



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“CAMBIOS EPIGENÉTICOS ASOCIADOS A IRRITACIÓN
MECÁNICA CRÓNICA DE MUCOSA BUCAL”**

TESISTA:

OD. JERÓNIMO LAZOS

DIRECTOR:

PROF. DRA. ANA MARÍA ZÁRATE

CÓRDOBA, 2019



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 Doctor en Odontología

CAMBIOS EPIGENÉTICOS ASOCIADOS A IRRITACIÓN MECÁNICA CRÓNICA DE MUCOSA BUCAL

Tesista: Jerónimo Lazos.

Director de tesis: Prof. Dra. Ana María Zárate

Asesor Científico: Prof. Dr. René Panico

Año 2019

Comisión de tesis

Prof. Dra. Ana María Zárate

Prof. Dra. Silvia López de Blanc

Prof. Dr. David Cremonezzi

Jurado de Tesis

Prof. Dra. Silvia López de Blanc

Prof. Dr. David Cremonezzi

Prof. Dra. Sandra Renou (Evaluadora Externa)



EVALUACIÓN AL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: "CAMBIOS INFLAMATORIOS Y EPIGENÉTICOS ASOCIADOS A IRRITACIÓN MECÁNICA CRÓNICA DE MUCOSA BUCAL"

NOMBRE DEL SOLICITANTE: ODONTOLOGO JERÓNIMO LAZOS

NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN Y SEDE DE LA INVESTIGACIÓN: FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNC - CORDOBA - ARGENTINA.

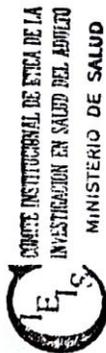
FECHA Y LUGAR DE LA DECISIÓN: 19 de Septiembre de 2013. REUNION DEL CIEIS DEL ADULTO. ACTA N° 150

DECLARACION DE LA DECISION TOMADA: **EVALUACIÓN APROBADA, SE ELEVA A COEIS PARA SU EVALUACIÓN.**

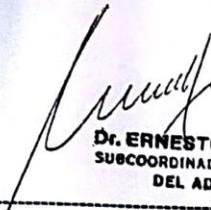
EN EL CASO DE UNA DECISIÓN POSITIVA EL INVESTIGADOR DEBERA:

ENTREGAR LOS REPORTES DE AVANCES.
NOTIFICAR AL CIEIS EN CASO DE ENMIENDAS Y EVENTOS ADVERSOS SERIOS O CUALQUIER OTRO CAMBIO EN LO EVALUADO.
INFORMAR CONCLUSIÓN DEL ESTUDIO O DECISIONES SIGNIFICATIVAS TOMADAS POR CUALQUIER OTRO COMITÉ DE ETICA.

NOTA: DURANTE EL DESARROLLO DEL ESTUDIO PODRIAMOS SOLICITARLE LOS FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE CADA PARTICIPANTE Y CITARLOS A FIN DE VERIFICAR EL CUMPLIMIENTO DE LAS NORMAS ETICAS.



Córdoba, 23 de Septiembre de 2013


Dr. ERNESTO TOLEDO
SUBCOORDINADOR C.I.E.I.S.
DEL ADULTO

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	3
Introducción	4
Irritación Mecánica Crónica y Cáncer Bucal	4
Úlcera Traumática Crónica.....	7
Epigenética y Cáncer Bucal	9
p16.....	11
MGMT	12
Citología exfoliativa y Modelo de boca dividida	13
Hipótesis	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Materiales y métodos	16
Procedimientos clínicos.....	16
<i>Criterios de inclusión y exclusión</i>	16
Procedimientos de laboratorio.....	21
<i>Extendidos Citológicos</i>	21
<i>Extracción de ADN de células de mucosa bucal obtenidas por cepillo</i>	21
<i>Cuantificación ADN</i>	21
<i>Tratamiento con Bisulfito de sodio</i>	22
<i>PCR Específica para Metilación (Methylation Specific PCR - MSP)</i>	24
Análisis estadísticos	26
Resultados	27
Discusión	39
Limitaciones	45
Conclusiones	46
Referencias bibliográficas	47
Anexos	55
Anexo 1	55
Anexo 2.....	58
Anexo 3.....	62
Anexo 4.....	63

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ALEP: Alteraciones Epigenéticas

CEB: Carcinoma de Células Escamosas Bucal

CIEX: Citología Exfoliativa

CpG: islas ricas en Citosina-Guanina

DPM: Desórdenes Potencialmente Malignos

IMC: Irritación Mecánica Crónica

MGMT: O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa

MSP: Methylation Specific PCR; PCR específica para metilación

qPCR: *quantitative Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa, también denominada *PCR en Tiempo Real*.

RB: Retinoblastoma

UTC: Úlcera Traumática Crónica

Resumen

Introducción: la Irritación mecánica crónica (IMC) ha sido propuesta como factor de riesgo para cáncer bucal. Las alteraciones epigenéticas, particularmente la metilación, son eventos tempranos en la carcinogénesis, y ha sido propuesto que la IMC podría inducir las. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue describir la metilación de p16 y MGMT en una lesión específica de IMC: la Úlcera Traumática Crónica (UTC).

Métodos: se usó un modelo de boca dividida, tomando dos muestras por individuo usando citología exfoliativa: una de lesión de UTC y otra de mucosa clínicamente sana de sitio contralateral. Luego de extraer el ADN, fue valorado el estado de metilación para p16 y MGMT usando qPCR. Para el análisis estadístico se utilizó el test de McNemar y Chi cuadrado.

Resultados: se estudiaron 27 pacientes, con edad media 59.1 años. El tiempo de evolución de UTC mostró un promedio de 24.4 meses. Para UTC, la metilación de p16 y MGMT presentó una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$ y $p < 0,0005$, respectivamente) con el sitio control.

Conclusión: los sitios afectados por IMC mostraron consistentemente más metilación de p16 y MGMT que mucosa libre de IMC. Dado que en cada caso las muestras control y estudio fueron del mismo individuo, el efecto de los confundentes se redujo. Esto sugiere que la IMC puede favorecer la carcinogénesis a través de alteraciones epigenéticas.

Abstract

Introduction: Chronic mechanical irritation (CMI) has been proposed as a risk factor for oral cancer. Epigenetic alterations, particularly methylation, are early events in carcinogenesis, and it has been proposed that CMI could induce them. Thus, the aim of this study is to describe p16 and MGMT methylation in a specific CMI lesion: Chronic Traumatic Ulcer (CTU).

Methods: A split-mouth design was used, and two samples per individual were taken using exfoliative cytology: one from a CTU lesion and the other of clinically normal mucosa of a contralateral site. After extracting DNA, p16 and MGMT methylation status was assessed using qPCR. The statistical analysis was performed by McNemar and Chi-square test.

Results: 27 patients were studied, mean age 59.1. CTU evolution time showed an average of 24.4 months. On CTU, methylation of both p16 and MGMT presented a statistically significant association ($p < 0.0001$ and $p < 0.0005$, respectively) when compared to control site.

Conclusion: CMI affected sites showed consistently more methylation of p16 and MGMT than mucosa devoid of CMI. Since in each case both control and study samples were from the same individual, effects of confounders were reduced. This suggests that CMI could foster carcinogenesis through epigenetic alterations.

Introducción

Irritación Mecánica Crónica y Cáncer Bucal

El cáncer de cabeza y cuello es uno de los seis más frecuentes en humanos. Los localizados en boca representan el 48% del total, y de éstos el Carcinoma de células Escamosas Bucal (CEB) es por mucho el más frecuente [1]. Si bien los CEB tienen baja prevalencia en relación a otras lesiones malignas del resto del cuerpo, resultan relevantes por su profundo impacto en la calidad de vida y por presentar un promedio de supervivencia a 5 años de aproximadamente 50% [2]. Históricamente la edad avanzada (≥ 40 años), el consumo de tabaco y de alcohol son considerados los factores de riesgo más importantes para CEB [3]. Sin embargo, dichos factores de riesgo tradicionales no pueden explicar la totalidad de las malignidades bucales [4]. Recientemente avances en la investigación epidemiológica y biomolecular han identificado otros factores de riesgo emergentes y controversiales [5]. Pertenecen a este grupo variables dentarias como enfermedad periodontal, pérdida dentaria e Irritación Mecánica Crónica (IMC) de la mucosa bucal por dientes y/o prótesis dentales [6].

La Irritación Mecánica Crónica (IMC) es producto de una acción mecánica repetida, prolongada y de baja intensidad de un agente irritativo bucal. La mucosa bucal puede presentar diversas lesiones originadas por IMC, de frecuente ocurrencia en la clínica. Entre las más comunes encontramos *morsicatio buccarum* (mucosa mordisqueada), queratosis friccionales, indentaciones, hiperplasias paraprotéticas, pseudopapilomas y úlcera traumática crónica [7]. Además, la IMC puede agravar lesiones preexistentes de la mucosa bucal, como por ejemplo enfermedades ampollares, liquen plano, leucoplasia, estomatitis aftosa y otras [8]. Esta injuria mecánica puede ser producida por piezas dentarias, prótesis dentales y alteraciones funcionales, ya sea actuando separadamente o de manera conjunta

[9]. Los factores capaces de producir IMC pueden ser de tres tipos: dentarios (ej. bordes filosos), protésicos (prótesis dentales removibles) y funcionales como deglución atípica [10].

La IMC ha sido propuesta como factor de riesgo para cáncer bucal [11,12]. Trabajos epidemiológicos describen la posible relación entre IMC y CEB [13]. Sin embargo, los estudios que inicialmente abordaron esta relación fueron insuficientes en el número de casos o en el control de factores confundentes [14]. En estudios experimentales de carcinogénesis inducida químicamente, la irritación repetida de mucosa determina el sitio de aparición del tumor, incrementa la frecuencia, da mayor grado de malignidad y reduce del período de latencia [15,16]. Aquí se evidencia un mecanismo carcinogénico por el cual las células que desarrollaran tumores pueden requerir el efecto promotor de un estímulo inespecífico y no mutagénico. Esto sugiere que la IMC puede, al menos, jugar un rol como promotor y progresor en la carcinogénesis bucal [17]. Si un cáncer es iniciado por otro carcinógeno, la IMC puede acelerar el proceso [18]. Por ejemplo, en fibrosis submucosa oral la IMC aumenta significativamente la presencia de displasia epitelial [19]. Sin embargo, no se considera que la IMC pueda *per se* inducir mutaciones en el ADN; pero sí cambios epigenéticos que inhiben la reparación de ADN, la apoptosis celular y alteran factores de transcripción [20].

La IMC produce un estado hiperproliferativo y un microambiente inflamatorio que pueden favorecer la carcinogénesis a través de la liberación de mediadores químicos y stress oxidativo [21]. Así, sitios sometidos a trauma crónico pueden originar metaplasia, que es un cambio mayor en el fenotipo tisular. Esto ocurre invariablemente en tejidos sometidos a **trauma crónico**, lo que representa un reprogramamiento epigenético de las células madres tisulares [22]. Está bien comprobado que una lesión de cáncer puede desarrollarse a partir de una metaplasia, y de ordinario se presenta la secuencia *metaplasia-displasia-carcinoma*, situación frecuente en el denominado esófago de Barret [23].

Por otro lado, existe evidencia que sugiere que el riesgo de desarrollar cáncer está fuertemente influenciado por el número de divisiones celulares acumuladas en un tejido. La muerte celular activa la división de células madre de capas profundas para regenerar el epitelio dañado. Esta aceleración de la proliferación celular es una fuente mayor de mutaciones, errores replicativos y varios fenómenos que promueven la carcinogénesis [24]. El daño repetido y persistente originado por trauma crónico origina un estímulo persistente de proliferación, en especial cuando produce pérdidas de sustancia [25].

Dvorak ha mencionado similitudes entre la cicatrización de heridas crónicas y la generación de estroma tumoral, llamando al cáncer "*heridas que no cicatrizan*" [26]. La inflamación subclínica y la muerte celular asociada también producen la liberación de moléculas que alertan al sistema inmune evocando regeneración epitelial, angiogénesis, proliferación y, por último tumorigénesis [27]. Los queratinocitos derivados de úlceras crónicas poseen un fenotipo asociado a heridas crónicas, con sobreexpresión de Ki67 y otros marcadores de proliferación [28]. Trabajos en las últimas décadas han consolidado esta hipótesis con bases moleculares firmes [29]. Esto coincide con las condiciones locales producidas por una irritación mecánica persistente, características de una Úlcera Traumática Crónica (UTC) [30].

La asociación entre inflamación y cáncer ya ha sido propuesta en el siglo XIX por Rudolf Virchow, quien observó que los tumores se formaban en sitios de inflamación crónica, y que se encontraban células inflamatorias en los tejidos tumorales [31]. Estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos han demostrado la fuerte asociación entre inflamación crónica y cáncer, correlacionando la persistencia de un medio inflamatorio con un considerable aumento de riesgo de desarrollar cáncer [32]. La inflamación crónica es considerada un importante factor de riesgo para el desarrollo de cánceres, relación que hoy está bien establecida. Se cree que al menos 20% de todas las malignidades nacen en asociación con

inflamación crónica [33]. Esto puede actuar sinérgicamente con otros carcinógenos aumentando el riesgo de CEB, ya que interrupciones en la barrera mucosa (situación característica de UTC), facilitan la penetración de sustancias [34]. Se ha reportado que la irritación crónica facilita la exposición a carcinógenos tales como tabaco, alcohol y otros [35]. Más aún, en sitios de injuria mecánica, el epitelio bucal es una rica fuente tanto de mediadores proinflamatorios como de factores de crecimiento [36]. En consecuencia, la IMC como causa de inflamación crónica podría predisponer a cáncer [27].

La inflamación es una respuesta inmune ante una injuria tisular, caracterizada por una compleja liberación de mediadores con el fin de combatir el agente nocivo, reparar el tejido dañando y restaurar la homeostasis [37]. En la inflamación crónica, esta respuesta es exagerada o mantenida. Esta persistencia puede producir cáncer por degeneración displásica del epitelio reparado, debido a la liberación continua de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno que causan daño en el ADN, otorgando inestabilidad genómica y una ventaja proliferativa para células con mutaciones [38]. Esto ha llevado a proponer que la IMC en boca representa un tejido morfológicamente alterado, en el cual la inflamación crónica causada por factores externos promueve la transformación maligna [39]. Asimismo, el adecuado tratamiento de factores mecánicos injuriantes podría representar una importante medida para reducir el riesgo de cáncer bucal [40]. A pesar de estas evidencias, es poco lo que se conoce sobre los procesos patogénicos que relacionan a la IMC con la carcinogénesis bucal [4].

Úlcera Traumática Crónica

En tejidos blandos bucales, las lesiones causadas por IMC están dentro de las más frecuentes, y entre ellas la denominada UTC es una de las más importantes [41]. La UTC representa la acción de una IMC local y persistente, y la relación **causa-efecto** (agente traumático-lesión) es normalmente evidente [42]. Suele aparecer como lesión única en

bordes de lengua, mucosa labial o mucosa yugal, en relación a dientes o prótesis defectuosos. En piso de boca y fondo de surco puede observarse en usuarios de prótesis removibles, principalmente por flancos sobreextendidos o filosos [43]. Las características clínicas del cuadro son bastante distintivas, y comprenden un fondo blanco-amarillento necrobiótico, bordes elevados y blanquecinos [30]. La forma puede ser aproximadamente circular cuando copia la forma del agente etiológico, cuando es originada por decúbito, o de una forma ovalada, más bien alargada, si está condicionada por factores funcionales [44]. Es común detectar un aumento de la consistencia de los bordes, producido por el infiltrado inflamatorio crónico y la formación de tejido fibroso. Si bien en su inicio la UTC puede producir diferentes niveles de dolor, al cronificarse hay poco o nada de sintomatología, por lo que su diagnóstico suele hacerse luego de un largo período de evolución. Cabe destacar el carácter recurrente de esta lesión, pudiendo observarse en diferentes etapas evolutivas. Histológicamente la UTC presenta epitelio hiperplásico en los bordes, acompañado de un tejido de granulación crónico en la base, con proliferación de vasos sanguíneos, fibroblastos y acompañado por un infiltrado inflamatorio mixto linfoplasmocitario. Al persistir y cronificarse, también puede observarse fibrosis en el tejido conectivo profundo [41,45]. El principal tratamiento para la UTC es remover los factores etiológicos y controlar la evolución. Las lesiones que persistan luego de eliminar la IMC asociada deben ser sometidas a biopsia para descartar malignidad [46].

En el año 1970 Grinspan sugirió que este proceso tenía un gran potencial de transformación maligna, registrando una tasa del 27,7% [47]. Ha habido reportes de casos mencionando transformación de UTC, aunque sin evidencia de sus mecanismos de acción para favorecer la carcinogénesis [48–50]. Se ha mostrado que ulceraciones traumáticas recurrentes aumentan el riesgo de CEB en individuos que no consumen alcohol ni tabaco [51]. Especialmente cuando el trauma crónico produce una UTC, podría reunir las condiciones

para actuar como cofactor promotor de transformación maligna [16,40]. Recientemente, se ha indicado que la UTC debería ser considerado un *desorden potencialmente maligno* (DPM), enfatizando que los atributos biológicos de este proceso aún se desconocen [52,53].

Epigenética y Cáncer Bucal

El desarrollo del CEB representa un complejo fenómeno multietápico que se inicia en un epitelio normal, lo modifican a un epitelio hiperplásico, displásico, carcinoma *in situ* y finalmente en un carcinoma invasivo [54]. Eventos cruciales que disparan la carcinogénesis incluyen la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores [55]. Actualmente en la patogénesis molecular del cáncer bucal se sugiere que, además de los cambios genéticos, están implicadas alteraciones epigenéticas (ALEP). Ambas son complementarias durante las sucesivas fases, por lo que unas pueden predisponer a las otras, como se puede ver en *Figura 1* [20].

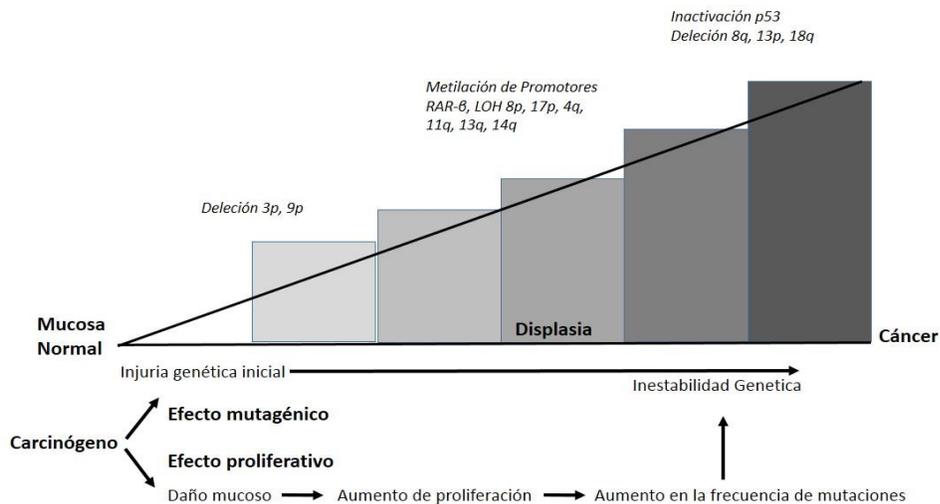


Figura 1. Modelo de progresión en la carcinogénesis bucal multietápica (adaptado de Choi & Meyers 2008).

Las ALEP representan cambios celulares heredables en la expresión génica que no están codificados en la secuencia de ADN [56]. Son cambios heredables y estables a través de múltiples ciclos de división celular, lo que permite a las células presentar diferentes fenotipos a pesar de poseer la misma información genética. Mientras que los cambios genéticos del CEB están bien documentados, el estudio del efecto de las alteraciones epigenéticas es más reciente. El cáncer tiene una base común basada en una disrupción epigenética policlonal de las células madre, e incluso la heterogeneidad tumoral se debe en gran parte a variaciones epigenéticas [57]. La iniciación, promoción y progresión de un cáncer se acompaña de profundas ALEP, sugiriéndose que éstas pueden ser eventos claves y tempranos [58]. Su importancia sobre la carcinogénesis es comparable a las mutaciones genéticas, aunque en contraste, las ALEP se dan con mayor frecuencia y son reversibles [59].

Los mecanismos epigenéticos capaces de modificar la estructura de la cromatina se pueden dividir en cuatro grandes categorías: metilación de ADN, modificaciones covalentes de histonas, mecanismos no-covalentes y ARN no codificante [60]. Una de las más estudiadas es la *hipermetilación del ADN*, que típicamente afecta a las denominadas islas ricas en *Citosina-Guanina (CpG)*, que representan aproximadamente un 1% del genoma [61]. Las islas CpG son regiones de 0.5-2 kilobases ricas en dinucleótidos de citosina-guanina, presentes en el extremo 5' de los genes [62]. Normalmente están ubicadas cerca de la región promotora de algunos genes y se extienden al primer exón. Estudios recientes estiman que el 60% de los genes humanos están asociados a islas de CpG, la mayoría de ellos metilados en todos los tejidos durante el desarrollo. La metilación y desmetilación que tiene lugar en estas islas CpG actúan como interruptores regulando la expresión génica, ya que un gen metilado silencia su expresión. La mayor parte de la metilación de ADN es esencial para el desarrollo normal, jugando un rol primordial en un número de procesos

fisiológicos incluyendo impronta genética (*genetic imprinting*), inactivación del cromosoma X y otros involucrados en diferenciación tisular normal [63].

A su vez, cuando la metilación se encuentra desregulada, puede contribuir al desarrollo de varias enfermedades como cáncer [64]. La metilación de ADN puede ocasionar pérdida funcional de genes en cáncer, similar a mutaciones genéticas como deleciones y mutaciones puntuales [65]. Se considera que la metilación aberrante en islas CpG de genes supresores de tumores es crítica para el desarrollo de un cáncer en sus etapas iniciales [66]. Más aún, se cree que la metilación es un marcador temprano de carcinogénesis bucal, y se ha utilizado para detectar CEB [67]. En éste, se han descrito altos niveles de metilación de varios genes, entre ellos supresores de tumores y detoxificantes de ADN, en tejido adyacente a malignidades, *histológicamente sano*, como así también en DPM bucales, sugiriendo que la metilación es un evento precoz [68].

Los marcadores de metilación de ADN se destacan por su potencial para ofrecer una combinación única de especificidad, sensibilidad, alto contenido de información y aplicabilidad en una amplia variedad de especímenes clínicos. Dichos indicadores de metilación son particularmente útiles para situaciones donde es necesario una escrupulosa detección, como cuando el ADN tumoral es escaso o puede estar contaminado por un exceso de ADN normal [65]. Se han mencionado numerosos genes en relación a hipermetilación de ADN asociada a CEB, destacándose p16 (inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina) y MGMT (O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa) [69].

p16

El gen **p16** se ubica en el *locus 9p21*, también es denominado CDKN2A, Ink4A y p16INK4a [70]. Actúa en el ciclo celular, se lo considera un gen supresor de tumores, ya que es vital para mantener al gen Retinoblastoma (RB) en su forma activa. En células normales, la

actividad de la proteína RB hipofosforilada evita la transición del ciclo celular en el paso de G1 a S. Precisamente, p16 actúa como inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6, lo que mantiene a RB hipofosforilada y activa en su función de represor del ciclo celular [71]. La metilación de p16 ha sido estudiada ampliamente en cáncer de cabeza y cuello, encontrándose en CEB en etapa de cáncer y precáncer [72]. La desregulación del complejo de proteínas RB por metilación de p16 está asociada con transformación maligna en cavidad bucal. Dado que esta alteración origina inactivación genética a través de múltiples vías, se considera que juega un rol mayor en el desarrollo de cáncer bucal [73]. Varios estudios han informado una metilación de 27-76% sobre este gen en CEB en contraposición de un 0% obtenido sobre mucosa sana, mencionándose que la metilación del p16 puede ser un evento temprano en la carcinogénesis bucal [74].

MGMT

Por otro lado, *O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa*, más comúnmente denominada **MGMT** [*locus 10q26*] es una enzima específica de reparación de ADN que remueve lesiones alquilantes, teniendo un rol importante para mantener la fisiología celular normal y estabilidad genómica [65]. Está involucrada en la defensa celular contra los efectos biológicos sobre el ADN de la O-6-metilguanina (O-6-MeG). Repara guaninas alquiladas, transfiriendo el grupo alquilo a una cisteína residual en la enzima [75]. La pérdida de expresión de MGMT por metilación está asociada a incremento de riesgo carcinogénico. Asimismo, está asociada con aumento de riesgo de CEB, y se han informado porcentajes de metilación del 23-75% en tejidos tumorales, y tiende a sobreexpresarse a medida que la severidad de la displasia aumenta [62]. Al igual que p16, la metilación de MGMT también ha sido relacionada con estadios iniciales de lesiones malignas. De hecho, ambas han sido detectadas en lesiones con displasia de bajo grado y en mucosa peritumoral clínicamente

sana, sugiriéndose su utilidad como marcador diagnóstico o pronóstico de transformación maligna [20].

Las ALEP y las mutaciones genéticas pueden producirse por diversas causas, estando influenciadas por la predisposición genética del paciente, así como por otros factores de riesgo para CEB. Dentro de los mismos, se mencionan principalmente tabaco y alcohol, aunque al presente se han propuesto otros como la dieta, ciertos virus (HPV), el consumo de bebidas extremadamente calientes y la irritación mecánica crónica [5]. Se ha informado que estresores externos como el trauma mecánico son capaces de producir ALEP [76].

Citología exfoliativa y Modelo de boca dividida

Actualmente se ha dado un cambio dramático desde métodos de diagnóstico histopatológicos a moleculares. En este sentido, la citología exfoliativa (CIEX) ha ganado importancia como una manera efectiva de obtener células para su estudio [77]. Los cambios a nivel molecular ocurren antes de que puedan ser vistos clínicamente, inclusive antes de que sean observables al microscopio óptico [78]. La identificación de lesiones bucales con riesgo de transformación maligna es clave para reducir la mortalidad, morbilidad y costos de tratamiento para CEB. Por otro lado, individuos con factores de riesgo, como alcohol, tabaco o trauma crónico tienen mayor posibilidad de padecer CEB [5]. En dichos pacientes, la inspección clínica bucal puede complementarse con métodos accesorios para identificar lesiones precursoras o cánceres iniciales [79]. Se ha propuesto el uso de CIEX con métodos analíticos moleculares como un medio para mejorar la detección precoz de CEB [80]. El estudio de ALEP es reciente en lesiones malignas bucales, y la metilación de ADN ha sido propuesta como un biomarcador útil para CEB. De esta manera, la detección de

hipermetilación de ADN sobre muestras de citologías orales puede ser un herramienta diagnóstica y pronóstica valiosa para CEB [70].

Debido a que IMC tiene un sitio de acción específico e identificable, es posible analizar biomarcadores a través del llamado diseño de *boca dividida* (*Split-mouth design*) [81]. En este modelo, se realiza una toma de material del sitio con lesión asociada a IMC y otra del lado contralateral clínicamente sano (sin IMC) en el mismo paciente. Debido a que el criterio para IMC de Piemonte *et al.* [82] permite una valoración objetiva en la identificación de una lesión traumática, es un método simple y seguro para seleccionar el sitio de la toma. Más aún, el modelo de *boca dividida* permite un ajuste excepcional de las variables confundentes, como consumo de tabaco, alcohol e incluso de características propias de cada individuo. De esta manera, se ha mencionado que este enfoque puede ser útil en el estudio de marcadores biomoleculares para la relación entre IMC y CEB [83].

La UTC es una entidad nosológica reconocida como consecuencia de trauma crónico y repetido que presenta inflamación crónica y cambios epiteliales proliferativos, lo que la vuelve adecuada para estudiar ALEP. De esta manera, el rol de la IMC como un estímulo potencial para alterar patrones de metilación de ADN proveen un área fértil de investigación. Las ALEP podrían explicar, en parte, la relación entre IMC y oncogénesis. Si bien existen numerosos trabajos que describen alteraciones epigenéticas en lesiones cancerizables y cáncer bucal [84,85], no hay ninguno en referencia a UTC.

Hipótesis

La UTC de la mucosa bucal se asocia con alteraciones epigenéticas en genes supresores de tumores como p16 y MGMT.

Objetivo general

Determinar alteraciones epigenéticas en Ulcera Traumática Crónica a través de estudios moleculares en citologías exfoliativas de mucosa bucal.

Objetivos específicos

- Estudiar cambios epigenéticos relacionados a la hipermetilación del ADN de los genes supresores de tumores p16 y MGMT en citologías de pacientes con UTC en mucosa bucal.
- Establecer asociaciones entre alteraciones epigenéticas y tiempo evolución de UTC.
- Establecer asociaciones entre alteraciones epigenéticas con factores de riesgo tales como hábito de fumar e ingesta de alcohol en pacientes con UTC.

Materiales y métodos

Procedimientos clínicos

Criterios de inclusión y exclusión

Se realizó un estudio observacional de corte transversal en pacientes mayores de 18 años, que concurrieron a la Cátedra “A” de Estomatología de la Facultad de Odontología en la Universidad Nacional de Córdoba. Todos los individuos que formaron parte de este estudio firmaron un consentimiento informado aprobado por Comité de Ética (CIEIS, Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Adulto, Ministerio de Salud, Hospital Córdoba), Protocolo N° 35/2013 (ver *Anexo 1*, Consentimiento Informado). Los procedimientos realizados fueron conforme con los estándares éticos del Comité institucional y la Declaración de Helsinki de 1964 y posteriores enmiendas.

El examen clínico y toma de fotografías se realizó en un sillón odontológico standard a simple ciego por 3 profesionales previamente calibrados (Od. Jerónimo Lazos, Dr. René Panico y Dr. Eduardo Piemonte). La calibración fue llevada a cabo con sesiones de entrenamiento mediante examen clínico de lesiones en pacientes y fotografías hasta alcanzar un umbral de concordancia ($\kappa > 0.60$).

Se confeccionó una historia clínica *ad hoc* a cada paciente incluido en el estudio. Los datos fueron obtenidos mediante anamnesis directa, registrándose datos personales, demográficos, clínicos, antecedentes personales patológicos y no patológicos, hábitos (ej. consumo acumulado de tabaco, alcohol y mate) y otros.

La inclusión de UTC se realizó de acuerdo al criterio de Lazos *et al.* [44], considerándose presente cuando **todas** las siguientes características fueron encontradas:

- 1) *Lesión clínica objetiva* compatible con origen irritativo mecánico (traumático): *pérdida de sustancia* de fondo amarillento y bordes blanquecinos.
- 2) Más de un mes de evolución: se estableció por la diferencia entre el tiempo del primer síntoma y el momento de la consulta, medido en meses [82].
- 3) El agente traumático debía estar presente *antes* de la iniciación de la lesión (esto se estableció vía anamnesis).
- 4) El agente traumático debía estar en *contacto directo* con la lesión, durante movimientos funcionales/parafuncionales o en posición de decúbito.
- 5) La lesión debe resolver 3-4 semanas luego de remover el agente mecánico causal. En caso de no cicatrizar luego de ese período, se realizó una biopsia para verificar el diagnóstico.

Cabe destacar que la UTC es *una* de las posibles lesiones originadas a consecuencia de IMC, por eso el criterio de identificación es específica para dicha entidad nosológica

Los agentes etiológicos de IMC fueron registrados en tres grupos: dentales, protéticos y funcionales. Los factores dentarios incluyeron: malposición, diastema, brechas desdentadas, incorrecta intercuspidadación, elementos filosos, fracturados o cariados, obturaciones desbordantes/filosas/ásperas, etc. Estos también incluyeron implantes y prótesis fijas como restauraciones coronarias unitarias o múltiples que no puedan ser removidas por el paciente. Los factores protésicos hacen referencia a dispositivos removibles, como dentaduras ásperas o filosas, con falta de retención y/o estabilidad, retenedores defectuosos, flancos sobreextendidos. Por último, los factores funcionales incluyen *disfunciones* (alteración de una función fisiológica, e.g. deglución disfuncional) y *parafunciones* (hábitos diferentes de características fisiológicas como masticación, comunicación, deglución o respiración) [86]. Un ejemplo común de este último grupo es la denominada interposición lingual [87]. Asimismo, los factores de IMC pueden presentarse

conjuntamente en un mismo caso, ej. un paciente con una prótesis sin estabilidad y con flancos rugosos (*Protésico*) más un hábito de interposición lingual (*Funcional*).

El *tiempo de evolución* de la UTC se registró en **meses** a través de una rigurosa inspección clínica y anamnesis, teniendo especial cuidado de evitar el sesgo de memoria, inherente al estudio de IMC y CEB [83]. Por ejemplo, el paciente podría no recordar el inicio de la lesión, pero fue habitual que recordara el momento en que comenzó a usar una nueva prótesis removible con movilidad, que producía molestias. En este caso, el período de acción del agente traumatizante (Factor Protésico) se consideró desde el inicio de uso de dicho dispositivo. En el factor Dentario, un ejemplo puede ser cuando se observa una lesión en relación a una brecha desdentada. A pesar de que el paciente puede desconocer el tiempo de la lesión, normalmente puede recordar bien el momento de la extracción, que fue cuando se creó el espacio, por lo que se toma eso como inicio de la acción del agente traumático. En todos los caso de IMC se utilizó un razonamiento similar.

Los criterios de exclusión fueron: lesiones con diagnóstico de malignidad comprobado por biopsia (punto 5 de inclusión); pacientes con desórdenes potencialmente malignos en cualquier otro sector de cavidad bucal como fuera estipulado por el Centro de colaboración de la Organización Mundial de la Salud para Cáncer y Precáncer Oral [88]; y pacientes sometidos a terapia oncológica (Quimio y/o Radioterapia), farmacológica o inmunomoduladora de cualquier tipo (ej. Corticoides, colchicina, tratamiento para afecciones autoinmunes, etc.) [59,89].

Se consideró *fumador* al individuo que fumó ocasional o regularmente por más de un año. El *consumo de tabaco* fue establecido mediante anamnesis determinando cuántos años duró el período de mayor consumo diario de tabaco y el promedio diario de cigarrillos durante dicho período. Luego se estableció cuántos cigarrillos diarios fumó el paciente antes y después del período de mayor consumo, y cuántos años duraron los períodos

anterior y posterior al de mayor consumo. Para cada período se multiplicó el promedio diario de consumo de tabaco por los años de duración de dicho período, y el resultado fue multiplicado por 365 para obtener el subtotal de cigarrillos fumados en cada período. Los subtotales fueron sumados para obtener así el consumo de tabaco, expresado en número de cigarrillos [4].

Se consideró *bebedor* al individuo que tomaba alcohol ocasional o regularmente por más de un año, independientemente del tipo de bebida. Por el contrario, *No bebedor* fue aquel que no consume ni consumió alcohol habitualmente, o consume ocasionalmente hasta un vaso de bebida semanal por menos de un año [4].

Recolección de la Muestra

Para la recolección de muestras se usó un modelo de *boca dividida* (Split-mouth design) [90]. A cada paciente incluido se le realizó citología exfoliativa de la UTC y del sector contralateral *clínicamente sano*. Las citologías exfoliativas se realizaron utilizando cepillo endocervical estéril (*Cytobrush*, Medibrush ®Plus, Medical Engineering Co.S.A. Bs As. Argentina). Un único operador (JL) le realizó a cada paciente 2 (dos) extendidos utilizando cepillo: uno de la UTC y otro del lado opuesto a la misma clínicamente sano. De esta forma, se establecieron dos grupos:

A) Grupo Estudio: conformado por las citologías exfoliativas de **UTC** conforme a los criterios de inclusión expuestos anteriormente.

Criterios para identificación de **Irritación Mecánica Crónica**
(*P i e m o n t e , L a z o s & B r u n o t t o 2 0 1 0 [8 2]*)

Lesión clínica objetiva compatible con origen traumático (eritema, atrofia, ulceración, queratosis, hiperplasia) con evolución de más de un mes

El agente traumático debe estar presente **antes** de la iniciación y/o modificación de la lesión (vía anamnesis)

El agente traumático debe estar en **contacto directo** con la lesión, durante movimientos funcionales/ parafuncionales o en posición de decúbito

Tabla 1. Criterios para identificación de Irritación Mecánica Crónica

B) Grupo Control: formado por citologías exfoliativas del sector contralateral *clínicamente sano* del mismo paciente. Por esto nos referimos *libre de IMC* según Piemonte *et al.* [82] y cualquier otra lesión clínica (ver criterios en *Tabla 1*). De esta manera, se tomaron dos muestras de cada caso *en el mismo paciente*: Estudio (UTC) y Control.

En la Figura 2 se puede ver un ejemplo clínico de cómo fue realizado este procedimiento.

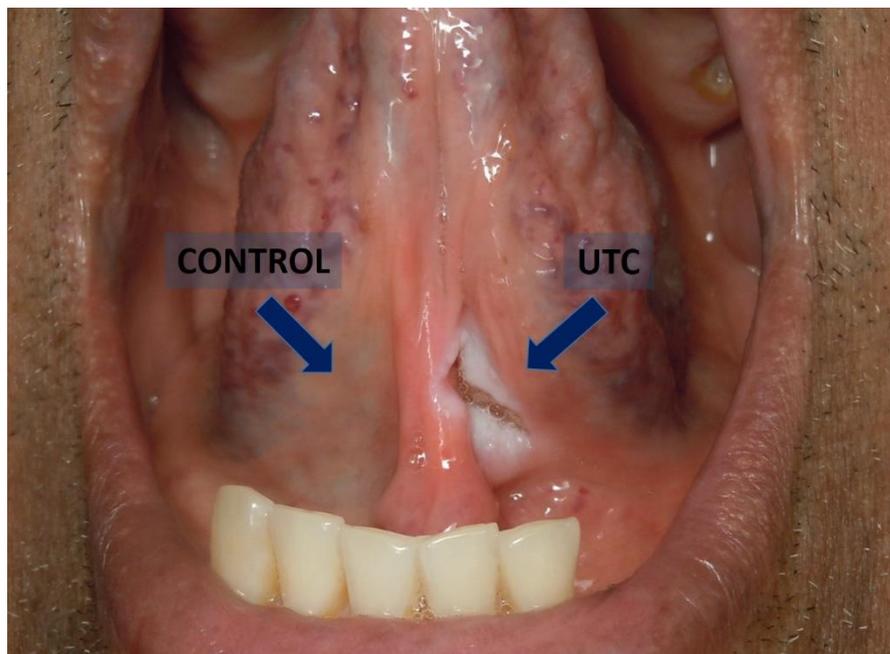


Figura 2. Ejemplo de selección de sitio de toma de la citología. En el sector izquierdo vemos la lesión (UTC), mientras que en el contralateral derecho vemos el sector clínicamente sano (Control).

Procedimientos de laboratorio

Citología Exfoliativa

El extremo de cada cepillo usado para las citologías fue cortado y colocado en tubos Eppendorf estériles, cada uno rotulado con un código para su posterior identificación. Las muestras en tubos fueron guardadas en freezer a -20°C hasta su extracción de ADN y posterior aplicación de técnica PCR específica para metilación.

Extracción de ADN de células de mucosa bucal obtenidas por cepillo

- 1) Cada muestra de células se resuspendió en 500 µl agua estéril y 200 µl de alcohol 70°. Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos con el cepillo adentro. Luego, se retiró el cepillo y se mantuvo en heladera durante 30 minutos, volviendo a centrifugar a 14.000 rpm durante otros 5 minutos.
- 2) Se eliminó el sobrenadante, manteniendo el *pellet* así formado en el tubo.
- 3) Se dejó secar y se adicionó 150 µl de buffer de extracción (TRIS-CLH más EDTA), más 10 µl de solución de Proteinasa K en concentración 1mg/ml.
- 4) Se incubó durante 30 minutos a 50°C en baño de agua.
- 5) Se adicionaron 150 µl de isopropanol frío para la precipitación del ADN.
- 6) Se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm.
- 7) Se descartó el sobrenadante y se lavará con 300 µl de alcohol 70%.
- 8) Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 14.000 rpm
- 9) Se descartó el sobrenadante, y finalmente el pellet de ADN recuperado se resuspendió en 75 µl de buffer TE 1x.

Cuantificación ADN

El ADN recuperado fue cuantificado mediante la relación de absorbancia en espectrofotómetro. Dado que las reacciones que usan ácidos nucleicos requieren grados

particulares de *pureza* para un óptimo rendimiento, esto se cuantificó [91]. Esta relación fue medida con el índice 260/280, debiendo ser de ≥ 1.7 , indicando un grado aceptable. Por otro lado, también se cuantificó la cantidad de líquido final. A estos fines se utilizó el lector Synergy HT de (Biotek USA, Winooski, Vermont) [92]. Tanto éste como los posteriores procedimientos de laboratorio fueron llevados a cabo en el *Laboratorio de Biología Periodontal* de la Facultad de Odontología en la Universidad Chile (Santiago, Chile), a cargo de la Dra. Marcela Hernández Ríos, con la supervisión de la Tecnóloga Médica Jessica Astorga.

Tratamiento con Bisulfito de sodio

El ADN extraído fue sometido a tratamiento de desnaturalización y bisulfito de sodio usando el EZ DNA Methylation-Gold™[93] kit. Para óptimo rendimiento, éste requirió una cantidad final de líquido de 200 a 500 ng *como mínimo* por muestra. Con esto se logró un $\geq 75\%$ de recuperación de ADN y una eficiencia de conversión $>99\%$ de residuos de Citosina no metilados a Uracilo. El protocolo utilizado fue el siguiente [93]:

- 1) Se adicionó 130 μl de *reactivo de conversión CT* a 20 μl de la muestra de ADN en un tubo de PCR. Si el volumen de la muestra de ADN fue menor a 20 μl , se debió llenar el volumen con agua. Se mezcló la muestra golpeándola o por pipeteo, luego de dar una pequeño *spin* para bajar el líquido que quedó en la tapa del tubo.
- 2) Se colocó el tubo de la muestra en un termociclador (Axygen® MaxyGene, Corning Life Science, USA) [94] con el siguiente programa: 98° por 10 minutos, 64° por 2.5 horas.
- 3) Se adicionó 600 μl de *M-Binding Buffer* a la *Zymo-Spin IC Column* y se colocó la columna dentro del tubo colector.
- 4) Se cargó la muestra del paso 2 en la *Zymo-Spin IC Column* conteniendo el *M-Binding Buffer*. Se debió cerrar la tapa y mezclar invirtiendo la columna varias veces.

- 5) Se centrifugó a alta velocidad ($>10.000 \times g$) por 30 segundos, para luego descartar el eluido.
- 6) Se adicionó 100 μl de *M-Wash Buffer* a la columna. Se centrifugó a alta velocidad (más o igual de $10.000 \times g$) por 30 segundos.
- 7) Se adicionó 200 μl de *M-Desulphonation Buffer* a la columna y se esperó a temperatura ambiente ($20-30^\circ \text{C}$) por 15-20 minutos. Después de la incubación, se centrifugó a alta velocidad (más o igual de $10.000 \times g$) por 30 segundos.
- 8) Se adicionó 200 μl de *M-Wash Buffer* a la columna. Se centrifugó a alta velocidad (más o igual de $10.000 \times g$) por 30 segundos. Se adicionaron otros 200 μl de *M-Wash Buffer* a la columna y se centrifugó a alta velocidad por 30 segundos.
- 9) Se colocó la columna de un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se adicionaron 10 μl de *M-Elution Buffer* directamente en la matriz de la columna. Se centrifugó a alta velocidad (más o igual de $10.000 \times g$) por 30 segundos para eluir el ADN.
- 10) El ADN está listo para análisis inmediato, o bien pudo ser almacenado a -20° o menos para su uso posterior. Se recomendó utilizar **1-4 μl del eluido** de ADN para cada PCR. Ver *Figura 3*.

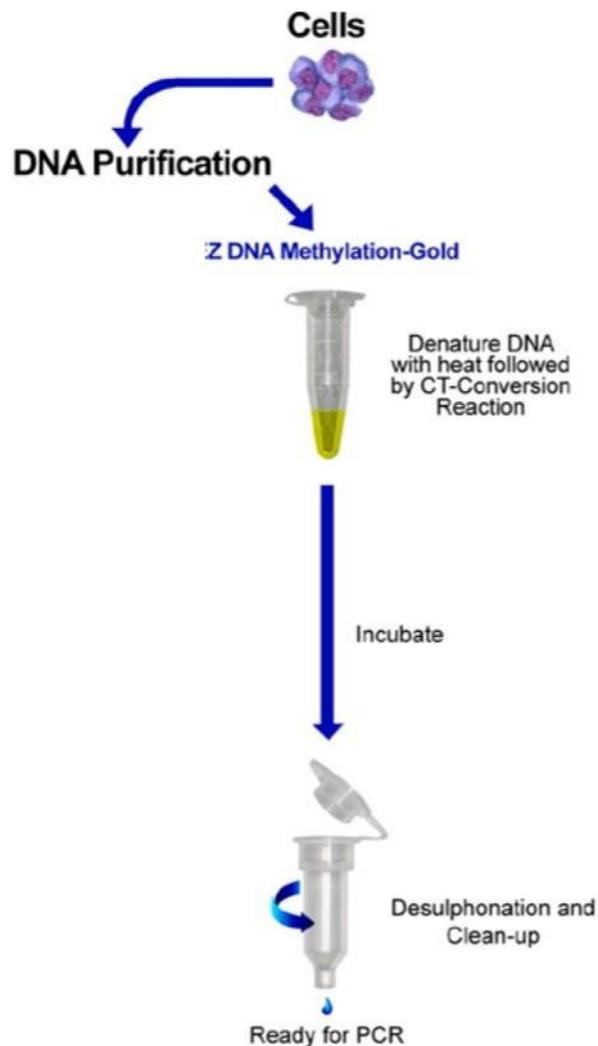


Figura 3. Esquemática del procedimiento de qPCR (Modificado de VanEde & Karberg 2008)

PCR Específica para Metilación (Methylation Specific PCR - MSP)

El estado de metilación de los genes p16 y MGMT en las muestras fue determinado por MSP. El ADN modificado fue utilizado como plantilla para MSP, con lo que el patrón de metilación de ADN en las islas CpG de los genes p16 y MGMT fue determinado por modificaciones químicas de citocinas no metiladas a uracilo y subsecuente qPCR (por *quantitative Polymerase Chain Reaction*, también llamada *PCR en tiempo real*), utilizando

primers específicos para secuencias metiladas y no metiladas. Los controles correspondientes fueron incluidos en cada reacción de qPCR.

Los primers utilizados se encargaron a InvitroGen (Life Technologies, California, USA), y fueron los siguientes:

Para p16:

Para reacción de secuencias *no metiladas*: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' (sense) y 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3' (antisense)

Para reacción secuencias *metiladas*:

5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' (sense) y

5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3' (antisense)

Para MGMT:

Para reacción de secuencias *no metiladas*: 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3' (sense) y

5'-AACTCCACACTCTTCCAAAACAAAACA-3' (antisense)

Para secuencias *metiladas*: 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3' (sense) y 5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG-3' (antisense).

El procedimiento de qPCR se llevó a cabo en una termocicladora de Applied Biosystems, modelo StepOne Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, USA), usando el siguiente programa de ciclado:

- 1) 95° C por 3 minutos: para la separación de la doble cadena de ácidos nucleicos del ADN.

- 2) Anillamiento (Annealing): *cuarenta ciclos* de 95° por 30 segundos, luego 55° para p16 o 63° para MGMT por 30 segundos, para lograr la unión de los primers a la plantilla de ADN.
- 3) 95° por 15 segundos, 55° por 1 minuto y finalmente otros 95° por 15 segundos, para facilitar la polimerización llevada a cabo por la ADN polimerasa.

Cada caso fue sometido a 8 reacciones en total: para p16 metilado y no metilado del lado control y de UTC; para MGMT metilado y no metilado del lado control y UTC. Los productos de qPCR fueron resueltos en gel de agarosa al 3% y visualizados con tinción de plata [67]. Finalmente, los eluidos finales de toda la muestra fueron enviados para purificación y secuenciación génica a MacroGen Inc. USA (Piccard Drive, Rockville).

Análisis estadísticos

Las variables *categorías* fueron descritas mediante frecuencias absolutas y relativas, en porcentaje; las *cuantitativas* por sus valores de dispersión (error standard) y sus valores de posición (media/mediana). El análisis de las asociaciones entre las diferentes variables se realizó mediante coeficiente de correlación McNemar y Chi-cuadrado. Se consideró estadísticamente significativo a un p-valor <0,05. Los datos se analizaron utilizando software informático Infostat 2018.

Resultados

En el período 2013-2017 se revisaron un total de 93 pacientes con lesiones compatibles con UTC. De éstos fueron excluidos 66 casos, con lo cual la muestra final (n=27) fue sometida al tratamiento con bisulfito, qPCR y posteriores análisis estadísticos. En la *Figura 4* se observa el flujograma con donde se detalla cronológicamente en qué etapa del proceso y la razón por la cual se excluyeron los casos.

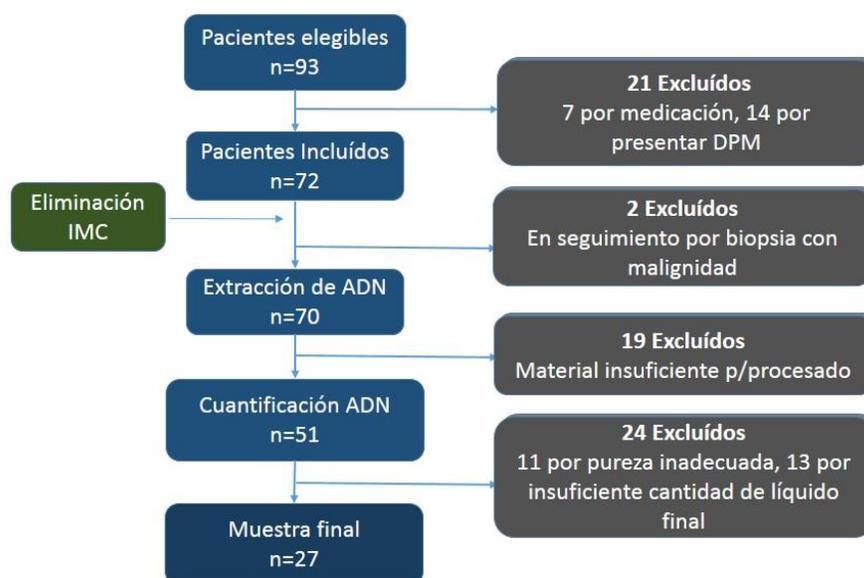


Figura 4. Diagrama de Flujo la población bajo estudio mostrando los pacientes excluidos en orden cronológico. DPM= Desórdenes Potencialmente Malignos; IMC= Irritación Mecánica Crónica.

En características demográficas, 41% (n=11) fueron mujeres y 59% (n=16) hombres. La edad media fue de 59 años (rango 33-81 años). En lo referente a *Hábitos de tabaco y alcohol*: 7% (n=2) consumo simultáneo de alcohol y tabaco; 30% (n=8) sólo tabaco; 26% (n=7) sólo alcohol; y 37% (n=10) sin tabaco ni alcohol. El *consumo acumulado de tabaco* presentó una media de 124.684 cigarrillos (rango 24.090-365.000). Sin embargo, sólo uno de los fumadores tuvo un consumo acumulado mayor de 190.000 cigarrillos. El período de

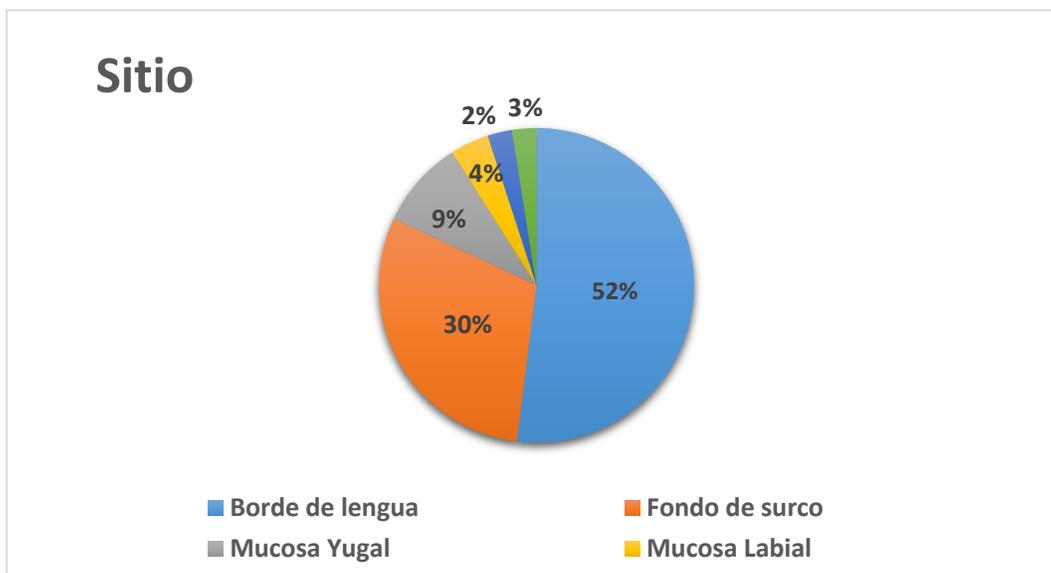


Figura 5. Localización de las UTC de la muestra inicial (n=77).

consumo de tabaco tuvo una media de 13 años (rango 2-41 años). El 37% (n=10) de la población relató consumo de mate, pero todos ellos con agua de temperatura normal o tibia.

Con la totalidad de los casos de UTC, habiendo excluido los asociados a DPM (n=14) y aquellos con diagnóstico de cáncer en el seguimiento (n=2), se realizó una **caracterización clínica** de la UTC (Anexo 2) con 77 casos. Esto se hizo para mostrar las características de todos los pacientes, ya que posteriormente se compararon los casos excluidos con los casos incluidos. La distribución por género fue un 60% (n=46) de femenino y 40% (n=31). La distribución por sitio y edad se pueden ver en la Figura 5 y 6, respectivamente.

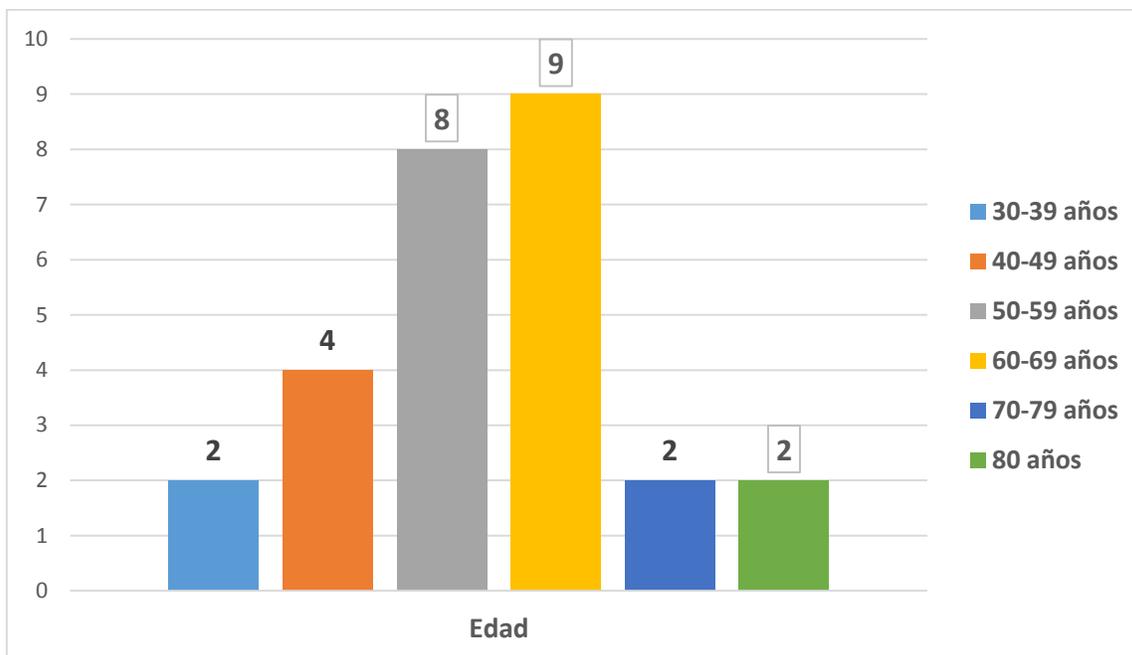


Figura 6. Distribución por grupos de Edad en la muestra final (n=27)

La **consistencia** a la palpación se clasificó en tres: sin cambios discernibles, aumento parcial (sólo una parte de la lesión denotaba consistencia aumentada) y aumento de consistencia total. En las lesiones de entre 5 a 13 meses (n=7), sólo una presentó aumento de consistencia parcial. Las entre 14 a 22 meses (n=18) tuvieron más cambios: 10 con aumento parcial, 7 con aumento de consistencia de toda la lesión y sólo una sin cambios en la consistencia (Figura 7). Finalmente, en las UTC con más de 23 meses (n=52), 93% presentaron consistencia aumentada en toda la lesión. Las lesiones con exposición a IMC de ≥ 29 meses presentaron más frecuentemente aumento de consistencia generalizado (X^2 , $p < 0,0001$).

El **color de los bordes de la UTC**, se describió como *Blanco/Rojo (B/R)* cuando en el mismo existían ambos colores, y en *Blanco* cuando la totalidad del borde fue blanca. Todas las lesiones de 5 a 13 meses (n=7), tuvieron bordes blancos y rojos, en tanto que en las de 14 a 22 (n=18) hubo 8 con bordes B/R y 10 con bordes blancos. En lesiones con más de 23 meses (n=52), 88% (n=46) tuvieron bordes enteramente blancos y sólo 12% (n=6)

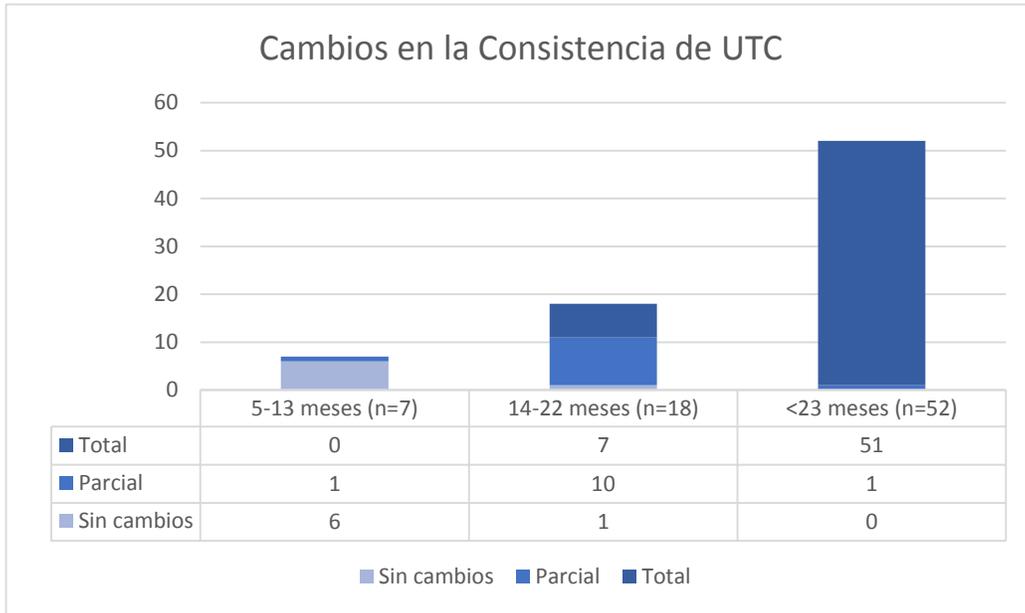


Figura 7. Cambios en la consistencia de UTC acorde al tiempo de evolución (n=77)

presentaron bordes rojos y blancos (Figura 8). En conclusión, a mayor tiempo de la UTC, el color del borde fue completamente blanco ($p=0,0004$). Asimismo, hubo asociación de más tiempo de evolución con mayor diámetro de la UTC ($p=0,0006$). Por otro lado, el tiempo no condicionó la forma ($p=0,40$), edad ($p=0,42$) o género ($p=0,14$).

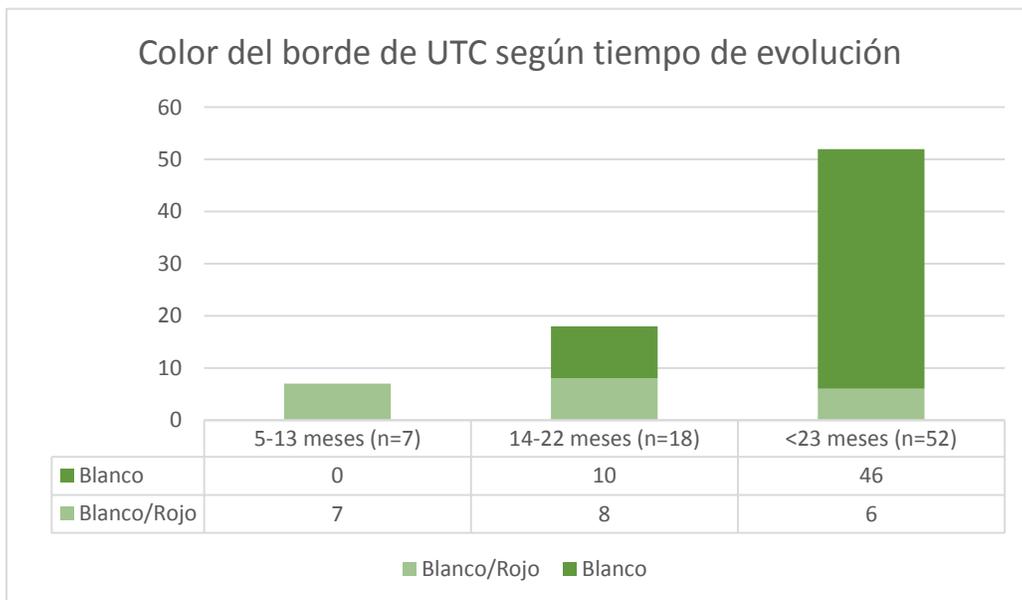


Figura 8. Color de los bordes UTC acorde al tiempo de evolución (n=77)

El tipo de IMC condicionó la **forma**: en factor Dentario hubo más forma ovalada (53%) y circular (44%), $p < 0,0001$. El factor Protésico presentó más forma alargada (56%) y oval (33%), $p < 0,0001$; en último lugar, el factor Funcional tuvo más oval (50%) y alargada (30%), $p = 0,0016$. El aumento de consistencia de toda la lesión sólo tuvo asociación significativa con los factores dentarios ($p = 0,05$). Los casos asociados a factores Funcionales ($n = 60$) presentaron un diámetro mayor que los sin éste (12 mm y 9.6mm, respectivamente), aunque esta diferencia no fue significativa ($p = 0,09$). Las UTC relacionadas a factores Protésicos ($n = 36$) se ubicaron preferentemente en Fondo de surco (64%), con una media de 30.3 meses. Como es habitual, estas estuvieron asociadas a fibrosis reactiva paraprótesis [43]. Así, los factores Dentarios ($n = 45$) tuvieron un tiempo menor (28 meses), y su ubicación preferencial fue borde de lengua (82%). Sin embargo, la diferencia en el tiempo no fue significativa.

Se realizó una comparación del **grupo de UTC** incluido ($n = 27$) con aquellas excluidas debido a inconvenientes en la toma y procesamiento de las muestras ($n = 50$), con el propósito de determinar si los casos incluidos para el estudio con qPCR eran representativos de todos los pacientes vistos con diagnóstico de UTC. Se excluyeron de este análisis los pacientes con presencia de DPM en otro sector bucal ($n = 14$) y malignidad evidenciada por biopsia realizada en el seguimiento ($n = 2$). Excepto para género y tiempo de IMC, la distribución de las variables es similar entre las UTC de la muestra final y las excluidas (*Anexo 3*).

En los extendidos citológicos de Grupo Control (clínicamente sano) se encontraron células epiteliales con ausencia de inflamación (Anexo 4). Por el contrario, en el grupo Estudio (UTC) se observaron signos inflamatorios (Figura 9).

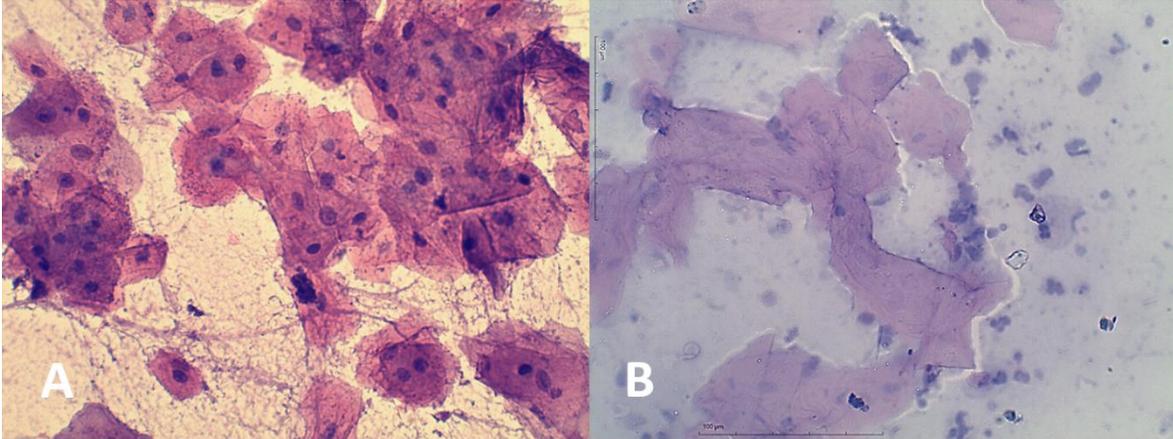


Figura 9. A) Extendido citológico de grupo Control (x40). B) Extendido de Grupo Estudio (UTC, x40)

Los **agentes etiológicos de IMC** fueron:

- **Factores Funcionales (n=19):** en todos los caso se presentaron combinados; en diez (n=10) casos se asoció con Factores Dentarios, y en nueve (n=9) con Factores Protésicos.
- **Factores Protésicos (n=15):** de ellos un caso (n=1) estuvo combinado con un Factor Dentario, en nueve (n=9) con Factor Funcional, y en cinco (n=5) fueron el único factor de IMC. En la *Figura 10* se puede ver un ejemplo clínico de dicho factor combinado con un funcional, que en este paciente provocaba una compresión de la musculatura peri orbicular al tragar (*deglución disfuncional*).

- Factores Dentarios (n=13): de los cuales un caso (n=1) estuvo combinado con un Factor Protésico, en diez (n=10) estuvieron combinados con Factor funcional y en dos casos (n=2) el Dentario fue el único factor de IMC. En las *Figuras 11 y 12* se pueden ver ejemplos clínicos en diferentes sitios.

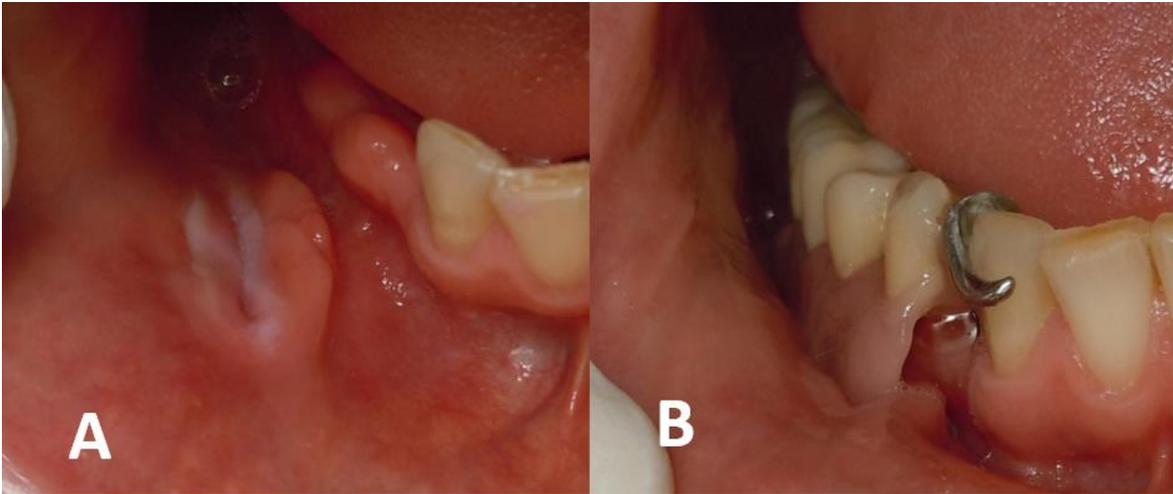


Figura 10. Caso clínico ilustrando el Factor Protésico y Funcional (♀ 64 años, 36 meses de evolución). A) UTC de bordes blanquecinos y alargada en sentido antero-posterior; B) La prótesis defectuosa in situ, con movilidad y falta de adaptación.



Figura 11. Caso clínico que ilustra el Factor Dentario y Funcional (♂ 68 años, 18 meses de evolución). Se puede ver la UTC en borde lingual y los dientes filosos; el paciente había desarrollado el hábito de frotar la lengua contra la arcada dentaria.



Figura 12. Ejemplo del Factor Dentario y Funcional (♀ 68 años, 28 meses de evolución) sobre mucosa labial.

Los *Factores Funcionales* encontrados fueron: Interposición lingual (n=9), mordisqueamiento (n=9), succión (n=1) y deglución disfuncional (n=1). Dentro de los *Factores Protésicos*: prótesis rugosas/filosas (n=9), flancos sobre extendidos (n=10), falta de estabilidad (n=14) y falta de retención (n=8). Cabe destacar que todas las prótesis removibles revisadas en relación a UTC presentaban alguna alteración de las mencionadas. Con respecto a los *Factores Dentarios*, hubo malposiciones (n=3), diastema (n=1), dientes con bordes filosos (n=10) y dientes con obturaciones filosas/rugosas/desbordantes (n=4). Sólo 30% (n=8) de la muestra tuvo un solo factor de IMC (dental ó protésico), mientras que la mayoría de los casos (70%, n=19) presentaron una combinación de los mismos.

En referencia a la **ubicación**: 48% (n=13) estuvieron en borde de lengua, 26% (n=7) en fondo de surco vestibular, 7,3% (n=2) en Mucosa labial, 7,3% (n=2) en Mucosa Yugal, 7,3% (n=2) en Piso de Boca y 4% (n=1) en Cara ventral de lengua. Para el Factor *Protésico*, el sitio más frecuente fue Fondo de surco, mientras que para el *Dentario* fue el borde de lengua.

El **tiempo de evolución** de la UTC tuvo un promedio de 24,4 meses (rango 5-48 meses).

En la *Figura 13* se los factores de IMC de la muestra estudiada.

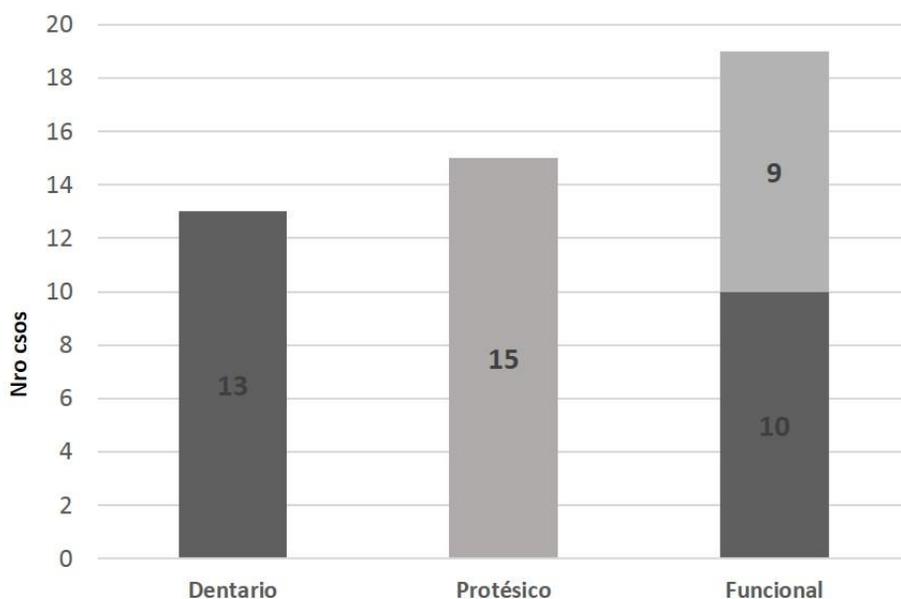


Figura 13. Distribución de factores de IMC. Los Funcionales se presentaron combinados en todos los casos.

Los **resultados de la qPCR** tanto para UTC como para control de ambos genes (p16 y MGMT) se muestran en la *Tabla 2* y en la *Figura 14*.

Tabla 2. Patrones de metilación en UTC y Control.			
	UTC	Control	p-valor*
MGMT	20% (5/25)	76% (19/25)	0.001
MGMTm	80% (20/25)	24% (6/25)	0.0005
p16	16% (4/26)	72% (18/25)	0.001
p16m	85% (22/26)	20% (5/25)	<0.0001

Negrita denota significancia estadística. *Según Test de McNemar. UTC=Úlcera Traumática Crónica; MGMT=no metilado; MGMTm= metilado; p16= no metilado; p16m= metilado. Entre paréntesis figura el número de resultados positivos sobre el número del total de casos estudiados para el correspondiente gen.

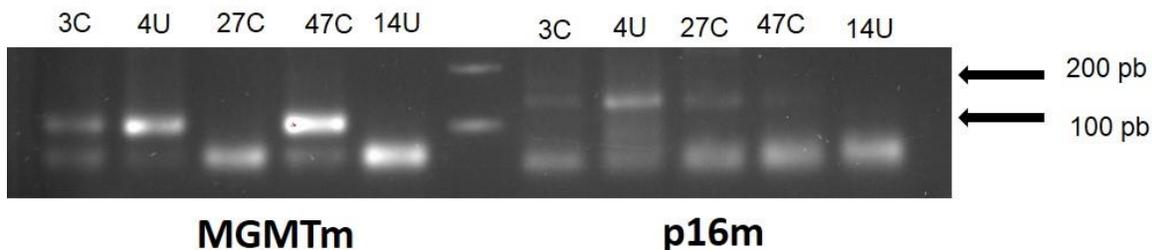


Figura 14. PCR específica para metilación de MGMT y p16 en control (C) y UTC (U) de los casos 3, 4, 27, 47 y 14. pb= pares de bases.

Cabe destacar que para algunos casos (5, 7, 8 y 26) no se pudo obtener una lectura adecuada de todas las reacciones de qPCR por cantidad insuficiente de muestra para todas las reacciones necesarias. Los resultados completos para todas las reacciones se muestran en la en *Tabla 3*.

En resumen, genes no metilados (tanto p16 como MGMT) fueron más frecuentes en el *Grupo Control*; a su vez, los metilados se asociaron más al Grupo de UTC, con significancia estadística en todos los casos.

En cuanto a variables clínicas, sólo se encontró asociación significativa en *MGMT* y *p16 metilado* en *pacientes fumadores*, $p=0,04$ y $p=0,02$ respectivamente; 7% ($n=2$) consumo simultáneo de alcohol y tabaco; 30% ($n=8$) sólo tabaco.

Para el resto de las variables no se encontraron asociaciones significativas para **p16 no metilado** con género ($p=0,07$), edad ($p=0,31$), tabaco ($p=0,65$) y alcohol ($p=0,28$). Por otro lado, en **p16 metilado** tampoco hubo asociación: género ($p=0,13$), edad ($p=0,07$) y alcohol ($p=0,82$).

Similarmente, para **MGMT no metilado** no hubo asociaciones significativas en relación a género ($p>0,99$), edad ($p=0,16$), tabaco ($p=0,30$), alcohol ($p=0,65$). Tampoco hubo diferencias para **MGMT metilado** para género ($p>0,99$), edad ($p=0,16$) y alcohol ($p=0,50$).

Tabla 3. Resultados qPCR de toda la muestra.

Caso	G	Edad	Meses	(U)MGMT	(U)MGMTm	(U) p16	(U) p16m	(C)MGMT	(C)MGMTm	(C) p16	(C) p16m
1	M	80	13	-	+	-	+	+	+	+	-
2	F	54	36	+	+	-	+	+	-	+	-
3	M	33	11	-	+	-	+	+	-	+	+
4	M	68	12	-	+	+	+	+	+	+	-
5	M	56	5	-	+	-	+	XX	XX	XX	XX
6	M	61	12	+	+	-	+	+	-	-	-
7	F	67	14	XX	XX	XX	XX	+	-	-	-
8	M	39	26	XX	XX	XX	XX	+	-	+	+
9	M	64	12	-	-	-	+	+	-	-	-
10	F	69	24	-	+	-	+	-	-	+	-
11	F	68	18	-	+	-	+	-	-	+	-
12	M	58	24	+	+	+	+	+	-	-	+
13	M	63	12	-	+	-	+	+	-	+	-
14	M	48	24	-	-	+	-	-	-	+	-
15	M	74	16	-	+	-	+	+	-	+	-
16	F	52	36	-	+	-	+	+	-	+	-
17	F	46	18	-	+	-	+	+	-	-	-
18	M	59	22	-	+	-	+	-	+	-	-
19	M	49	30	+	+	-	+	+	+	+	-
20	F	66	24	-	+	-	+	+	-	+	-
21	M	49	32	-	-	+	-	+	-	+	-
22	F	70	40	-	+	-	+	+	+	-	-
23	F	56	48	+	-	-	+	-	-	+	-
24	F	69	28	-	+	-	+	+	-	+	+
25	F	51	36	-	-	-	+	-	-	+	-
26	M	57	42	-	+	-	-	XX	XX	XX	XX
27	M	81	44	-	+	-	+	+	+	+	+
		59,5	24,41	5	20	4	22	19	6	18	5

G= Género; (U)MGMT= MGMT no metilado en UTC; (U)MGMTm= estado de MGMT metilado en UTC; (U)p16=p16 no metilado en UTC; (U)p16m=p16 metilado en UTC; (C)MGMT=control MGMT no metilado; (C)MGMTm=control MGMT metilado; (C)p16=control p16 no metilado; (C)p16m=control p16 metilado; XX=datos faltantes.

Discusión

La evidencia actual para la asociación entre IMC y CEB es limitada. En general, los estudios de esta relación tienen muestras de menor tamaño que aquellos sobre factores clásicos como tabaco y alcohol. El trabajo de Velly *et al.* es un ejemplo del primer grupo, contando con 717 casos de cáncer y 1434 controles. Mientras tanto, un estudio reciente de Winn *et al.* sobre causas de cáncer bucal focalizando alcohol y tabaco tuvo 25.500 pacientes con cáncer de cabeza y cuello, y 37.100 controles [95]. Las revisiones sistemáticas y meta-análisis podrían subsanar esta limitación. Entre ellos, podemos mencionar los trabajos de Manoharan *et al.* (2014) y Singhvi *et al.* (2017) [96,97]. Ambos encontraron asociación estadísticamente significativa entre cáncer bucal e IMC, especialmente en relación al uso de prótesis removibles defectuosas. Sin embargo, la heterogeneidad metodológica de los estudios hizo que muchos fueran excluidos, ya sea por falta de un criterio claro para definir la presencia de trauma crónico, o bien por valoración parcial de las fuentes potenciales de IMC [83].

En el presente estudio, se destaca el alto número de casos excluidos (n=66), dado que se redujo considerablemente la muestra producto de los estrictos criterios utilizados. El descartar casos por presencia de DPM (n=14) buscó evitar sesgos, ya que estos cuadros pueden presentar alteraciones epigenéticas [70,98]. Por la misma razón, los pacientes con diagnóstico de malignidad en seguimiento (n=2) o con medicación tampoco fueron incluidos [80,84].

Los casos excluidos por inconvenientes de *procesamiento en el laboratorio* (n=43) se debieron fundamentalmente a deficiencias en la toma de las muestras. Dado el alto número de reacciones demandadas, no sólo se necesitaba de una buena pureza de ADN sino también una gran cantidad de material en cada muestra. Para evitar esto se debería usar

al menos dos cepillos por sitio de toma, e idealmente cuantificar el ADN inmediatamente para constatar pureza y concentración.

Existe tan sólo un trabajo descriptivo sobre UTC (realizado por nuestro grupo de trabajo), con una población ligeramente mayor (n=44) con un período de reclutamiento similar: cinco años [44]. Si consideramos los casos excluidos por dichas deficiencias técnicas, de los cuales se obtuvo datos detallados, la población bajo estudio fue aún mayor. Así, los criterios aplicados reducen el error sistemático (sesgo), permitiendo una mejor valoración de la muestra [99]. También cabe destacar que ambos grupos de UTC (muestra final, n=27 y las excluidas por inconvenientes de laboratorio, n=50) presentaron escasas diferencias, por lo que se puede tomar a la población estudiada como representativa de dicha entidad nosológica.

Para analizar adecuadamente los resultados, consideraremos brevemente algunas características de la población estudiada. En la misma, hubo un 37% de uso de tabaco, y el consumo acumulado fue bajo, con una media de 124.684 cigarrillos. Esto difiere del estudio de Lazos *et al.* (de nuestro grupo de investigación), donde el 52% (n=23) del grupo de UTC presentaba el hábito de fumar [44]. Asimismo, sólo un 32% presentó consumo de alcohol. Sin embargo, dado que en el modelo de boca dividida ambas muestras (UTC y control) fueron del mismo individuo, el efecto encontrado en los perfiles de metilación probablemente pueda responder a la presencia de IMC y no de estas variables.

El diseño de boca dividida es adecuado porque remueve la variabilidad inter individual, mejorando así la validez del estudio. Además, nuestro enfoque salva los problemas más comunes de este diseño cuando se usa para evaluar terapias diferentes para cada lado. El *efecto de transmisión* (carry-across), puede ocurrir cuando un tratamiento realizado de un lado impacta al otro por falta de barreras naturales en boca, situación típica en estudios de periodoncia donde se compara diferentes tratamientos en el mismo individuo. Esto se evita

con el uso de un criterio objetivo y validado para identificar IMC, de manera que el sitio control está libre de injuria mecánica. Por otro lado, el análisis estadístico de los datos se realizó teniendo en cuenta el diseño metodológico de datos apareados, propio para este modelo [90].

Los *factores de IMC* se presentaron en su mayoría combinando el Factor Funcional con otro (Dentario o Protético) en la mayoría de los casos (70%, n=19), valor similar al informado en otro estudio (76.5%) [44]. Esto enfatiza la importancia de los factores funcionales para la producción de IMC, variable que ha sido tenida en cuenta en un limitado número de trabajos sobre el tema [83]. Por lo tanto, esto puede explicar por qué la mera existencia de dientes o prótesis defectuosas no fue calificada como factor de riesgo para CEB en estudios previos [100]. De hecho, el tener incluso ambos factores (dientes y prótesis defectuosas) *no significa que se producirá una lesión por IMC*. Muchos individuos pueden poseer dientes o prótesis en mal estado, no obstante pocos desarrollan lesiones mecánicas. Por consiguiente, los factores funcionales pueden aumentar la intensidad del contacto y su frecuencia, permitiendo así la persistencia de la injuria mecánica. Siendo así, resulta llamativo que la inmensa mayoría de los estudios sobre irritación mecánica analizan de manera individual los factores de trauma, ya sea dentarios o protéticos. Un mismo individuo puede tener diastemas, malposiciones, pérdida de dientes e incluso usar una prótesis defectuosa y no tener ninguna lesión clínica con todos estas potenciales fuentes de trauma [83].

Dentro de los Factores Dentarios, la presencia de dientes filosos fue el más asociado a UTC (77%, n=10), lo que está con concordancia con estudios previos [13,44].

No menos importante resulta el análisis de los Factores Protésicos, ya que en nuestro estudio **todas** las prótesis en relación a UTC presentaban alguna alteración: rugosas/filosas, flancos sobre extendidos, falta de estabilidad y/o retención. Este hallazgo

ha sido corroborado en otros estudios, incluyendo dos revisiones sistemáticas [25,44,96,97,101]. Preventivamente, los usuarios de dispositivos removibles deben ser revisados periódicamente para identificar cualquier alteración temprana de la mucosa [102].

En referencia a la localización, no es sorprendente que los sitios más afectados fueran lengua y fondo de surco vestibular, considerando que son zonas que se encuentran en contacto continuo con dientes y prótesis, respectivamente. Prácticamente la mitad de los casos (48%, n=13) se presentó en lengua, lo cual puede explicarse porque la *interposición lingual* fue el factor funcional más frecuente. Resulta destacable que tanto UTC como CEB se ubican de manera predominante en sitios de potencial irritación por dientes y prótesis. Esto sugiere que identificar la irritación mecánica como un potencial carcinógeno puede tener un gran impacto en estrategias de tratamiento y prevención [103].

El tiempo de evolución de IMC ha sido referido en pocos estudios, y sólo uno -fuera de reportes de casos- específicamente en UTC. Si tomamos en cuenta los casos excluidos por problemas en la fase de procesamiento en laboratorio, la media del tiempo fue de 31,5 meses, similar al informado anteriormente, de 33 meses [44]. En este sentido, la UTC presenta un tiempo de IMC similar a CEB. La IMC en relación a UTC y CEB necesita ser persistente, cubriendo un largo período de tiempo. Esto desacredita la noción que una o varias injurias accidentales pueden relacionarse a CEB. Por el contrario, se requiere una irritación prolongada y repetida para crear las condiciones que favorezcan la carcinogénesis. Algunos trabajos refieren de manera indirecta el período temporal de IMC usando la historia de úlceras recurrentes asociadas a prótesis [25,101]. A pesar de que el tiempo de evolución no es especificado, se refiere el hecho de que el trauma toma lugar *antes* del diagnóstico de cáncer bucal. Sin embargo, es más adecuado determinar IMC cuando existe una *lesión objetiva* en *contacto directo* con un factor potencialmente irritativo, y dicho factor mecánico debe estar presente *antes* de la aparición de dicha lesión [82]. Esta

restricción en el registro del tiempo es inherente tanto para el estudio de IMC como CEB, usualmente debido al largo tiempo que lleva el desarrollo de un carcinoma, máxime si éste presenta poca sintomatología, situación similar a la IMC. Su impacto sólo puede disminuirse utilizando una rigurosa anamnesis e inspección clínica para determinar el comienzo de la irritación mecánica, valorando los factores dentarios, protésicos y funcionales de cada caso [83].

La hipermetilación de ADN puede ocasionar una desregulación en los mecanismos de proliferación y control genético, eventos que se han demostrado en CEB. Los patrones de metilación aberrantes en genes supresores de tumores, oncogenes y genes de reparación de ADN han sido propuestos como herramientas de detección para el desarrollo de cáncer en etapas iniciales subclínicas, incluso antes de la aparición de cambios histológicos [104].

En el presente estudio examinamos la hipermetilación de la región promotora del gen supresor de tumores p16 y del gen reparador MGMT en UTC y mucosa clínicamente sana del mismo paciente. La frecuencia de metilación de p16 ha sido informada por otros autores en un rango de 27-76% y del 23-75% para MGMT en cáncer bucal [84,105]. Nuestros resultados muestran una proporción relativamente mayor para UTC, del 85% en p16 y del 80% en MGMT. En todas las muestras, además de las metilaciones, se observaron secuencias de ADN no metiladas, en concordancia con otros trabajos [106]. La metilación observada en UTC y mucosa contralateral clínicamente sana fue de 85% y 20% para p16 y de 80% y 24% para MGMT, respectivamente. El mayor porcentaje de metilación en nuestras muestras puede reflejar diferencias inherentes a mecanismos moleculares relacionados a IMC. Más aún, nuestro estudio indica que mucosa sometida a IMC y mucosa bucal contralateral clínicamente sana pueden presentar diferencias moleculares, sugiriendo daño inicial epigenético con mayor riesgo de progresión a malignidad. Por lo tanto, es

razonable conjeturar que una exposición continua a IMC de mucosa bucal puede inducir metilación de p16 y MGMT.

Con todo, en 4 casos de p16 y 5 de MGMT también observamos que tanto UTC como el correspondiente control exhibían metilación (ver *Tabla 2*). Las alteraciones epigenéticas del mismo paciente en sitios con y sin IMC pueden atribuirse al proceso de cancerización de campo por otros carcinógenos, que promueven dichos cambios moleculares tempranamente. El silenciamiento genético ocurre en las etapas más tempranas de la carcinogénesis, y pueden darse alteraciones epigenéticas en células normales bajo condiciones de stress, mucho antes de la aparición del tumor [56].

Nuestros resultados definen el perfil de metilación de mucosa sometida a IMC, sugiriendo inactivación de los genes p16 y MGMT a través de metilación de la región promotora, lo cual es un evento temprano observado CEB. La presencia de metilación de los genes p16 y MGMT se consideran como eventos iniciales en transformación maligna bucal. Varios estudios han mencionado metilación de genes promotores asociado con consumo de tabaco fumado y masticado, uso de betel, cáncer y precáncer [65,70,105,107]. No obstante, este es el único trabajo que ha investigado los patrones de metilación de p16 y MGMT en IMC de mucosa bucal. En este sentido, el número de potenciales alteraciones epigenéticas producto de IMC e inflamación asociada puede ser mucho mayor al ilustrado en este trabajo, lo que supone una subestimación del efecto carcinogénico [54].

El tratamiento principal para la lesiones producidas por IMC -como la *Úlcera Traumática Crónica*- consiste en la eliminación de factores etiológicos, que de ordinario se puede realizar de manera sencilla, estando al alcance de un odontólogo general. Es importante establecer un diagnóstico y tratamiento adecuado para UTC, dado que éstas pueden jugar un rol en la carcinogénesis bucal [50].

Limitaciones

En base a los antecedentes existentes consideramos que nuestro trabajo es representativo de UTC, aunque serían necesarias muestras más grandes y de diferentes lugares geográficos para dar mayor validez a los resultados.

Si bien la metilación de genes p16 y MGMT usualmente se asocia con silenciamiento génico, no llevamos a cabo los análisis de expresión génica. Esto permitiría asociar alteraciones epigenéticas con pérdida efectiva de función, mediante expresión proteica o niveles de ARNm [3]. Se requieren más estudios para validar estos hallazgos usando análisis de expresión.

Conclusiones

- Los sitios afectados por UTC mostraron más metilación de p16 y MGMT que mucosa libre de IMC.
- No se encontró asociación entre el tiempo de evolución y alteraciones epigenéticas.
- Dado que ambas muestras (UTC y control) fueron del mismo individuo, el efecto de otros factores de riesgo para cáncer bucal (consumo de tabaco y alcohol) está controlado.
- Las alteraciones epigenéticas presentes en p16 y MGMT en UTC podrían representar riesgo de transformación maligna.
- En nuestro trabajo, la cantidad de material extraído de las muestras por citología exfoliativa condicionó la aplicación de las técnicas de laboratorio, por lo que se aconseja tomar al menos dos muestras de cada caso con cepillos de buena calidad.
- Se requieren más estudios para profundizar en los posibles mecanismos moleculares que asocien IMC a cáncer bucal.

Referencias bibliográficas

1. Neville BW, Day TA. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52:195-215.
2. Morelatto RA, Herrera MC, Fernández EN, Corball AG, López de Blanc SA. Diagnostic delay of oral squamous cell carcinoma in two diagnosis centers in Córdoba Argentina. *J Oral Pathol. Med.* 2007; 36:405-8.
3. Dos Santos Costa SF, Brennan PA, Gomez RS, Fregnani ER, Santos-Silva AR, Martins MD, et al. Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: Is it any different from older patients? *J Oral Pathol Med.* 2018; 47:541-6.
4. Piemonte ED. Cáncer bucal: diseño y evaluación de un índice de riesgo multifactorial. 2015 [citado 2017 dic 15]; Available from: <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/1757>
5. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer – an appraisal of controversies. *Br Dent J.* 2009; 207:471-5.
6. Tezal M, Scannapieco FA, Wactawski-Wende J, Hyland A, Marshall JR, Rigual NR, et al. Local Inflammation and Human Papillomavirus Status of Head and Neck Cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012; 138:669.
7. Bruch JM. *Clinical Oral Medicine and Pathology.* Totowa, NJ: Humana Press; 2010.
8. Lanfranchi HE. Estomatología y PTR. En: *Prótesis total removable: Fundamentos, Técnicas y Clínica en Rehabilitación Bucal.* Buenos Aires: Hacheace; 2002. págs. 395–449.
9. Grinspan D. *Enfermedades de la boca: Semiología, patología, clínica y terapéutica de la mucosa bucal.* Tomo I. Buenos Aires: Mundi; 1970.
10. Vigaros E, de Bataille C, Campana F, Fortenfant F, Fricain J-C, Sibaud V. Chronic or recurrent ulceration of the tongue. *Ann Dermatol Venereol* 2016; 143:297-308; quiz 295-6, 309-10.
11. Thumfart W, Weidenbecher M, Waller G, Pesch H-J. Chronic mechanical trauma in the aetiology of oro-pharyngeal carcinoma. *J Maxillofac Surg.* 1978; 6:217–221.
12. Velly AM, Franco EL, Schlecht N, Pintos J, Kowalski LP, Oliveira BV, et al. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 1998; 34:284-91.
13. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl.* 2005; 1-66.
14. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* 2001; 65:328-39.

15. Konstantinidis A, Smulow JB, Sonnenschein C. Tumorigenesis at a predetermined oral site after one intraperitoneal injection of N-nitroso-N-methylurea. *Science* 1982; 216:1235-7.
16. Pérez MA, Raimondi AR, Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34:17-22.
17. Sato T. A study on effect of mechanical irritation in development and progression of tongue cancer. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 1995; 62:532-50.
18. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral pathology: clinical pathologic correlations [Internet]. Seventh edition. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017 [citado 2018 nov 8]. Available from: <http://myaccess.library.utoronto.ca/login?url=http://ebookcentral.proquest.com/lib/utoronto/detail.action?docID=4355775>
19. Dayal N, Reddy R, Anuradha Bhat K. Malignant potential of oral submucous fibrosis due to intraoral trauma. *Indian J Med Sci.* 2000; 54:182-7.
20. Verma M, Srivastava S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *The Lancet Oncol.* 2002; 3:755-63.
21. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem.* 2006; 387:365-72.
22. Allison MR. Stem Cell Plasticity. En: *Encyclopedia of cancer / Manfred Schwab* (ed.). Berlín: Springer; 2009. págs. 2816-8.
23. Naini BV, Souza RF, Odze RD. Barrett's Esophagus: A Comprehensive and Contemporary Review for Pathologists. *Am J Surg Pathol.* 2016; 40:e45-66.
24. Calderón-Montaña JM, Jiménez-Alonso JJ, Guillén-Mancina E, Burgos-Morón E, López-Lázaro M. A 30-s exposure to ethanol 20% is cytotoxic to human keratinocytes: possible mechanistic link between alcohol-containing mouthwashes and oral cancer. *Clin Oral Investig.* 2018; 22:2943-6.
25. Rotundo LDB, Toporcov TN, Biazevic GH, de Carvalho MB, Kowalski LP, Antunes JLF. Are recurrent denture-related sores associated with the risk of oral cancer? A case control study. *Rev Bras Epidemiol.* 2013; 16:705-15.
26. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986; 315:1650-9.
27. Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous Damage-Associated Molecular Pattern Molecules at the Crossroads of Inflammation and Cancer. *Neoplasia* 2009; 11:615-28.
28. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and

- Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. *Adv Skin Wound Care*. 2012; 25:11.
29. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res* 2015; 3:1-11.
 30. Cavalcante GM, Paula RJS de, Souza LP de, Sousa FB, Mota MRL, Alves APNN. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cir Bras*. 2011; 26:227–234.
 31. Lonkar P, Dedon PC. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer*. 2011; s128:1999-2009.
 32. Keibel A, Singh V, Sharma MC. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Curr Pharm Des*. 2009; 15:1949–1955.
 33. Herszényi L, Lakatos G, Hritz I, Varga MZ, Cierny G, Tulassay Z. The Role of Inflammation and Proteinases in Tumor Progression. *Dig Dis*. 2012; 30:249-54.
 34. Tezal M. Interaction between Chronic Inflammation and Oral HPV Infection in the Etiology of Head and Neck Cancers. *Int J Otolaryngol*. 2012; 2012:575242.
 35. Hashibe M, Jacob BJ, Thomas G, Ramadas K, Mathew B, Sankaranarayanan R, et al. Socioeconomic status, lifestyle factors and oral premalignant lesions. *Oral Oncol*. 2003; 39:664-71.
 36. Chen L, Arbieva ZH, Guo S, Marucha PT, Mustoe TA, DiPietro LA. Positional differences in the wound transcriptome of skin and oral mucosa. *BMC Genomics* 2010; 11:471.
 37. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454:428-35.
 38. Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2000; 60:184-90.
 39. Sarode SC, Sarode GS, Karmarkar S, Tupkari JV. A new classification for potentially malignant disorders of the oral cavity. *Oral Oncol*. 2011; 47:920-1.
 40. Piemonte E, Lazos J, Belardinelli P, Secchi D, Brunotto M, Lanfranchi-Tizeira H. Oral cancer associated with chronic mechanical irritation of the oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2018; 23:e151-60.
 41. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. *Oral pathology: clinical pathologic correlations*. 5th ed. St. Louis, Mo: Saunders/Elsevier; 2008.
 42. Anura A. Traumatic oral mucosal lesions: a mini review and clinical update. *Oral Health Dent Manag*. 2014; 13:254-9.

43. Burket LW, Greenberg MS, Glick M. Burket's oral medicine: diagnosis & treatment. 10th ed. Hamilton, Ontario: BC Decker; 2003.
44. Lazos JP, Piemonte ED, Lanfranchi HE, Brunotto MN. Characterization of Chronic Mechanical Irritation in Oral Cancer. *Int J Dent*. 2017; 2017:6784526.
45. Grinspan D. Enfermedades de la boca: semiología, patología, clínica y terapéutica de la mucosa bucal - Tomo II. Buenos Aires: Mundi; 1975.
46. Walsh T, Liu JLY, Brocklehurst P, Glennly A-M, Lingen M, Kerr AR, et al. Clinical assessment to screen for the detection of oral cavity cancer and potentially malignant disorders in apparently healthy adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; CD010173.
47. Grinspan D, Díaz J, Abulafia J, Villapol LO et al. Enfermedades de la boca: semiología, patología, clínica y terapéutica de la mucosa bucal. Tomo I: Patología clínica y terapéutica de la mucosa bucal. Buenos Aires: Mundi; 1973.
48. Kumar M, Singh PP, Saxena D, Singla N. Chronic Trauma As Precipitating Factor Of Squamous Cell Carcinoma Of Tongue – 3 Case Reports. *Indian J Dent Sciences*. 2014; 6:29-31.
49. Randhawa T, Shameena P, Sudha S, Nair R. Squamous cell carcinoma of tongue in a 19-year-old female. *Indian J Cancer* 2008; 45:128-30.
50. Nelonda R, Setiadhi R. Management of chronic traumatic ulcer mimicking oral squamous cell carcinoma on the tongue. *Dental J. (Majalah Kedokteran Gigi)* 2018; 51:76.
51. Huang J, He B, Chen F, Liu F, Yan L, Hu Z, et al. Association between oral hygiene, chronic diseases, and oral squamous cell carcinoma. *Chin J Prev Med*. 2015; 49:688-92.
52. Panta P, Sarode SC, Sarode GS, Patil S. 'Chronic traumatic ulcer of lateral tongue'- An underestimated 'oral potentially malignant disorder'? *Oral Oncol*. 2018; 85:101-2.
53. Lazos JP, Panico RL, Gilligan GM, Piemonte ED. Comment on "'Chronic traumatic ulcer of lateral tongue' – An underestimated 'oral potentially malignant disorder'?" *Oral Oncol*. 2019; 89:155-6.
54. Beerewinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, Kinzler KW, Velculescu VE, et al. Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput. Biol*. 2007; 3:e225.
55. Choi S, Myers JN. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. *J Dent Res*. 2008; 87:14-32.
56. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes Cancer*. 2011; 2:607-17.

57. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003; 299:1753-5.
58. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:21-33.
59. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:27-36.
60. Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci* 2012;13:2331-53.
61. Worm J, Guldborg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J. Oral Pathol. Med.* 2002;31:443-9.
62. Roth MJ, Abnet CC, Hu N, Wang Q-H, Wei W-Q, Green L, et al. p16, MGMT, RARbeta2, CLDN3, CRBP and MT1G gene methylation in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Oncol. Rep.* 2006;15:1591-7.
63. Tomizawa S-I, Nowacka-Woszek J, Kelsey G. DNA methylation establishment during oocyte growth: mechanisms and significance. *Int. J. Dev. Biol.* 2012;56:867-75.
64. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat. Res.* 2008;647:30-8.
65. Radhakrishnan R, Kabekkodu S, Satyamoorthy K. DNA hypermethylation as an epigenetic mark for oral cancer diagnosis: Epigenetic markers of oral cancer. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2011;40:665-76.
66. Shaw RJ, Hall GL, Lowe D, Bowers NL, Liloglou T, Field JK, et al. CpG island methylation phenotype (CIMP) in oral cancer: Associated with a marked inflammatory response and less aggressive tumour biology. *Oral Oncology* 2007;43:878-86.
67. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer research* 2000;60:892–895.
68. Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol.* 2006;7:77-82.
69. Don KR, Ramani P, Ramshankar V, Sherlin HJ, Premkumar P, Natesan A. Promoter hypermethylation patterns of P16, DAPK and MGMT in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Indian J Dent Res* 2014;25:797-805.
70. López M, Aguirre JM, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, et al. Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients--a diagnostic and/or prognostic tool? *Eur. J. Cancer* 2003;39:2306-9.

71. González-Moles MA, Rodríguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Martínez AB, Morales-García P, González-Moles S. p16 Expression in Squamous Carcinomas of the Tongue. *Onkologie*. 2002; 25:433-6.
72. Huang M-J, Yeh K-T, Shih H-C, Wang Y-F, Lin T-H, Chang J-Y, et al. The correlation between CpG methylation and protein expression of P16 in oral squamous cell carcinomas. *Int J Mol Med*. 2002; 10:551-4.
73. Akanuma D, Uzawa N, Yoshida MA, Negishi A, Amagasa T, Ikeuchi T. Inactivation patterns of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*. 1999; 35:476-83.
74. Bascones-Martinez. Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review). *Oncology Reports* [Internet] 2011 [citado 2017 dic 14]; 25. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/or/25/5/1203>
75. Zang H, Fang Q, Pegg AE, Guengerich FP. Kinetic analysis of steps in the repair of damaged DNA by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *J Biol Chem* 2005; 280:30873-81.
76. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003; 33 Suppl:245-54.
77. Mehrotra R, Hullmann M, Smeets R, Reichert TE, Driemel O. Oral cytology revisited: Oral cytology revisited. *J Oral Pathol Med*. 2008; 38:161-6.
78. Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer*. 2006; 5:11.
79. Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J Am Dent Assoc*. 1999; 130:1445-57.
80. Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol*. 2008; 44:10-22.
81. Zhu H, Zhang S, Ahn C. Sample size considerations for split-mouth design. *Stat Methods Med Res*. 2017; 26:2543-51.
82. 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; 513–517.
83. Piemonte ED, Lazos J. Evidence for chronic mechanical irritation as a causative factor in oral cancer: application of Bradford Hill criteria. *Translational Research in Oral Oncol*. 2018; 3:2057178X1879103.
84. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol*. 2004; 40:145-53.

85. Kordi-Tamandani DM, Moazeni-Roodi A-K, Rigi-Ladiz M-A, Hashemi M, Birjandian E, Torkamanzehi A. Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. *Arch Oral Biol* 2010; 55:809-14.
86. Khawaja SN, Nickel JC, Iwasaki LR, Crow HC, Gonzalez Y. Association between waking-state oral parafunctional behaviours and bio-psychosocial characteristics. *J Oral Rehabil.* 2015; 42:651-6.
87. Lambrechts H, De Baets E, Fieuws S, Willems G. Lip and tongue pressure in orthodontic patients. *Eur J Orthod.* 2010; 32:466-71.
88. 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.
89. Nair N, Wilson AG, Barton A. DNA methylation as a marker of response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2017; 18:1323-32.
90. Lesaffre E, Philstrom B, Needleman I, Worthington H. The design and analysis of split-mouth studies: what statisticians and clinicians should know. *Stat Med* 2009; 28:3470-82.
91. Tataurov AV, You Y, Owczarzy R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophys Chem.* 2008; 133:66-70.
92. Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader: Fluorescence-Luminescence - Overview [Internet]. [citado 2018 nov 2]; Available from: <https://www.biotek.com/products/detection-multi-mode-microplate-readers/synergy-htx-multi-mode-reader/>
93. VanEden M, Karberg M. EZ DNA Methylation-Direct. :10.
94. Axygen® MaxyGene Thermal Cycler II: Simplified Workflow – Improved Throughput [Internet]. [citado 2018 nov 2]; Available from: <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/resources/videos/axxygen-maxygene-thermal-cycler-ii.html>
95. Winn DM, Lee Y-CA, Hashibe M, Boffetta P, INHANCE consortium. The INHANCE consortium: toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer. *Oral Dis.* 2015; 21:685-93.
96. Manoharan S, Nagaraja V, Eslick GD. Ill-fitting dentures and oral cancer: a meta-analysis. *Oral Oncol.* 2014; 50:1058-61.
97. Singhvi H, Malik A, Chaturvedi P. The role of chronic mucosal trauma in oral cancer: A review of literature. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2017; 38:44.
98. Cruz AF, de Resende RG, de Lacerda JCT, Pereira NB, Melo LA, Diniz MG, et al. DNA methylation patterns of genes related to immune response in the different clinical forms of oral lichen planus. *J Oral Pathol. Med.* 2018; 47:91-5.

99. Lucas RM, McMichael AJ. Association or causation: evaluating links between «environment and disease». *Bull. World Health Organ.* 2005; 83:792-5.
100. Lockhart PB, Norris CM, Pulliam C. Dental factors in the genesis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* 1998; 34:133-9.
101. Vaccarezza GF, Antunes JLF, Michaluart-Júnior P. Recurrent sores by ill-fitting dentures and intra-oral squamous cell carcinoma in smokers. *J Public Health Dent.* 2010; 70:52-7.
102. Jain P, Jain M, Prasad BV, Kakatkar GS, Patel M, Khan J. A Case-control Study for the Assessment of Correlation of Denture-related Sores and Oral Cancer Risk. *J Contemp Dent Pract.* 2016; 17:930-3.
103. Perry BJ, Zammit AP, Lewandowski AW, Bashford JJ, Dragovic AS, Perry EJ, et al. Sites of Origin of Oral Cavity Cancer in Nonsmokers vs Smokers: Possible Evidence of Dental Trauma Carcinogenesis and Its Importance Compared With Human Papillomavirus. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015; 141:5.
104. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001; 61:3225-9.
105. Huang S-H, Lee H-S, Mar K, Ji D-D, Huang M-S, Hsia K-T. Loss expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to betel quid chewing in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109:883-9.
106. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002; 21:4231-6.
107. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 2001; 61:249-55.

Anexos

Anexo 1. Información y formulario de consentimiento para el paciente del estudio (CIEIS, Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Adulto, Ministerio de Salud, Hospital Córdoba), **Protocolo N° 35/2013**)

INFORMACION Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO PARA EL PACIENTE DEL ESTUDIO

Título del Estudio: CAMBIOS INFLAMATORIOS Y EPIGENÉTICOS ASOCIADOS A IRRITACION MECANICA CRONICA DE MUCOSA BUCAL

(Este estudio es parte de la **Tesis Doctoral del Od. Jerónimo Lazos**)

Investigadores responsables del estudio:

Dra. Ana María Zarate - Od. Jerónimo Lazos

Número de teléfono: 351-155552639; 351-3343744

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>.

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

¿CUALES SON LOS ANTECEDENTES Y EL OBJETIVO DEL ESTUDIO?

Se solicita que participe en este estudio porque presenta síntomas que presumen que tiene una enfermedad que es crónica y compleja. Particularmente, Ud. posee una enfermedad llamada *Úlcera Traumática Crónica*, que es una herida de larga data sobre mucosa bucal. Esta es producida por irritantes como ser prótesis desadaptadas o ásperas y dientes fracturados, careados o rotos.

Esta enfermedad tiene muchas variables (clínicas, bioquímicas y socio culturales) y en ocasiones no permite un diagnóstico temprano y/o preciso. El objetivo de este estudio es obtener información que ayude 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.

Este estudio **no está relacionado directamente ni afecta al tratamiento y/o diagnóstico** que haga su médico u odontólogo, sólo recogerá material biológico (células de la mucosa bucal por medio de cepillado- método indoloro); datos clínicos médicos u odontológicos (por examen y ficha clínica recabados por el médico u odontólogo) y datos sobre hábitos u factores considerados de riesgo

mediante encuesta. No existen complicaciones asociadas a este procedimiento, y Ud. puede retirarse del estudio cuando así lo desee y pedir que sus muestras sean destruidas.

El comienzo de la investigación estimado será en *Noviembre de 2013*. Las muestras biológicas serán almacenadas en freezer de -20° aproximadamente seis meses antes de ser procesadas; tanto el almacenaje como el procesamiento serán en el *Laboratorio de la Cátedra de Biología celular*, Facultad de odontología (Universidad Nacional de Córdoba). 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 -20°) hasta su procesamiento. 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.

¿CÓMO SE USARÁN MIS DATOS PERSONALES?

Al firmar este formulario de consentimiento informado, usted autoriza al médico del estudio y al personal del estudio 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:

CIEIS “Comité Institucional de Ética de la Investigación del Adulto Hospital de Córdoba”

Persona de contacto: Dr. Iván Rodríguez Gómez.

Av. Patria 656-Hospital Córdoba. Teléfono: 0531-4524476

Lunes a Viernes de 8:00 a 13:00 hs.

Secretaria: Sandra Franceschelli.

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

Si Ud. acepta ingresar al estudio y luego decide retirarse, puede hacerlo sin que ello represente una pérdida de sus 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 de 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

Fecha y Hora de la firma

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

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)
firma

Fecha y Hora de la
firma

Nombre del testigo imparcial (si corresponde)

DNI y domicilio del testigo (si corresponde)

Póliza de seguro n°: SMG seguros.-número 424930-0

Anexo 2. Características clínicas de UTC (n=77)

Referencias:

G = Edad. **G** = Género. **FD** = Factores Dentarios. **FP** = Factores Protésicos. **FF** = Factores Funcionales. **Tiempo** en meses. **Sitio**: BL= Borde de Lengua; CV= Cara Ventral de lengua; FS: Fondo de Surco; ML= Mucosa Labial; MY= Mucosa Yugal; **PB**= Piso de boca. **Diám**= diámetro mayor medido en milímetros; SD= Sin datos. **Color Bd**= Color bordes; Bl/Ro= bordes blancos y rojos. **↑Cons Bd**= aumento de consistencia de los bordes. El sombreado gris claro de una fila indica que dicho caso pertenece a la muestra final (n=27, ver Figura 5).

Caso	G	Edad	FD	FP	FF	Tiempo	Sitio	Diám. mm	Forma	Color Bd	↑Cons Bd	Dolor
1	F	56	1	0	1	48	BL	16	Circular	Blanco	Total	No
2	f	63	1	0	1	48	BL	18	Circular	Blanco	Total	No
3	m	72	1	0	1	48	BL	15	Ovalada	Blanco	Total	No
4	f	54	1	0	1	45	BL	18	Ovalada	Blanco	Total	No
5	M	81	0	1	1	44	BL	15	Ovalada	Blanco	Total	No
6	f	56	1	0	1	44	BL	15	Ovalada	Blanco	Total	No
7	M	57	1	0	1	42	BL	12	Circular	Blanco	Total	No
8	f	69	1	0	1	40	BL	10	Circular	Blanco	Total	No
9	f	51	1	0	1	37	BL	12	Ovalada	Blanco	Total	No
10	m	58	1	0	0	36	BL	10	Circular	Blanco	Total	No
11	f	51	1	0	1	36	BL	12	Circular	Blanco	Total	No
12	m	64	1	0	1	34	BL	9	Circular	Blanco	Total	No
13	m	50	1	0	1	34	BL	10	Ovalada	Blanco	Total	No
14	M	49	1	0	1	32	BL	12	Ovalada	Blanco	Total	No

15	f	66	1	0	1	31	BL	9	Ovalada	Blanco	Total	No
16	f	72	1	0	1	31	BL	11	Ovalada	Blanco	Total	No
17	M	49	1	0	1	30	BL	9	Circular	Blanco	Total	No
18	f	44	1	0	1	30	BL	12	Ovalada	Blanco	Total	No
19	f	51	1	0	1	30	BL	18	Ovalada	Blanco	Total	No
20	f	81	1	0	1	30	BL	SD	Ovalada	Blanco	Total	No
21	f	59	1	0	1	29	BL	12	Circular	Blanco	Total	No
22	M	39	1	0	1	26	BL	11	Circular	Blanco	Total	No
23	m	54	1	0	1	26	BL	SD	Ovalada	Blanco	Total	No
24	F	66	1	0	0	24	BL	9	Circular	Blanco	Total	No
25	M	58	1	0	0	24	BL	13	Circular	Blanco	Total	No
26	M	48	1	0	1	24	BL	10	Ovalada	Blanco	Total	No
27	f	62	1	0	0	24	BL	SD	Circular	Blanco	Total	No
28	m	58	1	0	1	24	BL	13	Ovalada	Blanco	Total	No
28	f	56	1	0	1	22	BL	8	Ovalada	Blanco	Total	No
30	f	48	0	1	0	22	BL	10	Circular	Blanco	Total	No
31	f	50	1	0	1	22	BL	11	Ovalada	Blanco	Total	No
32	m	68	1	0	1	21	BL	8	Circular	Blanco	Parcial	No
33	m	59	1	0	1	20	BL	SD	Ovalada	Blanco	Total	No
34	m	69	1	0	1	19	BL	SD	Ovalada	Blanco	Total	No
35	f	72	1	0	0	18	BL	8	Circular	Blanco	Total	No
36	m	77	1	0	1	16	BL	8	Ovalada	Blanco	No	No
37	M	80	0	1	1	13	BL	6	Ovalada	BI/Ro	No	No
38	M	68	1	0	0	12	BL	8	Circular	BI/RoI	No	No
39	M	33	1	0	1	11	BL	8	Circular	BI/Ro	No	Si
40	M	56	1	0	1	5	BL	9	Ovalada	BI/Ro	No	Si
77	M	61	1	0	1	12	CV	16	Alargada	BI/Ro	No	No

41	f	67	1	0	0	20	CV	10	Circular	BI/Ro	Parcial	No
42	f	55	0	1	1	60	FS	20	Alargada	Blanco	Total	No
43	f	76	0	1	1	48	FS	25	Alargada	Blanco	Total	No
44	m	57	0	1	1	44	FS	25	Alargada	BI/Ro	Total	No
45	m	74	0	1	1	40	FS	20	Alargada	Blanco	Total	No
46	F	54	0	1	0	36	FS	18	Ovalada	BI/Ro	Total	No
47	f	80	0	1	1	36	FS	SD	Ovalada	Blanco	Total	No
48	f	65	0	1	1	36	FS	15	Alargada	Blanco	Total	No
49	f	39	0	1	1	31	FS	SD	Alargada	Blanco	Total	No
50	f	54	0	1	1	29	FS	15	Alargada	Blanco	Total	Si
51	f	70	0	1	1	28	FS	9	Alargada	BI/Ro	Total	No
52	m	83	0	1	1	28	FS	12	Alargada	Blanco	Total	No
53	f	69	0	1	1	26	FS	9	Ovalada	Blanco	Total	No
54	f	57	0	1	1	26	FS	9	Alargada	BI/Ro	Parcial	No
55	f	49	0	1	1	26	FS	8	Ovalada	BI/Ro	Total	No
56	F	69	0	1	1	24	FS	18	Alargada	BI/Ro	Parcial	Si
57	M	59	0	1	1	22	FS	9	Alargada	Blanco	Total	Si
58	f	68	0	1	1	22	FS	9	Alargada	BI/Ro	Parcial	No
59	m	49	0	1	1	22	FS	10	Alargada	BI/Ro	Parcial	Si
60	F	68	0	1	0	18	FS	9	Alargada	Blanco	Parcial	Si
61	F	46	0	1	1	18	FS	12	Alargada	BI/Ro	Parcial	No
62	f	55	0	1	1	18	FS	10	Alargada	BI/Ro	Parcial	No
63	M	63	0	1	0	12	FS	9	Alargada	BI/Ro	Parcial	Si
64	M	64	0	1	1	12	FS	13	Alargada	BI/Ro	No	Si
65	f	71	1	1	0	48	ML	SD	Ovalada	Blanco	Total	No
66	m	66	1	0	1	47	ML	SD	Circular	Blanco	Total	No
67	f	68	0	1	0	42	ML	SD	Circular	Blanco	Total	No

68	F	69	1	1	1	28	ML	SD	Ovalada	Blanco	Total	No
69	f	67	1	0	1	28	ML	5	Ovalada	Blanco	Total	No
70	f	71	1	1	0	18	ML	5	Circular	BI/Ro	Parcial	No
71	M	74	0	1	1	16	ML	SD	Ovalada	BI/Ro	Parcial	No
72	F	51	0	1	0	36	MY	5	Circular	Blanco	Total	No
73	f	59	1	1	0	36	MY	SD	Ovalada	BI/Ro	Total	No
74	F	67	0	1	1	14	MY	5	Ovalada	BI/Ro	Parcial	No
75	F	70	0	1	1	40	PB	SD	Ovalada	Blanco	Total	No
76	F	52	0	1	0	36	PB	12	Alargada	Blanco	Total	Si

Anexo 3. Tabla de características demográficas y clínicas de casos de la muestra final (n=27) y aquellos excluidos por inconvenientes de procesamiento en el laboratorio.

		UTC incluidas	UTC excluidas	p-valor
Variable				
Género	Mujeres	11	35	0,012
	Hombres	16	15	
Edad (años)	Media	59,52	62,06	0,32
	Mediana	59	62,5	
	Rango	33-81	39-83	
Tabaco	SI	10	18	0,92
	NO	17	32	
Tabaco acumulado (cantidad de cigarrillos, entre fumadores)	Media	124684	102438	0,53
	Mediana	92162	91250	
	Rango	24090-365000	22550-268275	
Alcohol	SI	9	18	0,81
	NO	18	32	
IMC dentaria	SI	13	32	0,17
	NO	14	18	
IMC protética	SI	15	21	0,25
	NO	12	29	
IMC funcional	SI	19	41	0,24
	NO	8	9	
Tiempo de IMC	Media	24,41	31,52	0,007
	Fumadores	28	27,78	0,95
	No fumadores	21,53	33,63	0,001
	Mediana	24	30	
	Fumadores	28	27	
No fumadores	22	32,5		
	Rango	5-48	16-60	
En lengua	SI	13	28	0,51
	NO	14	22	
<i>Variables cualitativas analizadas mediante Chi cuadrado. Variables cuantitativas analizadas mediante test de Student. Negrita denota significancia estadística.</i>				

Anexo 4. Presencia de infiltrado inflamatorio en los extendidos citológicos de la muestra final (n=27)

Casos (n=27)	UTC	Control
Inflamación	25	0

UTC= Úlcera Traumática Crónica. Chi Cuadrado $p < 0,005$.

Anexo 5. Publicaciones vinculadas específicamente a IMC de tesis:

- Lazos JP, Piemonte ED, Panico R, Hernandez Ríos M, Astorga J, Brunotto M, Zárata A. **p16 and MGMT methylation in Chronic Mechanical Irritation of the oral mucosa.** Poster de investigación presentado en la XV Reunión de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal, realizado los días 17 al 20 de Julio de 2018, Rio de Janeiro (Certificado #201611.20180312.182016).