo, pues depende de la accesibilidad al telómero y de la coordinación con múltiples proteínas, moléculas de diversa índole y del microambiente tisular. <sup>(83)</sup>

Estos mecanismos de regulación son capaces de modificar la actividad enzimática en respuesta a cambios que se producen en el medio interno variando la capacidad funcional de la enzima.

Para la actividad de la telomerasa in vitro, sus **dos componentes** hTERT y h TERC son necesarios y suficientes. Sin embargo, la actividad in vivo requiere de una serie de moléculas complementarias que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la actividad de esta enzima. Por ejemplo, las proteínas TRF1, TRF2, tanquirasa, TIN2, POT1 y RAP1 que mencionáramos oportunamente, están involucradas en la interacción con los telómeros y regulan la apertura y cierre de éstos, permitiendo el acceso de otros complejos proteicos tales como la telomerasa.<sup>(84)</sup> Otras proteínas que también permiten el ensamblaje de la telomerasa y facilitan la interacción telomerasa- telómero son HSP90, DKC1, L22, P23 y GAR1. Mientras que MR11A, NBS1, KU70, KU80, DNAPK y ATM funcionan en la detección de telómeros cortos y organizan las vías de respuesta para la reparación de las secuencias teloméricas.<sup>(85)</sup>

Se conocen dos procesos básicos en la regulación molecular: en primera instancia la regulación de la expresión genética, que modifica la cantidad de enzima a sintetizar a través de mecanismos de inducción y represión genética, y la modificación cualitativa, que disminuye o aumenta la actividad enzimática mediante mecanismos que, por ejemplo, hacen variar el nivel de fosforilación de la enzima.<sup>(86)</sup> Para la telomerasa en particular se han estudiado todos los niveles de regulación genética. La regulación de la actividad telomerasa está comúnmente ligada a la regulación de su subunidad hTERT.

Tanto en células normales como desde el comienzo de la carcinogénesis, el nivel transcripcional es un factor determinante que regula el aumento de la actividad de la enzima al permitir o no la expresión de los genes específicos que forman el complejo enzimático.<sup>(87)</sup> Los reguladores descritos de manera típica que incrementan la transcripción de hTERT incluyen por ejemplo a los factores de transcripción multifuncional c-MYC, NF-κB y STAT3.c-MYC. Además, una variedad de factores regula la transcripción de hTERT de manera indirecta mediante la modulación de c-MYC. Por ejemplo, p300 activa la expresión del gen hTERT interactuando y estabilizando a c-MYC.<sup>(88)</sup>

Curiosamente, varios factores de transcripción desempeñan papeles duales en la transcripción de hTERT; un representante es SP1. Se ha informado que SP1 puede activar la

expresión de hTERT en células con telomerasa positiva. <sup>(89-91)</sup> Por el contrario, en las células somáticas con actividad telomerasa negativa, la supresión de hTERT se debe a la unión de SP1 a la región promotora proximal y al reclutamiento de proteínas de histona desacetilasa (HDAC) a los sitios de unión. <sup>(92)</sup> Otros factores que juegan efectos duales en la transcripción de hTERT incluyen la proteína activadora 1 (AP-1) <sup>(93,94)</sup> y el factor inducible por hipoxia 2-alfa (HIF2 $\alpha$ ). En el caso de hTERC, su transcripción es inducida por Sp1 y HIF-1 y reprimida por SP3. <sup>(95,96)</sup>

Además, de las formas comunes de regulación transcripcional descritas anteriormente, las mutaciones genéticas y / o modificaciones epigenéticas (metilación y acetilación) proporcionan otros modos reguladores para alterar con precisión la transcripción de la enzima telomerasa, afectando a sus dos subunidades componentes.

A nivel postranscripcional, se ha reportado que la expresión de hTERT puede ser regulada por diferentes microARNs (miARNs) y por ARNs no codificantes de cadena larga (TERRA), sobre todo en varios tipos de células cancerígenas. A este mismo nivel, uno de los enfoques más utilizado ha sido el de bloquear el funcionamiento del ARN mensajero de las subunidades hTERT y hTERC. De hecho, el *splicing* (corte y empalme del ARN mensajero) de la subunidad catalítica de la telomerasa, provoca la eliminación de dominios importantes para la actividad de la enzima. <sup>(88)</sup>

En el nivel postransduccional, dos importantes mecanismos de regulación de la enzima son la fosforilación y la ubicuidad de la misma. Varios estudios han revelado que el hTERT puede ser modificado por fosforilación. Un efecto prominente de la fosforilación es el cambio de localización celular de hTERT. Las quinasas más reportadas que fosforilan el hTERT son las proteínas AKT, PKC y SRC. En este sentido, la fosforilación de la hTERT por las isoenzimas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  de la PKC es vital para mantener la integridad de la holoproteína de la telomerasa en las células de cáncer de cabeza y cuello, que finalmente resulta en la activación de la telomerasa y la oncogénesis. <sup>(97)</sup> Hay cada vez más pruebas que demuestran que la fosforilación de hTERT también es importante para mantener localización nuclear y la actividad de la enzima.

Hasta la fecha, solo hay pocos informes que han investigado las modificaciones de ubicuidad de hTERT. Por ejemplo, Kim et al. muestra que romper la función HSP90 con geldanamicina induce un cambio de ubicación y la subsiguiente degradación de hTERT mediada por

proteasoma. La sobreexpresión de MKRN1 podría promover la degradación de hTERT y disminuir la actividad de la telomerasa y la longitud del telómero. <sup>(98)</sup> Asimismo, el secuestro de la enzima a nivel nucleolar también disminuye la actividad de la misma.

El microambiente también se relaciona a modificaciones en la ubicuidad de la subunidad hTERT de la telomerasa. De hecho, algunos estudios demuestran de qué manera el stress oxidativo es capaz de modificar la localización nuclear de la enzima hacia el citoplasma. <sup>(88)</sup>

Por otra parte, también a nivel postraduccional se ha comprobado que la actividad funcional in vivo de la telomerasa se encuentra supeditada al ensamblaje del complejo telomérico. Algunos constituyentes de este complejo tienen función reguladora intrínseca, entre ellos la proteína tanquirasa, que facilita el ensamblaje del complejo telomérico, demostrándose que este es uno de los principales mecanismos de regulación postraduccional implicados no sólo en la regulación de la enzima telomerasa, sino también de proteínas involucradas en la respuesta a daños del ADN. <sup>(99)</sup>

Algunos estudios han indicado que la actividad de la enzima es modulada bajo situaciones fisiológicas particulares durante el desarrollo y la homeostasis tisular. <sup>(100)</sup> Es conocido el hecho de que diversas señales intra y extracelulares tales como la radiación UV, interferon alfa y los estrógenos, modifican la actividad telomerasa.

Se ha observado una reactivación de la telomerasa inducida por radiación UV en melanomas cutáneos, carcinomas de células basales y carcinomas de células escamosas. Esta activación de la enzima, podría estar relacionada con el hecho de que dicha radiación provoca la mutación en el promotor del gen que codifica para hTERT. <sup>(101)</sup> El interferón alfa modula la AT en diversos tejidos, se ha comprobado que puede reprimir la actividad de la enzima en células hematopoyéticas malignas y no malignas. <sup>(102)</sup>

En relación a los estrógenos, diversos autores han demostrado la relación entre los mismos y un aumento de la actividad telomerasa, lo que podría explicar la patogénesis de diversos tipos de cáncer en células que poseen receptores para estrógenos. <sup>(103)</sup>

Asimismo, numerosos estudios dan cuenta de un incremento de la actividad de esta enzima en presencia del virus del papiloma humano (VPH) y citomegalovirus. <sup>(104, 105)</sup>

La transformación celular y la progresión del cáncer se producen a través de la activación de varias vías oncogénicas. Algunas infecciones pueden desencadenar la activación de estas vías oncogénicas. Un ejemplo de esto es el virus VPH. Los tipos de VPH de alto riesgo (AR)

están asociados con los cánceres anogenitales y orofaríngeos, y los cánceres asociados con AR VPH expresan universalmente dos oncogenes virales, E6 y E7. Estos dos oncogenes afectan a la mayoría de las vías que inducen cáncer. Una ruta crítica es la inmortalización celular, típicamente activada a través de la expresión de la telomerasa. La activación de la telomerasa es una parte clave del potencial maligno de los VPH de alto riesgo. Hace tiempo se conoce que E6 y E7 incrementan la actividad telomerasa, lo cual estaría relacionado con la malignización de lesiones producidas o sobreinfectadas por AR HPV desde estadios muy tempranos de la carcinogénesis. <sup>(104)</sup> Sin embargo, VPH no es el único virus implicado en la regulación de la telomerasa. Citomegalovirus también induce la actividad telomerasa, aunque por mecanismos no del todo dilucidados. Straat y col. <sup>(105)</sup> propusieron que uno de estos mecanismos sería la inducción de la transcripción de hTERT, y con ello, el aumento de la AT. Resulta interesante el hecho de que varios integrantes de la familia de los citomegalovirus han sido asociados a distintos tipos de cáncer, por lo que esta vía de activación de la telomerasa podría contribuir explicando en parte, los mecanismos carcinogénicos de esta familia de virus.

### **Inflamación crónica y telomerasa**

La inflamación crónica se considera uno de los factores de riesgo para la carcinogénesis. Recientemente se informó que la telomerasa desempeña un papel importante en la inducción de la inflamación crónica. Asimismo, diversos autores han referido el efecto de distintas citoquinas inflamatorias en la reactivación de la AT y la migración de células epiteliales en el cáncer oral. <sup>(106)</sup>

La diabetes, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la insuficiencia renal, el cáncer (entre ellos el cáncer de la mucosa bucal) y otras enfermedades crónicas, tienen como característica común el aumento de la síntesis de citoquinas proinflamatorias y la alteración de la asociación / equilibrio adecuado entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Interferón- (IFN), factor de necrosis tumoral a (TNF-a), interleucina 1 y 6 (IL-1, IL-6) son solo un puñado de las moléculas que se han encontrado elevadas en estas condiciones. <sup>(106)</sup> Muchos estudios han logrado vincular la inflamación crónica con el deterioro de la biología de los telómeros / telomerasas, un fenómeno que contribuye, entre otros, al deterioro del sistema inmunitario de estos pacientes. Sin embargo, no se ha

dilucidado del todo si la inflamación desencadena la disfunción telomerasa, del telómero o viceversa. <sup>(107)</sup>

La red de estímulos pro y antiinflamatorios originados durante la inflamación es muy compleja y está muy bien organizada. Las moléculas relacionadas con la inflamación mejor estudiadas son la interleucina 1 (IL-1), las familias de receptores de TNF, y también los receptores de reconocimiento de patrones microbianos (TLR), que pertenecen a la familia IL-1R. IL-1 y TNF $\alpha$  son citoquinas proinflamatorias que se liberan rápidamente en caso de lesión o infección. Uno de los siguientes pasos en el proceso inflamatorio es el reclutamiento de proteínas de señalización adicionales que pertenecen a la familia TRAF y varias proteínas quinasas, como IRAK1 e IRAK4, así como quinasas RIP que activan muchas vías moleculares, siendo la más importante posiblemente la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). <sup>(108,109)</sup> Algunos estudios han demostrado que hTERT tiene la capacidad de inducir un incremento en la concentración de ciertas citoquinas inflamatorias, y que estas también podrían tener un efecto modulador sobre la AT. <sup>(110-112)</sup> Esto sería particularmente importante en el caso de inflamaciones crónicas, ya que sería un paso más que permita explicar el nexo existente entre procesos inflamatorios de cierta cronicidad y el cáncer.

En los últimos años se han realizado investigaciones con el objetivo de estudiar el efecto del stress oxidativo sobre la AT y su implicancia en el desarrollo del cáncer, como profundizaremos a continuación.

### **Stress oxidativo, actividad telomerasa y cáncer**

El rol de las especies reactivas del oxígeno o radicales libres de oxígeno (**ROS**) en la reactivación de la telomerasa y su relación con iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis y el efecto protector de las **sustancias antioxidantes** ha estado sujeto a mucha especulación en el pasado reciente, con reportes a veces contradictorios en la literatura.

**Radical libre** es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, lo que hace que los mismos sean muy reactivos. <sup>(113)</sup> En la naturaleza los radicales libres son compuestos generalmente oxigenados y se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS). Debido a que los organismos se desarrollan en presencia de oxígeno, la vida aerobia está indefectiblemente conectada con la continua producción de ROS. <sup>(114)</sup> Estos

son responsables del daño oxidativo a macromoléculas biológicas tales como ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos. Así pues, participan en el mecanismo etiofisiopatogénico de diversas enfermedades tales como el cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, neurodegenerativas, etc; estando también implicadas en fenómenos fisiológicos tales como el envejecimiento. <sup>(115-117)</sup>

Frente al daño inducido por ROS, el organismo ha desarrollado una batería de defensa **antioxidante**, de naturaleza enzimática y no enzimática que evita que los radicales libres se acumulen y ejerzan su efecto lesivo. Sin embargo, la función de las sustancias antioxidantes va más allá del efecto de barrera defensiva y se interpreta en el contexto de una fina regulación del estado redox celular, con importantes implicancias en la regulación del ciclo celular y de la muerte celular programada o apoptosis. <sup>(118)</sup> El sistema antioxidante enzimático está formado por una serie de enzimas con capacidad antioxidante de origen endógeno que constituyen la primera y principal línea de defensa contra ROS. Está integrado por tres enzimas fundamentales que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres: la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la enzima glutatión peroxidasa (GPx).

La **SOD** es una enzima absolutamente necesaria para mantener la vida en los organismos aeróbicos, ya que cataliza la dismutación del  $O_2^-$  convirtiéndolo en  $H_2O_2 + O_2$ , en lo que parece ser la reacción enzimática más rápida conocida. En consecuencia, la pérdida de la función de SOD puede inducir una toxicidad oxidativa celular a través de un aumento de los niveles de  $O_2^-$  importante aún, en sus metabolitos derivados como el  $OH^-$  o el  $ONOO^-$ .

Dentro de los **antioxidantes no enzimáticos** encontramos una amplia gama de productos tales como el glutatión, la vitamina C, vitamina E, el ácido úrico (en plasma y saliva), estrógenos, carotenoides y flavonoides entre otros. En casi todas las especies animales el **ácido úrico (AU)** es metabolizado por la enzima urato oxidasa a alantoína. En el ser humano, el AU es el producto final del metabolismo de las purinas y su concentración es más elevada que en el resto de las especies, lo que podría significar una ventaja evolutiva. Su distribución en el organismo es ubicua, por lo que está presente tanto dentro de las células como en la mayoría de los fluidos corporales, lo que le permite tener funciones diversas de gran

importancia biológica entre las que destaca la función antioxidante que presenta a nivel de los líquidos corporales. Efectivamente, el AU es el antioxidante no enzimático más importante del cuerpo humano, con un espectro de acción amplio, siendo capaz de quelar radicales libres, iones metálicos tales como el hierro y el cobre, inhibir el daño producido por el peroxinitrito (radical libre altamente reactivo) y actuar como una sustancia oxidable capaz de aceptar electrones. En saliva, el AU es considerado el antioxidante más importante, aún por encima de SOD, siendo responsable de aproximadamente el 80 % de la capacidad antioxidante de dicho fluido. <sup>(119,120)</sup>

El estrés oxidativo se definió como la falta de equilibrio entre la aparición de especies reactivas de oxígeno / nitrógeno (ROS / RNS) y la capacidad del organismo para contrarrestar su acción mediante los sistemas de protección antioxidante. El estrés oxidativo surge de una generación de ROS / RNS mejorada o de un deterioro de la capacidad protectora antioxidante, que se caracteriza por la capacidad reducida de los sistemas endógenos para luchar contra el ataque oxidativo dirigido hacia las biomoléculas objetivo.

El desbalance entre sustancias oxidantes y antioxidantes resulta en una excesiva acumulación de sustancias reactivas de oxígeno y es definido como estrés oxidativo, el cual juega un papel fundamental en el daño tisular. Es decir que el stress oxidativo hace referencia a la falta de equilibrio entre la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del organismo para contrarrestar su acción mediante los sistemas de protección antioxidante. Surge de una generación de ROS / RNS mejorada o de un deterioro de la capacidad protectora antioxidante, que se caracteriza por la capacidad reducida de los sistemas endógenos para luchar contra el ataque oxidativo dirigido hacia las biomoléculas objetivo. <sup>(121)</sup> Por lo tanto, el stress oxidativo es la repercusión de un aumento en la aparición de radicales libres, pero también de una actividad reducida del sistema de defensa antioxidante protector. Las especies reactivas oxigenadas son principalmente responsables de las reacciones oxidativas dañinas. También se distinguieron especies radicales que contienen nitrógeno, denominadas especies reactivas de nitrógeno (RNS) derivadas del radical óxido nítrico, con capacidad para inducir daño celular. Se afirmó que los sistemas enzimáticos sintetizan especies reactivas no solo para la defensa química o desintoxicación, sino también para la señalización celular y las reacciones biosintéticas. <sup>(122)</sup>

Evidencia sustancial ha establecido el rol carcinogénico de los ROS en la iniciación y promoción del cáncer. Estas sustancias pueden provocar alteraciones en las bases de ADN, rupturas de cadenas, daños a genes supresores de tumores y una sobreexpresión de protooncogenes. Se ha establecido que el stress oxidativo produce daño de todos los biocompuestos esenciales como proteínas, algunos componentes glucídicos y lípidos de membrana, y puede provocar la muerte celular. <sup>(123)</sup> Se evaluó que las células cancerosas se caracterizan por mayores cantidades de ROS que las células sanas, y se demostró que las mismas son responsables del mantenimiento del fenotipo del cáncer. <sup>(124)</sup> ROS también han sido identificadas como estimuladores de oncogenes como los genes Jun y Fos. <sup>(125)</sup>

Además, algunos estudios dan cuenta del **efecto que tendrían los radicales libres en la regulación de la activación de la telomerasa** y en la longitud de los telómeros. Nishikawa y col. demostraron que el stress oxidativo de células in vitro eleva la actividad de la enzima telomerasa. <sup>(126)</sup> Bajo condiciones de estrés oxidativo, la enzima se transloca del núcleo a las mitocondrias y la AT se incrementa notablemente (en el término de 3 horas). <sup>(127)</sup> A pesar de que se conoce poco respecto de la implicancia fisiológica de esta observación, ha sido sugerido que la respuesta de la telomerasa frente al estrés oxidativo tiene especialmente un efecto protector celular, en lugar de inductor de la proliferación en células epiteliales. <sup>(128)</sup> Sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación de la telomerasa in vivo. <sup>(129)</sup> Esta enzima ofrece protección celular especialmente en el contexto de telómeros cortos. <sup>(130)</sup> La proteína de core de la telomerasa, hTERT, en fibroblastos humanos protege al DNA de la radiación UV y de los efectos del estrés oxidativo, sólo en células con acortamiento telomérico, a través de la elongación de los telómeros. <sup>(131)</sup>

Es así como los radicales libres han sido relacionados de manera creciente con los procesos de carcinogénesis, de forma directa por su efecto sobre las biomoléculas celulares y de forma indirecta por su interacción con otras sustancias implicadas en la iniciación y/o progresión del cáncer.

Las células tumorales durante su proceso de transformación producen altos niveles de ROS en pacientes con cáncer. Los **peróxidos lipídicos** pueden iniciar la peroxidación a través de la síntesis de prostaglandinas, la cual es una alteración patobiológica en las células cancerosas. Además, los productos de la lipoperoxidación poseen propiedades citotóxicas y

mutagénicas y son capaces de modular el crecimiento celular y la promoción tumoral activando caminos de transducción de señales intra e intercelulares. <sup>(132- 135)</sup>

La suposición básica de que los radicales libres dañan el material celular podría resultar en la transformación de células normales en malignas. La magnitud de este daño es también dependiente de los mecanismos de defensa del organismo contra radicales libres, mediado por varios antioxidantes celulares. El metabolismo de ROS en células cancerígenas está drásticamente alterado, favoreciendo al menos dos mecanismos: las células malignas producen grandes cantidades de ROS comparadas con las células no neoplásicas y además existe supresión del sistema de antioxidantes en las células cancerígenas. <sup>(136,137)</sup>

De hecho, evidencia considerable sugiere que las enzimas antioxidantes actúan para inhibir tanto la iniciación como la promoción de la carcinogénesis. La baja actividad de estos mecanismos de defensa antioxidante juega un papel clave en la progresión del cáncer. Diversos estudios revelan bajas concentraciones de enzimas antioxidantes, entre ellas la SOD, en tejido tumoral, sangre y saliva de pacientes con cáncer. <sup>(138)</sup>

El desbalance oxidante-antioxidante es considerado uno de los factores responsables de la carcinogénesis y crecimiento e invasión tumoral.

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, se ha intentado encontrar marcadores en saliva, sangre y muestras tisulares, que permitan determinar el daño oxidativo de los tejidos, así como evaluar la respuesta de los mecanismos antioxidantes frente a los mismos. Uno de los principales objetivos de la peroxidación por ROS son los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas biológicas. La descomposición de estos lípidos lleva a la generación de productos terminales tales como hidroperóxidos lipídicos y **malondialdehído (MDA)**. Los niveles de estos productos indican la extensión de la peroxidación lipídica y sirve como un marcador del daño celular causado por radicales libres. <sup>(139)</sup> El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA), dando un producto (MDA- TBA<sub>2</sub>) susceptible de ser medido espectrofotométricamente.

Distintos estudios han revelado que las respuestas celulares a estímulos externos, son mediadas principalmente por la peroxidación lipídica causada por el incremento del estrés oxidativo y estos han sido implicados en el desarrollo del tumor. <sup>(139)</sup>

Asimismo, altas concentraciones de ROS estarían implicadas en la patogénesis del cáncer de la mucosa bucal. Se encontraron elevados niveles de MDA en sangre, saliva y muestras de tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de carcinoma de células escamosas de la mucosa bucal. <sup>(140-143)</sup> Estos niveles elevados fueron atribuidos a los productos de descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados de las biomembranas. Otros trabajos establecieron además que los incrementos de MDA en las muestras correspondientes a cáncer de la mucosa oral ocurren como consecuencia del daño lipooxidativo y que esto se refleja fielmente en el plasma, por lo que los niveles de MDA en plasma son demostrativos de la peroxidación lipídica tisular. <sup>(139)</sup> En relación a los sistemas antioxidantes, existirían algunos resultados controversiales. Mientras que algunos investigadores encontraron elevados niveles de SOD en saliva y plasma de pacientes con cáncer bucal, <sup>(139, 144, 145)</sup> otros trabajos revelan una disminución de los niveles de esta enzima en sangre, en pacientes con esta patología. <sup>(146-154)</sup> En algunos casos, se cree que la sobreexpresión de SOD podría ser considerada como una respuesta adaptativa al incremento en los productos de la lipoperoxidación en eritrocitos y esto resulta en la dismutación de superóxido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resulta interesante destacar que la actividad de SOD se incrementa cuando la efectividad de otras enzimas decrece. <sup>(155)</sup>

También se han estudiado marcadores de estrés oxidativo y status antioxidante en algunos tipos de lesiones cancerizables, como las leucoplasias y el liquen plano de la mucosa bucal. Diversos estudios evaluaron marcadores de stress oxidativo en la sangre y la saliva de pacientes con **liquen plano bucal** (LP) sugiriendo que el stress oxidativo estaría implicado en la etiopatología de este desorden. Se han encontrado elevados niveles de MDA en pacientes con esta patología. Esto sugiere un incremento en la peroxidación lipídica en el liquen. Los factores implicados en la inducción de alteraciones histológicas presentes en el liquen plano están influenciados por el stress oxidativo. Sin embargo, no existe evidencia suficiente que demuestre diferencias en la concentración de radicales libres y sustancias antioxidantes en las distintas variedades de liquen ni su relación con otros marcadores moleculares que favorezcan la transformación maligna de estas lesiones. Distintos autores reportaron altos niveles de MDA en LP, leucoplasias y cáncer. <sup>(156-158)</sup>

Resulta importante profundizar el estudio de diversos aspectos relacionados con la participación de la enzima telomerasa en lesiones potencialmente malignas y en el cáncer de

la mucosa bucal, así como la relación que podría existir entre los aspectos moleculares de la actividad de la telomerasa con factores propios del fenotipo del paciente (sexo, edad, estado bucal, hábitos, etc) y las características clínicas e histopatológicas de las lesiones premalignas de la mucosa bucal.

Se considera de gran importancia la relación existente entre el stress oxidativo, los niveles de sustancias antioxidantes y la AT.

Existe consenso, entre diferentes autores, al expresar que hay poca evidencia para evaluar el nivel de la peroxidación lipídica y la capacidad antioxidante en el tejido de especímenes con DPM de la mucosa bucal. Asimismo, y teniendo en cuenta que los radicales libres actúan activando a la telomerasa, no disponemos de trabajos que correlacionen la actividad de esta enzima con el nivel de estrés oxidativo, el perfil antioxidante y la características clínicas e histopatológicas de DPM y cáncer de la mucosa bucal. Tampoco se lo ha relacionado con los factores asociados a estas patologías (tabaco, alcohol, etc). Por ello consideramos de suma importancia profundizar en el estudio de estas variables y su posible asociación para evaluar el comportamiento, pronóstico y evolución de estas patologías. Consideramos que este punto puede resultar uno de los principales aportes de este proyecto de tesis.

### **Actividad telomerasa y estilo de vida**

Diversos autores concuerdan en que las disfunciones en el comportamiento del sistema telómeros/ telomerasa puede deberse, en parte, a comportamientos poco saludables (por ejemplo, un comportamiento más sedentario, una dieta poco saludable, hábito de fumar y/ o uso de alcohol, abuso de sustancias, etc.).<sup>(159)</sup> En consecuencia, se ha sugerido y demostrado en varios estudios que un estilo de vida saludable con respecto a la nutrición, el manejo del estrés, abuso de sustancias y el ejercicio puede promover telómeros más largos <sup>(160,161)</sup> y una actividad telomerasa basal estable.

Boskus y col. <sup>(162)</sup> encontraron que los niveles de telomerasa y MDA en sangre de pacientes fumadores, eran significativamente más elevados que en aquellos que no fumaban tabaco. Del mismo modo, estudios realizados en células mononucleares de gemelos sanos con hábito tabáquico discordante demostró un incremento de la actividad telomerasa y de la longitud telomérica. <sup>(163)</sup> Asimismo se han hallado niveles elevados de actividad telomerasa en tejido proveniente de biopsias de lesiones malignas de pacientes fumadores crónicos. <sup>(164)</sup>

Con respecto al alcohol, Nahon y col. <sup>(165)</sup> hallaron mutaciones de hTERT en pacientes alcohólicos con diagnóstico de carcinoma hepatocelular, lo cual llevaría a modificar la actividad de esta enzima. Wu <sup>(166)</sup> describió un incremento en la actividad telomerasa y en la concentración de hTERT en tejido de hígado con diagnóstico de enfermedad hepática asociada a ingesta de etanol. No obstante, otros autores como Harpas y col. <sup>(167)</sup>, no hallaron asociación entre la actividad telomerasa y la ingesta de etanol, aunque este factor de riesgo sí influiría acortando la longitud de los telómeros. En el mismo sentido, otros estudios muestran una falta de correlación entre los hábitos de fumar y beber alcohol con la actividad telomerasa y el grado de severidad del carcinoma espinocelular de la mucosa bucal. <sup>(168)</sup>

Hasta la fecha no se han encontrado publicaciones en la literatura científica que relacionen el consumo de mate, ampliamente extendido en nuestro medio, con modificaciones de la actividad de la enzima.

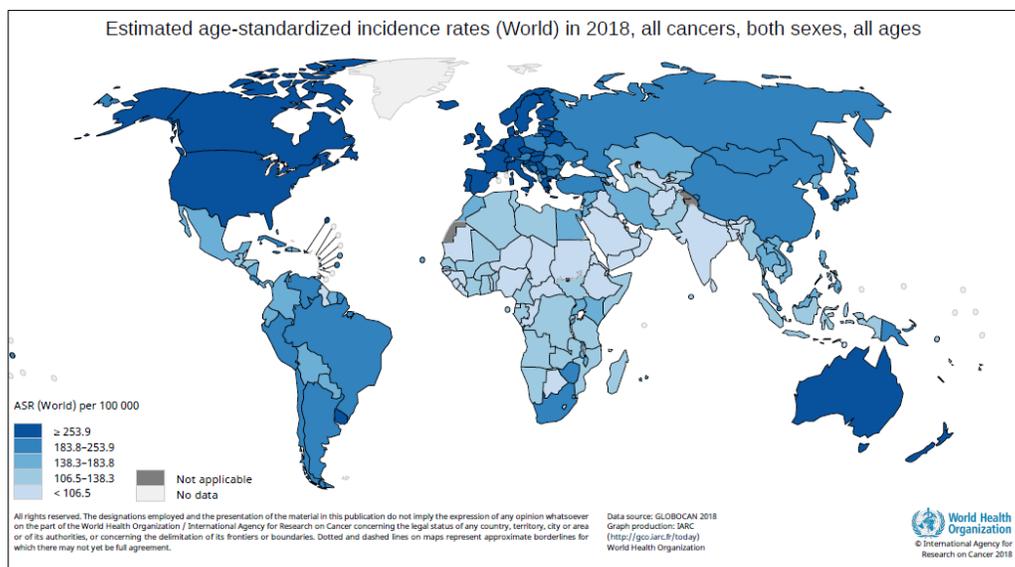
Teniendo en cuenta lo expresado en párrafos anteriores resulta interesante puntualizar que diversas publicaciones dan cuenta de intervenciones puntuales realizadas sobre distintos aspectos del estilo de vida del paciente mejoraría el funcionamiento del sistema telómeros/telomerasa. <sup>(169, 170)</sup>

### **Cáncer bucal, desórdenes potencialmente malignos (DPM) y actividad telomerasa**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa principal de muerte a nivel mundial, y es responsable de un estimado de 9.6 millones de muertes en 2018. Aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer (WHO statistics on cancer). <sup>(171)</sup>. **(FIGURA 9)**

Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se deben a los 5 principales riesgos conductuales y dietéticos: alto índice de masa corporal, baja ingesta de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y alcohol. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante para el cáncer y es responsable de aproximadamente el 22% de las muertes por esta patología. <sup>(172)</sup>

La prevención del cáncer es una de las mejores estrategias a nivel de Salud Pública ya que es un método de bajo costo y alta efectividad en el tiempo. La detección precoz permite intervenir en los estadios tempranos de la enfermedad, siendo este un momento con alto potencial para lograr la curación.



**Fig 9.** Distribución mundial del cáncer. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 V1.0. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase Nro 11. 2013. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

El cáncer de cabeza y cuello es uno de los seis cánceres más frecuentes en los seres humanos. Los localizados en la cavidad bucal representan el 48% de los casos de cabeza y cuello, y el 90% de éstos son carcinomas a células escamosas de la mucosa bucal (**CCEB**). Los carcinomas de cabeza y cuello comprenden a los de células escamosas del tracto superior aéreo, desde los labios hasta la región esofágica incluyendo la cavidad bucal, laringe y faringe. Estos cánceres se consideran en forma conjunta, dada sus similitudes epidemiológicas, de tratamiento y pronóstico. <sup>(173)</sup>

Se trata de una enfermedad de etiología multifactorial que en el 80 % de los casos se debe a factores exógenos o externos como el estilo de vida, el consumo de alcohol y hábito de fumar y en un 20% a factores endógenos genéticos. <sup>(174, 175)</sup> Los factores externos como la mala alimentación, las situaciones de estrés, las relaciones sexuales promiscuas, el hábito de beber alcohol en exceso, el hábito de fumar, entre otros, pueden producir en las células del organismo modificaciones moleculares en determinados genes que llevan a la generación en tumores. El comportamiento biológico del CCE es similar en pacientes jóvenes y mayores, aunque ciertos estudios sugieren que es más agresivo en los pacientes jóvenes. <sup>(176)</sup>

## **CÁNCER BUCAL**

### **Epidemiología del Cáncer de Cavidad Bucal**

El cáncer de la mucosa bucal incluye a los cánceres que afectan labio, lengua y demás órganos ubicados dentro de los límites anatómicos de la cavidad bucal (Clasificación OMS, ICD 10: C 01-06). Representa un problema creciente y preocupante en ciertas áreas geográficas del mundo como regiones del sur de Asia, Latinoamérica y partes del este y centro de Europa.

Se trata de uno de los once tipos de cáncer más comunes en el mundo, en términos del número de casos. Aproximadamente por año estos cánceres producen 200.000 muertes. La tasa de supervivencia de los pacientes con diagnóstico de CCE es de un 60% aproximadamente a los 5 años. Mientras que la recurrencia de lesiones malignas en pacientes con cáncer bucal, se producen en el 5-50% de los pacientes diagnosticados, e influye negativamente en el pronóstico de la enfermedad. Cerca de un 50% de los pacientes con diagnóstico de CCEB presentan metástasis de nódulos linfáticos. <sup>(177, 178)</sup>

La mayoría de los cánceres de la mucosa bucal diagnosticados corresponden al tipo CCE, clasificándose a nivel histológico de acuerdo al grado de queratinización (poco, moderado o bien diferenciado). Dentro de las variantes de estos carcinomas espinocelulares se pueden incluir los carcinomas ulcerados, vegetantes, verrugosos, sarcomatoides y linfo-epiteliomas. Presentan una baja prevalencia en la población mundial, de 2 al 5%, sin embargo, cuenta con altas tasa de morbilidad y mortalidad. <sup>(179,180)</sup>

Morelato y col. <sup>(181)</sup>, en un estudio realizado en la provincia de Córdoba (Argentina) observaron que en el sexo masculino la tasa de mortalidad del cáncer bucal se incrementó en un 59% entre los años 1975 al 1995; y posteriormente, esta tasa descendió levemente hasta el año 2000. Contrariamente en el sexo femenino, en el mismo período, se produjo un incremento gradual del 77%. La relación masculina: femenina es de 2:1 ó 15:1 dependiendo del sitio anatómico.

## **Carcinoma de células escamosas de la mucosa bucal (CCEB)**

Esta entidad representa el 98% de todas las formas de cáncer de cabeza y cuello y en la última década presentó un incremento de su incidencia de alrededor del 50%.<sup>(182)</sup> La mayoría de los casos se diagnostica en una fase tardía, en estadios histológicos III o IV, lo que en general disminuye las probabilidades de supervivencia y también deteriora la calidad de vida del paciente<sup>(183)</sup>. En general todos los cánceres, incluyendo el CCE de la mucosa bucal se generan a partir de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos resultando fenotipos que promueven el desarrollo de éste.

Comúnmente, el desarrollo del CCE está precedido por desórdenes potencialmente malignos de la mucosa bucal (**DPM**). La detección de este tipo de lesiones y estadios precoces del cáncer bucal permite realizar exámenes preventivos que conduzcan a una identificación temprana e instauración de tratamiento de manera oportuna.<sup>(184)</sup>

Teniendo en cuenta que los DPM tales como la leucoplasia, liquen plano bucal y lesiones liquenoides serán incorporadas al presente estudio, pasaremos a profundizar muy brevemente en sus características y epidemiología.

### **Algunos desórdenes potencialmente malignos de la mucosa bucal:**

#### **a) LEUCOPLASIA (LB):**

La definición y la terminología de la LB ha sido tema de discusión en la literatura durante muchas décadas. Esta discusión se centra principalmente en aspectos clínicos, pero también está relacionada en parte con algunos aspectos histopatológicos.

En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió la LB como: "Un parche o placa blanca que no puede caracterizarse clínica o patológicamente como cualquier otra enfermedad".<sup>(185)</sup> En una nota explicativa se ha declarado explícitamente que el término leucoplasia no está relacionado con la ausencia o presencia de displasia epitelial. En una monografía de la OMS, publicada en 1997, la frase: "cualquier otra enfermedad definible" fue reemplazada por "cualquier otra lesión definible".<sup>(186)</sup> En 2002, se recomendó hacer una distinción entre un diagnóstico clínico presuntivo de LB y uno definitivo.<sup>(187)</sup> Se realizó un diagnóstico presuntivo cuando una lesión en el examen clínico inicial no podía diagnosticarse claramente como leucoplasia o cualquier otra enfermedad. Se realizó un diagnóstico clínico

definitivo de leucoplasia después de la eliminación fallida de factores etiológicos sospechosos o en ausencia de tales factores. En este caso, además, el diagnóstico se confirma cuando el examen histopatológico de una biopsia incisional no muestra la presencia de ninguna otra enfermedad. En 2005, la definición de leucoplasia se cambió en una reunión apoyada por la OMS en: "Una placa blanca de riesgo cuestionable que ha excluido (otras) enfermedades o trastornos conocidos que no conllevan un mayor riesgo de cáncer." <sup>(188)</sup> Durante la última reunión, se decidió deliberadamente considerar la leucoplasia como una enfermedad potencialmente maligna o premaligna de la mucosa bucal, pero que también puede ocurrir en otros sitios en la cavidad oral o la región de la cabeza y el cuello.

Una combinación de las definiciones de LB de 1978 y 2005 de la OMS podría dar como resultado el siguiente texto: "Un parche o placa predominantemente blanco que no puede caracterizarse clínica o patológicamente como cualquier otro trastorno; la LB conlleva un mayor riesgo de desarrollar cáncer, ya sea en el área de la leucoplasia o cerca de ella, o en cualquier otro lugar de la cavidad bucal o la región del dolor de cabeza y el cuello". <sup>(189)</sup>

Tradicionalmente, se reconocen dos tipos clínicos principales de leucoplasia, que son el tipo homogéneo y el no homogéneo, respectivamente. El tipo no homogéneo conllevaría un mayor riesgo de transformación carcinomatosa. El tipo homogéneo se caracteriza por una apariencia blanquecina delgada, plana y homogénea. El tipo no homogéneo se subdivide en una variedad de subtipos, como moteado o eritematoso (cambios blancos y rojos), también conocido como eritroleucoplasia, nodular y verrugoso. <sup>(189)</sup>

Un tipo de lesión que concierne cierta polémica es la leucoplasia verrugosa proliferativa (LVP) tal como ha sido introducida en la literatura por Hansen et al. <sup>(190)</sup> En la publicación original, LVP se ha caracterizado como una lesión de crecimiento lento, persistente e irreversible, con alta probabilidad de malignización y es además resistente a todas las formas de terapia, ya que la recurrencia es la regla y que suele no estar asociada a ningún factor irritativo causal, más frecuente en mujeres por encima de los 40- 50 años. La LVP puede comenzar como una queratosis simple en un extremo y un carcinoma invasivo en el otro.

Grinspan <sup>(191)</sup> utiliza un criterio clínico histopatológico para la clasificación de las leucoplasias, clasificándolas en leucoplasias grado I (**FIGURA 10**) o maculosa, grado II o queratósica (**FIGURA 11**) y grado III o verrugosa (**FIGURA 12**).



**Fig. 10**



**Fig. 11**



**Fig. 12**

*Fig. 10. Leucoplasia maculosa de cara ventral de lengua y piso de boca, Fig. 11. Leucoplasia queratónica de mucosa yugal y Fig. 12 Leucoplasia verrugosa de mucosa yugal*

Petti y col. <sup>(192)</sup> realizaron estudios de prevalencia entre 1986-2002. Las técnicas estadísticas utilizadas en esta revisión arrojaron una prevalencia mundial unificada para esta patología de un 2,6%. <sup>(192)</sup>

En los países desarrollados la leucoplasia suele afectar a individuos entre la cuarta y séptima década de la vida. En países emergentes, estas lesiones suelen adelantarse entre 5-10 años a la aparición del carcinoma. La distribución por sexos, puede unificarse en un 3:1 más frecuentemente en hombres que en mujeres.

El consumo de tabaco es el factor predisponente más común en el desarrollo de LB, aunque una cierta proporción de ellas (entre 4.2 y 26 %) no se asocian con una causa conocida (leucoplasias idiopáticas). La importancia del consumo de alcohol en la etiología de la LB parecería ser en función de su efecto sinérgico con el tabaco. <sup>(193)</sup>

El porcentaje estimado de transformación maligna varía en función del país en donde se haya realizado el estudio y del tipo de muestra. Sin embargo, el rango de transformación maligna de la leucoplasia oscila entre el 0,13% y el 17,5%. <sup>(194)</sup>

## **LIQUEN PLANO (LP) Y LESIONES LIQUENOIDES (LLO) DE LA MUCOSA BUCAL**

La variante bucal del liquen plano es una enfermedad inflamatoria crónica de mecanismo inmunitario que afecta la mucosa bucal con brotes y remisiones características. Mientras que las lesiones cutáneas de LP pueden ser autolimitadas y pruriginosas, las lesiones bucales son comúnmente crónicas, no remisivas y pueden ser una fuente de morbilidad. <sup>(195)</sup>

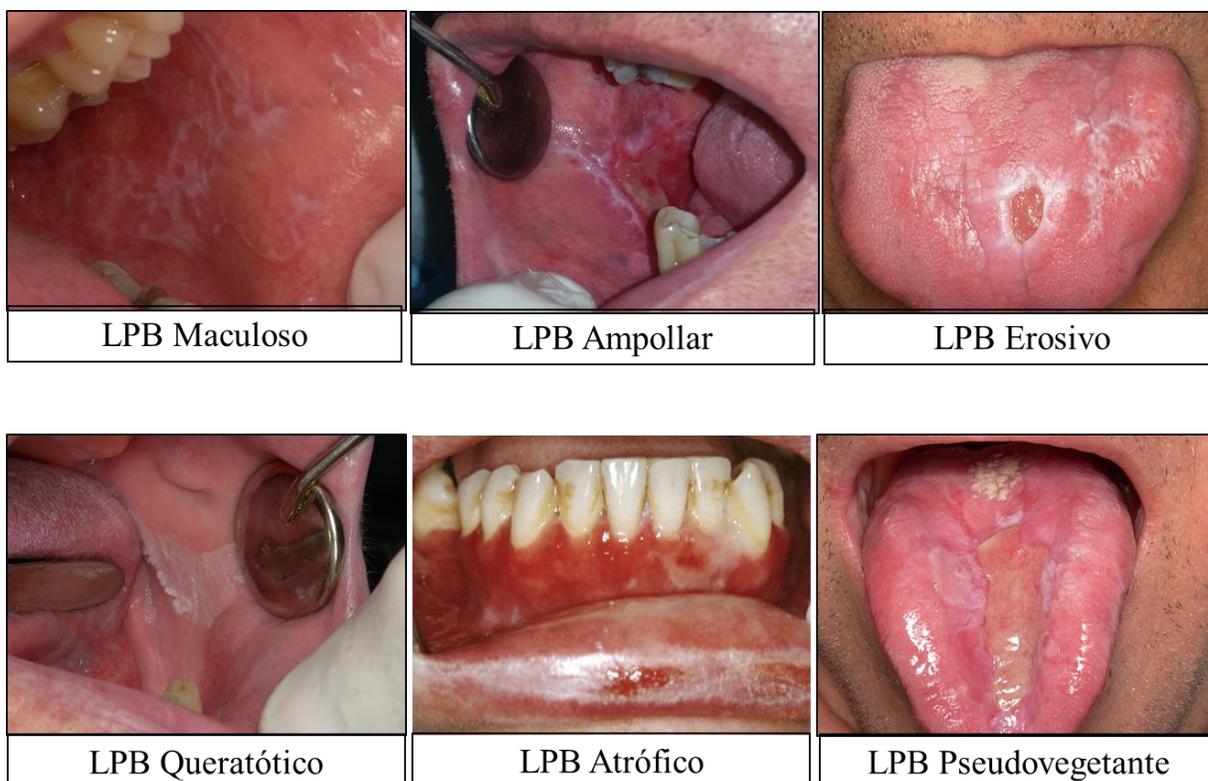
El diagnóstico de LP generalmente se realiza mediante exámenes clínicos e histológicos. Sin embargo, en las lesiones clásicas (patrón reticular bilateral), es posible hacer un diagnóstico basado solo en la apariencia clínica. <sup>(196)</sup>

La prevalencia estimada de LP en la población adulta general es de 0,5 a 2%. La proporción de sexo femenino / masculino reportada es de 2 a 1 y la edad de inicio es generalmente entre 30 y 60 años. <sup>(195)</sup> Sin embargo, ha habido informes de casos de LP en niños. <sup>(197)</sup>

Clínicamente, hay diferentes subtipos clínicos de LP que se pueden ver individualmente o en combinación. Los mismos pueden agruparse en dos variedades: líquenes maculosos o reticulares y no maculosos (atrófico, ampollar, erosivo / ulcerativo, anular, queratósico y pseudovegetante) (**FIGURA 13**). Los más comunes son los subtipos reticulares, erosivo / ulcerativo y en forma de placa queratótica o leucoplasiforme. <sup>(198,199)</sup> Las lesiones reticulares, la forma más reconocida de LP, a menudo son asintomáticas y aparecen como múltiples pápulas con una red de lesiones pequeñas, elevadas, de color gris blanquecino, de encaje, llamadas estrías de Wickham. <sup>(200)</sup> En ausencia del patrón reticular clásico en las superficies de la mucosa bucal, es difícil diagnosticar clínicamente LP. <sup>(195)</sup> Por lo tanto, se requiere confirmación histológica del diagnóstico. La forma erosiva de LP puede presentarse con eritema causado por inflamación o adelgazamiento epitelial y también se puede ver ulceración / formación de pseudomembranas, con la periferia de la lesión rodeada de estrías queratóticas reticulares. <sup>(201)</sup> Las lesiones atróficas y erosivas / ulcerativas de LP producen diversos grados de incomodidad y sintomatología dolorosa. La irritación mecánica crónica de la mucosa bucal, la acumulación de placa y cálculo dental suelen empeorar las manifestaciones y sintomatología de esta patología.

Estas lesiones particulares casi nunca remiten espontáneamente y pueden llevar a la confusión con otras enfermedades que comparten características clínicas similares, por lo que se refiere un diagnóstico diferencial exhaustivo. Con el objetivo de definir mejor los

criterios para el diagnóstico de LP, la Organización Mundial de la Salud (OMS) diseñó un conjunto de criterios clínico -patológicos en 1978. Sin embargo, estos criterios carecían de consenso con respecto a un diagnóstico clínico e histológico de LP, por lo que se propusieron modificaciones a los criterios de la OMS en 2003 (**Tabla 1**), lo que resultó en un aumento sustancial en el consenso y correlación clínico- patológica.



*Fig 13. Algunas variedades de LP de diferente localización.*

En cuanto a la potencial transformación carcinomatosa del LP, numerosos estudios han intentado abordar este problema. Varios autores acordaron una frecuencia de transformación maligna entre 0.4% y 5%, durante períodos de observación de 0.5 a más de 20 años con una tasa anual entre 0.2 y 0.5% <sup>(202)</sup>. En 1985, Krutchkoff y Eisenberg <sup>(203)</sup> acuñaron el término “displasia liquenoide” (DL) para describir lesiones que se parecen a LP histológicamente pero que además muestran características de displasia.

Van der Meij y col. <sup>(204)</sup> propusieron la designación “lesiones liquenoides orales” (LLO) para casos que son clínicamente característicos e histológicamente compatibles, clínicamente

compatibles e histológicamente característicos, o clínicamente e histológicamente compatibles con LP (**TABLA 1**).

<b>Tabla 1 Criterios de diagnóstico modificados para OLP y OLL (2003)</b>
<b>Criterios de diagnóstico modificados para LPB y LLO (OMS)</b>
<p><b>Criterio clínico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Presencia de lesiones bilaterales, más o menos simétricas.</li> <li>- Presencia de una red en forma de cordón de líneas gris-blancas ligeramente elevadas (patrón reticular)</li> <li>- Las lesiones erosivas, atróficas, ampollosas y de tipo placa solo se aceptan como un subtipo en presencia de lesiones reticulares en otras partes de la mucosa oral.</li> </ul> <p>En todas las demás lesiones que se asemejan a OLP pero no completan los criterios antes mencionados, se debe usar el término "clínicamente compatible con".</p>
<p><b>Criterios histopatológicos.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Presencia de una zona de infiltración celular bien definida, en forma de banda, confinada a la parte superficial del tejido conectivo, que consiste principalmente de linfocitos</li> <li>- Signos de degeneración de licuefacción en la capa celular basal</li> <li>- Ausencia de displasia epitelial.</li> </ul> <p>Cuando las características histopatológicas son menos obvias, se debe usar el término "histopatológicamente compatible con"</p>
<p><b>Diagnóstico final de OLP u OLL</b></p> <p>Para lograr un diagnóstico final, se deben incluir criterios clínicos e histopatológicos</p> <p><b>OLP</b></p> <p>Un diagnóstico de OLP requiere el cumplimiento de criterios clínicos e histopatológicos.</p>
<p><b>OLL</b></p> <p>El término OLL se utilizará en las siguientes condiciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Clínicamente típico de OLP pero histopatológicamente solo compatible con OLP.</li> <li>2. Histopatológicamente típico de OLP pero clínicamente solo compatible con OLP.</li> <li>3. Clínicamente compatible con OLP e histopatológicamente compatible con OLP.</li> </ol>

*Tabla1. Referencia: van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. J Oral Pathol 2003 Med 32:507–512. Con modificaciones.*

Actualmente algunos proponen que el potencial para malignizar de la LLO es igual o incluso mayor que el del LP. <sup>(204, 205)</sup>

Los mecanismos y factores de riesgo que tratan de explicar la transformación maligna de LP son variados. Un enfoque interesante es recordar que la inflamación crónica está asociada con varios tipos de cáncer, <sup>(206)</sup> y LP como condición inflamatoria fue propuesta por algunos autores para representar un modelo para tal asociación. <sup>(207)</sup>

## **Cambios moleculares en el carcinoma a células escamosas de la mucosa bucal**

El CCE es una neoplasia maligna del estrato escamoso del epitelio de la mucosa bucal; se produce en diversos sitios de la cavidad bucal, frecuentemente se encuentra en labios, bordes de lengua y piso de boca. La incidencia de CCE se incrementa con la edad; se ha observado que la mayoría de ellos se observa en pacientes mayores de 40 años. <sup>(208)</sup>

Es conocido que genes asociados a proliferación o apoptosis celular participan en el desarrollo de la enfermedad y pueden servir como marcadores de recurrencia o progresión de la patología en pacientes con CCE. En la carcinogénesis se sobre estimula o reprime la expresión de algunos proto-oncogenes. cuando se acumula un número crítico de mutaciones (usualmente entre 5 a 6) las células salen de su patrón de crecimiento normal y puede iniciarse la tumorigénesis. En casi todos los casos examinados, la formación del tumor es generado a partir de una sola célula, por lo cual se dice que es *monoclonal*. Los alelos mutados de los *proto-oncogenes* son llamados *oncogenes* y corresponden a alelos dominantes y se relacionan con la estimulación del ciclo celular. Los *genes supresores de tumores*, codificados por alelos recesivos, son los relacionados a la inhibición del ciclo celular. Las oncoproteínas, codificadas por estos genes, actúan regulando el ciclo celular en diferentes niveles actuando como: *a)* factores de crecimiento; *b)* receptores de los factores de crecimiento; *c)* transductores de señales intracelulares; *d)* factores de transcripción nuclear. <sup>(209)</sup>

Numerosos oncogenes se han observado involucrados en la carcinogénesis oral. Dentro de estos se mencionan: el factor de crecimiento epidermal (EGFR/c-erb 1) y miembros de la familia de genes *ras*, *c-myc*, *int-2/Fgf-3* (factor de crecimiento de fibroblastos), *hst-1/HSTF1* (factor de transformación de unión de la heparina secretoria), *PRAD-1* (adenomatosis paratiroidea) y *bcl-1* (leucemia a células B/ linfomas). <sup>(210,211)</sup>

Entre los genes supresores de tumores se puede mencionar a la proteína p53. La modificación molecular del gen p53 es una de las alteraciones más frecuentes en los carcinomas, observándose aproximadamente en el 70% de los CCE. <sup>(212, 213)</sup>

Más allá de los mecanismos mencionados, desde hace algunos años se le da una gran importancia a la reactivación de la actividad de la enzima telomerasa desde etapas tempranas de la carcinogénesis, encontrándose íntimamente relacionada con este proceso.

### **Actividad telomerasa en el carcinoma a células escamosas de la mucosa bucal**

Los primeros estudios demostraron que las células sin telomerasa presentaban un acortamiento de los telómeros en relación directa con el aumento de divisiones celulares. Esto sugirió que la pérdida de los telómeros podría explicar la senescencia celular después de un determinado número de duplicaciones in vitro. Se ha propuesto que la pérdida de repeticiones teloméricas, al alcanzar una longitud telomérica crítica, induce una señal de daño en el ADN que resulta en la salida del ciclo celular y la senescencia replicativa. De acuerdo con este modelo, los telómeros actúan como un reloj mitótico que determina la vida replicativa de una célula. <sup>(214)</sup>

La detención del ciclo celular que se impone en estas células se mantiene por medio de señales que activan las vías de los genes supresores de tumores p53 y Rb. Este límite en la etapa de mortalidad (M1) podría ser alterado por la transformación con agentes virales tales como SV40 o el antígeno T que inactivan los genes p53 o Rb y permiten a las células sufrir otras divisiones celulares adicionales. Estas células, sin embargo, no pueden dividirse indefinidamente y no se consideran inmortales, ya que va seguido por la erosión telomérica ulterior, las células alcanzan una segunda etapa de la mortalidad (M2), con los telómeros críticamente cortos. La progresión más allá de este punto es un evento muy raro que requiere la alteración por la mutación de oncogenes adicionales y genes supresores de tumores. Sin embargo, las células que tienen éxito en la superación de M2 se correlacionan fuertemente con la reactivación de la actividad de la telomerasa, la estabilización de los telómeros y la adquisición de un fenotipo inmortal. Por otro lado, la telomerasa está activa en la mayoría de líneas celulares immortalizadas y en 85-90% de los tumores humanos. En un estudio en células en cultivo (representando 18 tipos de tejidos humanos), se encontró que el 98% de células inmortales presentaban actividad telomerasa positiva, mientras que fue negativa en el 100% de las poblaciones de células mortales. <sup>(215)</sup> En general, se ha aceptado que el acortamiento telomérico es responsable de limitar la vida media de las células humanas normales, así como la expresión de la telomerasa en las células es suficiente para superar la senescencia replicativa para otorgarle la inmortalidad. Aunque los mecanismos implicados en la regulación de la telomerasa no se han resuelto por completo, su comprensión progresiva es la base necesaria para comprender aún mejor la manera en la que desarrolla la carcinogénesis.

Algunos estudios han detectado **AT elevada** en el CCE de la mucosa bucal y en ciertos DPM como LB, LP y displasia fibrosa de la submucosa, varios de ellos con resultados controversiales. Los estudios citados analizan solamente los aspectos moleculares de la actividad de esta enzima, sin profundizar en diferencias clínicas y anatomopatológicas de las lesiones antes mencionadas, lo cual es sumamente importante al momento de determinar su comportamiento y progresión, y que constituye uno de los objetivos principales del presente trabajo.

En este sentido, Correa Abrahao y col.<sup>(216)</sup> estudiaron la expresión inmunohistoquímica de p53, p16 y la subunidad catalítica de la enzima telomerasa (hTERT), que indirectamente señalaría la actividad de esta enzima, sin determinar la AT de manera directa. Para ello, analizaron 50 tacos de biopsias obtenidas del archivo del Departamento de la Universidad Federal Fluminense (Río de Janeiro), evaluando la edad y sexo de los pacientes y la localización de las lesiones orales.

Entre las muestras analizadas se incluyeron 15 lesiones potencialmente malignas (LB y eritroplasias), con displasia leve, moderada o grave; 30 CCE (bien diferenciados y pobremente diferenciados) y 5 hiperplasias benignas, sobre las que se aplicó el protocolo standard de estreptavidina- biotina para la determinación inmunohistoquímica de hTERT.

No se consideraron en este estudio las características semiográficas, las variedades clínicas de las lesiones ni tampoco los antecedentes sistémicos de los pacientes, así como los eventuales factores de riesgo a los que pudieran estar expuestos (hábito de fumar, de beber alcohol, irritación mecánica crónica de la mucosa, sobreinfecciones, etc), y que se conoce que tiene la capacidad de modular la actividad de la enzima. Por otra parte, dentro de los desórdenes potencialmente malignos sólo se incluyeron de manera genérica y sin brindar mayores precisiones clínicas, LB y eritroplasias, sin considerar otras lesiones premalignas de importancia y frecuencia en la clínica estomatológica. Los resultados de dicha investigación demostraron que todas las muestras analizadas eran positivas para la expresión de hTERT, sin encontrar correlación entre los niveles de hTERT y el grado de displasia de las lesiones.

En este mismo sentido, Palani y col.<sup>(217)</sup> analizaron por medio de técnicas inmunohistoquímicas la presencia de hTERT en tacos de biopsias del archivo del Departamento de Patología Oral y Maxilofacial (Ragas Dental College and Hospital, Chennai), con diagnóstico previo de LB con diversos grados de displasia (n= 15), fibrosis

submucosa oral (n= 15) y cáncer bucal con diferentes grados de diferenciación (n= 30), utilizando como grupo control mucosa bucal clínica e histológicamente normal obtenida durante la exodoncia de terceros molares retenidos( n=10). Como resultado de su estudio concluyeron que hubo una expresión incrementada de hTERT en LB y cánceres, pero no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grados de displasia y diferenciación de las lesiones y la expresión de hTERT. Por otra parte, resulta interesante destacar que Palani y col. consideran la necesidad de realizar futuras investigaciones de la actividad de la enzima telomerasa en los queratinocitos orales normales por medio de la técnica TRAP (metodología sugerida para la evaluación de la AT en el presente proyecto), dadas las limitaciones que en este sentido presenta la técnica inmunohistoquímica.

Tal como en el caso anterior, en este estudio se procedió exclusivamente a la evaluación de aspectos moleculares de las lesiones sin considerar aspectos clínicos del paciente que resultan de gran importancia a la hora de considerar el pronóstico, evolución y posible progresión de las lesiones, lo cual se constituye en uno de los objetivos principales de este proyecto.

Los resultados expuestos anteriormente se contraponen con los hallazgos de otros autores, quienes refieren correlación positiva entre el grado de displasia de distintas lesiones orales y el incremento de la actividad de la enzima telomerasa. Tal es el caso de Kim y col, <sup>(218)</sup> quienes analizaron los niveles de hTERT en especímenes con mucosa oral normal (n= 20), en tejidos con displasia leve (n= 7), moderada (n= 5) y severa (n=3), y en muestras de CCE de la mucosa bucal (n=18) a partir de biopsias archivadas en la Sección de Patología Oral (Universidad de California, Los Ángeles), a través de las técnicas de real time RT- PCR e in situ PCR. Entre sus resultados podemos destacar la existencia de correlación entre el grado de displasia y la expresión de hTERT. En este estudio, sin embargo, tampoco se evaluaron las características clínicas y fenotípicas de los pacientes, los factores de riesgo asociados, el nivel de estrés oxidativo ni la capacidad de defensa antioxidante de los tejidos que podrían estar modulando la actividad de la enzima telomerasa.

La existencia de esta controversia en cuanto a la posible correlación entre el incremento de la actividad de la enzima telomerasa, los diferentes grados de displasia de los DPM y los distintos estadios de diferenciación del CCE de la mucosa bucal, motiva nuevas investigaciones al respecto.

Rai y col. <sup>(82)</sup> realizaron una cuantificación de la actividad telomerasa mediante técnica TRAP en muestras de biopsias con diagnóstico de CCE de la mucosa bucal, encontrando que un 89% de las muestras eran positivas para AT contra un 5% de las muestras procedentes de tejidos sanos. En este caso, no encontraron correlación entre los niveles de actividad telomerasa y la localización, estadio, sexo o hábitos del paciente; aunque sí con la edad. Una edad más avanzada estaba en estos casos relacionada con un incremento de la actividad telomerasa. Por lo que los autores concluyen que la reactivación de la actividad de la enzima es un evento frecuente en los casos de CCE.

Utilizando el mismo tipo de técnica molecular, Zhong <sup>(219)</sup> encontró un incremento en la actividad telomerasa en saliva de pacientes portadores de CCE comparados con pacientes sanos. Sin embargo, en este caso no halló correlación entre el grado de actividad telomerasa y la edad de los pacientes. De este modo, estos autores postulan la utilidad de la determinación de esta enzima en saliva como marcador en este tipo de patología.

Yao y Wu <sup>(220)</sup> estudiaron la actividad telomerasa en DPM y CCE de la mucosa bucal, para lo cual llevaron adelante un estudio molecular utilizando la técnica TRAP sobre tacos de biopsia con diagnóstico previo de LP (n= 20), LB (n=10) y cáncer bucal (n=20), encontrando diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la AT entre las lesiones premalignas y malignas pero sin correlacionar esos niveles de expresión con las diferentes variedades clínicas de LP y LB, algo que se pretende a través de nuestro estudio. Por otra parte la determinación de la actividad telomerasa, se llevó adelante en tacos de biopsia procedentes de pacientes pertenecientes a grupos poblacionales asiáticos (pacientes chinos), por lo que consideramos que los resultados no pueden transferirse directamente a nuestro medio, teniendo en cuenta que numerosos autores plantean que los genes que regulan la expresión de la actividad telomerasa presentan polimorfismo y que la actividad de esta enzima presenta variaciones de acuerdo al grupo étnico del individuo. <sup>(221- 225)</sup>

Consideramos que no existe evidencia suficiente que explique la relación existente entre la exposición aislada o en asociación a factores de riesgo y factores clínicos del paciente y de sus lesiones orales con la actividad de la enzima telomerasa. En relación a este aspecto, Liao y colaboradores <sup>(168)</sup> analizaron la correlación entre la masticación de betel, consumo de tabaco y alcohol, la actividad telomerasa y la severidad del cáncer bucal. Para ello se realizaron biopsias de CCE de la mucosa bucal (n=154), cuyos estadios clínicos y sitios de

localización fueron clasificados de acuerdo al sistema de la American Joint Committee on Cancer (AJCC). Los pacientes fueron divididos en tres categorías de acuerdo a sus hábitos: masticador diario de betel, fumador diario y alcoholista diario. No se tuvo en cuenta a los ex fumadores o ex bebedores de alcohol, así como tampoco a los fumadores o bebedores ocasionales, a pesar de que es reconocido el hecho de que el daño producido por estas sustancias tiene carácter acumulativo. Para la evaluación de la actividad telomerasa se utilizó PCR-ELISA. Los resultados demostraron una elevada actividad telomerasa en el tejido perteneciente a lesiones malignas, pero no se encontró correlación entre el uso de las sustancias antes mencionadas con el estadio clínico del cáncer. Según estos autores, esto podría hacer presuponer que dichos factores no estarían involucrados en la progresión tardía del cáncer, sino que podrían estar involucrados en los estadios tempranos de la carcinogénesis oral. De allí otro de los objetivos de este proyecto de tesis que radica en la evaluación de la actividad telomerasa no sólo en el CCE sino también en DPM, las cuales no fueron evaluadas en el trabajo de Liao y col.

Además, es muy interesante la conclusión de Liao al expresar que la exposición a diferentes tipos de sustancias carcinogénicas sumada a posibles predisposiciones genéticas, puede resultar en distintos caminos (pathways) en la carcinogénesis oral, teóricamente resultando en diferentes niveles de AT expresados en los diferentes grupos poblacionales. Su trabajo se desarrolló en pacientes del Servicio de Otorrinolaringología del Gang Gung Hospital de Taiwán, por lo que podrían existir algunas diferencias con respecto a nuestra población de estudio, fundamentalmente en relación a los hábitos y factores de riesgo implicados, ya que, en nuestro medio, por ejemplo, es prácticamente inexistente el hábito de masticación de betel, aunque sí incluimos (a diferencia de lo que ocurre en Taiwán y otras regiones), el consumo de mate. Una vez más, entonces, planteamos las diferencias que pueden existir en la cuantificación de la actividad telomerasa y en el comportamiento de los telómeros teniendo en cuenta la etnia de la población de estudio, tal como fuese explicado en párrafos anteriores.

Resulta importante profundizar el estudio de diversos aspectos relacionados con la participación de la enzima telomerasa en DPM y en el cáncer de la mucosa bucal, así como la relación que podría existir entre los aspectos moleculares de la actividad de la telomerasa con factores propios del fenotipo del paciente (sexo, edad, estado bucal, hábitos, etc) y las características clínicas e histopatológicas de las lesiones premalignas de la mucosa bucal.

Se considera de gran importancia la relación existente entre el stress oxidativo, los niveles de sustancias antioxidantes y la actividad telomerasa.

De hecho, existe entre diferentes autores consenso al expresar que hay poca evidencia para evaluar el nivel de la peroxidación lipídica y la capacidad antioxidante en el tejido de especímenes con DPM de la mucosa bucal. Asimismo, y teniendo en cuenta que los radicales libres actúan activando a la telomerasa, no disponemos de trabajos que correlacionen la actividad de esta enzima con el nivel de estrés oxidativo, el perfil antioxidante y la características clínicas e histopatológicas de lesiones potencialmente malignas y cáncer de la mucosa oral. Tampoco se lo ha relacionado con los factores asociados a estas patologías (tabaco, alcohol, etc). Por ello consideramos de suma importancia profundizar en el estudio de estas variables y su posible asociación para evaluar el comportamiento, pronóstico y evolución de dichas patologías. Consideramos que este punto puede resultar uno de los principales aportes de este trabajo.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO:**

-La Actividad Telomerasa (**AT**) se encuentra aumentada en los desórdenes potencialmente malignos (**DPM**) y en el carcinoma a células escamosas (**CCEB**) de la mucosa bucal.

-La actividad de esta enzima está relacionada con la variedad clínica e histopatológica de las lesiones estudiadas y con la presencia de ciertos factores de riesgo como el tabaco, el consumo de alcohol y mate y la presencia de irritación mecánica crónica (**IMC**) de la mucosa bucal.

-Los niveles de MDA, como marcador de lipoperoxidación, y de SOD y AU salivales (para evaluar los sistemas de defensa antioxidante), se correlacionan con la AT y con las características clínicas e histopatológicas de los DPM y del cáncer de la mucosa bucal.

## **OBJETIVOS:**

### **OBJETIVO GENERAL:**

-Determinar la AT en DPM y en CCE de la mucosa bucal.

-Determinar la concentración de MDA tisular y salival en DPM y CCE de la mucosa bucal, como marcador de lipoperoxidación.

-Evaluar la capacidad de defensa antioxidante a través del dosaje de la enzima SOD y de AU en saliva de pacientes con diagnóstico de las patologías antes mencionadas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1-Describir la población estudiada en función de sus características clínicas y sus hábitos y factores de riesgo (sexo, edad, consumo de tabaco, drogas, alcohol, mate y presencia de factores que generen irritación mecánica crónica de la mucosa bucal).

2-Determinar la AT en muestras tisulares de DPM, carcinomas de la mucosa bucal y mucosa clínicamente sana.

3-Determinar la AT en muestras tisulares de DPM, carcinomas de la mucosa bucal y mucosa clínicamente sana.

4-Determinar la concentración de MDA en muestras de tejido procedentes de pacientes con diagnóstico de DPM y carcinomas de la mucosa bucal, y compararla con los valores hallados en muestras de mucosa clínicamente sana.

5-Determinar las concentraciones de MDA y AU y la actividad de SOD en la saliva de los pacientes con diagnóstico de DPM y cáncer de la mucosa bucal y compararla con los valores hallados en saliva de pacientes con mucosa bucal clínicamente sana.

6- Correlacionar las concentraciones de MDA halladas en muestras de tejido y en saliva basal, así como con la concentración de AU salival y la actividad de SOD.

7-Correlacionar la actividad de SOD con la concentración de AU salival de los pacientes incluidos en este estudio.

8-Correlacionar los valores de AT obtenidos en tejidos con las concentraciones de MDA tisular y salival, AU salival y la actividad de SOD salival.

# MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación en Salud (CIEIS) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba (Proy. Res. N° 76/2015). Los individuos seleccionados fueron informados sobre los objetivos y la característica del estudio y luego invitados a participar. Antes de ser incluidos firmaron el consentimiento informado. **(ANEXO 1)**.

### **Población**

El presente estudio de tipo caso-control se llevó a cabo en la provincia de Córdoba (Argentina) en pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años, que concurren por demanda espontánea o por derivación a las Cátedras de Estomatología “A” y “B” de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba entre los años 2017-2019. Se incluyeron 100 pacientes: 50 casos denominados **Grupo de estudio (GE)** y 50 controles, apareados por sexo y edad, denominados **Grupo control (GC)**.

### **GRUPO DE ESTUDIO (GE)**

En el **GE** se incluyeron 50 pacientes de ambos sexos mayores de 18 años, con diagnóstico clínico-histopatológico de carcinoma a células escamosas (CCEB) o con desórdenes potencialmente malignos (DPM) de la mucosa bucal, como la Leucoplasia bucal (LB) y el Liquen Plano (LP) o las Lesiones liquenoides orales (LLO).

#### **El GE se subdividió en dos subgrupos:**

1) Pacientes con diagnóstico de los siguientes DPM:

a) 10 muestras de **Leucoplasia Bucal (LB)**, según criterios diagnósticos de la OMS <sup>(188,189)</sup>. **(Subgrupo LB)**.

b) 20 muestras de lesiones liquenoides orales (**LLO**), según criterios de van der Meij y van der Wal <sup>(204)</sup> y Liquen plano (**LP**), según criterios diagnósticos de la OMS. <sup>(204)</sup> **(Subgrupo LP+LLO)**.

2) 20 muestras de carcinomas a células escamosas bucales (**CCEB**) en cualquiera de sus variedades reconocidas de presentación. Se siguieron los criterios de la OMS. <sup>(204)</sup> **(Subgrupo CCEB)**.

Para los pacientes del **GE** se valoró la presencia de infiltrado, el grado de displasia en los informes histopatológicos y en el caso de los carcinomas bucales, el grado de diferenciación.

- El **grado de infiltrado** de las lesiones se caracterizó de la siguiente manera:

\* **0:** Ausencia de infiltrado.

\* **1:** Infiltrado escaso.

\* **2:** Infiltrado moderado.

\* **3:** Infiltrado abundante.

- Para la caracterización del grado de **displasia epitelial**, se siguieron los criterios de clasificación de la OMS, <sup>(226)</sup> y se clasificó en los siguientes grados:

\* **0:** sin displasia epitelial.

\* **1:** displasia leve.

\* **2:** displasia moderada.

\* **3:** displasia severa.

- En el caso del grado de **diferenciación de los carcinomas orales**, se utilizó la siguiente clasificación: <sup>(227)</sup>

\* **Gx:** no es posible asignar un grado (Grado indeterminado).

\* **G1:** Bien diferenciado (Grado bajo).

\* **G2:** Semidiferenciado (Grado intermedio)

\* **G3:** Indiferenciado (Grado alto)

## **GRUPO CONTROL (GC)**

El **GC** incluyó a 50 pacientes apareados por sexo y edad con los pacientes del **GE**. Se obtuvo un sector de mucosa clínica e histopatológicamente normal del borde de lesiones extirpadas con diagnóstico clínico e histopatológico de lesiones benignas de naturaleza no inflamatoria de la mucosa bucal (**LBNI**), tales como: quistes mucoides, hiperplasias paraprotéticas e hiperplasia fibro-epiteliales sin componente inflamatorio y /o pacientes con mucosa clínicamente sana (**MCS**). Las muestras de mucosa clínicamente sana procedieron de

pacientes a los que se les practicaron exodoncias de terceros molares retenidos y de la mucosa clínicamente sana y sin signos inflamatorios, que se elimina al colocar implantes dentarios.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Se excluyeron de este estudio a pacientes embarazadas, a menores de 18 años, así como a pacientes que – según la literatura actual- cursen con patologías sistémicas que pudieran modificar los niveles de ROS o de sustancias antioxidantes como los pacientes con patologías crónicas y/o alteraciones del sistema inmune tales como diabetes e hipertensión no compensadas, lupus eritematoso, artritis en todas sus variedades, síndrome metabólico, síndrome de Cushing , o con diagnóstico de cualquier condición que suponga un proceso inflamatorio crónico sistémico subyacente, <sup>(228- 232)</sup> etc . También se excluyeron a aquellos pacientes que durante el último año hubiesen estado bajo tratamiento, de manera regular, con antiinflamatorios no esteroideos o glucocorticoides. No se incluyeron pacientes con diagnóstico de fibrosis quística u otras enfermedades pulmonares crónicas, por posibles alteraciones sistémicas en la fisiología del sistema telomerasa/ telómeros. <sup>(233)</sup> Por el mismo motivo se excluyó del estudio a pacientes con diagnóstico previo o al momento de la consulta de cáncer de cualquier otra localización que no sea la bucal, <sup>(234)</sup> pacientes con trastornos neurodegenerativos o bajo tratamiento psiquiátrico <sup>(235)</sup> y a pacientes con cualquier tipo de patología mielodistrófica. <sup>(236)</sup>

Del mismo modo, no se reclutaron pacientes que hubiesen recibido previamente radioterapia de cabeza y cuello.

Desde el punto de vista del estado bucal, se excluyeron de este estudio pacientes con enfermedad periodontal crónica moderada o severa, dado que la literatura refiere cambios en la expresión de la enzima telomerasa y en las concentraciones de los marcadores de stress oxidativo y batería antioxidante en dichos pacientes. <sup>(237, 238)</sup>

## METODOLOGÍA Y PROTOCOLO DE TRABAJO

Luego la firma del consentimiento informado (**ANEXO 1**), se completó la historia clínica odonto-estomatológica donde se consignaron datos filiatorios, sexo, edad, antecedentes personales sistémicos y patológicos, antecedentes heredofamiliares y estado de salud bucal. En la anamnesis, se hizo especial énfasis sobre hábitos tales como el consumo de tabaco, drogas, alcohol y mate, y sobre la presencia de factores irritativos mecánicos crónicos de la mucosa bucal. (**ANEXO 2**).

El examen clínico estomatológico de la cavidad bucal fue realizado por un odontólogo-estomatólogo, mediante inspección visual y palpación de la mucosa bucal, lengua, labio, mejilla, paladar entre otros tejidos blandos, siguiendo la metodología de examen estomatológico de Grinspan y col, <sup>(191)</sup> para luego proceder a la descripción de las lesiones estomatológicas observadas.

Se identificó como irritación mecánica crónica (**IMC**) o trauma crónico de la mucosa bucal a lesiones asociadas a una condición traumatizante como son: eritema, atrofia, pérdida de sustancia, queratosis, hiperplasia, leucoedema, de más de un mes de evolución, sin tendencia a la reparación; y en relación a cualquier agente físico dentario, protético o de cualquier otro origen, de existencia previa a la lesión, que contacte directamente con la misma, ya sea por decúbito o durante movimientos funcionales y/o para-funcionales. Entre los hábitos traumatizantes se tuvo en cuenta la deglución atípica, interposición lingual, mordisqueamiento o succión de mucosa bucal, estabilización de prótesis por presión de zonas móviles de mucosa bucal, masticación unilateral, etc. según criterios de Piemonte y col. <sup>(239)</sup>

Durante el examen de la mucosa bucal se evaluó si las lesiones estomatológicas que presentaban los pacientes estaban relacionadas con algún factor que generara IMC. La variable **IMC** se categorizó de la siguiente manera:

- \* **IMC 0:** Ausencia de signos de irritación mecánica crónica de la mucosa bucal.
- \* **IMC 1:** irritación mecánica crónica de origen **dentario**.
- \* **IMC 2:** irritación mecánica crónica de origen **protético**.
- \* **IMC 3:** irritación mecánica crónica de origen **dentario y protético**.
- \* **IMC 4:** irritación mecánica crónica de origen **funcional**.

Se realizó toma de muestra del sitio de la lesión para evaluación de *Candida sp.* a través de técnica de frotis para examen directo y de hisopado para cultivo micológico. Para el examen directo se utilizó la coloración de Gram con microscopio MOTIC Mod. DMBA-210 con cámara MotiCAM 3 para observación de levaduras y/o hifas. El cultivo se realizó en agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol por 24-48 hs en condiciones de aerofilia a 37°C. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de la Cátedra de Química Biológica “B” de la Facultad de Odontología de la UNC. Se consideró diagnóstico positivo de candidiasis crónica cuando hubo lesión clínica compatible con diagnóstico de esta patología y se pudo confirmar la presencia de *Candida sp.* por examen microscópico directo y/o su desarrollo en cultivo. (240)

Se procedió a la caracterización y categorización de los factores de riesgo de la siguiente manera:

**Consumo de tabaco:** se consideró el tipo de tabaco (rubio o negro), la cantidad de unidades fumadas por día y la cantidad de años durante los que se consumió. Con esto se obtuvo un total estimativo de tabaco consumido por el paciente a lo largo de su vida, según el método de Biondi y col, (241) multiplicando el número de unidades de tabaco fumadas / día por 365 y por el número de años que fumó. Luego se categorizó según la intensidad del hábito según **TABLA 2.**

*Tabla 2. Categorización de Tabaco según intensidad de consumo*

Categoría	Cigarrillos consumidos
T0	Nunca fumó
T1	< 100.000
T2	100.000- 200.000
T3	> 200.000

**Consumo de alcohol:** De acuerdo con Pentenaro y col, <sup>(242)</sup> se consideró como exposición al alcohol, una unidad de alcohol al día. Se estimó la ingesta total de alcohol en gramos por día y el consumo aproximado de alcohol por años de vida utilizando la **TABLA 3**, propuesta por Caciva y col, <sup>(243)</sup> resultando la siguiente categorización:

**Tabla 3.** *Equivalencia en gramos de alcohol según tipo de bebida, en Córdoba capital (Argentina)*

Bebida	Alcohol % (Rango)	Gramos por litro Mediana en g/L	Equivalente a un vaso /medida
<b>Vino tinto</b>	12- 14,5	130	150 ml:19,5 g
<b>Vino blanco</b>	8- 13	125	150 ml: 19 g
<b>Cerveza</b>	3,5- 5,2	49	330 ml: 16 g
<b>Fernet</b>	39- 40	395	100 ml: 39 g
<b>Whisky</b>	39-40	400	40 ml: 16 g

**Tabla 4.** *Categorización del Alcohol según intensidad de consumo*

Categorías	Consumo de Alcohol en g
<b>A0</b>	No bebe alcohol
<b>A1</b>	< 200.000
<b>A2</b>	200.000- 400000
<b>A3</b>	> 400.000

**Consumo de mate:** se registró la temperatura del agua (caliente o tibia), el promedio de consumo diario (en cc) por día y el tiempo de consumo según Goldenberg y col 2002. <sup>(244)</sup> Se categorizó según la intensidad del hábito, como se expresa en las **TABLAS 5 y 6.**

*Tabla 5. Categorización de mate tibio según cc/ día consumidos*

Categorías (Tibio)	Consumo de mate en cc/día
1	0-1000
2	1000- 1500
3	> 1500

*Tabla 6. Categorización de mate caliente según cc/ día consumidos*

Categorías (Caliente)	Consumo de mate en cc/día
1	0-500
2	500- 750
3	> 750

Posteriormente, se procedió a la **recolección de saliva basal** a los pacientes del **GE** y del **GC**, para la posterior determinación de **MDA** y antioxidantes salivales (**AU** y **SOD** salival).

**- Recolección de saliva basal:**

A los pacientes en ayunas o durante la primera o segunda hora después del desayuno, relajados, sentados y en silencio, se les pidió que se enjuagaran la boca con agua destilada. Durante 5 minutos, la saliva que se formó y acumuló en la cavidad bucal se recolectó en un tubo de plástico cónico centrífugo desechable previamente pesado. El material obtenido se transportó en un contenedor herméticamente cerrado con gel de congelación, a -4 ° C°. Luego se pesó, se centrifugó, se determinó su pH y se conservó a -18 ° C para su posterior análisis bioquímico. <sup>(245)</sup>

### **- Toma biopsica:**

Posteriormente se procedió a la toma biopsica. La muestra de tejido obtenido se dividió en tres fragmentos: para diagnóstico histopatológico (**fragmento A**), para determinación de AT y VPH (**fragmento B**) y para determinación de MDA tisular (**fragmento C**).

### **- Determinación de la AT y de VPH**

El procesamiento, almacenamiento y determinación de **AT** y de **VPH** se llevó adelante en el Instituto Viroológico “José M. Vanella” dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

### **- Determinación de AT**

Se obtuvieron finos cortes a partir del tejido congelado para proceder al procesamiento de las muestras. Para ello se colocaron las muestras en placas de Petri desechables y se utilizó un bisturí con hojas descartables para obtener finas láminas de tejido que luego fueron transferidas a tubos de homogenización que contenían 200  $\mu$ l de buffer para lograr lisis celular a baja temperatura. Luego se homogenizó en hielo hasta lograr una consistencia uniforme y se incubó en hielo durante 30 minutos para después centrifugar el lisado celular a 16.000 x g durante 20 minutos desde 2 hasta 8 grados. Se procedió a remover el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo, <sup>(246)</sup> tras lo cual se midió la concentración de proteínas del extracto a través del método de Bradford. <sup>(247)</sup> Posteriormente el extracto tisular se distribuyó en alícuotas que inmediatamente fueron conservadas a  $-80^{\circ}$  C hasta la determinación de la AT en las muestras.

La metodología utilizada para determinar la actividad de la enzima estuvo basada en la técnica **TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol)**, originalmente descrita por Kim y col. en 1994. <sup>(26)</sup>

En el presente estudio utilizamos una modificación de la técnica original de **Kim y col**, denominada **TRAP- ELISA (Telomerase Repeat Amplification Protocol- Enzyme Linked ImmunoabSorbent Assay)**, que permite la detección y la determinación de la actividad de la enzima telomerasa en tejidos y células aisladas por medio de un método no radiactivo. <sup>(248)</sup>

Para llevar adelante esta técnica se utilizó el **Kit TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA plus, versión 15.0 (Roche, Germany, Cat. No. 12013789001)** que consiste en un inmunoensayo enzimático fotométrico para la determinación no radiactiva de la actividad de la telomerasa, utilizando el protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP), seguido por el método ELISA.

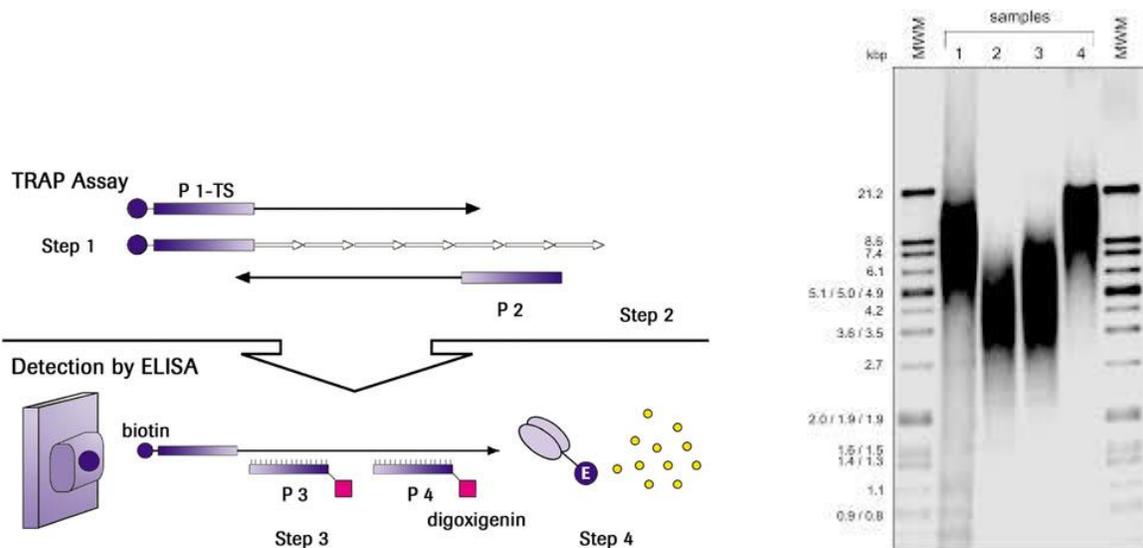
La técnica **TRAP** para determinación de **AT** se basa en la adición de repeticiones teloméricas a un cebador por parte de la enzima telomerasa (contenida en las muestras) y la subsecuente amplificación de los productos teloméricos por PCR.

Los principios del test pueden resumirse en dos pasos:

**a) Primer paso: Elongación/ amplificación:** en el primer paso, la enzima telomerasa (presente en las muestras), agrega repeticiones teloméricas (TTAGGG) al extremo 3' del cebador sintético P1-TS marcado con biotina. Estos productos de elongación, tanto como el Estándar Interno (ES) incluido en la misma reacción, son amplificados por medio de la técnica de PCR usando los cebadores P1-TS y el cebador de anclaje P2.

Los productos de la PCR derivados de la elongación mediada por telomerasa en el primer paso, contienen un incremento de los 6 nucleótidos específicamente agregados por esta enzima, mientras que el Standard Interno genera productos de PCR de 216 bp.

**b) Segundo paso: Detección por ELISA:** los productos de PCR se alicuotan en dos, y luego son desnaturalizados e hibridados por separado a sondas de detección marcadas con digoxigenina, específicas para las repeticiones teloméricas (P3-T) y para el Estándar Interno (EI) (P3- Std), respectivamente. Los productos resultantes se inmovilizan a través del marcador de biotina a una microplaca recubierta con estreptavidina. Los productos inmovilizados se evidencian con un anticuerpo contra digoxigenina que está conjugado con peroxidasa y el sustrato sensible a peroxidasa, tal como se representa en el siguiente gráfico. **(FIGURAS 14 y 15).**



Figuras 14 y 15. Obtenidas <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11854666910>

Esta técnica nos permitió determinar de la AT. Esta variable se categorizó según puede observarse en la **TABLA 7**.

**Tabla 7. Categorización de la Actividad Telomerasa (AT)**

Categoría	Actividad Telomerasa
AT0	NEGATIVA
AT1	POSITIVA (Débil)
AT2	POSITIVA (Intensa)

#### - Detección de VPH:

El ADN viral se extrajo con el kit comercial de extracción de ADN AccuPrepGenomic-Bioneer, siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, la región genómica del HPV L1 (450 pb) se amplificó con los cebadores degenerados MY09 y MY11 siguiendo el protocolo descrito previamente por Manos y col. <sup>(249)</sup> Las muestras positivas para ADN de HPV se tipificaron mediante el método de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción

(RFLP), utilizando siete enzimas de restricción diferentes (BamHI, DdeI, HaeIII, HinfI, PstI, RsaI y Sau3AIII).<sup>(250)</sup>

#### **-Análisis bioquímico de las muestras:**

Las mismas fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de la Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

La determinación de MDA se llevó adelante a través del método TBARS de Ohkawa y col.<sup>(251)</sup> El MDA es estimado como sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico. MDA reacciona con ácido tiobarbitúrico a 100° en medio ácido, para formar un compuesto coloreado (color rosa), que es posible medir espectrofotométricamente a 535 nm. La concentración de MDA es calculada usando el coeficiente de extinción molar del complejo MDA- TBA ( $1,5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} / \text{cm}^{-1}$ ). El resultado se expresó como nMol/ mg de tejido. Para muestras de saliva, el resultado se expresó en nMol/ mL de saliva.

Para determinar la SOD salival se utilizó un kit RANDOX (RANSOD Superóxido Dismutasa Manual) basado en el método de Mc Cord y Fridovich.<sup>(252)</sup> Este método utiliza xantina y xantina oxidasa para generar radicales superóxido que reaccionan con 2-(4- iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5- clorhidrato de feniltetrazolio (INT) para generar un pigmento de color rojo usado como detector. SOD inhibe la formación del pigmento rojo, por lo que su actividad es medida como porcentaje de inhibición comparada con una curva de calibración que utiliza SOD purificada. Es decir que la actividad de la enzima es medida por el grado de inhibición de esta reacción. El producto final se midió espectrofotométricamente a 500 nm. El resultado se expresó en Unidades SOD / mL de saliva. (Unid. SOD/mL).

Para la determinación de AU se utilizó el método enzimático colorimétrico UOD/PAP Trinder Color (Wiener Lab). En este caso, el AU de la muestra es oxidado a alantoína por acción de la uricasa. El peróxido de hidrógeno producido en presencia de peroxidasa y sustancias cromógenas forma quinoneiminas con un pico de absorción de 510 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de ácido úrico de la muestra.<sup>(253)</sup> Los resultados se expresaron en mg/dL de saliva.

**- Análisis estadístico de los datos:**

Los datos cuantitativos se describieron utilizando valores medios, y los datos cualitativos se expresaron como porcentajes.

La información se procesó utilizando la prueba de Chi-cuadrado, el Test “T” de Student para datos apareados y ANAVA. Se estableció un  $p < 0.05$  para diferencias significativas.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con Infostat Profesional (v. 2018, <http://www.infostat.com.ar>).<sup>(254)</sup>

# RESULTADOS

### **- Descripción de la población estudiada**

El presente estudio se llevó a cabo en la provincia de Córdoba (Argentina) en pacientes que concurren a la Cátedras de Estomatología “A” y “B” de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba entre los años 2017-2019. Se incluyeron 100 pacientes: 50 casos y 50 controles, apareados por sexo y edad.

Del total de sujetos del **GE**, el 60% ( $n=30$ ) eran de sexo femenino, con un rango etario de 27 a 91 y una media de 59,5 años, mientras que el rango etario de los pacientes del **GC** fue de 25 a 88 años y una media de 59,3 años.

### **- Características clínicas de los pacientes**

#### **- Distribución de patologías estomatológicas según grupo**

El **GE** estuvo conformado por un 40% ( $n=20$ ) de pacientes con diagnóstico de **CCEB** de la mucosa bucal. Otro 40% ( $n=20$ ) estuvo representado por pacientes con diagnóstico **LP** y **LLO** y el restante 20% correspondió a pacientes con diagnóstico de **LB**. Algunas características de los pacientes que conformaron el **GE** y el **GC** pueden analizarse en la **TABLA 8**.

En cuanto al grado de diferenciación histológica, de los pacientes con diagnóstico de **CCEB**, el 85% ( $n=17$ ) correspondió a lesiones semidiferenciadas o **Grado 2** de Broders y el 15 % restante ( $n=3$ ) resultaron lesiones diferenciadas o **Grado 1**. Con respecto a la localización de las lesiones en el caso de los pacientes con diagnóstico de **CCEB**, un 75% ( $n= 15$ ) se ubicó en la lengua, seguido por un 15% ( $n= 3$ ) en mucosa yugal y un 5 % ( $n=1$ ) en reborde alveolar superior extendiéndose hacia paladar blando. (**FIGURA 16**). El único **CV** (Carcinoma Verrugoso) de la muestra fue de ubicación gingival.

Al aplicar la prueba de *Chi- cuadrado* no se encontró relación entre la localización de las lesiones y el grado de diferenciación de las mismas.

*Figura 16. Grupo de Estudio: Características clínicas de pacientes con diagnóstico de CCE.*



Paciente: VMR  
Edad: 61 años  
Diagnóstico CCE, Semidiferenciado

*Lesión exofítica, úlcerovegetante, de reborde alveolar que se extiende hacia paladar.  
Expuesta a agroquímicos, no tabaco ni alcohol.*



Paciente: MC  
Edad: 62 años  
Diagnóstico CCE, Semidiferenciado

*Lesión endofítica, úlcerovegetante, de borde lingual que se extiende hacia cara ventral y  
piso de boca. Paciente fumador y bebedor de alcohol.*

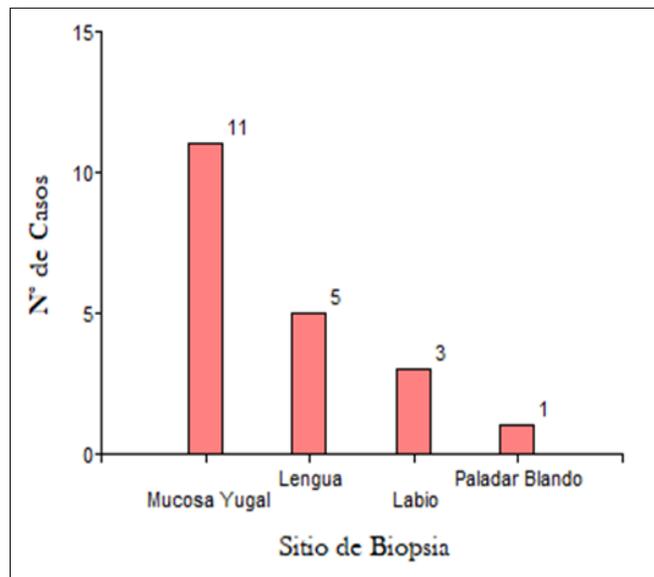


Paciente: DFE  
Edad: 42 años  
Diagnóstico CCE, Semidiferenciado

*Lesión endofítica, ulcerada, de bordes elevados y evertidos, localizada en mucosa yugal derecho, asociada a IMC por tercer molar superior derecho. Paciente no fumador ni bebedor.*

En el caso de los 20 casos del subgrupo **LP + LLO** el 90 % ( $n=18$ ) correspondió a **LLO** y el 10 % restante ( $n=2$ ) a **LP** en sus variedades queratótico y erosivo respectivamente. En cuanto a la localización de los sitios de biopsia, un 55% correspondió a mucosa yugal, seguido por lengua y otras localizaciones (**TABLA 8 y FIGURAS 17 y 18**).

**Figura 17.** Grupo de Estudio (GE): Distribución de LP y LLO según sitio de Biopsia



*Figura 18. Grupo de Estudio: Características clínicas de pacientes con diagnóstico de LP y LLO.*



Paciente: PM  
Edad: 54 años  
Diagnóstico LPB erosivo

*Lesión bilateral con patrón reticular, sectores atróficos, erosivos y queratóticos.*



Paciente: NN  
Edad: 67 años  
Diagnóstico LLO

*Lesión erosiva rodeada por mancha blanca y sector queratótico, acompañada de múltiples lesiones blancas intrabucuales con patrón de red.*



Paciente: RV  
Edad: 65  
Diagnóstico LLO

*En dorso lingual se observa atrofia de papilas que alterna con sectores de mancha blanca y sectores queratóticos, acompañada de múltiples lesiones blancas intrabucuales con patrón de red.*

Mientras que en el caso de las **LB** un 30% ( $n= 3$ ) de los casos correspondió a LVP (dos de ellas localizadas en lengua y la tercera en mucosa yugal), y el resto a leucoplasias homogéneas de pacientes fumadores. Estas últimas, de acuerdo a la clasificación clínico-histopatológica de Grinspan<sup>(190)</sup>, correspondían a leucoplasias grado II o queratóticas (40%) y el restante (30%) a leucoplasias grado III o verrugosas.

*Figura 19. Grupo de Estudio: Características clínicas de pacientes con diagnóstico de LB.*



Paciente: MC  
Edad: 50 años  
Diagnóstico LB grado II

*Lesión queratótica, color blanco seco, de aspecto parqueteado, ubicada en retrocomisura y tercio anterior de mucosa yugal derecha.*



*Lesión blanca, de aspecto queratótico, ubicada en semimucosa y mucosa labial inferior.*



*Lesión blanca en forma de placa localizada en borde y cara ventral de lengua.*

El **GC** estuvo conformado en un 62% ( $n=31$ ) por muestras de mucosa clínicamente sana (**MCS**) y el 38% restante ( $n=19$ ) por muestras de mucosa normal obtenida del borde lesiones benignas no inflamatorias de la mucosa bucal (**LBNI**) entre las que encontramos quistes

mucoides, pseudopapilomas e hiperplasias focales de la mucosa. Algunas características clínicas adicionales del **GC** se muestran en la **TABLA 8**.

**TABLA 8.** Características clínicas generales de los Grupos de Estudio y control

Características	Total n (%)	GE/ CCE n (%)	GE/LP+LLO n (%)	GE/LB n (%)	GC n (%)
<b>Género</b>					
Femenino	29 (58)	10 (50)	15 (75)	05 (50)	29 (58)
Masculino	31 (42)	10 (50)	05 (25)	05 (50)	31 (42)
<b>Edad media</b>	59,41	63,9	56,2	57,2	59,3
<b>Variedad</b>		CCE 20 (100)	LP erosivo 01 (5) LP queratótico 01 (5) LLO 18 (90)	LB II 04 (40) LB III 03 (30) LVP 03 (30)	MCS 31 (62) LBNI 19 (38)
<b>Ubicación</b>					
Labio		--	03 (15)	02 (20)	11 (22)
Lengua		15 (75)	05 (25)	02 (20)	02 (4)
Mucosa Yugal		03 (15)	11 (55)	06 (60)	04 (8)
Paladar		--	01 (5)	--	01 (2)
Encía		01 (5)	--	--	32 (64)
Reborde		01 (5)	--	--	--
<b>Total</b>	100	20	20	10	50

\***GE/CCE:** Grupo de Estudio/ Subgrupo Carcinoma a Células Escamosas. **GE/ LP+LLO:** Grupo de Estudio/ Subgrupo Liquen Plano + Lesiones Liquenoides Orales. **GE/LB:** Grupo de Estudio/ Leucoplasias Bucales. **GC:** Grupo Control

**- Caracterización de la muestra según hábitos y factores de riesgo**

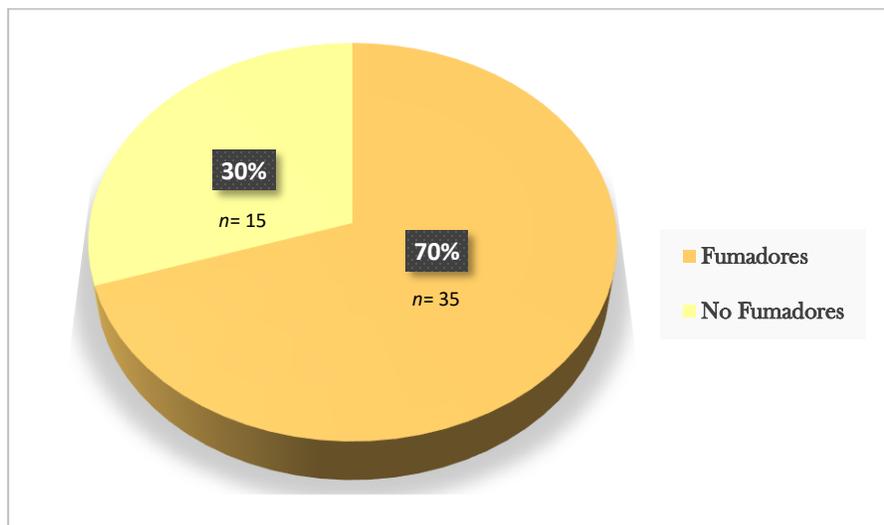
**- Consumo de tabaco:**

El 70% ( $n=35$ ) de los pacientes del **GE** eran fumadores. El 60% de los pacientes fumadores del **GE** había consumido más de 100.000 cigarrillos en toda su vida.

(**FIGURA 20**). En cuanto al **GC**, el 50% ( $n=25$ ) de los pacientes eran fumadores. Del total de los pacientes fumadores del **GC**, el 40% de los mismos había consumido más de 100.000 cigarrillos en toda su vida. (**FIGURA 21**).

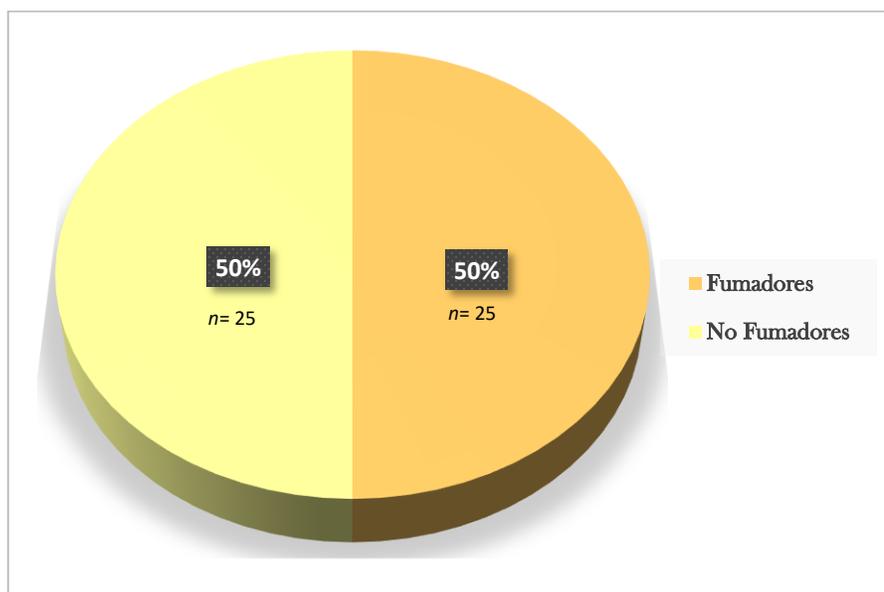
La intensidad del consumo de tabaco en el **GE** y **GC** se analiza en la **TABLA 9**.

*Figura 20. Distribución del GE según consumo de Tabaco*



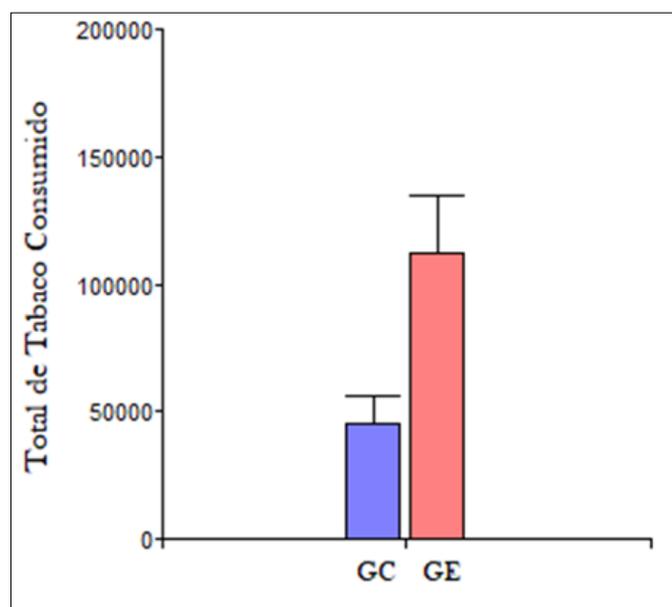
Sólo 2 pacientes del **GE** refirieron consumir marihuana de manera regular, además de tabaco.

*Figura 21. Distribución del GC según consumo de tabaco*



Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,04$ ) en el consumo de tabaco entre el **GE** y el **GC**. (**FIGURA 22**).

*Figura 22. Distribución de la muestra según total de cigarrillos consumidos.*



GC: Grupo Control. GE: Grupo de Estudio.

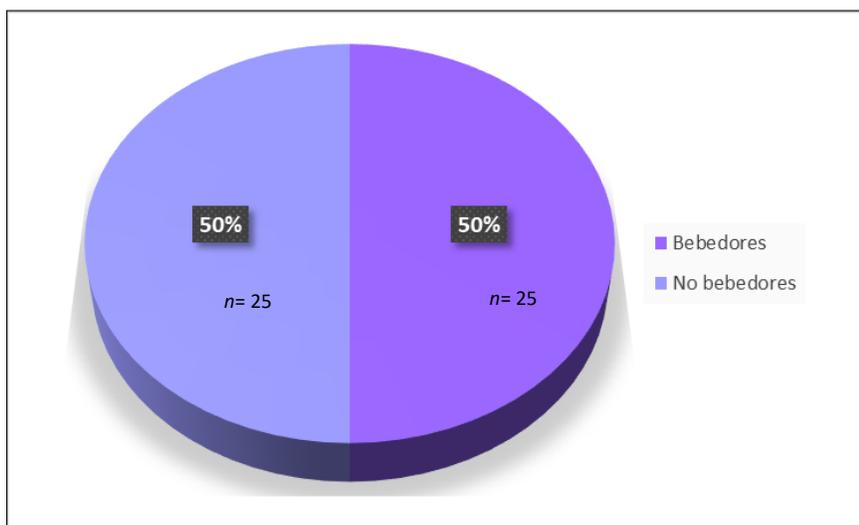
$\chi^2 (p = 0,04)$

### - Consumo de Alcohol

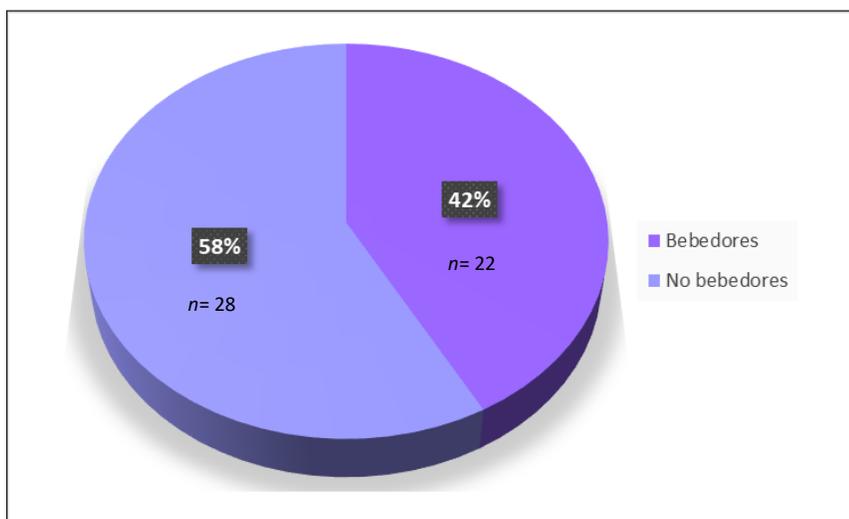
El 50% de los pacientes del **GE** bebía alcohol. El 28% de ellos había consumido más de 200.000 gramos. (**FIGURA 23**). En el **GC** solo el 42% de los pacientes consumía alcohol, de los cuales el 14% había consumido más de 200.000 gramos. (**FIGURA 24**).

La intensidad del consumo de alcohol en el **GE** y **GC** se analiza en la **TABLA 9**.

*Figura 23. Distribución del GE según Consumo de Alcohol*



*Figura 24. Distribución del GC según Consumo de Alcohol*

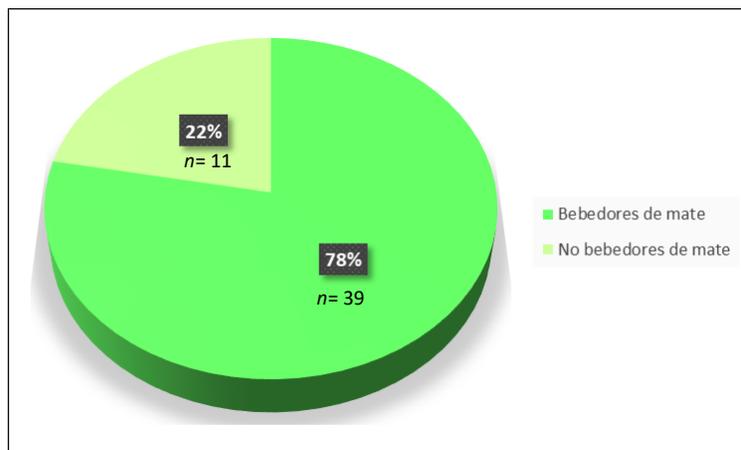


No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las categorías Bebedores /No bebedores en los grupos estudiados ( $p= 0,83$ ).

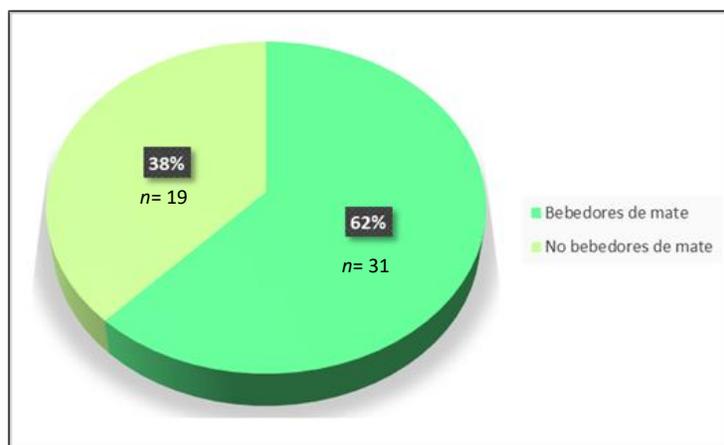
**- Consumo de mate:**

El hábito de consumir de mate en ambos grupos puede observarse en las **FIGURAS 25 Y 26**. La intensidad del consumo de mate en el **GE** y **GC** se analiza en la **TABLA 9**.

*Figura 25. Distribución del GE según Consumo de Mate*



*Figura 26. Distribución del GC según Consumo de Mate*



No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,08$ ) en relación al consumo de mate entre el **GE** y el **GC**.

**- Irritación mecánica crónica (IMC):**

En el **GE** pudimos observar un mayor porcentaje de pacientes con algún tipo de **IMC** de la mucosa bucal (70%). En el **GC** solo un 44% de los pacientes presentó evidencias clínicas de **IMC**. (**FIGURAS 27 Y 28**).

La frecuencia y tipo de **IMC** presentes en el **GE** y **GC** se analizan en la **TABLA 9**.

*Figura 27. Distribución del GE según presencia de IMC*

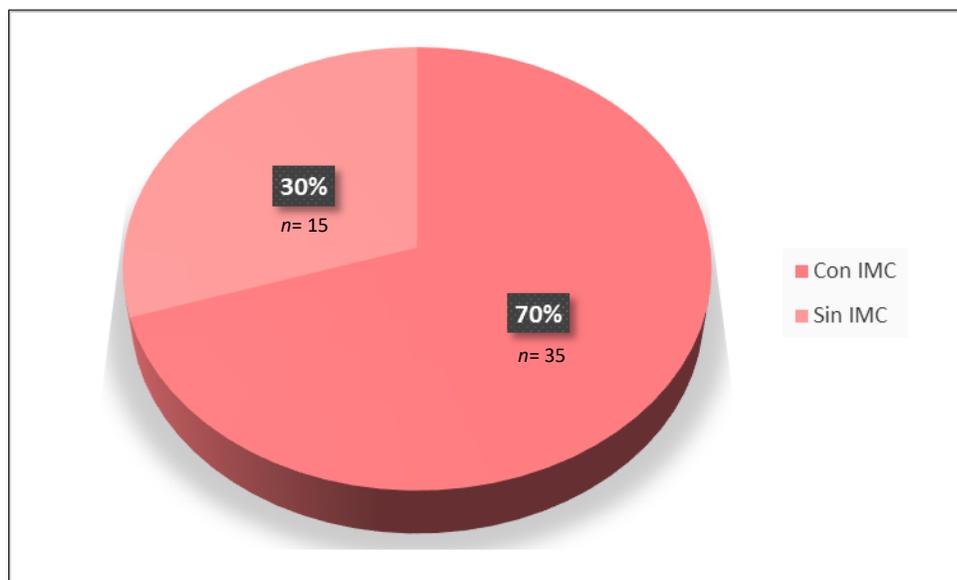
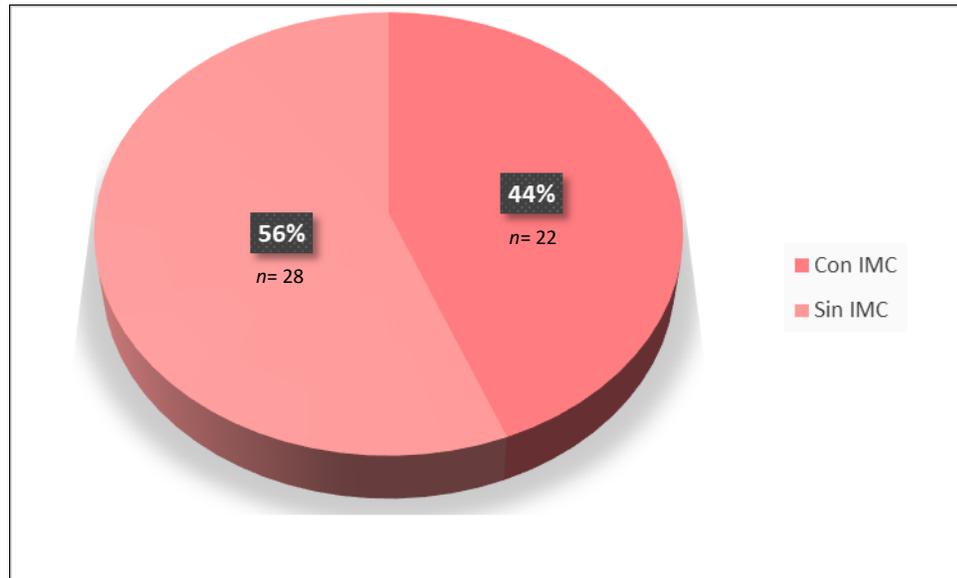


Figura 28. Distribución del GC según presencia o no de IMC



Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de **IMC** entre **GE** y **GC** ( $p= 0,008$ ).

- **Determinaciones Microbiológicas**

- **Estudios Micológicos:**

En el **GE** se encontraron un 52% ( $n=26$ ) de muestras positivas para *Candida sp*, mientras que el **GC** solo presentó un 12% ( $n= 6$ ) de resultados positivos. (**FIGURAS 28a y 28b**).

Figura 28a.

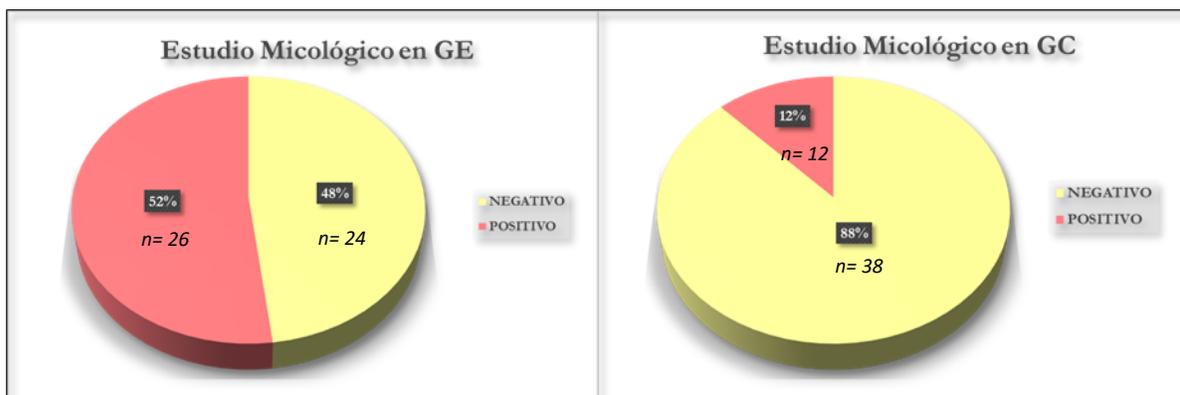


Figura 28b.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de *Candida* sp. entre los pacientes del **GE** y el **GC** ( $p= 0,003$ ).

**- Estudios virológicos:**

Solamente 3 pacientes (1,5%) del **GE** resultaron positivos para VPH. Todos los pacientes del **GC** resultaron negativos para el virus, por lo cual se desestimó este factor como variable confundente que motive la activación de AT.

**TABLA 9.** Distribución de los Grupos de Estudio y Control según intensidad de los hábitos.

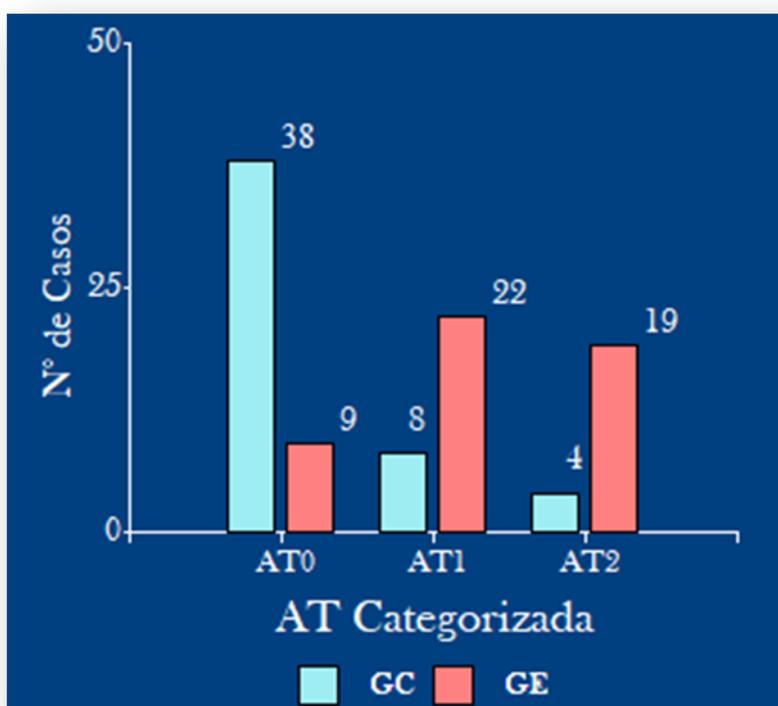
HÁBITO	GC n (%)	GE n (%)	p valor
<b>TABACO</b>	<b>25 (50)</b>	<b>35 (70)</b>	
T1	15 (60)	14 (40)	<b>0,04</b>
T2	07 (28)	12 (34)	
T3	3 (12)	9 (26)	
<b>ALCOHOL</b>	<b>21 (42)</b>	<b>25 (50)</b>	
A1	18 (86)	18 (72)	<b>0,83</b>
A2	3 (14)	2 (8)	
A3	0	5 (20)	
<b>MATE</b>	<b>31 (62)</b>	<b>39 (78)</b>	
M1	28 (90)	12 (31)	<b>0,08</b>
M2	03 (10)	10 (26)	
M3	-	17 (43)	
<b>IMC</b>	<b>22 (44)</b>	<b>35 (70)</b>	
IMC 1	13 (59)	19 (54)	<b>0,008</b>
IMC 2	01 (5)	11 (32)	
IMC 3	08 (36)	04 (12)	
IMC 4	-	01 (2)	

### - Determinación de la AT

El 82% ( $n= 41$ ) de las muestras del **GE** resultaron **AT positiva**, mientras que en el **GC** sólo el 24% ( $n= 12$ ) mostraron actividad de la enzima, siendo estas diferencias estadísticamente significativas con un  $p < 0,0001$ .

Se observaron también diferencias en la categorización de la **AT según intensidad (AT0, AT1 y AT2)**, entre **GE** y **GC**. Estas diferencias fueron sobre todo evidentes para **AT0** encontrándose mayor cantidad de casos de **AT negativa** en el **GC** con respecto al **GE**; y para **AT2** donde los casos de **AT intensa** estuvieron más presentes en el **GE** que en el **GC**. (**FIGURA 29**).

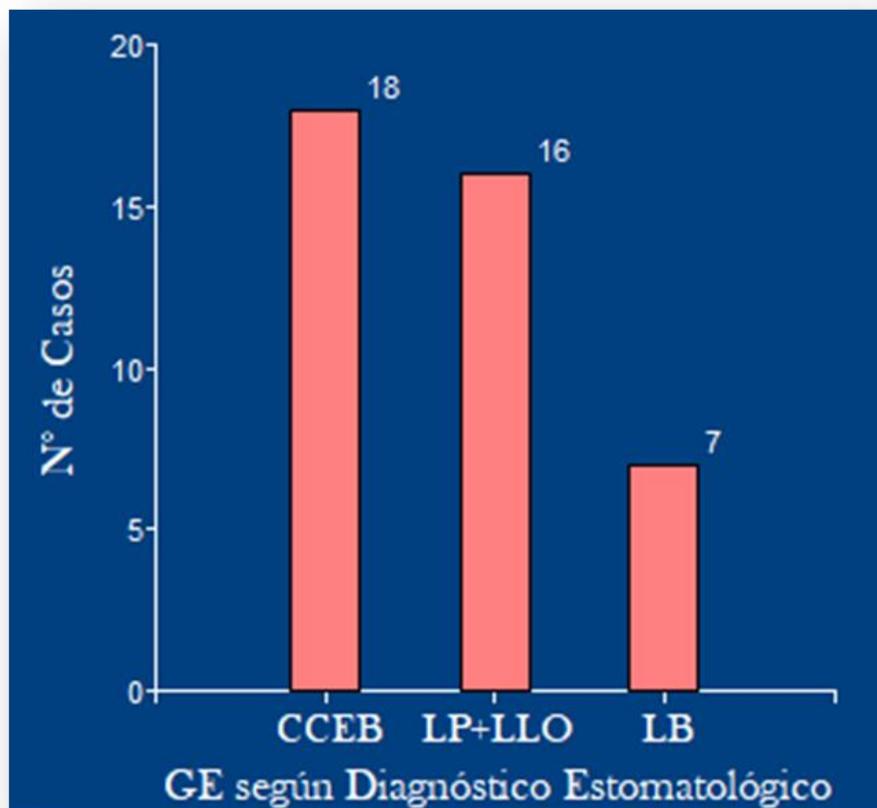
**Figura 29.** Distribución de la AT categorizada en GE y GC



**N° de Casos:** Casos que mostraron AT positiva en cada grupo. **GE:** Grupo de Estudio. **GC:** Grupo Control  $\chi^2$  ( $p < 0,0001$ ).

Considerando los diferentes subgrupos del **GE**, la **AT** resultó positiva en un 90 % de las muestras procedentes de los pacientes diagnosticados con **CCEB** (n= 18), seguidos por un 80 % de las muestras con diagnóstico de **LP+LLO** (n=16) y finalmente un 70% (n=7) de las muestras de **LB** positivas para **AT**. (**FIGURA 30**).

*Figura 30. Actividad Telomerasa positiva según Diagnóstico Estomatológico*



*Nº de casos:* Casos que mostraron **AT** positiva en cada patología.

*GE:* Grupo de Estudio. **CCE:** Carcinoma a células escamosas bucales.

*LP+LLO:* Liquen plano + Lesiones liquenoides orales. **LB:** Leucoplasia bucal

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las diferentes categorías de la **AT** entre las distintas patologías que integraron el **GE**, con un  $p= 0,004$ ; tal como puede observarse en la **TABLA 10**.

**TABLA 10.** Categorización de AT según patologías del GE

AT	CCE n (%)	LP n (%)	LB n (%)
AT 0	2	4	3
AT 1	4	13	5
AT 2	14	3	2

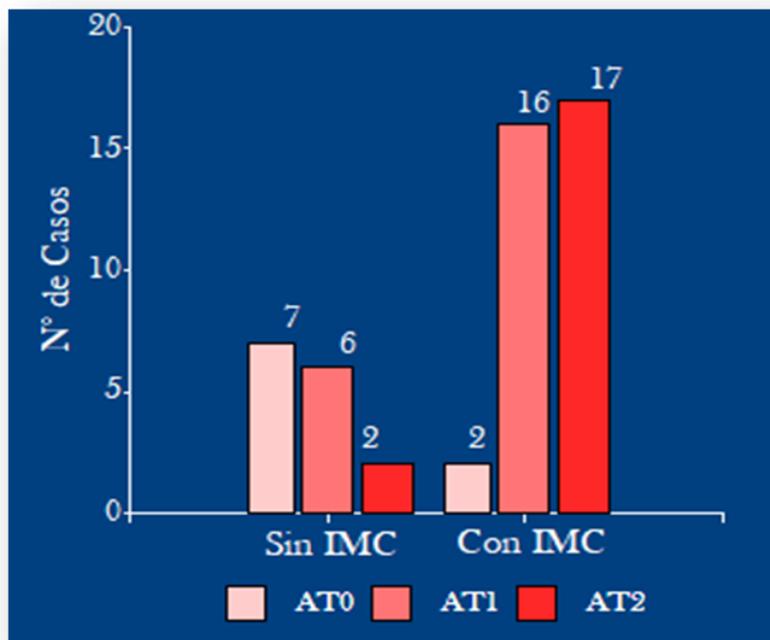
No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la AT, el sexo y la edad de los pacientes.

#### **Relación entre AT, hábitos tóxicos y factores de riesgo**

No se encontró relación entre los hábitos de fumar, beber alcohol y consumir mate y la AT. No obstante, resulta interesante destacar que el 47% ( $n=18$ ) de los pacientes del GC que resultaron AT0 eran pacientes no fumadores y no bebían alcohol, mientras que solo 2 pacientes fumadores de este grupo demostraron actividad intensa de la enzima (AT2). En contraposición a lo observado en el GE, donde solamente el 10% ( $n=5$ ) de los pacientes eran no fumadores y resultaron AT0.

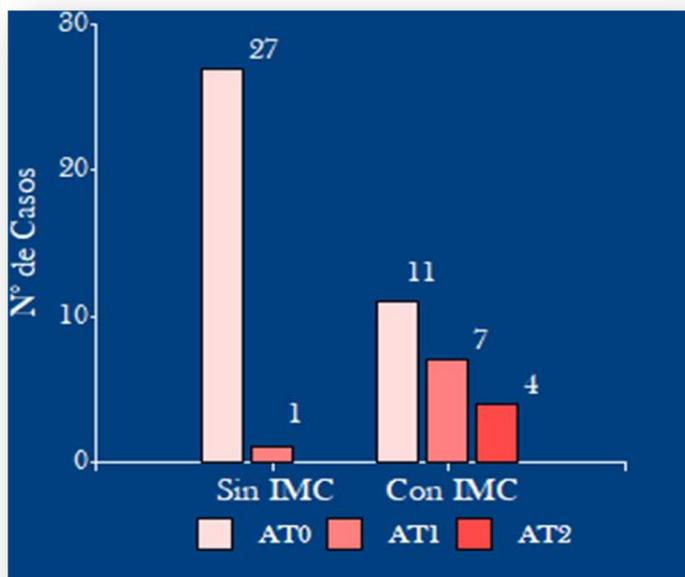
Se pudo observar relación entre la AT y la presencia de IMC tanto en los pacientes de GE ( $p= 0,0006$ ), como en los de GC ( $p= 0,0001$ ). Asimismo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre IMC y la categorización según intensidad de AT, tanto en GE ( $p= 0,0004$ ) como en GC ( $p= 0,0006$ ) (FIGURAS 38 y 39).

**Figura 38. Grupo de Estudio:** Presencia de IMC y categorización según intensidad de AT.



*N° de Casos: Casos discriminados según categorización por intensidad de AT según existencia de factores irritativos crónicos en el GE. (p= 0,0004)*

**Figura 39. Grupo Control:** Presencia de IMC y categorización AT según intensidad.



*N° de Casos: Casos discriminados según categorización por intensidad de AT según existencia de factores irritativos crónicos en el GE. (p= 0,0006)*

**- Relación entre AT y parámetros histopatológicos (grado de displasia y presencia de infiltrado):**

No se observó asociación entre la **AT** y el grado de diferenciación de las lesiones, pero sí con la presencia de displasia ( $\chi^2 p= 0,03$ ) y la presencia del infiltrado ( $\chi^2 p= 0,01$ ) en las lesiones pertenecientes al **GE**.

**- Determinación de marcadores de stress oxidativo y sustancias antioxidantes**

Las medidas resumen que resultaron de la determinación de **MDA** salival y tisular, **SOD** y **AU** salivales pueden observarse en la **TABLA 11**.

**TABLA 11.** Medidas resumen de marcadores de stress oxidativo y sustancias antioxidantes

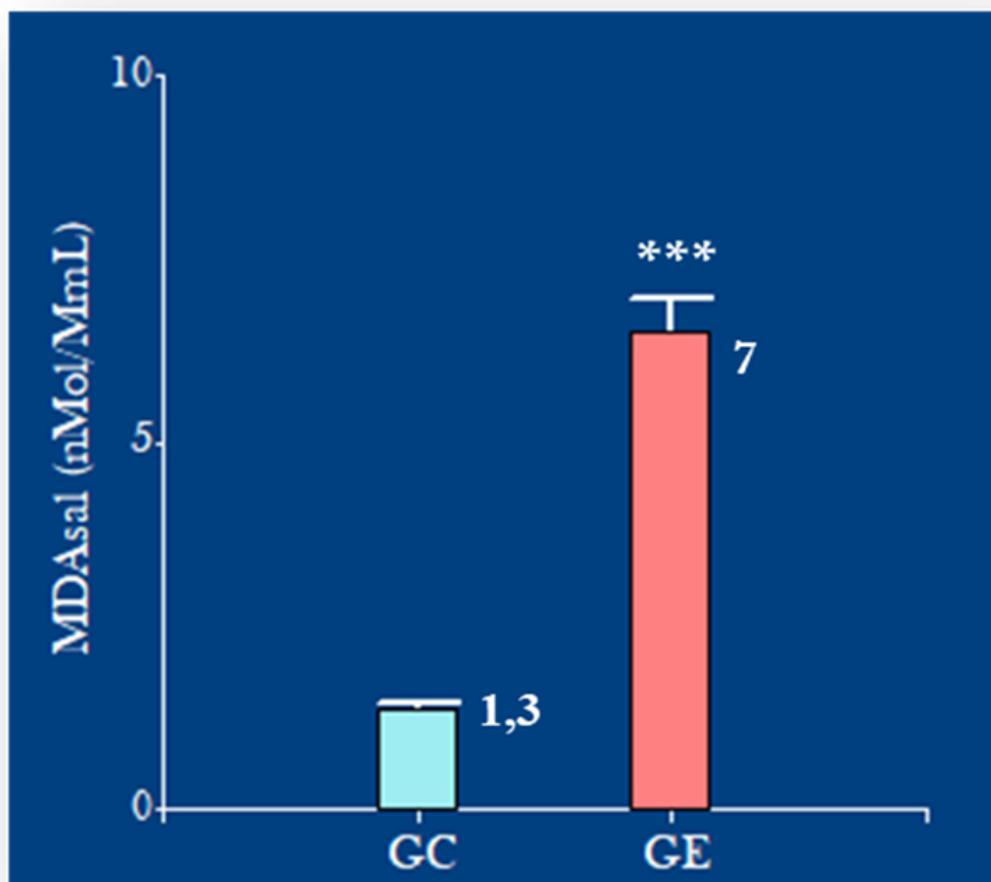
Variable	GE X (±) n= 50	GC X̄ (±) n= 50	p valor
MDA Salival (nM/mL saliva)	7 (±3)	1,3 (±0,6)	0,0001
MDA Tisular (nM/ mg tejido)	6 (± 3)	0,5 (± 0,2)	0,0001
SOD Salival (Unid. SOD/mL)	3 (±1)	1,2 (±0,2)	0,0001
AU Salival (mg/dL)	1,8 (± 0,6)	4 (±1)	0,0001

GE: Grupo de Estudio. GC: Grupo Control. X̄: Media. (±): Desviación Standard

### - Determinación de la concentración de MDA salival y tisular

Se observaron mayores valores en la concentración de **MDA** salival en el **GE** ( $7 \text{ nM/mL} \pm 3$ ) comparado con el **GC** ( $1,3 \text{ nM/mL} \pm 0,6$ ). Esta diferencia resultó estadísticamente significativa, con un  $p=0,0001$ . (**FIGURA 40**).

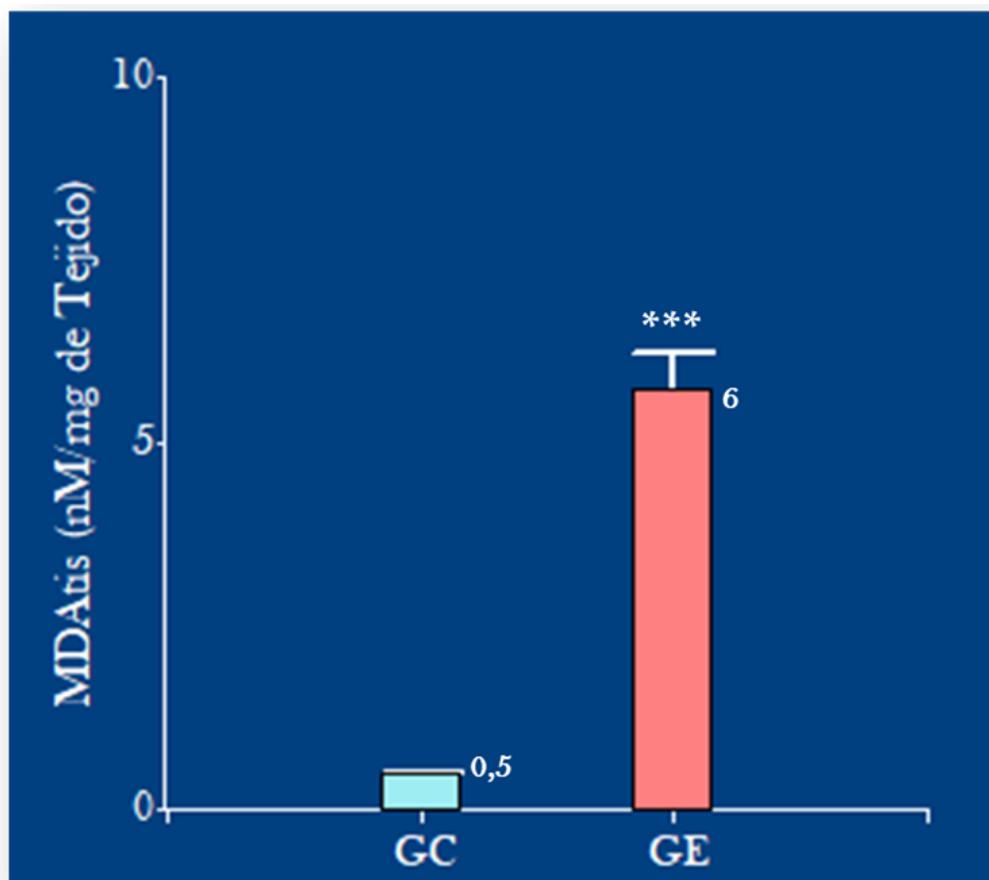
*Figura 40.* Concentración de MDA en saliva, en Grupo de Estudio y Grupo Control.



*GE: Grupo de Estudio. GC: Grupo Control. Test "T" de Student ( $p < 0,0001$ ).*

Del mismo modo, la concentración de **MDA tisular** en el **GE** ( $6 \text{ nM/mg} \pm 3$ ) resultó elevado con respecto a los valores hallados en el **GC** ( $0,5 \text{ nM/mg} \pm 0,2$ ), resultado estadísticamente significativo con un  $p= 0,0001$ . (**FIGURA 41**).

**Figura 41.** Concentración de MDA tisular en Grupo de Estudio y Grupo Control.



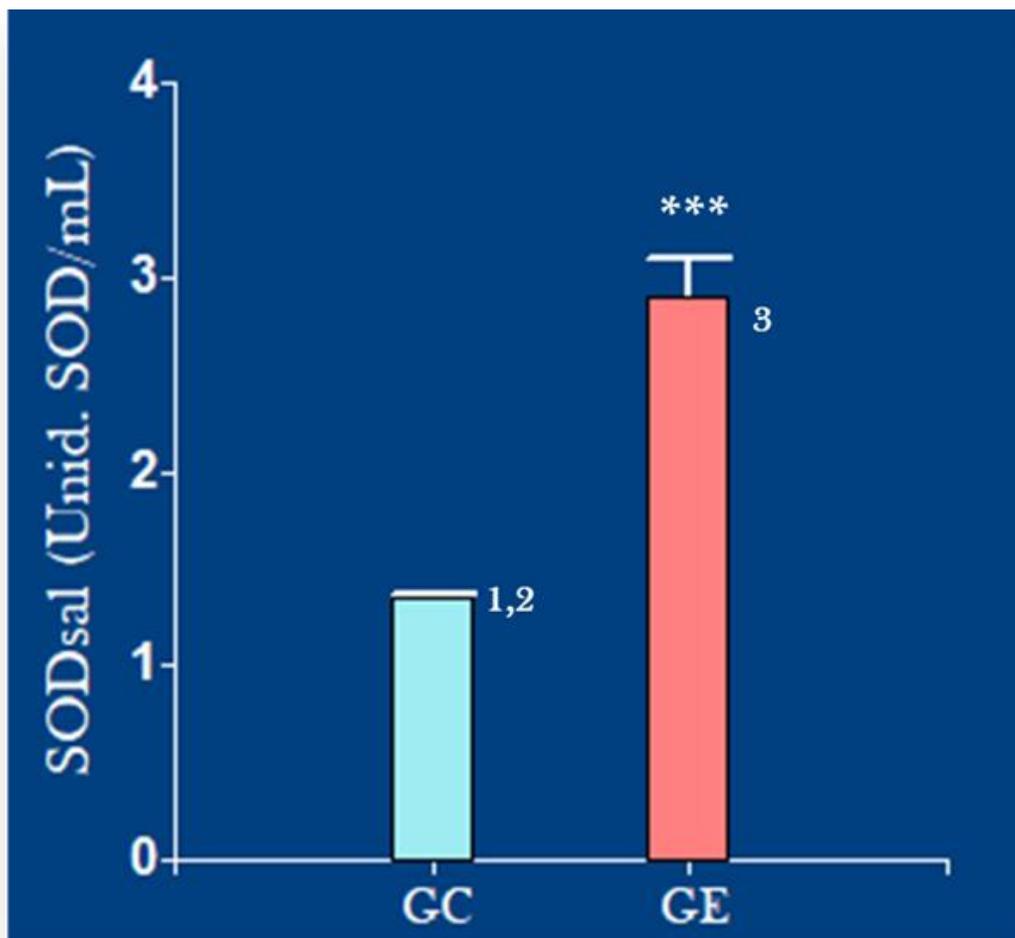
*GE: Grupo de Estudio. GC: Grupo Control. Test "T" de Student ( $p < 0,0001$ ).*

Estos valores estarían expresando una mayor lipoperoxidación tanto a nivel de los tejidos biopsiados como en la saliva de los pacientes con lesiones estomatológicas.

**- Determinación de la actividad de SOD salival**

Se observó mayor actividad de **SOD** en los pacientes del **GE** ( $3 \text{ Unid. SOD/mL} \pm 1$ ) comparado con los del **GC** ( $1,2 \text{ U/ml} \pm 0,2$ ), con una diferencia estadísticamente significativa y un  $p < 0,0001$ . (**FIGURA 42**).

**Figura 42.** Determinación de la actividad de SOD salival en Grupo de Estudio y Grupo Control.

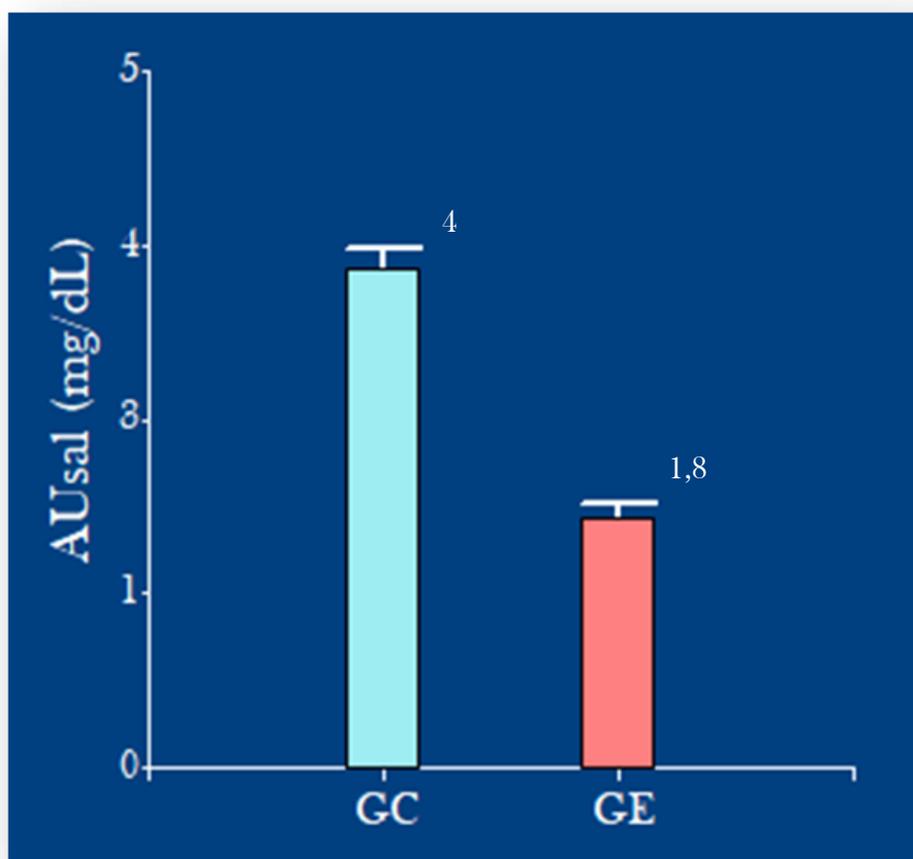


*GE: Grupo de Estudio. GC: Grupo Control. Test "T" de Student ( $p < 0,0001$ ).*

**- Determinación de la concentración de AU salival**

Se encontró una menor concentración AU salival en el **GE** ( $1,8 \text{ mg/dL} \pm 0,6$ ) comparado con el **GC** ( $4 \text{ mg/dL} \pm 1$ ), con un  $p= 0,0001$ . (**FIGURA 43**).

**Figura 43.** Concentración de AU salival en Grupo de Estudio y Grupo Control.

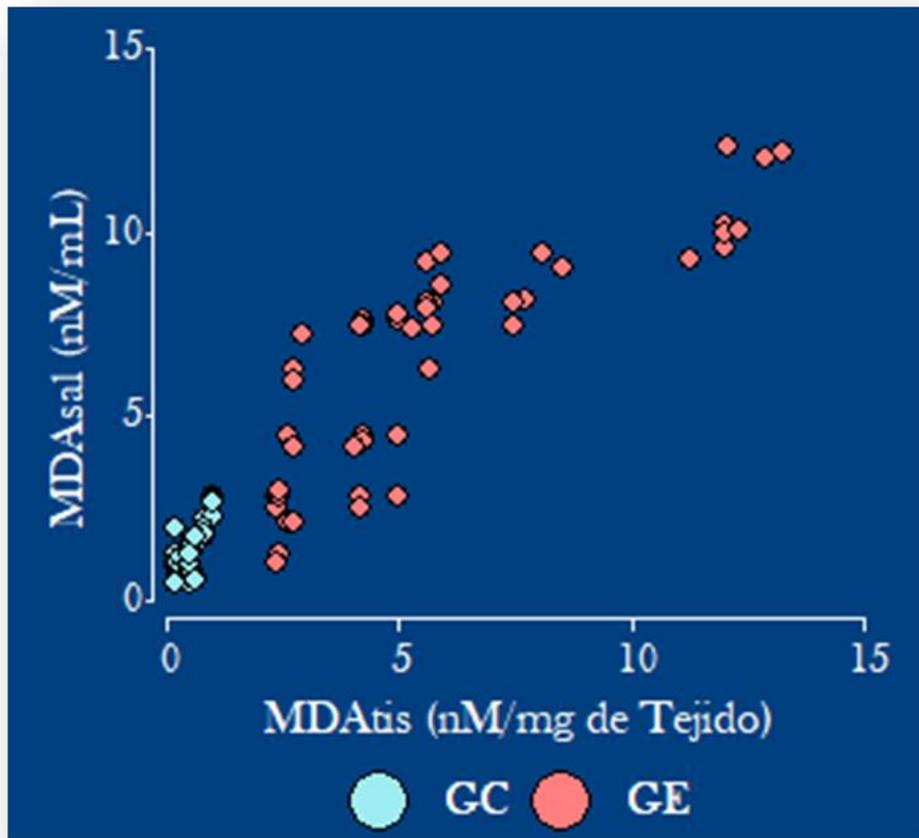


*GE: Grupo de Estudio. GC: Grupo Control. Test "T" de Student ( $p < 0,0001$ ).*

**- Correlación entre la concentración de MDA salival y tisular**

A través del cálculo de coeficiente de relación de Pearson se encontró correlación entre las concentraciones de **MDA salival** y **tisular**. Es decir que en el **GE**, el incremento de la concentración de **MDA** tisular se acompañó por un aumento en la concentración de **MDA** salival. (**FIGURA 44**).

**Figura 44.** Correlación entre las concentraciones de MDA salival y tisular

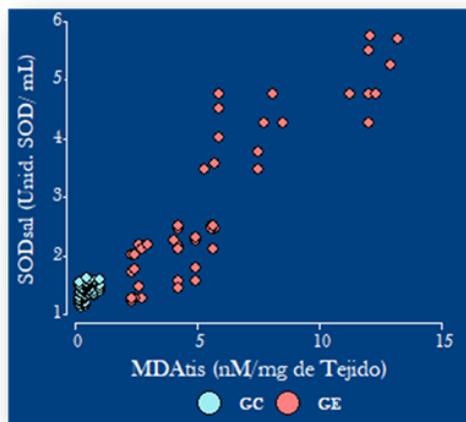


**GE:** Grupo de Estudio. **GC:** Grupo Control  
Coeficiente de correlación de Pearson  $p < 0,05$   $r = 0,82$

**- Correlación entre la concentración de MDA tisular y salival y la actividad de SOD salival**

Del mismo modo, se comprobó por medio del coeficiente de Pearson, una correlación entre la concentración de **MDA** salival y tisular y la actividad de **SOD** en saliva. A medida que se produjo un incremento en la concentración de **MDA** , se observó un aumento en la actividad de **SOD** en la saliva de estos pacientes. **(FIGURA 45).**

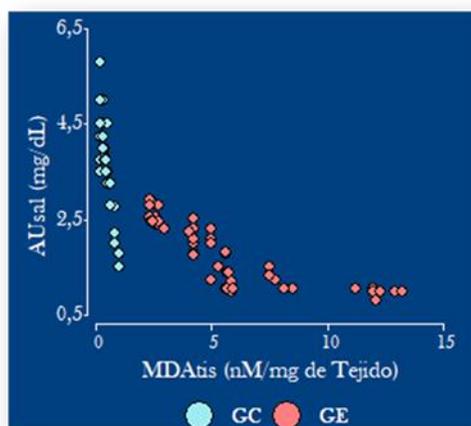
**Figura 45.** Correlación entre las concentraciones de MDA y la actividad de SOD salival.



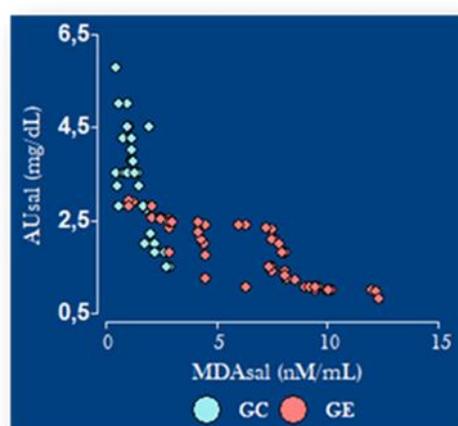
### - Correlación entre las concentraciones de MDA Y AU salival

Se observó una correlación inversa entre las concentraciones de **MDA tisular y salival** y **AU salival**. A medida que aumentó la concentración de **MDA**, se produjo una marcada disminución de la concentración de **AU salival**. Los datos se obtuvieron calculando el coeficiente de correlación de Pearson. (**FIGURA 46**).

*Figura 46. Correlación entre las concentraciones de MDA y AU salivales*



*Coeficiente de correlación de Pearson*  
 $p < 0,05$   $r = 0,87$

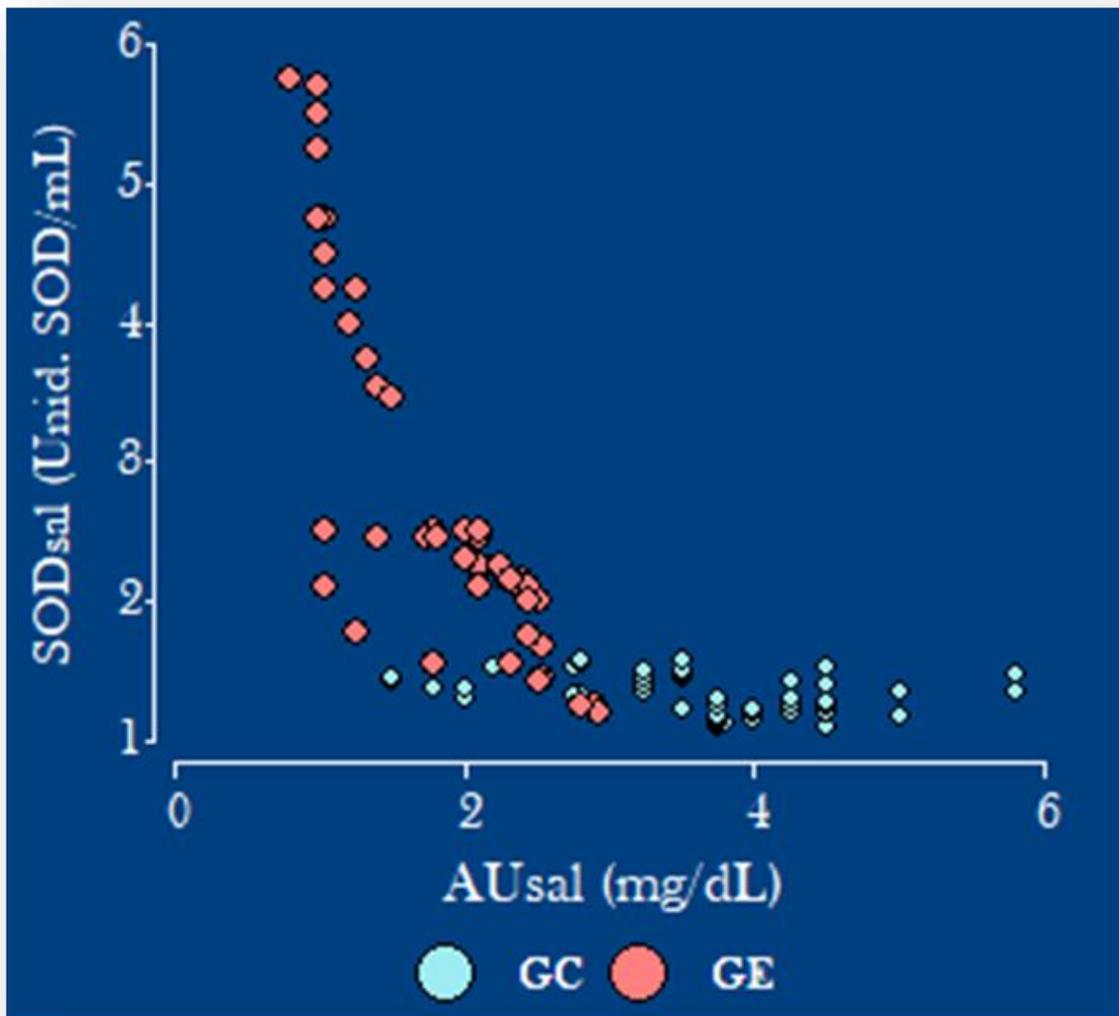


*Coeficiente de correlación de Pearson*  
 $p < 0,05$   $r = -0,85$

### Correlación entre la actividad de SOD y la concentración de AU a nivel salival

De manera similar al caso anterior, a través del cálculo de coeficiente de correlación de Pearson se observó una correlación inversa entre la actividad de la enzima **SOD** y las concentraciones de **AU** en saliva. El aumento de los niveles de **SOD** se correlacionó con una disminución de la concentración de **AU** salival. (**FIGURA 47**).

**Figura 47.** Correlación entre la actividad de SOD y las concentraciones de AU a nivel salival.

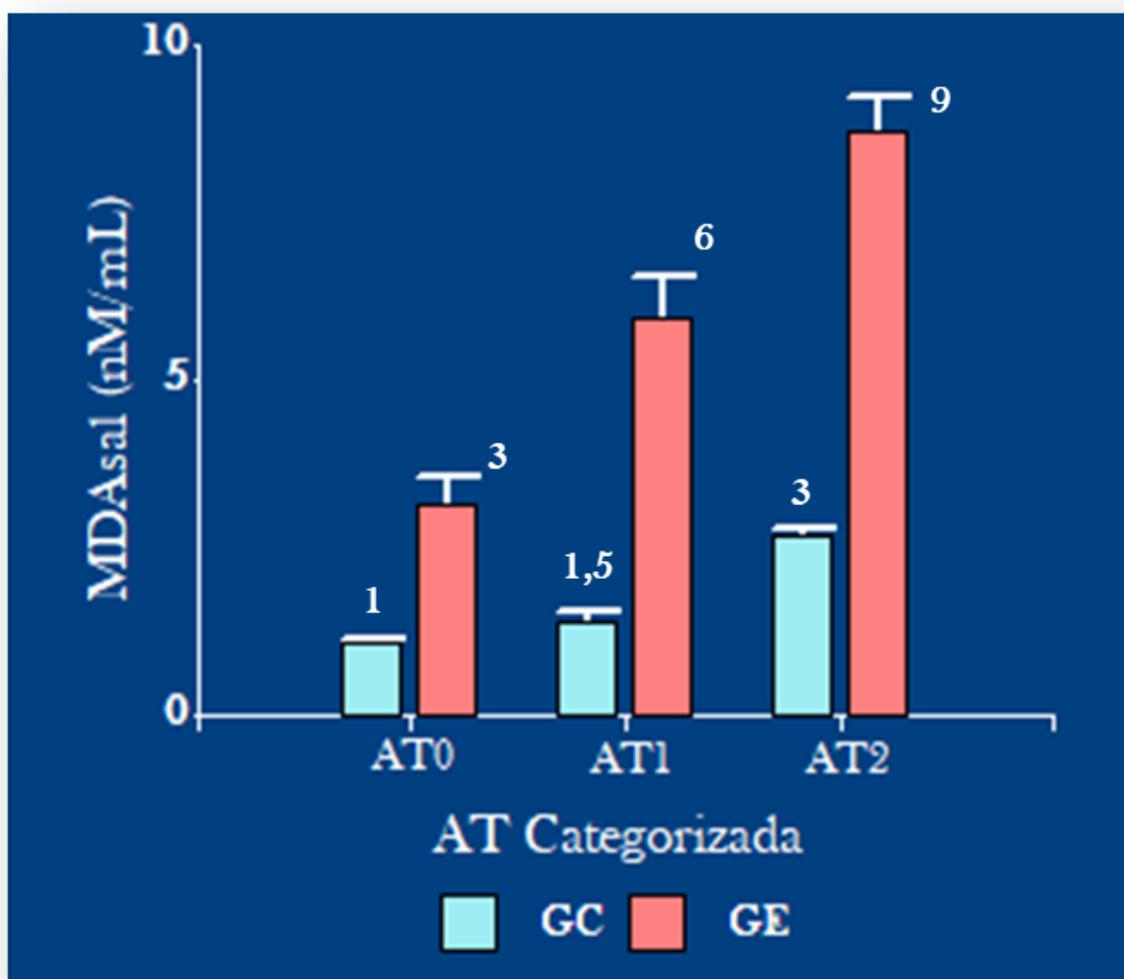


*Coefficiente de correlación de Pearson  $p < 0,05$   $r = - 0,86$*

### Relación entre la AT y las concentraciones de MDA salival y tisular

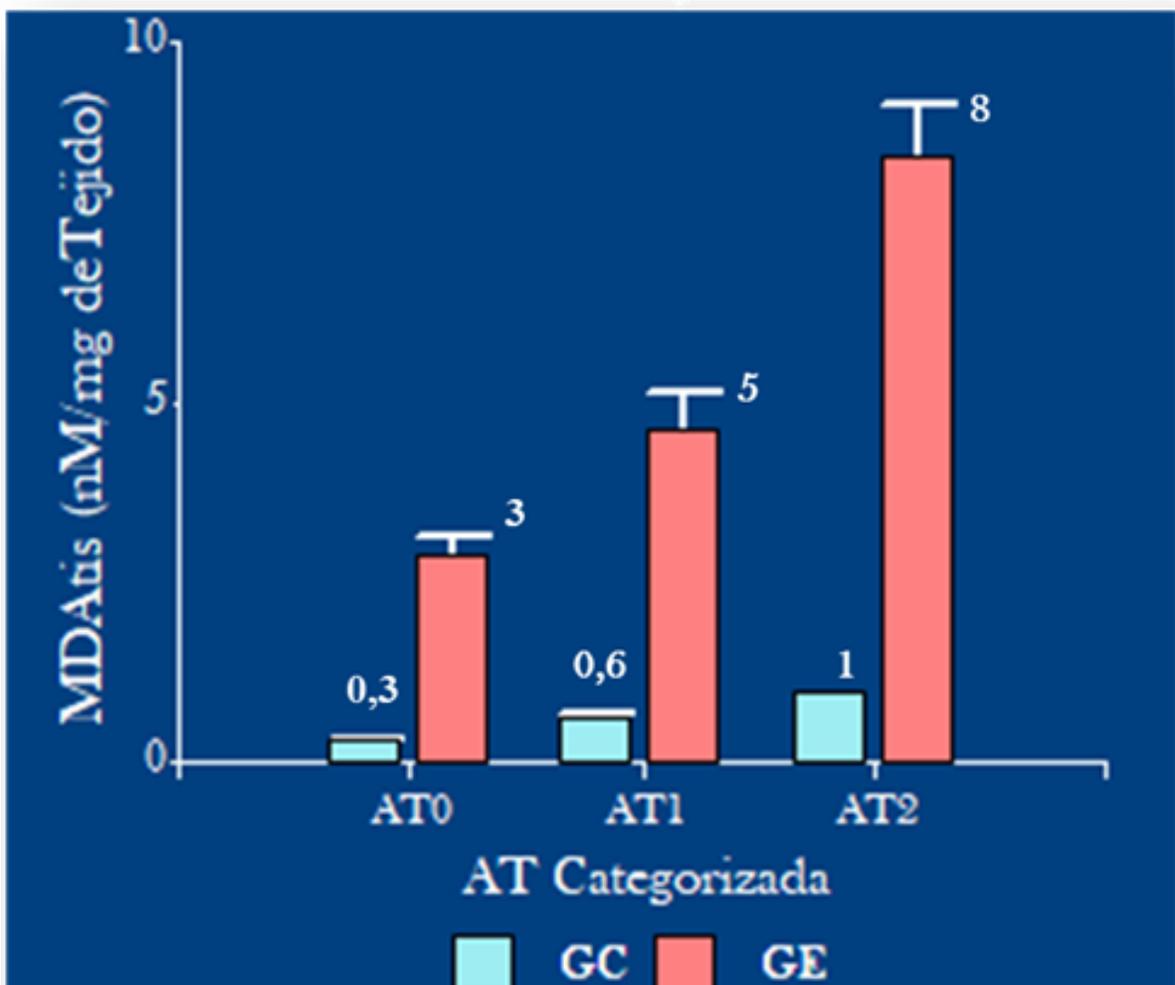
En ambos grupos se pudo comprobar la relación existente entre los valores de **MDA salival** y **tisular** y los distintos niveles de **AT**. Se observó que mayores valores de **MDA** se asociaron a mayor categoría de la **AT**, en ambos casos con un  $p= 0,0001$ , obtenido mediante ANOVA y posterior comprobación con Test “T” de Student para variables independientes. (FIGURAS 48 y 49).

**Figura 48.** Concentración de MDA salival según la categorización de AT en GE y GC.



ANOVA.  $p < 0,0001$ .

Figura 49. Concentración de MDA tisular según categoría de AT en GE y GC.

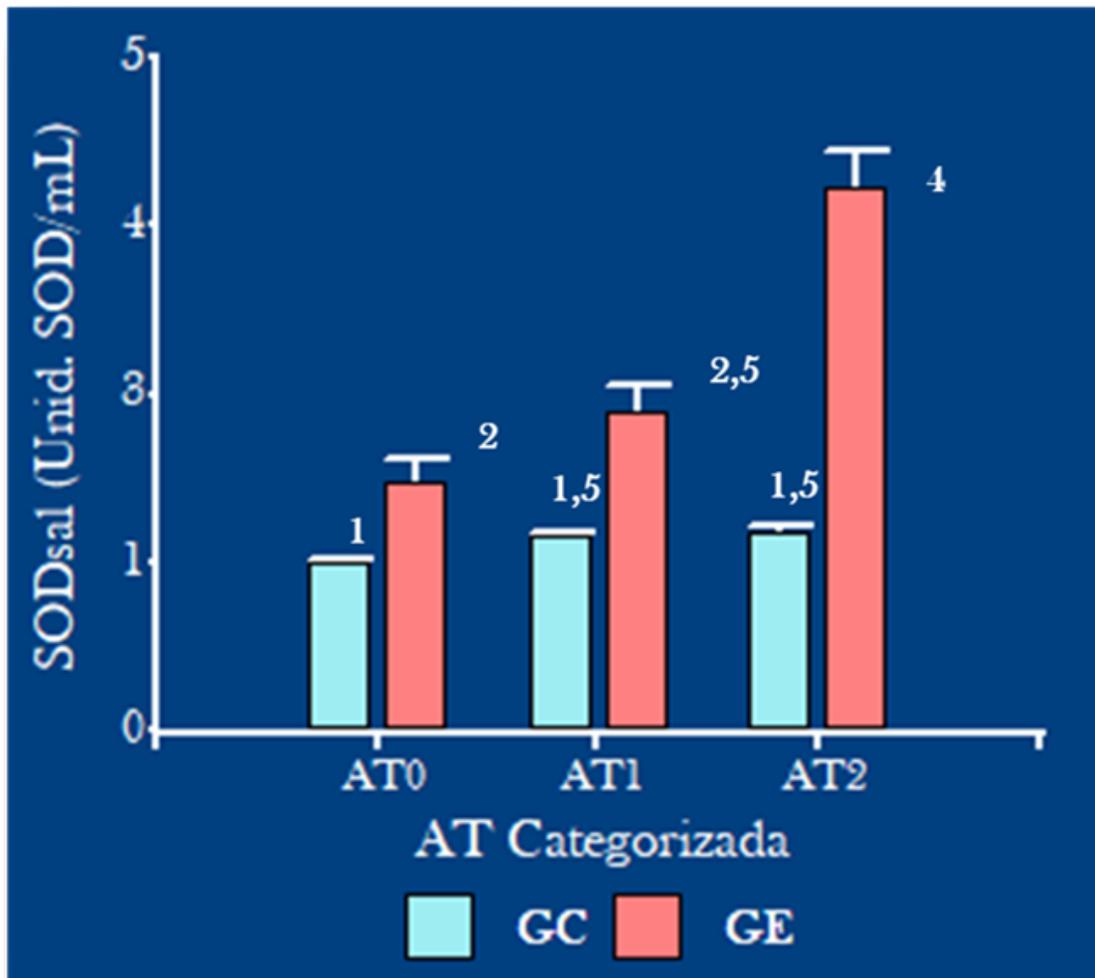


ANAVA.  $p < 0,0001$ .

### Relación entre la AT y la actividad de SOD salival

Del mismo modo, se halló asociación entre la AT y la concentración de SOD salival. A mayor AT, la actividad de SOD salival también aumentó., con un  $p < 0,0001$ . (FIGURA 50).

Figura 50. Actividad de SOD salival según intensidad de AT en GE y GC.

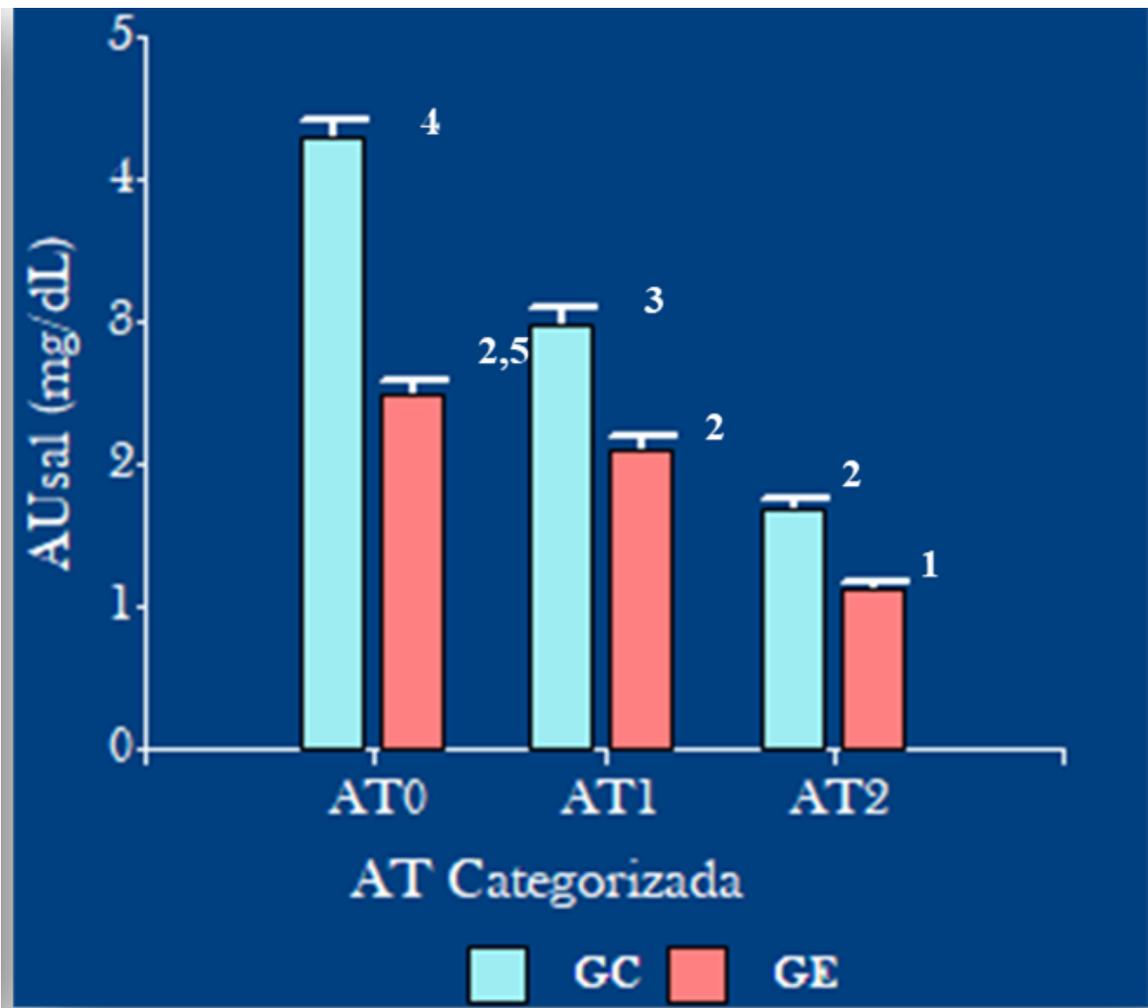


ANAVA.  $p < 0,0001$ .

**- Relación entre la AT y la concentración de AU salival**

Finalmente, se observaron diferencias entre las concentraciones de **AU salival** en relación a la categoría de **AT**. El aumento en la **AT** de los pacientes se correlacionó con una marcada disminución de la concentración de **AU salival** ( $p < 0,0001$ ). (**FIGURA 51**).

**Figura 51.** Concentración de AU salival según la categoría de AT en GE y GC



ANAVA.  $p < 0,0001$

**Relación entre los marcadores de stress oxidativo y sustancias antioxidantes y la presencia de factores de riesgo.**

**- Consumo de Tabaco:**

Los valores de **MDA** salival y tisular tuvieron valores más altos en fumadores, siendo más evidente en el **GC**, por lo que la mayor concentración de este marcador en el **GE** podría estar más relacionado con la lesión estomatológica en sí que con el hábito de fumar. **TABLA 12.**

**TABLA 12.** Concentraciones de MDA salival y tisular en pacientes fumadores y no fumadores

MDA salival (nM/mL y MDA tisular (nM/mg de tejido)	Fumadores $\bar{X}$	No fumadores $\bar{X}$	p valor
MDA salival en ambos grupos	4,5	3	> 0,05
MDA salival GE	6,5	6,3	> 0,05
MDA salival GC	1,6	1	< 0,05
MDA tisular en ambos grupos	3,8	2,1	<0,05
MDA tisular GE	6.1	4,8	> 0,05
MDA tisular GC	0,5	0,3	< 0,05

La actividad de **SOD** salival fue mayor en fumadores del **GC** y el **AU** salival fue menor en fumadores, en especial en el **GC**. **TABLAS 13 Y 14.**

**TABLA 13.** Actividad de SOD salival en pacientes fumadores y no fumadores

SOD salival (Unid. SOD/mL)	Fumadores $\bar{X}$	No Fumadores $\bar{X}$	p valor
SOD salival en ambos grupos	2,2	1,7	> 0,05
SOD salival GE	2,9	2,8	> 0,05
SOD salival GC	1,2	1	<0,05

**TABLA 14.** Concentraciones AU salival en pacientes fumadores y no fumadores

AU salival (mg/dL)	Fumadores $\bar{X}$	No Fumadores $\bar{X}$	p valor
AU salival ambos grupos	2,3	3,2	<< 0,05
AU salival GE	1,7	1,7	> 0,05
AU salival GC	3,1	4	<< 0,05

**- Consumo de alcohol:**

Las concentraciones de **MDA** salival y tisular y la actividad de **SOD** salival fueron mayores en pacientes consumidores de alcohol, pero sin diferencias significativas. La concentración de **AU** salival fue menor en consumidores de alcohol (p= 0,05). **TABLAS 15, 16 Y 17.**

**TABLA 15.** Concentraciones de MDA salival y tisular en pacientes bebedores y no bebedores de alcohol

MDA salival (nMoles/mL y MDA tisular (nMoles/mg)	Bebedores de alcohol $\bar{X}$	No Bebedores de alcohol $\bar{X}$	p valor
MDA salival en ambos grupos	4,6	3,3	> 0,05
MDA salival GE	7,2	5,8	> 0,05
MDA salival GC	1,5	1,2	>> 0,05
MDA tisular en ambos grupos	3,8	2,5	> 0,05
MDA tisular GE	6,5	5	> 0,05
MDA tisular GC	0,5	0,4	> 0,05

**TABLA 16.** Actividad de SOD salival en pacientes bebedores y no bebedores de alcohol

SOD salival (Unid . SOD/ mL)	Bebedores de alcohol $\bar{X}$	No Bebedores de alcohol $\bar{X}$	p valor
SOD salival en ambos grupos	2,2	1,8	> 0,05
SOD salival GE	3,1	2,7	> 0,05
SOD salival GC	1,2	1,1	> 0,05

**TABLA 17.** Concentración de AU salival en pacientes bebedores y no bebedores de alcohol

AU salival (mg/dL)	Bebedores de alcohol $\bar{X}$	No bebedores de alcohol $\bar{X}$	p valor
AU salival ambos grupos	2,4	3	< 0,05
AU salival GE	1,6	1,9	> 0,05
AU salival GC	3,3	3,7	> 0,05

**- Consumo de mate:**

Las concentraciones de **MDA** salival y tisular fueron mayores en consumidores de mate del **GE**, tendencia que no se evidenció en el **GC**.

La actividad de **SOD** salival fue mayor en consumidores de mate y particularmente en el **GE**, mientras que las concentraciones de **AU** salival fueron menores también en pacientes no consumidores de mate del **GE**. **TABLAS 18, 19 y 20.**

**TABLA 18.** Concentraciones de MDA salival y tisular en pacientes bebedores y no bebedores de mate.

MDA salival (nMoles/mL y MDA tisular (nMoles/mg)	Bebedor de mate $\bar{X}$	No Bebedor de mate $\bar{X}$	p valor
MDA salival en ambos grupos	4,6	2,3	<<0,05
MDA salival GE	7,2	4	<0,05
MDA salival GC	1,4	1,3	> 0,05
MDA tisular en ambos grupos	3,7	1,8	<<0,05
MDA tisular GE	6,1	4,3	> 0,05
MDA tisular GC	0,5	0,4	>>0,05

**TABLA 19.** Actividad de SOD salival en pacientes bebedores y no bebedores de mate.

SOD salival (Unid. SOD/mL)	Bebedor Mate $\bar{X}$	No Bebedor Mate $\bar{X}$	p valor
SOD salival en ambos grupos	2,3	1,4	<< 0,05
SOD salival GE	3,1	2	<< 0,05
SOD salival GC	1,2	1,1	>> 0,05

**TABLA 20.** Concentración de AU salival en pacientes bebedores y no bebedores de mate.

AU salival (mg/dL)	Bebedores de Mate $\bar{X}$	No Bebedores de Mate $\bar{X}$	p valor
AU salival en ambos grupos	2,5	3,1	<0,05
AU salival GE	1,7	2,2	<0,05
AU salival GC	3,5	3,7	>> 0,05

**- Irritación mecánica crónica:**

Las concentraciones de **MDA** salival y tisular y la actividad de **SOD** salival, fueron mayores en pacientes con **IMC**, siendo muy evidente en ambos grupos. Mientras que las concentraciones de **AU** salival fueron menores en pacientes con **IMC**, en ambos grupos.

**TABLAS 21, 22 Y 23.**

**TABLA 21.** Concentraciones de MDA salival y tisular en pacientes con y sin IMC.

MDA salival (nMoles/mL y MDA tisular (nMoles/mg)	IMC Sí $\bar{X}$	IMC No $\bar{X}$	p valor
MDA salival ambos grupos	5,3	2	<<0,05
MDA salival GE	7,6	3,8	<<0,05
MDA salival GC	1,6	1	<<0,05
MDA tisular ambos grupos	4,4	1,4	<<0,05
MDA tisular GE	6,7	3,4	<<0,05
MDA tisular GC	0,6	0,4	<< 0,05

**TABLA 22.** Actividad de SOD salival en pacientes con y sin IMC

SOD salival (Unid. SOD/mL)	IMC Sí $\bar{X}$	IMC No $\bar{X}$	p valor
SOD salival en ambos grupos	2,5	1,4	<<0,05
SOD salival GE	3,2	2	<<0,05
SOD salival GC	1,2	1	<<0,05

**TABLA 23.** Concentraciones de AU salival en pacientes con y sin IMC.

AU salival (mg/dL)	IMC Sí $\bar{X}$	IMC No $\bar{X}$	p valor
AU salival en ambos grupos	2,1	3,4	<<0,05
AU salival GE	1,5	2,2	<<0,05
AU salival GC	3	4	<<0,05

# DISCUSIÓN

El cáncer oral afecta aproximadamente a 400.000 personas por año a nivel mundial. <sup>(255)</sup> La mayor parte de los CCE de la mucosa bucal asientan sobre diferentes DPM previamente desarrollados sobre la misma.

Teniendo en cuenta la creciente incidencia del cáncer de cabeza y cuello, los problemas asociados con el diagnóstico tardío y el complejo problema de salud pública que representan, parecería lógico enfocar los esfuerzos en generar estrategias para contribuir a la detección precoz de las lesiones premalignas y malignas, así como al estudio de los fenómenos y factores de riesgo asociados a ellas. El diagnóstico temprano permitiría enfoques terapéuticos conservadores con una mejor recuperación y un pronóstico más favorable. Uno de los aspectos de la investigación del cáncer que ha intrigado a la mayoría de los científicos es la adquisición del potencial proliferativo ilimitado de las células cancerosas. En el proceso de transformación de una célula del estado normal al maligno, uno de los pasos clave es la inmortalización de las células. La evidencia reciente indica que la telomerasa juega un papel importante en la inmortalización celular. La pérdida de la AT se ha correlacionado con la senescencia celular, mientras que su reactivación parece ser un requisito previo para el desarrollo de células tumorales malignas a partir de células somáticas. <sup>(256)</sup>

Más del 85% de las células cancerosas humanas expresan AT. <sup>(26)</sup> Fujita y col. <sup>(246)</sup> hallaron AT más alta en el CCE, mientras que los DPM mostraron una AT relativamente más baja. Por lo tanto, estos autores consideran a la AT como un posible marcador diagnóstico de malignidad. Además, se ha encontrado que la telomerasa está regulada también según la progresión del tumor y, por lo tanto, puede servir como un indicador pronóstico útil para identificar a los pacientes que necesitan un seguimiento cercano y un tratamiento adyuvante vigoroso. <sup>(257,258)</sup> En consecuencia, esta enzima se ha convertido en un objetivo importante para el diseño de agentes terapéuticos que podrían tener efectos secundarios mínimos.

Rai y col. <sup>(82)</sup> llevaron adelante un estudio con el objetivo de cuantificar la AT en pacientes de la India con diagnóstico de CCE y compararla con los valores obtenidos en mucosa sana. Para hacerlo, utilizaron la técnica TRAP, también utilizada en nuestro estudio. El ensayo de TRAP (basado en PCR) es altamente sensible y proporciona los medios para analizar AT en una amplia variedad de tejidos. Este método permite detectar la AT en un número muy pequeño de células, lo cual es una gran ventaja para examinar muestras clínicas. La prevalencia general del 85% entre más de 3000 muestras de tumores humanos analizadas

mediante TRAP hace que la AT sea el marcador más universal para los cánceres humanos. En su protocolo de trabajo, el grupo de estudio comprendió 45 casos con diagnóstico histopatológico de CCE y el grupo control comprendió 20 muestras normales de la mucosa bucal obtenidas de individuos sanos que se sometieron a exodoncia de terceros molares retenidos. Los resultados del presente estudio mostraron AT en el 89% de CCE y el 5% de la mucosa oral normal.

De manera similar, en nuestro trabajo encontramos que un 82% de las muestras del GE mostraron AT positiva, mientras que esta actividad se demostró en un 24% de las muestras del GC. Ahora bien, el GE estuvo integrado por CCEB, LPB+LLO y LB, por lo que si consideramos solamente los casos de CCEB (n=20), el 90% de las muestras procedentes de pacientes con esta patología demostraron AT positiva. Mientras tanto, el GC estuvo constituido por pacientes con mucosa clínicamente sana (procedente de exodoncias de terceros molares retenidos y de cicatrizales de implantes dentales) y por muestras de lesiones benignas no inflamatorias de la mucosa bucal. Si consideramos por separado las muestras de mucosa clínicamente sana, sólo un 5% de las mismas resultó con AT positiva. En síntesis, en nuestro estudio encontramos AT positiva en el 90% de las muestras de CCE y en un 5% de las muestras de mucosa clínicamente sana.

Estos hallazgos están de acuerdo con estudios previos en los que la AT detectada en el CCE de cabeza y cuello ha oscilado entre 75% y 100% de las muestras investigadas. En este sentido Califano y col. <sup>(259)</sup>, Liao y col <sup>(260)</sup>., Mao y col <sup>(261)</sup>, Curran y col <sup>(262)</sup> han demostrado en sus estudios AT positiva en por encima del 75% de las muestras de CCE estudiadas. Thurnher y otros <sup>(263)</sup> detectaron AT en el 100% de las muestras de cáncer bucal en su estudio.

Estos resultados sugieren que la telomerasa se activa en el CCE y esto está de acuerdo con el concepto de que la enzima desempeña un papel clave en el mantenimiento de los telómeros en la carcinogénesis. Sin embargo, resulta interesante puntualizar que la reactivación de la AT no sería una vía única y obligada para la carcinogénesis oral ya que en el 25 % de las muestras de pacientes con carcinoma de nuestro trabajo se obtuvieron resultados negativos para la actividad de esta enzima. Esto podría deberse a que estas muestras exhiban un mecanismo de alargamiento alternativo de mantenimiento de los telómeros.

Por otra parte, detectamos AT en el 5% de las muestras de mucosa clínicamente sana, correspondientes al GC. Cabe destacar que la AT detectada en los casos de mucosa clínicamente sana se trató de actividad débil de la enzima.

En este sentido, la literatura previa sobre este tema ha mostrado resultados contradictorios. Mientras que algunos autores tales como Sumida y col. <sup>(264)</sup>, Chang y col. <sup>(265)</sup> y Miyoshi y col. <sup>(266)</sup> no han reportado AT detectable en tejidos normales; Mao Z y col. <sup>(267)</sup>, Yayima y col. <sup>(268)</sup>, Xian y col. <sup>(269)</sup> y Rai y col. <sup>(82)</sup> han observado la presencia de AT débil en muestras normales. Las tasas de positividad de la telomerasa en estos casos han oscilado entre 2.78% y 100% para muestras normales.

Una de las razones que explicaría la AT positiva débil en las muestras de mucosa sana en nuestro estudio, podría estar relacionada con las características histológicas y fisiológicas del epitelio de la mucosa bucal, en relación a su estratificación y a su complejo proceso de maduración y diferenciación. El epitelio escamoso de la mucosa bucal tiene una tasa de renovación celular muy alta, y la pérdida constante de células superficiales por el proceso de descamación se reemplaza por una división continua en las células basales. Por lo tanto, es probable que haya más células madre en el epitelio escamoso para el proceso de autorrenovación activa <sup>(270)</sup>. Como en el caso de las células inmortalizadas, se ha demostrado que las células madre del tejido hematopoyético humano poseen AT. <sup>(271)</sup> Existe cierta similitud entre los patrones de proliferación del CCEB y de las células madre hematopoyéticas. Por lo tanto, la detección de AT en la mucosa bucal sana podría deberse a la capacidad de autogeneración y proliferación de las células de la capa basal epitelial, las cuales tendrían un comportamiento similar al de células madre. Teniendo en cuenta que las muestras de tejido sano se obtuvieron mediante el procedimiento de biopsia incisional (y no a partir de citología exfoliativa de células de capas más superficiales) es de suponer que la AT positiva podría estar relacionada con la presencia y actividad normal de dichas células basales.

Algunos autores han estudiado la actividad telomerasa en DPM. Yao y col. <sup>(220)</sup> analizaron la AT en pacientes con diagnóstico de CCEB, LP y LB, encontrando los niveles más elevados en pacientes con el diagnóstico de cáncer, seguidos por los casos de LB y finalmente LP, no encontrado diferencias estadísticamente significativas en los valores de AT entre estas dos últimas entidades.

Ries y col. <sup>(272)</sup> llevaron adelante una investigación con el objeto de estudiar la AT mediante TRAP en CCEB y compararla con los niveles obtenidos en LB y mucosa clínicamente sana ubicada en los márgenes libres de las lesiones malignas de los mismos pacientes diagnosticados con CCEB. Para ello utilizaron 46 muestras de pacientes con diagnóstico de CCEB, 8 muestras de LB y 13 muestras de mucosa adyacente al tumor (clínicamente sana). Encontraron AT positiva en el 46 % de las muestras de CCEB y sólo en el 50% de las muestras de LB. Sólo el 2% de los tejidos de control resultaron positivos para AT. Los autores concluyen que la reactivación de la actividad de la enzima puede ser un método novedoso para la detección de clones celulares inmortalizados y de células malignas en el epitelio bucal que aún no ha sufrido transformación carcinomatosa.

Del mismo modo, Shimamoto H <sup>(273)</sup> encontró AT positiva en el 50% de las LB estudiadas, utilizando la técnica TRAP para detección de la actividad de la enzima, por lo que recomienda que la misma podría ser utilizada como un marcador temprano en DPM y en el cáncer bucal. Mientras que Liao y col. <sup>(260)</sup> llevaron a cabo un estudio sobre tumores orales y maxilofaciales, incluyendo también muestras de pacientes con diagnóstico de LB para estudio de la AT mediante técnica TRAP y concluyeron que la actividad de la enzima tiene cierta correlación con la progresión de la carcinogénesis desde etapas tempranas de este proceso. De hecho, encontraron AT positiva en más del 80% de las muestras tumorales y en el 58% de los tejidos con diagnóstico de LB.

La AT en el LP de la mucosa bucal también ha sido estudiada. Zhang y col. <sup>(274)</sup> resultan de los pocos autores que además de medir la actividad de la enzima lo correlacionan con algunos parámetros clínicos. Sin embargo, ellos llevan adelante su estudio no sobre las lesiones propiamente dichas sino en sangre periférica. Teniendo en cuenta el mecanismo inmunológico que media la fisiopatogenia del LP, el objetivo de su investigación fue el de determinar los niveles de hTERT mediante real-time PCR en los linfocitos CD4 y CD8 de pacientes con esta patología y relacionar dichos niveles con la variedad clínica de LP (maculoso, atrófico y erosivo). Observaron una disminución de los niveles de hTERT en linfocitos CD4 de sangre periférica, sin hallar modificaciones en los niveles de este componente en las células CD 8. No hallaron correlación entre estos niveles y la variedad o severidad del liquen ni con el sexo, aunque sí con la edad de los pacientes (a mayor edad, menor presencia del componente proteico de la enzima). Concluyen postulando que la

disminución de hTERT en los linfocitos CD4 podría estar relacionada con la disfunción del sistema inmune propia de esta patología. Por el contrario, Tohngprasom y col. <sup>(275)</sup> hallaron elevada AT en muestras procedentes de pacientes con diagnóstico de LP, considerando que la reactivación de la enzima es un hallazgo frecuente en lesiones propias de esta patología. En nuestro estudio, encontramos AT positiva en ambos DPM analizados (LP+LLO y LB). De hecho, la mayor AT se encontró en los pacientes con diagnóstico de CCE (90% de las muestras), seguida por las muestras procedentes de pacientes con LLO+ LP (80% de los casos) y finalmente por los casos de LB (70 % de las muestras con resultado positivo). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre LLO+LP Y LB. Coincidiendo con algunos autores citados anteriormente, consideramos que la reactivación de la enzima telomerasa y su detección y cuantificación mediante TRAP PCR se comporta como un marcador importante en los casos de CCEB y de DPM, estando la misma implicada desde estadios muy tempranos de la carcinogénesis bucal.

Diversos estudios dan cuenta de la relación existente entre el estilo de vida y la existencia de hábitos tóxicos, la AT y la longitud de los telómeros. <sup>(158, 162-166)</sup> La mayoría de ellos establecen una relación entre la AT y diversas patologías, incluso cáncer, de diversas localizaciones. Sin embargo, es poco lo publicado respecto de la posible influencia de estos factores en la AT en el caso del CCEB de la mucosa bucal y los DPM, sobre todo considerando que históricamente han sido considerados como factores iniciadores y/o promotores de carcinogénesis bucal. La mayor parte de dichos estudios contemplan sólo aspectos biomoleculares y los pocos que correlacionan la AT en mucosa bucal con hábitos tóxicos del paciente, lo hacen en países tales como India, Pakistán, China, Japón y otras culturas con una idiosincrasia completamente diferente a la nuestra, donde los tipos de hábitos (y el método para llevar adelante los mismos) difiere absolutamente de lo que ocurre en Sudamérica y, particularmente en Argentina. Como ejemplo de ello, basta recordar el ejemplo de la masticación del betel, que en India es considerado como un factor de primer orden de importancia en la carcinogénesis bucal, hábito inexistente en nuestro medio. En contraposición, el hábito de tomar mate es propio de países latinoamericanos. De hecho, hasta el momento no tenemos conocimiento de publicaciones de grupos de estudios de procedencia sudamericana que hayan analizado estos aspectos en función de la actividad de la enzima.

Esto se convierte en un elemento a tener en cuenta, sobre todo cuando algunos autores plantean que los genes que regulan la expresión de la actividad telomerasa presentan polimorfismo y que la actividad de esta enzima presenta variaciones de acuerdo al grupo étnico del individuo. <sup>(28- 30)</sup> Otros autores consideran que las diferencias en la AT no se deberían tanto a cuestiones relacionadas con el grupo étnico del paciente, sino que sus estudios han demostrado diferencias de AT y longitud telomérica entre diferentes grupos poblacionales, lo cual podría atribuirse a cuestiones ambientales y no tanto genéticas <sup>(161, 276, 277)</sup>. En este sentido, consideramos que los aportes de nuestro trabajo pueden resultar interesantes para comprender algunos aspectos de la influencia de los hábitos tóxicos y factores de riesgo presentes en nuestro medio en la reactivación de la enzima telomerasa en lesiones malignas y DPM de la mucosa bucal.

Un estudio llevado adelante por Liao y col. en Taiwán analizó la relación existente entre hábitos tales como masticar betel, fumar tabaco y beber alcohol y la AT en 154 muestras biópsicas de pacientes con diagnóstico de CCEB de la mucosa bucal comparadas con muestras de mucosa clínicamente sana. No hallaron asociación de estos factores con la severidad del CCEB ni con el nivel de AT determinado. <sup>(167)</sup> Por el contrario, algunos autores tales como Patel y col. <sup>(143)</sup> consideran que la agresión continua generada por el tabaco a las células de la mucosa bucal contribuiría a la reactivación de la enzima telomerasa, aún en el caso de muestras procedentes de mucosa clínicamente sana de pacientes fumadores. Eso en parte, también contribuiría a explicar la presencia de AT positiva en algunas muestras de mucosa bucal sana en pacientes de nuestro GC.

Hasta el momento no conocemos publicaciones que den cuenta de la relación entre el consumo de mate y la AT. En nuestro trabajo, no hemos encontrado asociación entre los hábitos de fumar, beber alcohol y consumir mate y la AT. Sin embargo, teniendo en cuenta la complejidad de la fisiopatogenia del cáncer bucal y la importancia que en el origen y desarrollo del mismo revisten factores genéticos (entre los que hallamos la reactivación de la enzima telomerasa, entre muchos otros) y los factores de riesgo antes mencionados, creemos que es necesario continuar con investigaciones al respecto.

En el presente trabajo de tesis encontramos relación entre la AT y la presencia de IMC de la mucosa oral. Hasta el presente, no conocemos trabajos que den cuenta de esta relación, por lo cual este punto podría resultar un aporte de especial interés al intentar explicar una de las

vías posibles por las cuales el trauma crónico de la mucosa bucal participa de modo activo en el desarrollo de la carcinogénesis oral.

La mucosa oral podría albergar muchas lesiones originadas por IMC. Las lesiones más comunes de IMC son mordeduras de lengua / mejilla (*morsicatio buccarum*), queratosis friccional, úlcera traumática crónica, hiperplasia papilar, hiperplasia fibrosa inducida por restauraciones protéticas e hiperplasia fibrosa focal. Además, la IMC podría empeorar las lesiones orales preexistentes, tales como patologías ampollares, liquen plano, leucoplasia, o estomatitis aftosa. <sup>(282)</sup> La IMC se produce a través de la acción de baja intensidad, sostenida y repetida de un agente nocivo bucal y en los últimos años se ha propuesto como factor de riesgo para el cáncer oral. <sup>(283)</sup> La IMC *per se* puede no ser capaz de producir mutaciones genéticas, pero puede provocar cambios epigenéticos que finalmente inhiben la reparación del ADN y la apoptosis. <sup>(284)</sup> Esto sugiere que IMC podría desempeñar un papel como promotor y progresor en la carcinogénesis oral. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la IMC estaría implicada en la carcinogénesis oral no están del todo dilucidados. En relación a nuestro tema de estudio, cabe considerar que el trauma sostenido y a largo plazo de la mucosa bucal genera un proceso inflamatorio crónico en la misma, con liberación de mediadores químicos y distintas sustancias que llevan a la producción de ROS induciendo un incremento de la lipoperoxidación tisular que, si va acompañado de una disminución de la batería antioxidante propia de la piel y las mucosas, puede llevar a un stress oxidativo que, entre otros mecanismos, reactiva a la enzima telomerasa, aumentando la actividad de ésta. Sin embargo, desde ya que la complejidad de este proceso multietápico y multifactorial, requiere de estudios más profundos que permitan explicar más detalladamente los mecanismos a través de los cuales la irritación mecánica crónica de la mucosa puede incidir y favorecer la activación de la telomerasa y, de esta manera, incidir en la iniciación y la progresión del cáncer de la mucosa bucal.

La relación de la AT con algunos parámetros histológicos propios del CCE y de los DPM de la mucosa bucal muestra algunos resultados contradictorios en la bibliografía. Mientras que Kunická y col. <sup>(267)</sup> en un estudio llevado adelante en 58 muestras de CCE analizadas por medio de técnica TRAP hallaron correlación entre los grados de diferenciación del tumor y la AT, otros autores tales como Miyoshi y col. no hallaron diferencias estadísticamente

significativas en la AT y los diferentes grados de diferenciación del CCE de la mucosa bucal.  
(285)

En su estudio, Rai y col. (274) analizaron AT en mucosa de pacientes con diagnóstico de CCE y en secciones de tejido inmediatamente adyacente a las lesiones tumorales. Usando esta técnica, pudieron comparar AT en tumores y tejidos adyacentes con sus características histológicas precisas. El grado de AT en CCE se relacionó con la diferenciación histológica y con la edad del paciente, aunque no con la localización del tumor, el sexo o los hábitos del paciente. Un mayor grado histológico de malignidad en la clasificación de la OMS se asoció con un mayor nivel de AT. Se ha informado que los CCE de Grado I de la OMS son de crecimiento lento, en comparación con los de Grado II y III, que también son de naturaleza más agresiva. Según estos autores, es probable que un CCE menos diferenciado (Grados II y III) pueda contener más células inmortales que el tipo histológico más diferenciado (Grado I) y por lo tanto, la AT también sería más intensa. De manera similar, un análisis semicuantitativo realizado por Kannan y col. (286) reveló niveles altos de AT en 10 (29.4%) de 34 lesiones de CCE bien diferenciadas y 7 (100%) de 7 lesiones CCE moderadamente a pobremente diferenciadas, lo que sugiere que un grado histológico de diferenciación más bajo se asocia con una AT más alta. Por el contrario, Patel y col. (258) y Fujita y col. (245) no hallaron correlación entre el grado de diferenciación del tumor y la AT.

En cuanto a la relación existente entre la localización del CCE y el grado de AT, la bibliografía también muestra resultados controversiales. Un estudio realizado por Miyazaki y col. (71) encontró diferencias estadísticamente significativas en la concentración de hTERT del CCE de diferentes localizaciones de la mucosa bucal. Así, el CCE de lengua mostró mayor hTERT comparado con el de localización gingival. Por el contrario, Koscielny y col. (287) no hallaron diferencias entre la AT y las diferentes localizaciones del CCE de la mucosa bucal.

En nuestras muestras encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la AT y la presencia de displasia y de infiltrado en las lesiones del GE. Sin embargo, no hallamos la asociación entre la AT y el grado de diferenciación de la lesiones y sitio de biopsia.

Como hemos venido destacando, el desarrollo del cáncer en seres humanos es un proceso complejo y multifactorial. Involucra, entre otros procesos, alteraciones moleculares y celulares que contribuyen a la carcinogénesis. Todo este proceso es mediado por una serie de estímulos endógenos y exógenos que llevan, entre otras consecuencias, a la generación de elevadas concentraciones de ROS. Varios autores han documentado que un incremento en la concentración de productos de la lipoperoxidación se relaciona con el desarrollo del cáncer. <sup>(288-290)</sup> El stress oxidativo puede modificar ciertas funciones en las células cancerígenas y en los tejidos, que van desde la proliferación celular, promoción de mutaciones, invasión y metástasis. De hecho, Rai y col. <sup>(154)</sup> han reportado que altas concentraciones de ROS no sólo actúan durante la iniciación sino también en la promoción de la carcinogénesis.

Distintos estudios han revelado que las respuestas celulares a estímulos externos son mediadas principalmente por la peroxidación lipídica causada por el incremento del estrés oxidativo, y sus subproductos (especialmente el MDA) han sido implicados en el desarrollo de la tumorogénesis <sup>(291- 292)</sup>. MDA ha sido reportado como un potente promotor y agente co-carcinogénico debido a su elevada citotoxicidad. <sup>(293)</sup> De hecho, el daño de los radicales libres sobre los lípidos se ha visto reflejado en elevadas concentraciones de MDA sérico en pacientes oncológicos. <sup>(288)</sup> Estos resultados demuestran que, en el cáncer, los procesos de peroxidación están significativamente intensificados en relación a pacientes sanos.

Asimismo, altas concentraciones de ROS y/o MDA estarían implicadas en la patogénesis del cáncer de la mucosa oral, desde estadios tempranos. En el caso de pacientes con este tipo de cáncer, Kaur y col. <sup>(293)</sup> encontraron elevados niveles de MDA salival en un estudio realizado en India en pacientes con carcinoma a células escamosas, liquen plano oral, fibrosis submucosa y leucoplasia. Mientras que Aly y col hallaron similares resultados en sangre y muestras de tejido procedentes de pacientes con diagnóstico de LP. <sup>(294)</sup> Este estudio incluyó a 45 pacientes egipcios, con un rango etario de 23 a 65 años, con diagnóstico de LP en diferentes variedades y a 45 voluntarios sanos. Se tomaron biopsias y muestras de sangre periférica, hallándose en los pacientes del grupo de estudio niveles más elevados de MDA y SOD tanto a nivel tisular como en sangre comparados con los pacientes del grupo control. De esta manera se interpreta un incremento en los niveles de lipoperoxidación muestras provenientes de pacientes con este diagnóstico, lo cual puede en parte explicar el rol del stress

oxidativo en la modulación de los mecanismos inmunológicos que median la fisiopatogenia del LP y, por qué no, su posible transformación carcinomatosa.

Reznick y col. <sup>(295)</sup> reportaron niveles elevados de MDA en precáncer oral, y no solamente en lesiones malignas. En este sentido, Ergun y col hallaron concentraciones significativamente más elevadas de MDA en saliva de pacientes con LP bucal en comparación a controles sanos.

Coincidiendo con estos autores, nuestro equipo encontró concentraciones elevadas de MDA tanto a nivel tisular como saliva en los pacientes del GE comparados con el GC, lo cual nos estaría indicando una mayor lipoperoxidación en el caso de las lesiones malignas y premalignas analizadas.

Además, se halló una correlación entre los niveles de MDA salival y tisular, ya que un incremento en la concentración del MDA a nivel del tejido biopsiado fue acompañado de un aumento en los niveles de este mismo subproducto en la saliva de pacientes con CCE y DPM de la mucosa bucal. Por lo que resultan particularmente interesantes los resultados obtenidos en saliva, ya que si se correlacionan con lo hallado en tejido, la técnica para la recolección de la muestra para determinación de los niveles MDA salival resulta mínimamente invasiva, de gran comodidad para el paciente y de fácil almacenamiento y transporte con respecto a la técnica quirúrgica para la obtención de tejido que permita evaluar el mismo producto de la lipoperoxidación. En este caso, coincidimos con Kaur y col. <sup>(294)</sup> en que los diagnósticos basados en saliva son no invasivos y ofrecen herramientas de detección rentables como posibles sustitutos a tecnologías de diagnóstico basadas en sangre, suero y, en algunos casos, tejido.

En relación a los niveles de antioxidantes hallados en saliva y tejidos de pacientes con DPM y cáncer de la mucosa bucal, la literatura internacional también refiere resultados controversiales.

Autores como Fu y col. <sup>(296)</sup> hallaron niveles elevados de SOD en tejidos de pacientes con diagnóstico de CCE de mucosa yugal, comparados con tejidos provenientes de pacientes con mucosa clínicamente sana.

Las modificaciones de los niveles de SOD afectan el comportamiento de las células malignas, lo que sugiere que es importante para el desarrollo y el pronóstico del cáncer. Varios estudios han demostrado que SOD tiene efectos antiproliferativos y supresores de tumores, incluida

la inhibición de la transformación neoplásica, la reversión del fenotipo maligno al tipo de célula no maligna, la disminución del potencial metastásico y la tasa de proliferación en células de cultivo.

Jain y col. <sup>(298)</sup> observaron un incremento de los niveles de MDA y SOD en muestras de tejido y en plasma de pacientes portadores de LB comparados con los valores hallados en controles. Para ello realizaron en India un estudio prospectivo en el que incluyeron a 40 pacientes con diagnóstico de LB y 10 controles apareados por sexo y edad. Se evaluaron tres enzimas: lipoperoxidasa, catalasa y superóxido dimutasa. Los niveles de lipoperoxidasa y SOD se encontraron elevados y la catalasa disminuida en los pacientes del grupo de estudio comparados con los del grupo control. Los autores interpretan este aumento de SOD como una respuesta frente a la injuria generada por el tabaco y los posibles mecanismos carcinogénicos que se estarían llevando adelante en el tejido enfermo.

Asimismo niveles elevados de esta enzima han sido descritos en los eritrocitos de pacientes con DPM y CCE de la mucosa bucal. Sezer y col. <sup>(299)</sup> hallaron niveles elevados de MDA y SOD en eritrocitos de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de LP.

Mientras tanto, Giebultowics y col. <sup>(300)</sup> describieron niveles elevados de SOD en saliva de pacientes con CCE de la mucosa bucal. Para ello llevaron adelante un estudio clínico con el objetivo de comparar el status de defensa antioxidante en la saliva de pacientes con diagnóstico de CCE (n=12), quistes odontogénicos (n=18) y controles sanos (n= 19). Los pacientes con CCE y quistes odontogénicos mostraron una concentración mayor de SOD en saliva y una disminución de lipoperoxidasa y AU.

Sin embargo, existen varios estudios que refieren una disminución de la actividad de SOD en pacientes con lesiones estomatológicas. En un estudio realizado por Patel y col. <sup>(301)</sup> sobre 52 pacientes con cáncer bucal, se encontró disminuía la concentración de SOD en eritrocitos, mientras los niveles de otras enzimas tales como glutatión peroxidasa y catalasa se hallaron aumentados. Esto coincide en parte con los estudios llevados a cabo por Gokul y col. <sup>(136)</sup>, quien describió niveles disminuidos de SOD en tejido tumoral de pacientes con CCE oral, mientras que los niveles de SOD en sangre de estos mismos pacientes estaban elevados. Para ello analizaron las muestras procedentes de 18 pacientes con diagnóstico clínico e histológico de CCE, todos ellos fumadores o masticadores de tabaco. El grupo control estuvo constituido por 25 pacientes sanos sin hábitos tóxicos.

Subaprayida y col <sup>(302)</sup> también encontraron disminuída la concentración de SOD y catalasa en sangre y tejidos de pacientes con dicha patología.

Esta controversia se extiende a los desórdenes potencialmente malignos, ya que en contraposición a los resultados expresados en párrafos anteriores, Guradath y col. <sup>(303)</sup> describieron una disminución en los niveles de SOD en la sangre de pacientes con LB y fibrosis submucosa, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en las diferentes localizaciones de la lesión. De todas formas, resulta un tanto difícil comparar los resultados hallados por estos autores en su muestra (llevadas adelante en India) a los de nuestro trabajo, ya que la etiología de las LB está en ese caso asociada a hábitos que no existen en nuestro medio (masticación de betel o de tabaco, ingesta oral de nuez de areca, etc). Sin embargo, no se han publicado estudios llevados adelante en nuestro país ni en Sudamérica que puedan dar cuenta del status oxidativo y antioxidante en pacientes con lesiones malignas y premalignas de la mucosa bucal.

Con respecto a las determinaciones en saliva, Rasool <sup>(141)</sup> describió el hallazgo de niveles elevados de MDA y ácido siálico en pacientes con CCE, mientras que los niveles de SOD resultaron significativamente disminuidos. En este sentido, un estudio llevado a cabo por Vlková y col. <sup>(152)</sup> coincidió al describir una disminución de los niveles de SOD en la saliva de pacientes con DPM de la mucosa oral (LB, LP y eritroplasia).

Nuestros resultados refieren un incremento estadísticamente significativo de los niveles de SOD en la saliva de pacientes portadores de DPM y CCE de la mucosa bucal comparados con los pacientes del GC. Además, estos niveles se correlacionarían con el incremento de la lipoperoxidación expresada por el aumento de los niveles de MDA tisular y salival. Una posible explicación para este resultado es que la elevación de los niveles de SOD podría deberse a un mecanismo defensivo o bien a un mecanismo compensatorio de adaptación para contrarrestar los peróxidos lipídicos acumulados en lesiones malignas y premalignas de la mucosa bucal. Diversos estudios mostraron que la actividad de la enzima SOD aumenta cuando disminuye la efectividad de otras enzimas. Se ha informado que la SOD es la primera enzima inducida frente a la injuria representada por la producción de ROS. <sup>(304)</sup> Por lo que resultaría interesante en futuras investigaciones evaluar conjuntamente con SOD los niveles de catalasa y peroxidasa en saliva de pacientes con CCE y DPM de la mucosa bucal y correlacionarlos con los niveles de MDA y la AT observada.

El AU es uno de los principales antioxidantes en los fluidos corporales y el principal antioxidante en la saliva, ya que representa más del 85% de la capacidad antioxidante salival total de la saliva en reposo y estimulada, tanto en pacientes sanos como de sujetos comprometidos periodontalmente <sup>(118)</sup>. Se ha propuesto que la acumulación de urato en humanos y primates superiores tiene ventajas evolutivas. Al igual que la vitamina C, el urato es un potente antioxidante <sup>(305)</sup>.

En el presente trabajo, encontramos una disminución de los niveles de AU salival en los pacientes del GE comparados con los del GC. Estos niveles se correlacionaron de manera inversa tanto con los niveles de MDA saliva y tisular como con los niveles de SOD, ya que al aumentar el MDA y la SOD se comprobó una disminución significativa del AU.

Coincidiendo con nuestros resultados, Battino y col. <sup>(118)</sup> refirieron una disminución significativa del ácido úrico saliva en un grupo de 20 pacientes con diagnóstico de LP bucal. Giebultowics <sup>(300)</sup> encontró bajos niveles de AU salival en pacientes con CCE de la mucosa bucal.

Con todo esto, la disminución del principal antioxidante salival nos da cuenta de la posible disfunción de la batería de defensa antioxidante que podría estar desarrollándose en los pacientes con las patologías estudiadas.

No hemos encontrado hasta el momento estudios que describan la posible correlación entre la reactivación de la AT, el aumento de la lipoperoxidación (medida por medio de la concentración de MDA) y las modificaciones en los niveles de SOD y AU (tal como lo hemos descrito en el capítulo correspondiente) en DPM y CCE de la mucosa bucal, por lo que creemos que este punto resulta de especial interés y representan una pequeña contribución por parte de nuestro equipo de trabajo al estudio de los mecanismos moleculares, bioquímicos y clínicos que inciden en el desarrollo del cáncer bucal.

# CONCLUSIONES

- Teniendo en cuenta los resultados analizados en capítulos anteriores, podemos concluir que la expresión de la AT difiere entre las muestras del GE comparadas con las del GC. El 82% de las muestras del GE resultaron AT positivas, contra un 24% de las muestras del GC.

Asimismo, resulta interesante destacar que encontramos diferencias estadísticamente significativas en la determinación de AT dependientes del tipo de patología del GE. Así el 90% de las muestras correspondientes a pacientes con diagnóstico de CCE de la mucosa bucal resultaron positivas para AT, seguidas por un 80% de AT positiva para los pacientes del subgrupo LP+LLO y un 70% de las muestras de pacientes con LB.

- No encontramos relación entre la AT, el sexo y la edad de los pacientes. Tampoco hallamos relación entre la activación de la enzima y hábitos tóxicos del paciente tales como fumar, beber alcohol ni consumir mate.

- No encontramos asociación entre la AT y los grados de diferenciación de las muestras de CCEB de la mucosa bucal, como así tampoco con la localización de las lesiones malignas ni premalignas orales. Sin embargo, sí se encontró relación entre la AT y la presencia de displasia (aunque no con el grado de la misma) y de infiltrado presente en las lesiones estomatológicas.

- Se observó una fuerte asociación entre la presencia de IMC de la mucosa bucal con la intensidad de la AT en las distintas patologías del GE. El trauma sostenido y a largo plazo de la mucosa bucal generaría un proceso inflamatorio crónico en la misma, lo que llevaría a la producción de ROS induciendo un incremento de la lipoperoxidación tisular que, si va acompañado de una disminución de la batería antioxidante propia de la piel y las mucosas, puede llevar a un estrés oxidativo que, entre otros mecanismos, reactiva a la enzima telomerasa, aumentando a actividad de ésta. Sin embargo, la complejidad de estos fenómenos requiere de estudios más profundos que permitan explicar más detalladamente los mecanismos a través de los cuales la irritación mecánica crónica de la mucosa puede estar involucrada en la carcinogénesis oral a través de una vía de reactivación de la telomerasa.

- El aumento de la concentración de MDA saliva y tisular podría interpretarse como un marcador de lipoperoxidación a nivel de los pacientes del GE.
- El incremento de la actividad de la SOD salival podría considerarse como un mecanismo defensivo frente a la injuria tisular que representa el aumento de la lipoperoxidación en pacientes con lesiones malignas y premalignas de la mucosa bucal. Estos factores, a su vez, influirían en la marcada disminución de los niveles de AU, el principal antioxidante de la saliva en los pacientes con diagnóstico de CCEB y DPM de la mucosa bucal.
- El incremento en la concentración de MDA salival se correlacionaría con el aumento de MDA tisular, SOD salival y la disminución de AU en los pacientes del GE.
- La AT resultaría modificada por las concentraciones de MDA en saliva y en tejido, y por la actividad de SOD y AU salivales, por lo que estos marcadores de estrés oxidativo regularían por medio de mecanismos aún no dilucidados del todo la reactivación de la enzima, tanto en DPM como desde etapas tempranas de la carcinogénesis oral.

A la luz de los resultados obtenidos, los marcadores salivales y tisulares analizados en el presente trabajo podrían estar implicados en el desarrollo y progresión de las lesiones premalignas y malignas de la mucosa bucal, por lo que se requieren estudios de mayor profundidad al respecto.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- McGrath M, Wong J, Michaud D et al. Telomere length, cigarette smoking, and bladder risk in men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 815-819).
- 2- Murnane JP. (2006) Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair*, 5, 1082–1092. *Carcinogenesis* vol.29 no.6 pp.1197–1201, 2008 doi:10.1093/carcin/bgn099,
- 3- Loeb, LA et al. (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 776–781).
- 4- Muller HJ. The remaking of chromosomes. *The collecting net-woods hole* 1938, 13, 181-195.
- 5- Mc Clintock B. The stability of broken ends of chromosomes of *Zea mays* *Genetics* 1941, 26, 234-282.
- 6- Sandell LL, Zakian VA. Lost of a yeast telomere: arrest, recovery and chromosome los, 1993, *Cell* 75, 729-739.
- 7- Blackburn EH Telomeres: no end in sight. *Cell* 1994; 77:621-3.
- 8- Mengual Gómez D, Armando RG, Farina HG, Gómez DE. *Medicina* 2014;74: 69-76.
- 9- Zvereva MI, Shchervakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)* 2010; 75: 1563-83.
- 10- Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008; 42: 301-34.
- 11- Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument – Bromage H, Hanish J, Tempst P, et al. A human telomeric protein. *Science* 1995; 270: 1663- 7.
- 12- Bianchi A, Stansel RM, Fairall L, Griffith JD, Rhodes D, de Lange T. TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *EMBO J* 1999; 18: 5735- 44.
- 13- Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1659-68.
- 14-Dandjinou AT, Dionne I, Gravel S, LeBel C, Parenteau J, Wellinger RJ. Cytological and functional aspects of telomere maintenance. *Histol Histopathol* 1999; 14: 517-24.
- 15- Hou H, Cooper JP. Stretching, scrambling piercing and entangling: Challenges for telomeres in mitotic and meiotic chromosome segregation. *Differentiation* 2018; 100:12-20.

- 16- Liu J, Wang L, Wang Z, Liu JP. Roles of telomere biology in cell senescence, replicative and chronological ageing. *Cells* 2019; Jan 15 (8):54.
- 17- Saretzky G. Telomeres, telomerase and ageing. *Subcell Biochem* 2018; 90: 221- 308.
- 18- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585- 621.
- 19- Wright WE, Hayflick L. The regulation of cellular aging by nuclear events in cultured normal human fibroblasts (WI-38). *Adv Exp Med Biol* 1975; 61: 39-55.
- 20- Olovnicov, AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 1973; 41: 181-90.
- 21- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-460.
- 22- Allsopp RC, Vasiri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. *Proc Natl Acad Sci US* 1992; A89: 10114-18.
- 23- Pommier JP, Lebeau J, Ducray C, Sabatier L. Chromosomal instability and alteration of telomere repeat sequences. *Biochimie* 1995; 77: 817-25.
- 24- Bryan TM, Englezou A, Dalla Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 1997;3: 1271-4.
- 25- Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005; 6:611 – 22).
- 26- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West M, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer. *Science*. 1994;266 :2011-5.
- 27- Martín Gámez DC, Molano Luque M, Bravo MM. Telomerase's activity as a biomarker of progression in uterine cervical Lesions. *Rev Colomb Cancerol* 2006;10(2):125-133.
- 28- Hofer P, Backry A, Benhardt K, Leeb G, Mach K, Micksche M, Gsur A. Association of genetic variants of human telomerase with colorectal polyps and colorectal cancer risk. *Mol Carcinog* 2012, Oct, 51 Supl: 176-82.

- 29-Concetti F, Lucarini N, Carpi FM, Di Pietro F, Dato s, Capitani N, Nabissi M, Santoni G, Mignini F, Passano G, Napolioni V. The functional VNTR MNS16A of the TERT gene is associated with human longevity in a population of Central Italy. *Exp Gerontol* 2013 Jun; 48 (6): 587- 92.
- 30-De Felice B, Nappi C, Zizolfi B, Guida M, Di Spiezio Sardo A, Bifulco G, guido M. Telomere shortening in women resident closet o naste ladfill sites. *Gene* 2012 May; 500 (1): 101- 6.
- 31- Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 1987; 51: 887-898.
- 32-Wyatt HD, West SC, Beattie TL. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acid Res* 2010; 38: 5609-22.
- 33- Lendva TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* 1996; 144: 1399-412.
- 34- Cooper JP, Nimmo ER, Alishire RC, Cech TR. Regulation of telomeric lenght and function by a myb- domain protein in fission yeast. *Nature* 1997; 385:744-7.
- 35- Wolpin BM, Rizzato C, Kraft P, Kooperberg C, Petersen GM, Wang Z, Arslan AA, Beane-Freeman L, Bracci PM, Buring J, Canzian F, Duell EJ, Gallinger S et al. Genome- wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nat Genet* 2014 Sep; 46 (9 :994- 1000.
- 36- Rafnar T, Sulem P, Stacey S, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, Jakobsdottir M, Helgadottir H, Thorlacius S, Aben K, Blöndal T, Thorgheirsson T, Thorleifsson G, Kristjansson K, Ragnarsson R, et al. Sequence variants at the TERT- CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet* 2009; 41: 221-227.
- 37- Hagaruchi K, Yada N, Sato S, Habu M, Hayakawa M, Takahashi O, Sasaguri M, Takenaka S, Yoshioka I, Matsuo K, Tominaga K. The methylation status and expresión of human telomerase reverse transcriptase is significantly high in oral carcinogénesis. *APMIS* 2017; 125: 797- 807.
- 38- Goueli BS, Janknecht R. Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor. *Oncogene* 2003; 22: 8042- 7.

- 39- Renaud S, Loukinov D, Bosman FT, Lobanenkov V, Benhattar J. CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription *Nucleic Acids Res* 2005; 33 :6850–60.
- 40- Ramlee MK, Wang J, Toh WX, Li S. Transcription regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Genes* 2016; 7:50.
- 41- Blasco MA, Funk W, Villeponteau B, Greider CW. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 1995; 269, 1267-1270.
- 42- Ventura A, Pellegrini C, Cardelli L, Rocco T, Ciciarelli V, Peris K, Fagnoli MC. Telomeres and telomerase in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 2019 Mar 16; 20(6)
- 43- MacNeil DE, Lambert-Lanteigne P, Autexier C. N- terminal residues of human diskerin are required for interactions with telomerase RNA that prevents RNA degradation. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jun 4; 47 (10): 5368- 5380.
- 44- Schorova S, Fajkus J, Závězká Drávková L, Honys D, Schrupfová PP. The plant Pontin and Reptin homologues, RuvBL1 and RuvBL2a, colocalize with TERT and TRB proteins in vivo, and participate in telomerase biogenesis. *Plant J* 2019 Apr; 98 (2):195-212.
- 45- Fu D, Collins K. Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation. *Mol Cell* 2007; 28: 773-85.
- 46- Venteicher AS, Meng Z, Mason PJ, Veenstra TD, Artandi SE. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* 2008; 132: 945-57.
- 47- Zhon F, Savage SA, Shkreli M, Giri N, Jessop L, Myers T, et al. Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. *Genes Dev* 2011; 25: 11-6.
- 48- Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 693-704.
- 49- Yuan X, Larsson C, Xu D. Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene* 2019 Jul 8. doi: 10.1038/s41388-019-0872-9.

- 50- Cascales M. Telómeros, telomerasa, senescencia y cáncer. *Anal Real Acad Doctores* 1999; 3: 83-101.
- 51- Yuan X, Xu D. Telomerase reverse transcriptase (TERT) in action: cross talking with epigenetics. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20,3338.
- 52- Romaniuk A, Paszel Jaworska A, Totón E, Lisiak N, Holysz H, Królak A, Grodecka Gazdecka S, Rubís B. The non- canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off. *Molecular Biology Reports* 2019; 46: 1401- 1411.
- 53- Smith LL, Coller HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 474- 479.
- 54- Lis S, Crothers J, Haqq CM, Blackburn EH. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA. *J Biol Chem* 2005; 280: 23709- 17.
- 55- Oh H, Taffet GE, Youker KA, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10308- 10313.
- 56- Chang S, DePinho RA. Telomerase extracurricular activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12520-12522.
- 57- Haendeler J, Hoffmann J, Diehl JF, Vasa M, Spyridopoulos I, Zeiher AM, Dimmeler S. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circ Res* 2004; 94: 768-775.
- 58- Kumar Jaiswal R, Kumar P, Kumar Yadava P. Telomerase and its extracurricular activities. *Cell Mol Biol Lett* 2013; 18: 538-554.
- 59- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20:781–810.
- 60- Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127:469–480
- 61- Park J-I, Venteicher AS, Hong JY et al Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 2009; 460:66–72
- 62- Liu N, Ding D, Hao W et al. hTERT promotes tumor angiogenesis by activating VEGF via interactions with the Sp 1 transcription factor. *Nucleic Acid Res* 2016; 44: 8693-8703.

- 63- Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, et al. Nuclear factor-kappa B p65 mediates tumor necrosis factor alpha- induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein. *Cancer Res* 2003; 63: 18- 21.
- 64- Sharma GG, Hwang KK, Pandita RK, Gupta A, Dhar S, Parentau J, Agarwal M, Worman HJ y Wellinger RJ. Human heterochromatin protein 1 isoforms HP1 (Hsaplha) and HP1 (Hsbeta) interfere with hTERT- telomere interactions and correlates with changes in cell growth and response to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8363- 8376.
- 65- Mendelsohn AR, Larrick JW. Telomerase may paradoxically accelerate aging of the DNA methylome. *Rejuvenation Res* 2018 Apr; 21(2): 168-172.
- 66- Ding D, Zhou J, Wang M, Cong YS. Implications of telomere- independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer. *FEBS J* 2013 Jul; 280 (14): 3205- 11.
- 67- Nguyen THD, Collins K, Nogales E. Telomerase structures and regulation: shedding light on the chromosome end. *Curr Opin Struct Biol* 2019 Jun 12; 55: 185- 193.
- 68- Cong YS, Wright WE, Shy JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, 66: 407-425.
- 69- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey, WE, Byrd W, Shay, JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 8: 173-179.
- 70- Broccoli D, Young JW, Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 90-82- 9086.
- 71- Harle- Bachor C, Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma- derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6476- 6481.
- 72- Miyazaki Y, Yoshida N, Nozaki T, Inoue H, Kikuchi K, Kusama K. Telomerase activity in the occurrence and progression of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci* 2015; 57 (4): 295- 303.
- 73- Shay JW, Bachetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-791.
- 74- Saito T, Schneider A, Martel N, Mizumoto H, Bulgay- Moerschel M, Kudo R, Nakasawa H. Proliferation- associated regulation of telomerase activity in human

- endometrium and its potential implication in early cancer diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 610- 614.
- 75- Tsao J, Zhao Y, Lucas J, Yang X, Shah A, Press M, Shibata D. Telomerase activity in normal and neoplastic breast. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 627- 631.
- 76- Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 180: 10- 18.
- 77- Kulic A, Plavetic ND, Gamulin S, Jakic Razumivic J, Vrbanc D, Sirotkovic- Skerlev M. Telomerase activity in breast cancer: association. n with poor prognosis and more aggressive phenotype. *Med Oncol* 2016 Mar; 33 (3): 23.
- 78- Dobija- Kubica K, Zalewska- Ziob M, Brulinski K, Rogozinski P, Wickzkowski A, Gawrychowska A, Gawrychowsky J. Telomerase activity in non- small cell- lung cancer. *Kardiochir Torakochirurgia Pol* 2016 Mar 13 (1): 15- 20.
- 79- Bertorelle R, Rampazzo E, Pucciarelli S, Nitti D, De Rossi A. Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014 Feb 28; (20) 8: 1940- 50.
- 80- Orlando G, Gelmini S, Selli C, Pazzagli M. Telomerase in urological malignancy. *J urol* 2001 Aug; 166 (2): 666- 73.
- 81- Boldrini L, Loggini B, Gisfredi S, Zucconi Y, Di Quirico D, Biondi R, Cervadoro G, Barachini P, Basolo F, Pingitore R, Fontanini G. Evaluation of telomerase in non-melanoma skin cancer. *Int J Mol Med* 2003 May; 11 (5): 607- 11.
- 82- Rai A, Naikmasur VG, Sattur A. Quantification of telomerase activity in normal oral tissue and oral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2016 Jul- Sep; 37 (3): 183-8.
- 83- Hathcock KS, Jeffrey Chiang Y, Hodes RJ. In vivo regulation of telomerase activity and telomere length. *Immunol Rev* 2005; 205: 104- 113.
- 84- Recal K. Molecular modeling studies on G-quadruplex complexes of telomerase inhibitors: structure-activity relationships. *J Med Chem.* 2009; 42: 4538-46.
- 85- Alon B. Of transcriptional regulatory sequences of telomerase (hTER and hTERT) for selective killing of cancer cells. *Mol Ther.* 2012; 2:539-44.
- 86- Chiv CP. Inhibition of telomerase activity by ribozymes in endometrial carcinoma cells. *Cancer Research*; 2009.

- 87- Yokoyama Y. Attenuation of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the template region of telomerase RNA in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res.* 2010; 58: 5406-10.
- 88- Jie MM, Chang X, Zeng S, Liu C, Liao GB, Wu YR, Liu CH, Hu CG, Yang SM, Li XZ. Diverse regulatory manners of human telomerase reverse transcriptase. *Cell Commun Signal* 2019 Jun 11; 17 (1): 63.
- 89- Kyo S, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 2000;28: 669–77.
- 90- Knight JS, Cotter MA, Robertson ES. The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus Transactivates the telomerase reverse transcriptase promoter. *J Biol Chem.* 2001; 276:22971–8.
- 91- Liu L, et al. MCAF1/AM is involved in Sp1-mediated maintenance of cancer associated telomerase activity. *J Biol Chem.* 2009; 284:5165–74.
- 92- Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol.* 2001;75: 5559–66.
- 93- Takakura M, Kyo S, Inoue M, Wright WE, Shay JW. Function of AP-1 in transcription of the telomerase reverse transcriptase gene (TERT) in human and mouse cells. *Mol Cell Biol.* 2005; 25:8037–43.
- 94- Kuhlmann AS, et al. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology.* 2007; 4:92.
- 95- Lou F, et al. The opposing effect of hypoxia-inducible factor-2alpha on expression of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cancer Res.* 2007;5: 793– 800.
- 96- Cifuentes Rojas C, Shippen D. Telomerase regulation. *Mutation Research* 2012; 730: 20- 27.
- 97- Chang JT, et al. hTERT phosphorylation by PKC is essential for telomerase holoprotein integrity and enzyme activity in head neck cancer cells. *Br J Cancer.* 2006; 94:870–8.
- 98- Kim JH, et al. Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT. *Genes Dev.* 2005; 19:776–81.
- 99- Ying SY, Xiong JX, Mai HX, Lin JJ, Jiang LN, Cheng L, Ye Q. Advances on the regulation of telomerase. *Yi Chuan* 2016 Apr, 38 (4): 289-99.

- 100- Entringer S, de Punder K, Buss C, Wadhwa PD. The fetal programming of telomere biology hypothesis: an update. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018; 373 (1741).
- 101- Lin SY, Liao SL, Hong JB, Chu CY, Sheen YS, Jhuang JY, Tsai JH, Liao JY. TERT promoter mutations in periocular carcinomas: implications of ultraviolet light in pathogenesis. *Br J Ophthalmol* 2015; 0: 1-4.
- 102- Xu D, Erikson M, Szeps M, Gruber A, Sangfelt O, Einhorn S, Pisa P, Grandt D. Interferon alpha downregulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and nonmalignant hematopoietic cells. *Blood* 2000; 96:4313-4318.
- 103- Zhou C, Steplowsky TA, Dickens HK, Malloy K, Gehrig P, Bogess J, Bae- Jump VL. Estrogen induction of telomerase activity through regulation of the mitogen activated protein-kinase (MAPK) dependent pathway in human endometrial cancer cells. *PloS One* 2013; 8 (2): e55730.
- 104- Katzenellbogen R. Activation of telomerase by HPVs. *Virus Research* 2017; 231: 50-55.
- 105- Straat K, Liu C, Rahbar A, Zhu Q, Liu L, Wolmer- Solberg N, Lou F, Liu Z, Shen J, Jia J, Kyo S, Björkholm M, Sjöberg J, Söderberg- Naucér C, Xu D. Activation of telomerase by human cytomegalovirus. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Apr 1;101 (7): 488-97.
- 106- Kordinas V, Ioannidis A, Chatzipanagiotou S. The telomero/telomerase system in chronic inflammatory diseases. Cause or effect? *Genes* 2016; 7: 60.
- 107- Lawrence, T.; Gilroy, D.W. Chronic inflammation: A failure of resolution? *Int. J. Exp. Pathol.* **2007**, 88, 85–94.
- 108- Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**.
- 109- Kanzaki Y, Onoue F, Sakurai H, Ide T. Telomerase upregulates expression levels of IL 1 alpha, IL 1 beta, IL 6, IL 8 and granulocyte macrophage colony stimulating factor in human normal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 May 23; 305 (1): 150-4.
- 110- Chung SS, Wu Y, Okobi Q, Adekoya D, Atefi M, Clarke O, Dutta P, Vagdama JV. Proinflammatory cytokines IL6 and TNF alfa increased telomerase activity through NF-

- kB/STAT1/STAT3 activation, and Whitafarin A inhibited the signaling in colorectal cancer cells. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 5958429.
- 111- Chung SS, Aroh C, Vagdama JV. Constitutive activation of STAT3 signaling regulates hTERT and promotes stem cell- like traits in human breast cancer cells. *PloS One* 2013 Dec 30 8 (12): e83971.
- 112- Huang MZ, Li JY. Physiological regulation of reactive oxygen species in organisms based on their physicochemical properties. *Acta Physiol (Oxf)* 2019 Jul 25: e13351.
- 113- Van Wijk R, Van Wijk EPA, Wiegant FAC, Ives J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. 2008. *Indian J Exp Biol* 16: 273-309.
- 114- Bardaweel SK, Gul M, Alzweiri M, Ishagat A, ALSalamat HA, Bashatwa RM. Reactive oxygen species: the dual role in physiological and pathological conditions of the human body. *Eurasian J Med* 2018 Oct; 50 (3): 193- 201.
- 115- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007. Vol. 39, no 1, pp 44- 84.
- 116- Garcia Escudero V, Martin Maestro P, Perry G, Avila J. Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 2013: 162152.doi 10.1155/2013/162152.
- 117- Rybakova YS, Kalen AL, Eckers JC, Fedorova TN, Goswami PC, Sarsour EH. Increased manganese superoxide dismutase and cyclin B1 expression in carnosine-induced inhibition of glioblastoma cell proliferation. *Biomed Khim* 2015 Jul- Aug; 61 (4): 510- 8.
- 118- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical- caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Acad Sci EEUU*. 1981; 78: 6858- 62.
- 119- Battino M, Greabu M, Totan A, Bulon P, Bucur A, Tovar S, Mohora M, Didilescu A, Parlatescu I, Spinu T, Totan C. Oxidative stress markers in oral lichen planus. *Biofactors* 2008; 33 (4): 301- 10.
- 120- Pisoschi AM, Pop A. The role of the antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 97: 55- 74.

- 121- Lopez Alarcona C, Denicola A. Evaluatin the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular based assays. *Anal Chim Acta* 2013; 763: 1-10.
- 122- Tandon VR, Sharma S, Mahajan A, Bardi GH. Oxidative stress: a novel strategy in cancer treatment. *JK Sci* 2005; 7: 1-3.
- 123- Yousri R, Noaman E, EL Shawi O, Fhamy N, Ghaz M. Evaluation of antioxidant status and radioprotective activity of a novel anti-cancer drug in mice. *J Cancer Ther* 2011; 2: 616- 628.
- 124- Rahman T, Hosen I, Towhidul Islam MM, Sekhar HU. Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol* 2012; 3: 997- 1019.
- 125- Eppel ES, Lin J, Dhabar FS, Wolkowics OM, Puterman E, Karan L, Blackburn E. Dynamis of telomerase activity in response to acute psychological stress. *Brain Behav Immun* 2010; 24(4): 531–539.
- 126- Nishikawa T, Nakajima \_T, Katagishi T, Okada Y, Jo M, Kagawa K, et al. oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation. *Liver Int* 2009; 29 (6): 846- 856.
- 127- Saretzky G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp Gerontol* 2009; 44(8): 485- 492.
- 128- Zhu J, Wang H, Bidhop J, Blackburn E. Telomerase extends the lifespan of virus transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci USA*,1999; 96; 3723- 3728.
- 129- Rubio MA, Davalos AR, Campisi J. Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress. *Exp Cell res* 2004; 298 (1): 17- 27.
- 130- Rasheed, MH, Beeve S, Geetha A. Enhanced lipid peroxidation and nitric oxide products with deranged antioxidant status in patients with head and neck squamous cell carcinoma. 2017. *Oral Oncol* 43: 333- 338.
- 131- Fleisig HB, Hukezalie KR, Thompson CA, Au- Yeng TT, Ludlow AT, Zhao CR, Wong JM. Telomerase reverse transcriptase expression protects transformed human cells against DNA- damaging agents, and increase tolerance to chromosome instability. *Oncogene* 2016 Jan 14; 35 (2): 218- 27.

- 132- Gegotek A, Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chem Phys Lipids* 2019 Jul; 221: 46- 62.
- 133- Winczura A, Zdzalik D, Tudek B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radical Res* 2012 Apr; 46 (4): 442-59.
- 134- Demir E, Turna F, Kaya B, Creus A, Marcos R. Mutagenic/ recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 53: 221- 227.
- 135- Purohit V, Simeone DM, Lyssiotis CA. Metabolic regulation of redox balance in cancer. *Cancers (Basel)* 2019 Jul 8;11 (7). pii: E955.
- 136- Hsu PP, Sabatini D. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008; 134: 703- 707.
- 137- Gokul S, Patil VS, Jaikhan R, Hallikeri K, Kattappagari KK. Oxidant- Antioxidant status in blood and tumor tissue of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Dis* 2010 Jan; 16 (1): 29- 33.
- 138- Beevi SSS, Rasheed AMH, Geetha A. Evaluation of oxidative stress and nitric oxide levels in patients with oral cavity cancer. *Jpn J clin Oncol* 2004 34: 379- 385.
- 139- Kangari P, Zarnoosheh Farahany T, Golchin A, Ebadollahzade S, Salmaninejad A, Mahboob SA, Nourazarian A. Enzymatic antioxidant and lipid peroxidation evaluation in the newly diagnosed breast cancer patients in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018 Dec 25; 19 (12): 3511- 3515. *Oral Pathol Med* 2011; 40: 726- 730.
- 140- Malik UU, Siddiqui IA, Hashim Z, Zarina S. Measurement of serum paraoxonase activity and MDA concentrations in patients suffering with oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta* 2014; 430: 38- 42.
- 141- Barut O, Vural P, Sirin S, Aydin S, Dizdar Y. The oxidant/antioxidant status and cell death mode in oral squamous cell carcinoma. *Acta Odontol Scand* 2012; 70: 303- 308.
- 142- Rasool M, Khan SR, Malik A, Kahn KM, Zahid S, Manan A, Qazi MH. Comparative studies of salivary and blood sialic acid, lipid peroxidation and antioxidative status in oral squamous cell carcinoma. *Pak J Med Sci* 2014; 30 (3): 466- 471.
- 143- Giebultowics J, Wroczynski P, Samolczyk- Wanyura D. Comparison of antioxidant enzymes activity and the concentration of uric acid in the saliva of patients with oral cavity cancer, odontogenic cysts and healthy subjects.

- 144- Patel JB, Shab FD, Shuckla SN, Shah PM, Patel P. Role of nitric oxide and antioxidant enzymes in the pathogenesis of oral cancer. *J Cancer Res Ther* 2009; 5 (4): 247-251.
- 145- Sadaksharam J. Significance of serum nitric oxide and superoxide dismutase in oral submucous fibrosis and squamous cell carcinoma: a comparative studio. *Contemp Clin Dent* 2018 Apr- Jun; 9 (2): 283- 288.
- 146- Islam Mo, Bacchetti T, Ferretti G. Alterations of antioxidants enzymes and biomarkers of nitro- oxidative stress in tissues of bladder cancer. *Oxid Med Cel Longev* 2019 May 5; 2019: 2730896.
- 147- Bobrowska- Korczak B, Skrajnowska D, Kiss AK, Wrzesien R, Bielecki W, Orzol A, Zebrowski P, Bialek S. Lipid peroxidation as a predictive biomarker of the early stage of cancer. *J Biol Regul Homeost Agents* 2019 May- Jun; 33 (3): 799-810.
- 148- Wei J, Xie G, Zhou Z, Shi P, Qiu Y, Zheng X, Chen T, Su M, Zhao A, Jia W. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *Int J Cancer* 2011; 129: 2207-2217.
- 149- Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler R. Salivary analysis in oral cancer patients. *Cancer* 2007; 109: 54-9.
- 150- Srivastava KC, Austin RD, Shrivastava D. Evaluation of oxidant- antioxidant status in tissue samples in oral cancer: a case control study. *Dent Res J* 2016; 13:181- 7.
- 151- Hanspal S, Pushparaja S, Sreelatha SV, Madhvika P. Analysis of salivary antioxidant levels in different clinical staging and histological grading of oral squamous cell carcinoma: noninvasive technique in dentistry. *J Clin Diagn Res* 2014 Aug 8 (8): ZC08-ZC11.
- 152- Srivastava KC, Shrivastava D. Analysis of plasma lipid peroxidation and antioxidant enzymes status in patients of oral leukoplakia: a case control study. *J Int Soc Prevent Cummunit* 2016; 6: S213- 8.
- 153- Vloková B, Stanko P, Minarik G, Tothová L, Szemes T, Baňasová L, Novotňáková D, Hodosy J, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in patients with oral premalignant lesions. *Arch Oral Biol* 2012; 57: 1651- 1656.

- 154- Scrobota I, Mocan T, Catoi C, Bolfa P, Muresan A, Baciut G. Histopathological aspects and local implications of oxidative stress in patients with oral lichen planus. *Rom J Morphol Embryol* 2011, 52 (4): 1305- 1309.
- 155- Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC: Salivary lipid peroxidation product malonaldehyde in pre-cancer and cancer. *Adv Med Dent Sci.* 2008;2(1):7–8.
- 156- Agha- Hosseini F, Mirzaii- Dizgah I, Mikaili S, Abdollahi M. Increased salivary lipid peroxidation in human subjects with oral lichen planus. *Int Dent Hygiene* 2009; 7: 246-250.
- 157- Ergun S, Trosala SC, Warnakulasuriya S, Özel S, Önal AE, Ofluoglu S; Güven Y, Tanyeri H. Evaluation of oxidative stress and antioxidant profile in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 286- 293.
- 158- De Punder K, Heim C, Wadhwa PD, Entringer S. Stress and immunosenescence: the role of telomerase. *Psychoneuroendocrinology* 2019; 101: 87-100.
- 159- Ornish D, Lin J, Chan JM, Epel ES, Kemp C, Weidner G, Marlin R, Frenda SJ, Magbanua MJ, Daubenmier J, Estay I, Hills NK, Chainani- Wu N, Carroll PR, Blackburn EH. Effect of comprehensive lifestyle changes on telomerase activity and telomere length in men with biopsy- proven low-risk prostate cancer: a 5- year follow-up of a descriptive pilot study. *Lancet Oncol* 2013; 14: 1112- 1120.
- 160- Puterman E, Epel ES, Lin J, Blackburn EH. Multisystem resiliency moderates the major depression- telomere length association: findings from the Heart and Soul Study. *Brain Behav Immun* 2013; 33: 65- 73.
- 161- Boccardi V, Espósito A, Rizzo MR, Marfella R, Barbieri M, Paolisso G. Mediterranean diet, telomere maintenance and health status among elderly. *PloS One* 2013; 8: e62781.
- 162- Bozcus F, Atilla N, Simsek S, Kurutas E, Samur A, Arpaq H, Kahraman H. Serum telomerase levels in smokers and smokeless tobacco users as Maras powder. *Tuberk Torask* 2017 Sep; 65 (3): 186-192.
- 163- Marcon F, Siniscalchi E, Andreoli C, Allione A, Fiorito G, Medda E, Guarrera S, Matullo G, Crebelli R. Telomerase activity, telomere length and hTERT DNA methylation in peripheral blood mononuclear cells of monozygotic with discordant smoking habits. *Environ Mol Mutagen* 2017 Oct; 58 (8): 551- 559.

- 164- Targowski T, Jahnz- Rózik K, Szkoda T, From S, Rozynska R, Plusa T. Influence of nicotine addiction on telomerase activity in malignant non- small cell lung tumors. *Przegl Lek* 2005; 62 (10): 1043-6.
- 165- Nahon P, Nault JC. Constitutional and functional genetics of human alcohol- related hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2017 Nov; 37 (11): 1591- 1601.
- 166- Wu XQ, Yang Y, Li WX, Cheng YH, Li XF, Huang C, Meng XM, Wu BM, Liu XH, Zhang L, Lv XW, Li J. Telomerase reverse transcriptase acts in a feedback loop with NF-kB pathway to regulate macrophage polarization in alcoholic liver disease. *Sci Rep* 2016 Jan 4; 6: 18685.
- 167- Harpas T, Abumok H, Beery E, Edel Y, Lahav M, Rozovsky U, Uziel O. The effect of ethanol on telomere dynamics and regulation in human cells. *Cells* 2018, 7: 169.
- 168- Liao CT, Chen IH, Chang JCT, Wang HM, Hsie LL, Cheng AJ. Lack of correlation of betel nut chewing, tobacco smoking and alcohol consumption with telomerase activity and the severity of oral cancer.
- 169- Balcerkzyk A, Gajewska A, Macierzynska- Piotrowska E, Pawelczyk T, Bartosz G, Szemraj J. Enhanced antioxidant capacity and anti- ageing biomarkers after diet micronutrient supplementation. *Molecules* 2014; 19: 14794- 14808.
- 170- Pawelczyk T, Grankow- Grabka M, Trafalska E, Szemraj J, Zurner N, Pawelczyc A. Telomerase level increase is related to n-3 polyunsaturated fatty acid efficacy in first episode schizophrenia: secondary outcome analysis of the OFFER randomized clinical trial. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*; 83: 142-148.
- 171- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 V1.0. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase Nro 11. 2013. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- 172- GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct; 388 (10053):1659-1724.
- 173- Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez JJ, González-Moles MA, Bascones-Martínez A. [Update on molecular pathology in oral cancer and precancer](#). *Anticancer Res* 2008; 28 :1197-205.

- 174- Losi-Guembarovski R, Menezes RP, Poliseli F, Chaves VN, Kuasne H, Leichsenring A, Maciel ME, Guembarovski AL, Oliveira BW, Ramos G, Mizuno LT, Cavalli IJ, Ribeiro EM, Cólus IM. Oral carcinoma epidemiology in Paraná State, Southern Brazil. *Cad Saude Pub*; 25(2):393-400.
- 175- Brunotto [M](#), [Zarate AM](#), [Bono A](#), [Barra JL](#), [Berra S](#). Risk genes in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of last 5 years. *Oral Oncol* 2014; 50(3):178-88.
- 176- Falaki F, Dalirsani Z, Pakfetrat A, Falaki A, Saghravanian N, Nosratzahi T, Pazouki M. Clinical and histopathological analysis of oral Squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: A retrospective study and review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011 Jul 1; 16 (4): e473-7.
- 177- Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: etiology and risk factors: a review. *J Cancer Res Ther* 2016 Apr- Jun; 12 (2): 458- 63.
- 178- Xu C, Liu Y, Wang P, Wenhong Fan, Rue TC, Upton MP, Houck JR, Lohavanichbutr P, Doody DR, Futran ND, Zhao LP, Schwartz SM, Chen C, and Méndez E. Integrative analysis of DNA copy number and gene expression in metastatic oral squamous cell carcinoma identifies genes associated with poor survival. *Mol Cancer* 2010; 9:143.
- 179- [Scully C](#), [Bagan J](#). Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5):301-8.
- 180- WHO. World health statistics (2006). Geneva, Switzerland: WHO Press, World Health Organization, (<http://www.who.int/healthinfo/statistics>).
- 181- [Morelato RA](#), [López de Blanc SA](#). Oral cancer mortality in the province of Cordoba, Argentine Republic in the period 1975-2000. A comparative study with other populations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11(3): E230-5.
- 182- Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PV, Liyanage RL, Dias KD and Tilakaratne WM. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113: 518-525.
- 183- Jung DW, Che ZM, Kim J, Kim K, Kim KY and Williams D. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int J Cancer* 210; 127: 332-344.

- 184- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; 45:309–316.
- 185- Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978; 46:518-39.
- 186- Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. Second Edition ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 1997.P. 1-85.
- 187- van der Waal I, Axéll T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol.* 2002; 38:521-6.
- 188- Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36:575-80.
- 189- van der Waal I. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition or terminology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015 Nov 1; 20 (6): 685-6 92.
- 190- 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.
- 191- Grinspan D. Semiología topográfica. Enfermedades de la boca. Tomo I. Argentina: Editorial Mundi SAIC y F., 1977; 392.
- 192- Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral oncology* 2003 Dec;39(8):770-80.
- 193- Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008 Jan;37(1):1-10.
- 194- Escribano Bermejo M, Bascones Martínez A. Leucoplasia oral: conceptos actuales. *Av Odontostomatol* 2009; 25 (2): 83- 97.
- 195- Alrashdan M, Cirillo N, Mc Cullough M. Oral lichen planus: a literatura review and update. *Arch Dermatol Res* 2016; 308: 539- 555.
- 196- Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation 2007. *J Oral Sci* 49:89–106.

- 197- Kanwar AJ, De D. Lichen planus in childhood: report of 100 cases. *Clin Exp Dermatol* 2010; 35:257–262.
- 198- Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010; 28:100–108.
- 199- Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008; 46:15–21.
- 200- Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian JV, Thongprasom K, Number V. Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis* 2005; 11:338–349.
- 201- Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, Axell T, Bruce AJ, Carpenter W, Eisenberg E. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103(Suppl: S25) e21–12.
- 202- van der Meij EH, Schepman KP, Smeele LE, van der Wal JE, Bezemer PD, van der Waal I. A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88:307–310.
- 203- Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60:308–315.
- 204- van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med* 2003; 32:507–512.
- 205- Gonzalez-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis* 2008; 14:229–243.
- 206- Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 2004; 118:671–674.
- 207- 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; 40:120–130.
- 208- [Rivera C](#), [Venegas B](#). Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*.2014; 8(1):7-11.
- 209- Holland-Frei. *Cancer Medicine*. 6th edition. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.

- 210- Ryott M, Wangsa D, Heselmeyer-Haddad K, Lindholm J, Elmberger G, Auer G, et al. EGFR protein overexpression and gene copy number increases in oral tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2009. 45(9):1700–8.
- 211- Williams H K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol*. 2010; 53(4):165-72.
- 212- Zarate AM, Brezzo MM, Secchi DG, Barra JL, Brunotto M. Malignancy risk models for oral lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18(5): e759-65.
- 213- Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 1998; 8: 279-82.
- 214- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11: 1921-9.
- 215- Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer: an update. *Virchows Arch* 2000; 437: 1-16.
- 216- Correa Abrahao A, Venturi Bonelli B, Daumas Nunez F, Pedra Dias E, Grillo Cabral M. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Bras Oral Res* 2011, Jan- Feb; 25 (1): 34-41.
- 217- Palani J, Lakshminarayanan V, Kaman R. Immunohistochemical detection of human reverse transcriptase in oral cancer and precancer. *Indian J Dent Res* 2011; 22:362- 363.
- 218- Kim HR, Christensen R, Park NH, Sapp P, Kang MK, Park NH. Elevated expression of hTERT is associated with dysplastic cell transformation during human carcinogenesis in situ. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3079- 3086.
- 219- Zhong LP, Chen JF, Xu ZF, Zhang X, Ping FY, Zhao SF. Detection of telomerase activity in saliva from squamous cell carcinoma patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005 Jul; 34 (5): 566- 70.
- 220- Yao H, Wu B, Wu Q. Study and detection of telomerase activity in oral squamous cell carcinoma and precancerous lesions. *Zhohua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1999 Nov: 34 (6): 328- 30.

- 221- Zheng CM, Zhan X, Yang YH, Jiang T, Ye Q, Lu Y. A rare missense variant in telomerase reverse transcriptase is associated with idiopathic pulmonary fibrosis in a Chinese Han family. *Clin Med J (Engl)* 2018; 131 (18): 2205- 2209.
- 222- Gutmajster E, Chudek J, Augusciak- Duma A, Szwed M, Szybalska A, Mossakowska M, Puzianowska- Kuznicka M, Wiecek A, Sieron AL. Possible association of the TERT promoter polymorphism rs2735940, rs7712562 and rs2853669 with diabetes mellitus in obese elderly Polish population: results from the national PolSenior Study. *J Appl Genet* 2018; 59 (3): 291- 299.
- 223- Li J, Chang J, Tian J, Ke J, Zhu Y, Yang Y, Gong Y, Zou D, Peng X, Yang N, Mei S, Wang X, Cheng L, Hu W, Gong J, Zhong R, Miao X. A rare variant P507L in TPP1-TIN2 interaction, influences telomere length and confers colorectal cancer risk in Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2018; 27 (9): 1029- 1035.
- 224- Dahlström J, Liu T, Yuan X, Saft L, Ghaderi M, Wei YB, Lavebratt C, Li P, Zheng C, Björkholm M, Xu D. TERT rs2736100 genotypes are associated with differential risk of myeloproliferative neoplasms in Swedish and Chinese male patient populations. *Ann Hematol* 2016; 95 (11): 1825- 1832.
- 225- Norberg A, Rosén A, Raaschou- Jensen K, Kjeldsen L, Moilanen JS, Paulsson- Karlsson Y, Baliakas P, Lohi O, Ahmed A, Kittang AO, Larsson P, Roog G, Degerman S, Hultdin M. Novel variants in Nordic patients referred for genetic testing of telomere-related disorders. *Eur J Hum Genet* 2018; 26 (6): 858- 867.
- 226- Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, El Naggar A, Westra W, Califano J et al. Epithelial precursors lesions. En: Barnes L, Eveson WH, Reichardt H, Sidransky D Eds. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press- WHO Press, 2005: 177- 9.
- 227- American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010.
- 228- Sinha N, Dabla PK. Oxidative stress and antioxidants in hypertension- a current review. *Curr Hypertens Rev* 2015; 11(2): 132- 42.
- 229- Carrier A. Metabolic Syndrome and oxidative stress: a complex relationship. *Antioxid Redox Signal* 2017 Mar 20; 26 (9): 429- 31.
- 230- Ligthfoot YL, Blanco LP, Kaplan MJ. Metabolic abnormalities and oxidative stress in lupus. *Curr Opin Rheumatol* 2017 Sep; 29 (5): 442- 449.

- 231- Hashikova L, Pavlikova M, Hulejova H, Kozlik P, Kalikova K, Mahajan A, Hermann M, Stiburkova B, Zavada J. Serum uric acid increases in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases after three months of treatment with TNF inhibitors. *Rheumatol Int* 2019 Jul 31. En prensa.
- 232- Karamouzis I, Berardelli R, D'Angelo V, Fussotto B, Zicchi C, Giordano R, Settani F, Maccario M, Ghigo E, Arvat E. Enhanced oxidative stress and platelet activation in patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015 Apr; 82 (4): 517- 524.
- 233- Arish N, Pethukov D, Wallach- Dayan SB. The role of telomerase and telomeres in interstitial lung diseases: from molecules to clinical implications. *Int J Mol Sci* 2019 Jun 19; 20 (12).
- 234- Popli DB, Sirkar K, Choudhry A. Telomerase: an exploration toward the end of cancer. *Indian j Dent Res* 2017 Sep- Oct; 28 (5): 574- 584.
- 235- Muneer A, Minhas FA. Telomere biology in mood disorders: an updated, comprehensive review of the literature. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2019 Aug 31; 17(3): 343- 363.
- 236- Germing U, Schroeder T, Kaivers J, Kündgen A, Kobbe G, Gattermann N. Novel therapies in low and high risk myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Hematol* 2019 Jul 31: 1- 16.
- 237- Katarkar A, Saha A, Mukherjee S, Kundu D, Badyopadhyay P, Chaudhuri K. Telomerase expression in individuals with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2015 May; 86 (5): 656- 65.
- 238- Tóthová L, Celec P. Oxidative stress and antioxidants in the diagnosis and therapy of periodontitis. *Front Physiol* 2017 Dec 14; 8: 1055.
- 239- 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* 2010. 1; 39(7):513-7.
- 240- Aguirre Urizar JM. Oral candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19:17-21.
- 241- Biondi K, Belloni S, Velasco M, Robledo G, Gallardo A, Femopase F et al. Correlation between oral precancer and cancer and tobacco. *J Dent Res* 1998; 77: 5.
- 242- Pentenaro M, Broccolatti R, Carbone M, Corotto D, Gandolfo S. The prevalence of oral mucosal lesions in adults from the Turin area. *Oral Diseases* 2008; 14,356-366.

- 243- Caciva RC, Belardinelli PA et al. ¿Alcohol y salud! ¿Alcohol y salud? Revisión bibliográfica. *Claves de Odontología* 2015; 74: 41-46.
- 244- Goldenberg D. Mate: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2002; 38: 646–649.
- 245- Hershkovich O, Nagler RM. Biochemicals Analysis of saliva and taste acuity evaluation in patients with burning mouth syndrome, xerostomia and / or gustatory disturbances. *Arch Oral Biol.* 2004; 49:515–22.
- 246- Fujita H, Nagata M, Hoshina H, Nagashima K, Seki Y, Tanaka K, Nishizawa R, Shingaki S, Inishi M, Takagi R. Clinical significance and usefulness of quantification of telomerase activity in oral malignant and nonmalignant lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004 Oct; 33 (7): 693-9.
- 247- Fujimoto R, Kamata N, Yokoyama K, Ueda N, Satomura K, Hayashi E, Nagayama M. Expression of telomerase components in oral keratinocytes and squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2001 Feb, 37 (2):132-40.
- 248- Durusoy M, Ozturk K. Methods used in evaluating telomerase activity. *Turk J Med Sci* 200, 381, 384.
- 249- Manos M, Ting Y, Wright D, et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989; 7:209–214.
- 250- Bernad H, Chan S, Manos M, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequences and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* 1994; 170:1077–1085.
- 251- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 252- Mc Cord JM, Fridovich I. An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *Jour Biol Chem* 1969, 244: 6049-55.
- 253- Prencipe L, Fossati P, Vanzetti G. Enzymatic determination of uric acid in serum with the Trinder reaction (author's transl). *Quad Sclavo Diagn* 1978, Sep; 15(3): 382- 94.

- 254- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- 255- Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 2002; 68:617-21.
- 256- Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol* 2000; 18:2626-34.
- 257- Patel MM, Parekh LJ, Jha FP, Sainger RN, Patel JB, Patel DD, et al. Clinical usefulness of telomerase activation and telomere length in head and neck cancer. *Head Neck* 2002; 24:1060-7.
- 258- Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett* 2003; 194:221-33.
- 259- Califano J, Ahrendt SA, Meininger G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res* 1996; 56:5720-2.
- 260- Liao J, Mitsuyasu T, Yamane K, Ohishi M. Telomerase activity in oral and maxillofacial tumors. *Oral Oncol* 2000; 36:347-52.
- 261- Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, Lee JS, Lippman SM, Kayser S, et al. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 1996; 56:5600-4.
- 262- Curran AJ, St. Denis K, Irish J, Gullane PJ, MacMillan C, Kamel-Reid S. Telomerase activity in oral squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124:784-8.
- 263- Thurnher D, Knerer B, Formanek M, Kornfehl J. Non-radioactive semiquantitative testing for the expression levels of telomerase activity in head and neck squamous cell carcinomas may be indicative for biological tumour behaviour. *Acta Otolaryngol* 1998; 118:423-7.
- 264- Sumida T, Sogawa K, Hamakawa H, Sugita A, Tanioka H, Ueda N. Detection of telomerase activity in oral lesions. *J Oral Pathol Med* 1998; 27:111-5.
- 265- Chang LY, Lin SC, Chang CS, Wong YK, Hu YC, Chang KW. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:389-96.

- 266- Miyoshi Y, Tsukinoki K, Imaizumi T, Yamada Y, Ishizaki T, Watanabe Y, et al. Telomerase activity in oral cancer. *Oral Oncol* 1999; 35:283-9.
- 267- Mao Z, Gao Z, Xu P, Zuo H, He Y. Identification of telomerase activity in the experimental carcinogenesis of oral cavity. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2000 Feb; 18 (1): 52-4, 57.
- 268- Yayima Y, Noma H, Furuya Y, Nomura T, Yamauchi T, Kasahara K, Hatada K, Takano M. Quantification of telomerase activity of regions unstained with iodine solution that surround oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004 Mar; 40 (3): 314-20.
- 269- Xian J, Liu S, Zhou G, Yiang H. Modified quantitative determination of telomerase activity in human head and neck malignant tumor. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2003; 17:285-7.
- 270- Leary T, Jones PL, Appleby M, Blight A, Parkinson K, Stanley M. Epidermal keratinocyte self-renewal is dependent upon dermal integrity. *J Invest Dermatol* 1992; 99:422-30.
- 271- Ramadas K, Sankaranarayanan R, Jacob BJ, Thomas G, Somanathan T, Mahé C, et al. Interim results from a cluster randomized controlled oral cancer screening trial in Kerala, India. *Oral Oncol* 2003; 39:580-8.
- 272- Ries HC, Hassfurth E, Steininger H, Kloss FR, Wiltfang J, Girod SC, Neukam FW. Correlation of telomerase activity, clinical prognosis and therapy in oral carcinogenesis. *Anticancer Res* 2001 Mar- Apr; 21 (2A): 157- 63.
- 273- Shimamoto H. Telomerase activity in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 2001 Mar; 68 (1): 125- 33.
- 274- Zhang J, Wei MH, Lu R, Du GF, Zhou G. Declined hTERT expression of peripheral blood CD4 (+) T cells in oral lichen planus correlated with clinical parameter. *J Oral Pathol Med* 2016 Aug; 45 (7): 516- 22.
- 275- Thongprasom K, Mutirangura A, Cherat S. Telomerase activity in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1998 Sep; 27 (8): 395- 98.
- 276- Freitas- Simoes TM, Cofán M, Blasco MA, Soberón N, Foronda M, Serra- Mir M, Roth I, Valls- Pedret C, Doménech M, Ponferrada- Ariza E, Calvo C, Rajaram S, Sabaté J, Ros E, Sala- Vila A. Walnut consumption of two years and leukocyte telomere

- attrition in Mediterranean elders: results of a randomized controlled trial. *Nutrients* 2018 Dec 4; 10 (2): E1907.
- 277- Gomez- Delgado F, Delgado- Lista J, López- Moreno J, Rangel- Zúñiga OA, Alcalá- Díaz JF, León – Acuña A, Corina A, Yubero- Serrano E, Torres- Peña JD, Camargo A, García- Ríos A, Caballero J, Castaño J, Ordovas JM, López- Miranda J, Pérez- Martínez P. Telomerase RNA component genetic variant interact with the Mediterranean diet modifying inflammatory status and its relationship with aging: CARDIOPREV Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018 Mar 2; 73 (3): 327- 332.
- 278- Patel MM, Patel DD, Pakeh LJ, Raval GN, Rawal RM, Bhatavdekar JM, Patel BP, Patel PS. Evaluation of telomerase activation in head and neck cancer *Oral Oncol* 1999 Sep; 35 (5): 510- 5.
- 279- Lazos JP, Piemonte ED, Lanfranchi HE, Brunotto MN. Characterization of chronic mechanical irritation in oral cancer. *Int J Dent* 2017; 2017: 6784526.
- 280- Keibel,V. Singh, and M.C. Sharma.Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15 (17): 1949–1955.
- 281- Kunická Z, Mucha I, Fajkus J. Telomerase activity in head and neck cancer. *Anticancer Research* 2008; 28: 3125- 3130.
- 282- Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK, et al. Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:413-20.
- 283- Koscielny S, Eggeling F, Dahse R, Fiedler W. The influence of reactivation of the telomerase in tumour tissue in the prognosis of squamous cell carcinomas in the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 538- 42.
- 284- Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Lleonart ME. Oxidative stress and cancer: and overview. *Ageing Res Rev* 2013 Jan; 12 (1): 376- 90.
- 285- Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress end antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15 (11): 4405- 4409.
- 286- Kay J, Thadhani E, Samson L, Engelward B. Inflammation- induced DNA damage, mutations and cancer. *DNA repair (Amst)* 2019 Jul 25: 102673.

- 287- Scibior- Bentkowska D, Czczot H. Cqancer cells and oxidative stress. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2009 Feb 23: 58- 63.
- 288- Kaur J, Politis C, Jacobs R. Salivary 8- hydroxy- 2- deoxyguanosine, malondialdehyde, vitamin C, and vitamin E in oral pre- cancer and cancer: diagnostic value and free radical mechanism of action. *Clin Oral Invest* 2016; 20: 315- 319.
- 289- Aly DG, Shain RS. Oxidative stress in lichen planus. *Acta Dermatoven APA* 2010; 19: 3-11.
- 290- Reznick AZ, Hershkovich O, Nagler RM. Saliva, a pivotal player in the pathogenesis of oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* 2004 Jul 5; 91 (1): 111-8.
- 291- Fu TY, Tsai MH, Wang JS, Ger LP. Antioxidant enzymes in oral verrucous carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2017; 46: 46- 49.
- 292- Jain RK, Singh GB, Singh AP, Goel RK, Aryya NC, Jha SK. Role of measurement of antioxidant enzymes in evaluation of antioxidant therapy in tobacco abusers with oral leukoplakia. *Indian J Otolaryngol Head and Neck Surg* 2011; 63 (4): 336- 42.
- 293- Sezer E, Ozugurlu F, Ozyurt H, Sahin S, Etikan I. Lipid peroxidation and antioxidant status in lichen planus. *Clin Expert Dermatol* 2007 Jul; 32(4): 430-4.
- .
- 294- Patel BP, Rawal UM, Shah PM; Prajapati JA, Rawal RM, Dave TK, Patel PS. Study of tobacco habits and alterations in enzymatic system in oral cancer. *Oncology* 2005; 68: 511- 519.
- 295- Subapriya R, Kumaraguruparan R, Ramachandran CR, Nagini S. Oxidant – antioxidant status in patients with oral squamous cell carcinoma at different intraoral sites. *Clinical Biochemistry* 2002; 35: 489- 493.
- 296- Gurudath S, Ganapathy KS, Sujatha D, Pai A, Sushmini B, Asha ML. Estimation of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in oral submucous fibrosis, oral leukoplakia and oral cancer- A comparative study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012; 13: 4409- 12.
- 297- Topdag S, Aslaner A, Tataroglu C, Ilce Z. Evaluation of antioxidant capacity in lung carcinoma. *Ind J Thorac Cardiovas Surg* 2005; 21: 269-71.

298- Lee DH, Jacobs DR, Gross M, Kiefe CI, Roseman J, Lewis CE, Steffes M. Gamma glutamil transferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the CARDIA Study. Clin Chem 2003; 49: 1358- 66.

# **ANEXOS**

## **ANEXO I: Consentimiento Informado**

Información y formulario de consentimiento para el paciente del estudio

### **INFORMACIÓN Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO PARA EL PACIENTE DEL ESTUDIO**

**TÍTULO: Correlación de la Actividad Telomerasa (AT) con marcadores de peroxidación lipídica y sustancias antioxidantes en lesiones potencialmente malignas (LPM) y carcinomas de la mucosa oral.**

(Este estudio es parte de la **Tesis Doctoral de la Od. Evelin Bachmeier**)

**Investigadores responsables del estudio:**

- Prof. Dra. Silvia Adriana López de Blanc
- Od. Evelin Bachmeier

Números de teléfono: 351-155937036, 351-156214725, 351-156633620, 3548- 424041.

### **INVITACIÓN PARA PARTICIPAR**

Se lo invita a participar de un estudio de investigación, éste es gratuito, no conlleva ningún beneficio adicional a su tratamiento ni será pagado por el mismo. 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.

**Disponible en el sitio web: <http://www.cba.gov.ar/vercanal.jsp?idCanal=65473>. 159**

O bien solicitar leer el protocolo de investigación y los datos de los profesionales involucrados en el estudio.

### **¿Por qué se está haciendo este estudio?**

Se ha descrito en la literatura científica que la presencia de una proteína denominada telomerasa y su relación con otras sustancias (tales como el malondialdehído) en distintas lesiones de la mucosa bucal, favorecería (junto con otros factores tales como el cigarrillo y el alcohol) el desarrollo de cáncer bucal. Por otra parte, nuestro cuerpo genera en respuesta al daño que sufren nuestras células, diversos sistemas defensivos (tales como la enzima superóxido dismutasa y el ácido úrico). Si decide participar en nuestro estudio, estas sustancias (telomerasa, malondialdehído, superóxidodismutasa y ácido úrico) serán medidos en tejidos de su cavidad bucal.

El cáncer bucal tiene muchas causas (clínicas, genéticas, bioquímicas y socio culturales) y en ocasiones no permite un diagnóstico temprano y/o preciso. El objetivo de este estudio es obtener información que nos brinde una herramienta más para ayudar a prevenir y a diagnosticar mejor o más tempranamente esta enfermedad; y permitir que se establezcan las pautas adecuadas de tratamiento, que conduzcan a mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por estas patologías.

### **¿Qué se pedirá que haga?**

En caso de lesiones que sus lesiones necesiten biopsias para llegar a un diagnóstico de certeza estomatológico, parte del tejido extirpado que presenta lesión y el sector de mucosa sana adyacente al sitio de la misma, se utilizarán para medir las sustancias antes mencionadas por medio de técnicas de biología molecular (PCR, reacción en cadena de la polimerasa).

La biopsia es un procedimiento diagnóstico de rutina, las mismas serán realizadas por la Od. Evelin Bachmeier, la Dra Silvia López de Blanc, el Od. Gerardo Gilligan o el Od. Dante Gustavo Secchi.

Las complicaciones como dolor, hinchazón, mínimo sangrado, son pocos frecuentes y posibles en toda cirugía menor. Ud. será informado de los resultados del estudio 160

de sus muestras una vez que hayan sido analizadas y controlado clínicamente a las 48 horas y a los 7 días para retiro de los puntos de sutura.

El comienzo de la investigación estimado será en *Marzo de 2017*.. Las muestras biológicas serán almacenadas en freezer de -80° hasta el momento de ser procesadas; tanto el almacenaje como el procesamiento será en el Instituto Viroológico “J. M. Vanella” de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Córdoba).

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.

Cabe aclarar que el procesamiento de las muestras produce que éstas se destruyan por el mismo, pero si ocasionalmente hubiera sobrantes éstos serán conservados por seis meses bajo las condiciones anteriormente citadas (congeladas a -80 grados centígrados) hasta su eliminación. Para la eliminación de dichos sobrantes se seguirán los lineamientos del **Protocolo de Eliminación de Residuos Patológicos** del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET) dependiente de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (vigencia desde 10/2009), acorde a la **Ley Nacional 24051**: Residuos peligrosos y documentos complementarios (Secretaría de Ambiente y Desarrollo sustentable) y a la **Resolución HCD 336/05**: Gestión de Residuos Peligrosos FCQ. Según dicho protocolo, en primera instancia se procederá al tratamiento de los sobrantes de las muestras con desinfectantes químicos para su fijación (formol/formalina) y luego colocados en bolsas rojas de polietileno de 200 micras de espesor que contengan el rótulo “Residuos Patógenos” y que deberán ser llenadas hasta un 80% como máximo de su capacidad, que luego serán recogidas de la Institución por empresas autorizadas de recolección de residuos patógenos.

#### **Participación y compensación:**

Todos los procedimientos realizados durante el estudio, son gratuitos para usted, que es participante del mismo. Por su participación no recibirá compensación económica alguna.

**Responsabilidad:**

Los efectos colaterales o daño son posibles en cualquier programa de investigación, a pesar de utilizar elevados estándares de calidad y pueden ocurrir aún sin falta o falla suya o de los investigadores. Pero si existiera algo eventual, se le proveerá la atención médica que corresponda en tiempo y forma sin que signifique ningún gasto para ud.

Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral de la Od. Evelin Bachmeier (M.P. 6794), quien se desempeña como investigadora principal de este estudio y cuenta con seguro de responsabilidad civil profesional médica con cobertura estipulada en la resolución número 35.467 de la Superintendencia de Seguros de la Nación, a cargo de San Cristóbal Seguros Generales, según póliza 03-11-010236896/5.

En caso de cualquier emergencia llame a la Od. Evelin Bachmeier (teléfono 351155937036) durante las 24 horas o concurra al servicio de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología dirección Haya de la Torre s/n- Pabellón Argentina, 2º piso, los días lunes, miércoles y viernes de 9 a 17 hs y martes y jueves de 9 a 13.00 hs o al Servicio de guardias del Hospital Nacional de Clínicas Santa Rosa 1546 durante las 24 hs (dependiente de la Universidad Nacional de Córdoba).

**¿Cómo se usarán mis datos personales?**

Se le informa que los datos obtenidos durante su atención serán confidenciales, asegurándose su privacidad. Su nombre no figurará en ningún momento, ya que será reemplazado por un código.

Al firmar este formulario de consentimiento informado, usted autoriza al profesional del estudio y al personal auxiliar 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. Asimismo, todos sus datos están protegidos por la Ley Federal de Protección de Datos N°25.326 y reglamentaciones vigentes.

Si se le presenta alguna duda en relación al estudio en el que consiente participar Ud. puede comunicarse con: 162

*Comité Institucional de Ética en Investigaciones en Salud.*

*Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba.*

*Persona de contacto: Coordinadora del CIEIS Prof. Dra. Lidia Levín*

*Días martes de 12 a 14 hs.*

La firma de este consentimiento no significa la pérdida de los derechos que le corresponden de acuerdo a las leyes vigentes en el territorio nacional.

La Od. Evelin Bachmeier y demás investigadores y profesionales colaboradores en este estudio se comprometen a cumplir con los requisitos éticos para investigaciones médicas en seres humanos promulgados por la Asociación Médica Mundial (AAM) en su Declaración de Helsinki (1965) y sus subsiguientes modificaciones (Japón 1975, Italia 1983, Hong Kong 1989, Sudáfrica 1996, Escocia 2000, EEUU 2002, Japón 2004 y Korea 2008) así como aquellos promulgados en la Ley 9694/09 de la provincia de Córdoba; y demás resoluciones pertinentes vigentes en el territorio de la República Argentina.

#### **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 a ninguno de mis derechos, como participante de la investigación. Esto incluye aquellos vigentes en la legislación de la República Argentina y de la Provincia de Córdoba, referidas a normas bioéticas para investigación con personas. Además, este estudio fue aprobado por un Comité de Ética, en acuerdo 163

con las Declaraciones de Nüremberg, Helsinki, y la de Tokio de la Asociación Médica Mundial. El participante es libre de negarse a participar.

Entiendo que si acepto ingresar al estudio y luego decido retirarme, puedo hacerlo sin que ello represente una pérdida de mis derechos como paciente, pudiendo continuar con los controles habituales establecidos por otros profesionales.

---

Firma del paciente Fecha y hora de la firma

Nombre del paciente con letra imprenta

(manuscrito): \_\_\_\_\_

DNI del paciente: \_\_\_\_\_

Certifico que el participante mencionado anteriormente tuvo suficiente tiempo para considerar esta información, tuvo oportunidad de hacer preguntas y aceptó, voluntariamente, participar en este estudio.

---

Firma del investigador o persona delegada que lleva a cabo el proceso de consentimiento informado

Nombre del investigador o persona delegada que lleva a cabo el consentimiento informado con letra de imprenta (manuscrito):

---

DNI y número de matrícula del investigador o persona delegada que lleva a cabo el consentimiento informado: \_\_\_\_\_ 164

Según la disposición 06/2008 emitida por la Dirección Nacional de Protección de Datos Personales (DNPDP), usted podría ser contactado para dar información sobre el proceso de consentimiento informado

\_\_\_\_\_ Firma

del testigo imparcial (si corresponde) Fecha y Hora de la firma

Nombre del testigo imparcial (si

corresponde):\_\_\_\_\_

DNI y domicilio del testigo (si

corresponde):\_\_\_\_\_

Póliza de seguro n°: San Cristóbal seguros.-número 03-11-01023696/5 165

## ANEXO II: Modelo de Historia Clínica

 		<b>HISTORIA CLÍNICA ESTOMATOLOGÍA</b>		H.C. N° ...../...../..... Fecha ...../...../..... Dx. Presuntivo ..... Dx. Histopatológico .....		
<b>DATOS FILIATORIOS</b>						
APELLIDO Y NOMBRE:						
Edad:	Género:	Estado Civil:	Nacionalidad:			
Documento N°	Lugar y Fecha de Nacimiento					
Domicilio actual:		Tel./Cel.:				
Residencias Anteriores:		Obra Social:	Af. N°:			
Nivel de Instrucción:		Profesión/Oficio:				
Derivado por	Alumno:	Demanda Espontánea		Campaña SLC		
	Profesional:	Docente responsable:				
<b>MOTIVO DE CONSULTA</b>						
<b>ANTECEDENTES DE ENFERMEDAD ACTUAL</b> (Tiempo de evolución, consultas, tratamientos previos, sintomatología)						
<b>ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS</b>						
Diabetes	SI	NO	TIPO I	TIPO II	Compensada SI NO	
Hipertensión Arterial	SI	NO	Idiopática	Emocional	Compensada SI NO	
Hipotensión Arterial	SI	NO				
Alergia	SI	NO	medicamentosas	alimentarias	ambientales	
Alteraciones en tracto digestivo	SI	NO				
Alteraciones en sistema respiratorio	SI	NO				
Alteraciones en hígado / vesicular biliar	SI	NO				
Alteraciones dermatológicas	SI	NO				
Alteraciones en sistema genito-urinario	SI	NO				
Enfermedades infectocontagiosas	SI	NO				
Infecciones de transmisión sexual	SI	NO				
Verrugas (HPV)	SI	NO				
Hongos en piel / mucosas	SI	NO				
Alteraciones neurológicas	SI	NO				
Terapia psicológica / Psiquiátrica	SI	NO				
Alteraciones inmunológicas /reumáticas	SI	NO				
Agua de consumo habitual			de red	de pozo	potabilizada	mineral de aljibe
Agua de pozo en zona arsenical	SI	NO	Años:			
Exposición solar o fuentes de calor	SI	NO	Motivo(s):			
Tratamiento médico actual	SI	NO	Cuál/Cuáles:			
Medicación de consumo regular (indicar uso terapéutico)			..... ..... ..... .....			
Tratamientos de medicina alternativa	SI	NO	Cuál/Cuáles:			

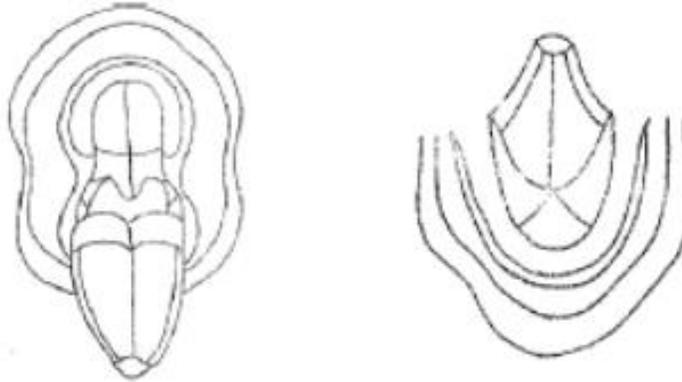
Intervenciones quirúrgicas	SI	NO	Motivo y año:					
Internaciones	SI	NO	Motivo y año:					
Antecedentes Oncológicos	SI	NO	Diagnóstico:					
			Cirugía	Quimioterapia	Radioterapia			
Menstruación regular SI/NO			Amenorrea-Metrorragia - Menopausia (edad.....)					
Embarazo	SI/NO	Semanas:	Controles Ginecológicos Regulares		SI	NO		
			Anticonceptivos		SI	NO		
<b>ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES</b>								
	SI	NO	Patologías o motivo de fallecimiento		SI	NO		
Madre viva			Abuela Materna viva					
Padre vivo			Abuelo Materno vivo					
Hermano/s			Abuela Paterna viva					
Hijos (indicar n°)			Abuelo Paterno vivo					
<b>NUTRICION y DIETA</b>								
Dieta	Omnívora	Vegano	Vegetariano	Otra:	Autoadministrada	Por indicación médica		
Alimentación	Frecuencia semanal de frutas y verduras frescas			Orgánica SI NO				
	Frecuencia semanal de carnes rojas y procesadas, frituras y asados							
<b>TABACO</b>								
¿Fuma?	SI	NO	Desde - Hasta	Cantidad diaria	Subtotal			
¿Ha fumado?	SI	NO						
Cantidad de años de consumo								
TOTAL								
Fumador pasivo	SI	NO	familiar	laboral	durante la infancia			
Tipo de tabaco	cigarrillos rubios		cigarrillos negros	cigarrillos armados	cigarros	pipa		
<b>MARIHUANA Y OTRAS DROGAS</b>								
¿Consuma? ¿Ha consumido?	SI	NO	Cigarrillos semanales		años de consumo			
	Cultivada		Comercializada	Estimación total				
¿Consuma otro tipo de drogas?	SI	NO	¿Cuáles? ¿Cuánto?					
<b>BEBIDAS ALCOHOLICAS</b>								
¿Consuma?	nunca		ocasionalmente	diariamente	semanalmente	ha consumido		
Tipo de bebida	desde	hasta	cantidad diaria	cantidad semanal	subtotal en litros	subtotal en g		
Cerveza								
Vino (tinto-blanco)								
Fernet								
Bebidas blancas								
Total	años:				T	T		
<b>MATE Y OTRAS INFUSIONES</b>								
Consuma	nunca	ocasionalmente	diariamente	ha consumido	periodo	Cantidad diaria	total	temperatura
mate								F-T-C-MC
té								F-T-C-MC
café								F-T-C-MC
TIPO DE YERBA			normal	orgánica			compuesta	
<b>HÁBITOS SEXUALES</b>								
Sexo genital	SI - NO - No contesta		Sexo oral	SI - NO - No contesta			N° de parejas	



**EXAMEN CLÍNICO EXTRAORAL**


**EXAMEN CLÍNICO INTRAORAL**

**Estomatograma**



**Odontograma**

16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	<b>REFERENCIAS</b> COLOR ROJO: Protecciones existentes COLOR AZUL: Protecciones requeridas X: Diente ausente o a cubrir <input type="checkbox"/> : PROTESIS FIJA <input type="checkbox"/> : PROTESIS REMOVIBLE ○: CORONAS CANTIDAD DE DIENTES EXISTENTES <input type="checkbox"/>
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	
Derecha						Izquierda							

Indicadores de salud periodontal						
Sector	Sup Der	Ant Sup	Sup Izq	Inf Der	Ant Inf	Inf Izq
Pérdida de inserción (mm)						
Placa bacteriana visible	SI - NO					
Tártaro visible	SI - NO					