



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“MARCADORES DE MALIGNIDAD
RELACIONADOS CON EL CONSUMO DE
TABACO, ALCOHOL Y MATE”**

TESISTA:

OD. RICARDO CRHISTIAN CACIVA

DIRECTOR:

PROF. DRA. LÓPEZ DE BLANC S.

CÓRDOBA, 2016



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 CORDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
Escuela de Posgrado

PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORADO

**Marcadores de malignidad relacionados con el
consumo de tabaco, alcohol y mate**

Tesista: Od. Caciva Ricardo Crhistian
Director: Prof. Dra. López de Blanc S
Asesor: Prof. Dra. Itoiz María Elina
2016

Comisión de tesis:

Prof. Dra. Tolosa de Talamoni, Nori (Fac. de Cs. Médicas UNC)

Prof. Dra. Carranza, Miriam (Fac. de Odontología UNC)

Prof. Dra. Gandolfo, Mariana (Fac. de Odontología UBA)

JURADO

Prof. Dra. Tolosa de Talamoni, Nori (Fac. de Cs. Médicas UNC)

Prof. Dra. Carranza, Miriam (Fac. de Odontología UNC)

Prof. Dra Livia Escovich (Fac. de Odontología UNR)

DEDICATORIA

A mis padres por todo lo que me brindaron en la vida.

A Maria Eloisa Garay y mi Hija Maria Emilia Caciva.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por darme toda lo que me ha dado en la vida.
- A la Dra. Silvia López de Blanc mi maestra, por su generosidad al brindarme la oportunidad de compartir su capacidad y experiencia para poder concretar este trabajo.
- A mi asesor científico la Dra Itoiz María Elina y a la Dra Renoun Sandra por su ayuda y por ser guía durante el desarrollo de este trabajo.
- A la Dra Ana Baruzzi por su gran ayuda y ayuda constante.
- A las Doctoras Tolosa de Talamoni Nori, Carranza Miriam, Gandolfo Mariana y Escovich Livia por sus aporte, correcciones y sugerencias.
- A la Dra Morelatto Rosana por ser incondicional y prestar su ayuda en cualquier momento.
- A la Dra Belardinelli Paola por compartir este camino en nuestros trabajos
- A la Dra Elba Gimenez y Dra Delia Elsa Caminos por iniciarme y ser mi guía en la docencia.
- A mis compañeros de la Catedra de Estomatología A y Semiología.
- A las secretarias Carina Juarez, Monica bornancini y Mirta Ceballos con ser incondicionales en el apoyo brindado.
- A la Técnica Agustina Pereira por compartir su espacio y charlas. Gracias.
- A la Secretaria de Post-grado Liliana y Sofia por su buena onda y colaboración.
- A los Alumnos que son lo que impulsan a seguir en la formación permanente.
- A los pacientes que han sido parte de dicho trabajo.
- A todos los que en mayor o menor manera han aportado y ayudado para poder realizar dicho trabajo.

CERTIFICADO DEL COMITÉ DE ETICA

Formulario Inscripción INVESTIGACIONES V. 1.20



Gobierno de Córdoba
Ministerio de Salud

REGISTRO PROVINCIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD (RePIS)

REGISTRO DE INVESTIGACIONES EN SALUD

REGISTRO PROVINCIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

22/12/10

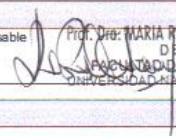
REGISTRADO

N° 1619 FIRMA: AGUSTINA ACUNA

N° DE RePIS
DE INVESTIGACIÓN

1619

I. PATROCINANTE					
Posee Patrocinante:		SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			
Identificación:		Secretaría de Ciencia y Técnica. UNC			
Carácter:		Público <input checked="" type="checkbox"/> Privado <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/>			
Domicilio Legal:		Filloy s/n Ciudad Universitaria (5000) Córdoba			
II. CRO (Organización de Investigación por Contrato)					
Posee CRO:		SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>			
Identificación:					
Ámbito:		Local <input type="checkbox"/> Nacional <input type="checkbox"/> Internacional <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/>			
Domicilio Legal:					
III. TÍTULO					
Título de la Investigación incluyendo el N° de enmienda si lo tiene		Marcadores histoquímicos de malignidad relacionados al consumo de tabaco y alcohol			
Número	Nombre abreviado				
Especialidad Vinculada	Estomatología. Anatomía Patológica				
Nombre de la Droga en Estudio					
Consentimiento Informado (Versión y Fecha)	Elaborado para este Proyecto. Octubre/10				
IV. INVESTIGADOR					
Nombre Investigador Principal	Ricardo Cristina Caciva		N° RePIS Investigador 431		
V. EQUIPO DE INVESTIGADORES					
Nombres	Lopez de Blanc Silvia		276		
	Belardinelli Paola		430		
	Morellato Rosana				
VI. TIPO DE INVESTIGACIÓN (marcar con cruz lo que corresponda)					
Descriptivo	<input type="checkbox"/> Descriptivo simple	Observacional	<input type="checkbox"/> de Cohortes	Experimental	<input type="checkbox"/> Ensayo clínico no farmacológico.
	<input type="checkbox"/> Descriptivo correlacional		<input checked="" type="checkbox"/> de Casos y Controles		<input type="checkbox"/> Ensayo clínico farmacológico con grupo control con placebo.
	<input type="checkbox"/> Descriptivo longitudinal				<input type="checkbox"/> Ensayo clínico farmacológico con grupo control con otros fármacos.
FASE DEL ESTUDIO		Otros (Describir):			<input type="checkbox"/> Ensayo clínico farmacológico sin grupo control.

VII. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO (marcar lo que corresponda, pueden ser varias marcas)				
<input type="checkbox"/>	Investigación en Genética humana			
<input type="checkbox"/>	Investigación en Reproducción Humana			
<input type="checkbox"/>	Estudios Farmacológicos en Fase I o II			
<input type="checkbox"/>	Estudios Clínicos con Vacunas (cualquier Fase)			
<input type="checkbox"/>	Investigaciones consideradas de alto riesgo			
<input type="checkbox"/>	Nuevos procedimientos aún no descriptos y/o validados en la literatura (aún en Fase IV)			
<input type="checkbox"/>	Investigación con grupos vulnerables, (niños, embarazadas, ancianos, pacientes psiquiátricos, discapacitados, poblaciones marginales, prisioneros, etc.)			
<input type="checkbox"/>	Estudios que incluyen investigación en farmacogenómica			
VIII. VINCULACIÓN INTERNACIONAL				
<input type="checkbox"/>	Investigaciones coordinadas desde el extranjero o con participación extranjera			
<input type="checkbox"/>	Estudios que incluyen envío de material biológico al extranjero			
IX. ALCANCE DEL ESTUDIO				
<input type="checkbox"/>	Estudios multicéntricos	<input checked="" type="checkbox"/> Local	<input type="checkbox"/> Nacional	<input type="checkbox"/> Internacional
<input type="checkbox"/>	Otros:			
X. DURACIÓN				
Duración de la Investigación (tiempo estimado desde el inicio a la terminación)		5 años		
XI. LUGAR DE REALIZACIÓN		N° DE REPIS DEL CENTRO		
Establecimiento/s:	Facultad de Odontología- UNC			
Ciudad:	Córdoba			
Domicilio:	Av Haya de la Torre s/n Cód. Postal: 5000, Agencia postal N° 4			
Ámbito:	Público <input checked="" type="checkbox"/>	Privado <input type="checkbox"/>	Otros (Especificar):	
XII. AUTORIDAD RESPONSABLE DEL ESTABLECIMIENTO				
Apellido y Nombre	Prof. Dra. Visvisián María del Carmen	Firma y sello del responsable		
Cargo	Decana Facultad de Odontología	 Prof. Dra. MARÍA R. del CARMEN VISVISIÁN DECANA FACULTAD DE ODONTOLOGIA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA		
XIII. PÓLIZA DE SEGURO				
Compañía Aseguradora				
Domicilio:				
Ciudad:				
País				
Fecha de vencimiento (deber tener vigencia mayor a 15 días al momento de presentar este formulario)	___/___/20__			
Póliza presenta renovación automática:	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	Periodo de duración de cada Renovación:	
XIV. COMITE INSTITUCIONAL DE ETICA DE LA INVESTIGACION EN SALUD DONDE SE PRESENTO EL ESTUDIO				
Nombre	CIEIS Facultad de Odontología			
Institución	Facultad de Odontología			
Coordinador	Dra. López de Blanc			
XV. PAGO DE TASA RETRIBUTIVA				
Tasa de Registro	N° de Ticket:		Fecha de Pago:	___/___/20__
Tasa de Evaluación	N° de Ticket:		Fecha de Pago:	___/___/20__

La información de este formulario tiene carácter de declaración jurada por lo que no se aceptarán inscripciones manuales ni enmiendas realizadas al mismo.

Ricardo C. Cacia
 RICARDO C. CACIVA
 ODONTOLOGO
 M.P. 4371
 Firma Investigador: Sello Fecha 3.12.2010

XVI. INFORME CIEIS	
Resultado Evaluación CIEIS	<input checked="" type="checkbox"/> Aprobada
	<input type="checkbox"/> Aprobada con recomendación
	<input type="checkbox"/> Condicionada y aprobada
	<input type="checkbox"/> Rechazado
	<input type="checkbox"/> Condicionada y rechazada

Silvia A. López de Blanc
 Dra. Silvia A. López de Blanc
 Coordinadora
 del CIEIS Facultad de Odontología U.N.C.
 Firma Autoridad/ Responsable del CIEIS Sello Fecha 07-12-10

XVII. EVALUACIÓN DE COEIS	
Se Solicita Evaluación:	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Razón:	<input type="checkbox"/> La investigación posee características nombradas en el Art. 21- Ley 9694/09 (Art. 18 Res. 22/07)
	<input type="checkbox"/> La investigación posee características nombradas en el Art 22- Ley 9694/09 (Art. 19 Res. 22/07)
	<input type="checkbox"/> Ambos

XVIII. INFORME CONSEJO DE EVALUACIÓN ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SALUD COEIS (cuando corresponda)	
Resultado Evaluación	<input type="checkbox"/> Aprobado (Fase I, Fase II, Reproducción Humana, Nuevos procedimientos no farmacológicos)
	<input type="checkbox"/> Aprobado con recomendación
	<input type="checkbox"/> Condicionada y aprobada
	<input type="checkbox"/> Condicionada y rechazada
	<input type="checkbox"/> Rechazada
	<input type="checkbox"/> Rechazada por no cumplir condicionamiento

Firma Autoridad/ Responsable

Firma Autoridad/ Responsable

Firma Autoridad/ Responsable

Fecha

Instrucciones para promotores/ investigadores y CIEIS:

- El investigador debe presentar ante el CIEIS este formulario por triplicado debidamente fechado, firmado y sellado.
- Este formulario debe ser llenado en computadora
- El CIEIS presentará ante el RePIS el formulario de inscripción, debidamente llenado, fechado y firmado con la resolución del CIEIS.
- En caso de haber solicitado enmienda o condicionamiento deberá especificar y registrar el protocolo según el resultado de los mismos (aprobado o rechazado)
- El CIEIS deberá informar en un plazo de 10 días hábiles el inicio, finalización, suspensión y/o cancelación del protocolo registrado con el formulario correspondiente.

INDICE

INTRODUCCION

HIPOTESIS

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLOGRAFIA

ANEXOS

ABREVIATURAS

A: Alcohol.
AA: Acetaldehído.
aC: Área celular.
ADH: alcohol deshidrogenasa.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ALDH: acetaldehído deshidrogenasa.
B: Reactividad en estrato basal.
BP: Benzopirenos.
CA: Anhidrasa carbónica.
CARP: Anhidrasa carbónica relacionada a proteína.
CB: Cáncer bucal.
CCEB: Carcinomas de células escamosas bucales.
cGMP: Guanosina monofosfato cíclico.
CH₃-CH₂-OH: Alcohol etílico o etanol.
CIS: Carcinoma in-situ.
CNS: Sistema nervioso central.
CYP: Citocromo P450.
dL: Decilitro.
eNOS: Oxido nítrico sintasa endotelial.
EBV: Virus Epstein-Barr.
FAD: Flavina adenina dinucleótido.
FMN: Flavina mononucleótido.
FNT α : Factor de necrosis tumoral α .
FSM: Fibrosis de la sub-mucosa.
H: Homogénea.
HIF: Factor inducible de hipoxia.
H₂O₂: Peróxido de hidrogeno.
HSV: Virus herpes hominis.
IARC: Agencia internacional para la investigación del cáncer.
IC: Intervalo de confianza.
IL6: Interleuquina 6.
iNOS: Oxido nítrico sintasa inducible.
IX: Nueve.
M: Mate.
M: Reacción en estrato medio.
MEOS: Sistema microsomal oxidativo del etanol.

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido.
NNAL: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol.
NNN: Nitrosonornicotina.
NNK: cetona nitrosamina nicotina.
ON: Oxido nítrico.
NO₂: Nitrito.
NO₃: Nitrato.
NOS: Oxido nítrico sintasa.
nONS: Oxido nítrico sintasa neuronal
·OH: Oxidrilos.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
OR: Odd ratio.
OSMF: Fibrosis de la sub-mucosa.
P: Parcheada.
PAP: Papanicolaou.
PAH: Hidrocarburos aromático policíclicos.
pC: Perímetro del citoplasma.
pN: Perímetro del núcleo.
S: Reacción en estrato superficial.
T: Tabaco.
TAM: Tabaco, alcohol y mate.
VPH: virus del papiloma humano.

RESUMEN

El cáncer bucal es multifactorial, la mayor parte de los autores coinciden en afirmar que la asociación del consumo de tabaco y alcohol aumenta el riesgo de desarrollo. Sin embargo el aumento del número de casos sin los factores tradicionales ha llevado a considerar otros factores como enfermedades e infecciones bucales, higiene oral deficiente, mal estado bucal, traumatismo crónico, una dieta deficiente, factores de carácter ambiental y otros llamados emergentes como la infección por virus del papiloma humano y el consumo de mate.

Objetivo: Analizar la expresión de marcadores de malignidad en células exfoliadas y biopsias de la mucosa bucal, en voluntarios consumidores de tabaco, alcohol y mate.

Material y métodos: Se incluyeron 80 individuos voluntarios adultos sanos; que asistieron de forma espontánea a las cátedras de Estomatología A y B de la Facultad de Odontología de la UNC. Se obtuvieron células con citobrush de tres zonas de la mucosa bucal clínicamente sana del lado derecho: A-piso de boca, B-mucosa yugal y C- paladar blando. En pacientes con lesiones estomatológicas que requerían extirpación quirúrgica se separó un sector de mucosa sana de la biopsia (7 pacientes con hábitos y 9 sin hábitos), y se determinó la expresión de NOS2 y CA-IX mediante Inmunohistoquímica Se aplicó el test de Kruskal Wallis.

Resultados: En el presente trabajo se observó que las personas que consumían tabaco, alcohol y mate, en forma individual o conjunta, presentaron una reducción en la relación N/C siendo más evidente con la intensidad del hábito. En biopsias de mucosa bucal clínicamente normal de pacientes consumidores de tabaco, alcohol y mate mostraron mayor de positividad de NOS2 y CA IX con diferentes grados de expresión a nivel epitelial. Mientras que las mucosas sin factores de riesgo con ambos marcadores, resultaron débilmente o no reactivas.

Conclusión: Los cambios morfológicos observados permiten establecer que el consumo de tabaco, de alcohol y de mate en exceso produce alteraciones celulares que podrían asociarse a cambios tempranos de una cancerización de campo. La presencia de de NOS2 y CA-IX nos confirman el daño celular observado en la citomorfometría, aún cuando todavía no se habían evidenciado cambios clínicos ni histopatológicos en la mucosa bucal. La presente observación puede significar un aporte al conocimiento de la biología de los cambios iniciales de la carcinogénesis.

Summary

Oral cancer (OC) is a multifactorial disease, most of the authors agree that the association with tobacco and alcohol consumption increases the risk of development. The increase in the number of cases without the traditional factors, has led to consider other risk factors such as poor oral hygiene, poor oral condition, chronic trauma, poor diet, environmental factors and others as human papilloma virus infection and mate consumption called emerging factors.

Objective: To analyze the expression of markers of malignancy in exfoliate cells and biopsies of the normal oral mucous of volunteers consuming tobacco, alcohol and mate.

Patients and methods: 80 healthy volunteers were included. Cells were obtained with citobrush from three locations of clinically healthy oral mucosa of the right side: A-floor of the mouth, B- buccal mucosa and C- soft palate. In patients with oral lesions requiring surgical treatment, a section of healthy mucosa biopsy was obtained (7 patients with habits and 9 without habits) were studied. The expression of NOS2 and CA IX was analyzed by immunohistochemistry. Kruskal Wallis test was applied.

Results: In this study it was found that individuals who smoke or consumed alcohol and mate, individually or jointly, showed a reduction in N / C ratio being more evident with the intensity of the habit. In clinically normal biopsies of smokers, alcohol and mate consumers, oral mucosa showed higher positivity for CA-IX and NOS2, with different degrees of expression at the epithelial level; while patients without risk factors, were weakly or not reactive with both markers.

Conclusion: The morphological changes observed allow us the conclusion that consumption of tobacco, alcohol and mate in excess, produces cellular changes that may be associated with early changes in a field cancerization. The presence of NOS2 and we CA-IX confirm the cell damage observed in the cytomorfometry, although not yet had shown non clinical or histopathological changes in the oral mucosa. This observation may mean a significant contribution to the knowledge of the biology of the initial changes of carcinogenesis.

INTRODUCCION

La mayor parte de los autores coinciden en afirmar que la asociación del consumo de tabaco y alcohol aumenta el riesgo de desarrollo del cáncer bucal (1-30, 45, 48, 70); también se han descrito otros factores de riesgo como enfermedades e infecciones bucales, higiene oral deficiente lo que produciría un sobrecrecimiento bacteriano, mala salud bucal, mal estado dental(8, 16, 26,31-37, 38, 43, 47), trauma dentario o protético (38, 39), dieta con bajos niveles de nutrientes (16, 20, 26, 37, 40-42, 44, 46, 49, 50), consumo de mate (51-58), herencia (16, 18, 26, 40, 43, 59-61), factores de carácter ambiental (26), como también la posibilidad de intervención de algunos virus como el del papiloma humano (HPV) (16, 18, 26, 40, 62-64, 69-71, 75, 76), el virus herpes hominis (HSV) y el virus de Epstein-Barr (EBV) (44,65-68,72-74).

El tabaco como factor de riesgo

El tabaco es una solanácea típica de América que posteriormente fue llevada a Europa. Los nativos de América inhalaban o masticaban la planta con nicotina para estimular el sistema nervioso central (91, 109, 110). Cuando una persona inhala el humo del cigarrillo, la nicotina que se encuentra en él se absorbe rápidamente en el torrente sanguíneo a través de los pulmones y la mucosa oral y alcanza el cerebro en siete segundos. Una vez en el cerebro, la nicotina produce una sensación placentera que lleva a través del tiempo a la adicción (79, 83, 84, 91, 109). La nicotina aumenta el estado de alerta del usuario e intensifica el desempeño mental, la frecuencia cardíaca y la presión arterial, y disminuye el flujo sanguíneo al miocardio. Esta sustancia también estimula la liberación de epinefrina, que a su vez incita al sistema nervioso central a liberar beta endorfinas que pueden inhibir el dolor (91, 109).

A partir de los años 40 se iniciaron investigaciones para relacionar el tabaquismo con la aparición de determinadas enfermedades, principalmente respiratorias y pulmonares (106).

El tabaco es reconocido por su asociación epidemiológica con numerosos tipos de cáncer, habiéndose aislado más de 4000 compuestos químicos tóxicos,

mutagénicos y carcinogénicos que junto con el alcohol, son considerados los principales factores de riesgo en el desarrollo del cáncer bucal. (1, 8, 20, 25, 28, 33, 30, 44, 45). El papel independiente de cada uno de ellos parece estar claro, sin embargo el resultado de su asociación, permite ser explicado por tres modelos posibles: -un modelo aditivo: en el que se suman los efectos producidos por cada factor en forma independiente; - uno exponencial: según el cual los efectos se multiplicarían y -el modelo sinérgico o intermedio apoyado por la mayor parte de los autores que consideran que el efecto producido por ambos factores, es superior a la simple suma de sus efectos de forma independiente (1, 3, 15, 24, 111). Se ha demostrado que el uso de tabaco tiene un efecto carcinógeno directo sobre el epitelio de la cavidad bucal, pero su asociación con alcohol aumentaría el riesgo en 6 a 15 veces, en relación a una persona que no tiene ninguno de estos hábitos tóxicos (6, 103, 104, 105).

Estar en contacto con el humo de cigarrillo es arriesgado, el riesgo de cáncer oral es 87% mayor en aquellos que nunca han fumado, pero que han sido expuestos al mismo en forma pasiva o tabaquismo involuntario (9, 77). Todas las formas de tabaco son carcinogénicas y capaces de causar cáncer (3, 9, 78, 79,92-94).

La nicotina no es un carcinógeno, resulta citotóxico y puede actuar como cofactor en la carcinogénesis, esta sustancia es el principal alcaloide psicoactivo del tabaco y a través del tiempo es adictivo (79, 83, 84, 91). Estudios in vivo muestran que la nicotina en concentraciones tan bajas como al 2% pueden causar daño epitelial, y es capaz de producir alteraciones de la permeabilidad del epitelio a carcinógenos (83). Una persona que fuma 25 cigarrillos por día absorberá aproximadamente 0,43 mg nicotina/kg peso corporal (85). Más del 80% de la nicotina absorbida sufre metabolismo en el hígado, la cotinina es el principal metabolito. La concentración en sangre de cotinina en los fumadores es de 200-400 ng / ml (1.1-2.2 M) (86). Evidencia experimental in vitro a partir de estudios sobre cultivos celulares, estudios in vivo en roedores, en seres humanos indican que la nicotina en sí, independientemente de otros constituyentes del tabaco, pueden estimular una serie de efectos de importancia en el desarrollo del cáncer (87, 88). La nicotina afecta la circulación periférica, causando una vasoconstricción gingival importante, lo que disminuye el aporte de elementos de reparación por parte de la sangre al tejido gingival y, por consiguiente, se debilita

la capacidad de cicatrización de este tejido. También puede estar suprimido el sistema inmune, a causa de una reducción de la quimiotaxis y fagocitosis por parte de los leucocitos.

Además, la nicotina causa daños a la matriz extracelular de fibroblastos gingivales. Una concentración menor a 0,075% causa muerte celular, una de 0,075% causa una vacuolización de los fibroblastos y una del 0,05% inhibe la producción de fibronectina y colágeno tipo II, ocasionando una ruptura de la matriz extracelular gingival; por consiguiente, aumenta la gravedad de la enfermedad periodontal. Por lo anterior podemos pensar que un efecto similar se puede dar en cualquier otro sitio de la mucosa bucal y no sólo en el periodonto. El fumar se asocia clínicamente a bolsas profundas, formación de cálculo, pérdida de hueso alveolar, gingivitis ulceronecrotizante aguda y osteoporosis (95, 435, 436). Muchos estudios en ratas sugieren que la combinación simultánea de alcohol y tabaco tiene un efecto sinérgico en la progresión de la periodontitis, evidenciado por una destrucción ósea en la zona de furca y un aumento de la gravedad de la enfermedad periodontal (437, 438, 439, 440).

La carcinogenicidad del tabaco es más que evidente y alrededor de una cuarta parte de los casos de cáncer bucales son atribuibles al consumo de cigarrillos (80). Específicamente, los productos de tabaco están causalmente vinculados a una variedad de cánceres, incluyendo los de pulmón, cavidad oral, cavidad nasal, laringe, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, hígado, páncreas, vejiga, uréter, riñón, cuello uterino y leucemia mieloide (9, 82, 92-94, 98). El cigarrillo contiene más de 4000 sustancias carcinogénicas, las más importantes son nitrosaminas específicas del tabaco, tales como 4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-butanona (NNK/NNAL) y N-nitrosornicotina (NNN), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), tales como el benzopireno, y aminas aromáticas (Fig.1). En particular, NNK, NNN y PAH han sido causalmente relacionados con el cáncer oral (81, 82, 97, 99, 100, 101) y se encuentran clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como carcinógenos en humanos (89, 90).

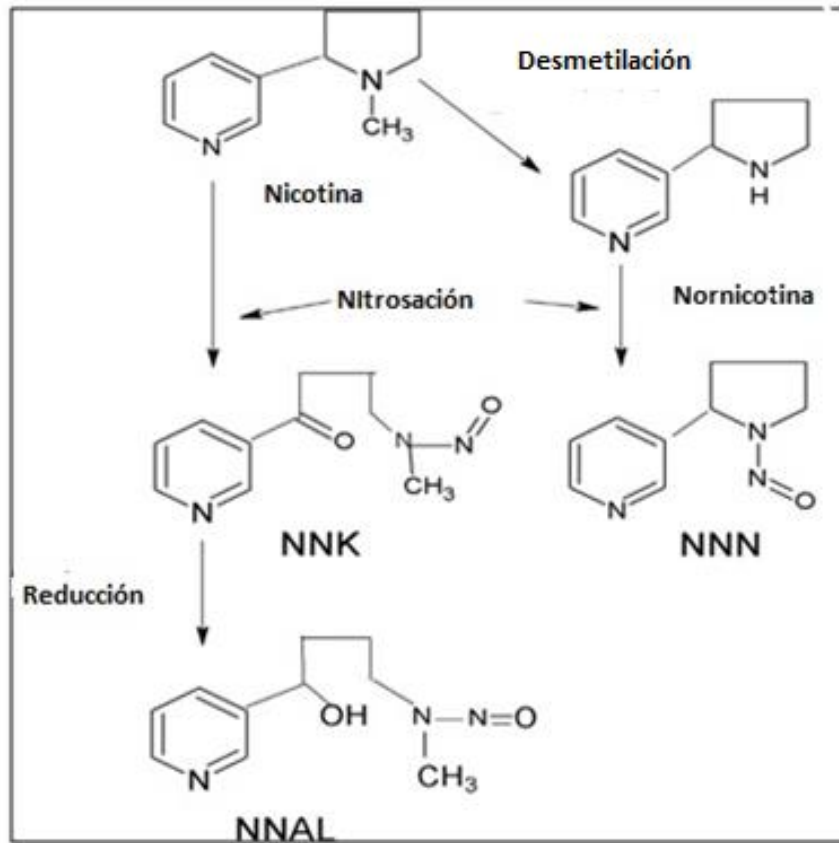


Fig. 1: Formación de NNK: cetona nitrosamina nicotina; NNN: N-nitrosornicotina y NNAL: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol

Todos los productos del tabaco, independientemente de su forma de consumo (cigarrillos, los habanos o puros, tabaco de pipa, tabaco de mascar y rapé), contienen productos tóxicos, carcinógenos y nicotina. Los puros y las pipas a menudo se consideran la manera menos dañina de fumar tabaco; sin embargo, el hecho de no inhalar el humo, protege los pulmones pero aumenta el riesgo de desarrollar cáncer en la cavidad bucal (9). Los fumadores de pipas también tienen el riesgo elevado de padecer cáncer de labio en las zonas donde se asienta la pipa. Por otro lado, los puros demoran más en consumirse y contienen más tabaco que los cigarrillos, lo que aumenta la exposición al humo (92-94).

Estudios realizados por Squier y col. (95), cuyo objetivo fue determinar si el cigarrillo con mentol influye en la penetración de los carcinógenos del tabaco, estos indicaron que existe un incremento en la posibilidad de desarrollar un padecimiento carcinogénico en los usuarios de tabaco con sabor a mentol (95,

102). Al fumar un cigarrillo, el fumador absorbe alrededor de 500 mg de humo, de los cuales aproximadamente el 65% es nitrógeno y oxígeno; el 35% restante consiste en sustancias biológicamente activas (96, 97).

El tabaquismo es una enfermedad crónica sistémica, perteneciente al grupo de las adicciones, según el Manual de Diagnóstico y Estadística de los trastornos mentales DSM-IV de la Asociación Psiquiátrica Americana (106).

A partir de los años 40 se iniciaron investigaciones para relacionar el tabaquismo con la aparición de determinadas enfermedades, principalmente respiratorias y pulmonares (106). Posteriormente, otros estudios mostraron la asociación entre consumo de tabaco y cáncer de la cavidad oral, laringe y esófago. Alrededor de 1957, se identificaron algunos componentes de los cigarrillos como promotores tumorales, co-carcinogénicos y carcinogénicos órgano-específicos (107, 108).

Por otro lado, a las diversas formas de administración y consumo de tabaco se le han atribuido diferentes efectos carcinogénicos (431). Las principales zonas receptoras de los efectos carcinogénicos según el tipo de hábito tabáquico son los siguientes: el tabaco inhalado en pulmones y laringe; el masticado en piso de boca, trigono retromolar y lengua; y la combinación de tabaco y alcohol en orofaringe y base de lengua.

Franceschi S. y col. (432), hablan de una mayor influencia del tabaco que el alcohol en el cáncer de lengua, con mayor riesgo para fumadores de tabaco negro, siendo este riesgo el doble en fumadores de marcas de tabaco con elevada cantidad de alquitrán por cigarrillo (22 g o más). Estos autores señalan la importancia y la diferencia significativa encontrada en relación al tipo de tabaco que consumen, número de cigarrillos que fuman al día, el tiempo que haya tenido el paciente este hábito y la edad de comienzo del hábito. También se presta especial atención al riesgo de cáncer oral que puede producir el fumar en pipa o puros, siendo éste sustancialmente mayor en el cáncer de lengua. Hsu. T y col. (194) sitúan al tabaco como factor causante mayoritario de cáncer oral y el alcohol como co-factor.

En los trabajos científicos suelen aparecer rangos de clasificación de la intensidad del consumo de tabaco, siendo éstos rangos variables según los autores y en muchos casos arbitrarios.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2003) los fumadores se clasifican en leves, moderados y severos en la siguiente escala:

- Fumador leve: consume menos de 5 cigarrillos diarios.
- Fumador moderado: fuma un promedio de 6 a 15 cigarrillos diarios.
- Fumador severo: fuma más de 16 cigarrillos por día en promedio.

Jovanovic A y col (433), categorizan al consumo de tabaco en cigarrillos por día en: fumador moderado de 1 al 20 y fumador intenso o "heavy" a aquellos fumadores de más de 20 cigarrillos/día. Un puro y una pipa son equivalentes a 4 y 2 cigarrillos respectivamente. Blot W y col (3), consideraron pacientes de alto riesgo a aquellos que fumen 2 o más paquetes/día durante 20 años.

El nivel de exposición al tabaco tiene un efecto acumulativo, por lo que aparte del consumo actual o puntual es de gran interés reconocer el consumo a lo largo de toda la vida. En este sentido cada día se interroga sobre un índice denominado "paquetes-año" o "Pak/Year" y que no se refiere al consumo de paquetes al año sino al consumo de tabaco durante toda la vida del sujeto. Se calcula multiplicando el número de paquetes al día por el número de años que ha fumado esa cantidad. Veamos un ejemplo: Un fumador de 1 paquete al día durante 5 años y que posteriormente incrementa su consumo a un paquete y medio al día durante 20 años más, será un fumador de: $(1 \times 5) + (1,5 \times 20) = 5 + 30 = 35$ paquetes-año.

El alcohol como factor de riesgo

El alcohol es la droga más antigua de nuestra cultura, de acuerdo a su consumo es una bebida problemática, adictiva- dependi gena o abusiva que constituye en nuestro país un serio problema sanitario y social (116, 117, 118). En la actualidad se ven implicadas, cada vez en mayor medida, todas las clases sociales sin distinción alguna. Llamado alcohol etílico o etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) es el componente esencial de las bebidas alcohólicas, que en general, se obtiene por dos procesos de elaboración: la fermentación o descomposición de los azúcares contenidos en las distintas frutas y/o destilación, consistente en la depuración de las bebidas fermentadas (2, 8, 112-114, 115, 119, 120).

El alcohol es consumido por vía oral y su absorción se produce en primer lugar en el estómago, le sigue el intestino delgado y en menor proporción el intestino grueso, llegando por vía portal al hígado, donde es metabolizado en forma mayoritaria (10, 121-123). Se metaboliza por "oxidación" que consiste en la transformación del etanol en acetaldehído, mediado por una enzima: la alcohol deshidrogenasa (ADH), que cataliza la conversión reversible de los alcoholes (8, 121, 124-126, 140-142, 150). Dos enzimas hepáticas más, metabolizan el alcohol ante niveles elevados de consumo, una es el sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS) que se caracteriza por la oxidación del acetaldehído obtenido anteriormente a acetato a través de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) y su degradación por la catalasa (33, 121, 127-131- 135) (Fig 2). También existe un metabolismo extra-hepático del etanol a nivel del cerebro, ri n n, corazón, estómago, que repercute prácticamente en todos los aparatos o sistemas e incluso en la cavidad bucal (1, 136, 137).

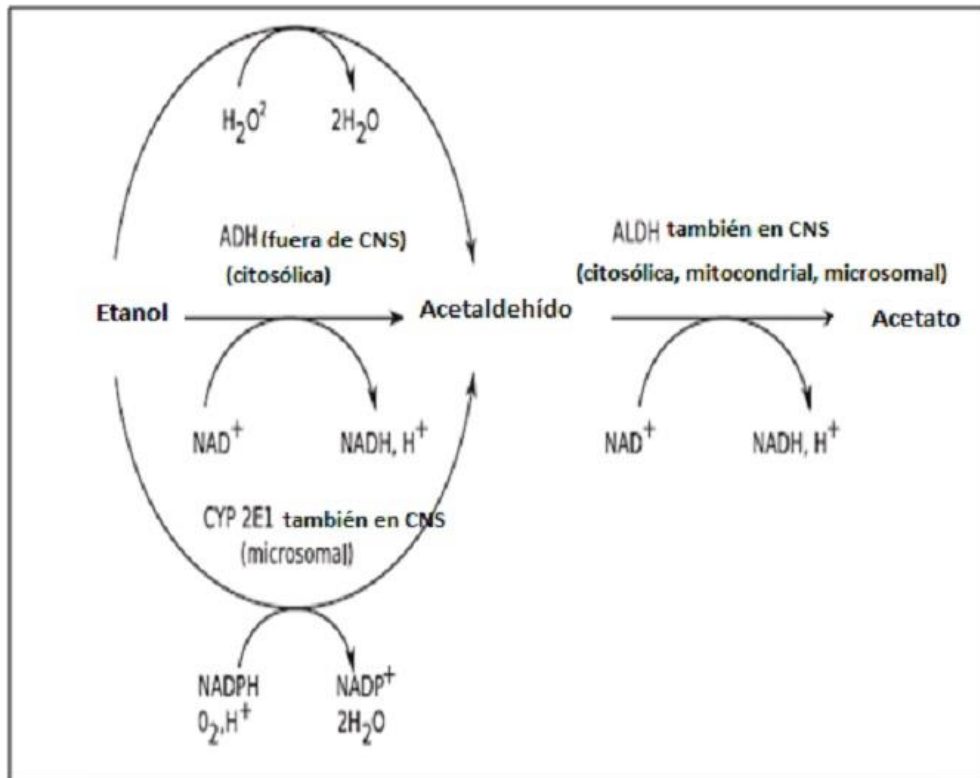


Fig 2: Metabolismo del etanol. ADH: alcohol deshidrogenasa; ALDH: acetaldehído deshidrogenasa; CYP: Citocromo P450; CNS: Sistema nervioso central.

La mayor parte del etanol se elimina a través de sus productos metabólicos, pero existe un escaso porcentaje, alrededor del 2 al 10 % del alcohol consumido, que es eliminado sin sufrir transformación en orina, heces, sudor y aire exhalado (2, 121, 134)

El consumo de alcohol en exceso así como el tiempo de consumo, han sido relacionados con el cáncer bucal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe como consumo perjudicial de alcohol a aquél que conlleva consecuencias para la salud física y mental de la persona y está definido como “el consumo regular promedio de más de 40 g de alcohol al día en mujeres y de más de 60 g al día en hombres”. El consumo excesivo episódico o circunstancial (también llamado *binge drinking*), que puede resultar particularmente dañino para la salud, implica el consumo de por lo menos 60 g de alcohol en una sola ocasión (119, 120, 133).

Existe una relación dosis-efecto, cualquiera sea la unidad en que se haya medido el consumo de alcohol: gramos, volumen (%), onzas (138).

El etanol -per se- no ha demostrado ser un carcinógeno, existiendo distintas hipótesis que intentan explicar cómo el etanol por vía local o sistémica puede actuar como factor de riesgo del cáncer bucal (10, 11, 125, 139, 140, 141, 142).

Cuando las bebidas alcohólicas son ingeridas actúan a nivel de la cavidad bucal produciendo su primer metabolito, el acetaldehído (AA), a través de la ADH presente tanto en la microflora como en las células de la mucosa oral. El papel de la microflora oral en la oxidación del etanol ha sido estudiado por Homann (31, 33, 139, 143) quien ha demostrado la producción de cantidades considerables de AA durante el consumo social de alcohol. Numerosos experimentos *in vitro e in vivo* en células cultivadas eucariotas y procariotas y en modelos animales, se demostró que el AA posee un efecto directo tóxico, mutagénico y carcinogénico (27, 131, 132, 144-149). Por lo tanto, el etanol puro es considerado un pro-carcinógeno para el desarrollo de tumores primarios (1, 20, 22, 133, 144, 146).

El consumo de bebidas alcohólicas tiene repercusión prácticamente en todo el organismo, manifestándose en todos los aparatos y sistemas: nervioso (115, 121, 151), cardiovascular (121, 151-153), digestivo (121,15-153), sexual (121, 151) y a nivel de la médula ósea (121, 151). Los daños más importantes son los realizados a nivel del hígado, ya que metaboliza productos, que no sólo no van a poder ser utilizados como fuentes de energía, sino que van a constituir potenciales carcinógenos, entre ellos, el mismo etanol, que debido a la falta de transformación permanecerá más tiempo en sangre, actuando como un posible co-carcinógeno. La falta de una alimentación sana y equilibrada (151), y la elevada tendencia al vómito (121), predispone a los sujetos a déficits nutricionales, y en algunos casos, supone un estado de debilidad general del organismo, que presentará mayor riesgo de patologías en general (124, 154). La depresión del sistema inmune asociada al consumo crónico de etanol contribuye a agravar esta situación.

El consumo agudo puede producir, por su acción sobre el sistema nervioso central: euforia, excitabilidad y desinhibición, alteraciones de la coordinación, disminución de los reflejos, depresión del estado de conciencia, coma y muerte (120).

El consumo crónico predispone a trastornos cerebrales, cardiovasculares y a algunos tipos de cáncer. El consumo acumulado puede causar miocardiopatía, arritmias e hipertensión arterial por su acción sobre las glándulas suprarrenales, determinando la liberación de cortisona (155-157). A nivel del sistema nervioso, se modifica la fluidez de las membranas, produciendo degeneración cerebelosa, neuropatía periférica y miopatías; altera las etapas del sueño, produce déficit cognitivo. En relación a la sexualidad, aumenta los niveles de estrógenos y reduce los de testosterona. A nivel gastrointestinal, predispone a gastritis, úlceras digestivas y a nivel hepático puede generar esteatosis hepática, hepatitis y cirrosis (1, 159). En el sistema inmunológico disminuye la movilidad y la adherencia de los polimorfonucleares neutrófilos y la respuesta de hipersensibilidad tardía o tipo IV (160). En la piel se incrementa el flujo sanguíneo, es frecuente observar aumento de la sudoración, y en pómulos y nariz telangiectasias y formaciones aracnoideas vasculares. El alcohol inhibe la función de la hormona antidiurética, aumentando la diuresis y la pérdida de agua (161). En mujeres embarazadas puede acarrear graves consecuencias para el desarrollo fetal, incluyendo bajo peso al nacer y un mayor riesgo de aborto espontáneo. Grandes cantidades de alcohol pueden causar el síndrome alcohólico fetal, daño cerebral y hasta retardo mental y del crecimiento (162-164). La OMS lo denomina “síndrome de Dependencia al alcohol” (165, 166, 209) y está incluido en el capítulo V de la Clasificación Internacional de Enfermedades No. 10 (CIE-10) (167, 168, 209). Varios factores pueden influir en el desarrollo de esta adicción, entre ellos la genética, el estrés, la ansiedad, conflictos en relaciones interpersonales, depresión, autoestima baja, favorecidos por la facilidad para conseguir el alcohol y la aceptación social de su consumo (169-171, 209).

Pocos estudios han descripto la salud bucal en los pacientes consumidores de bebidas alcohólicas, siendo su efecto nocivo más estudiado la predisposición al cáncer bucal y del tracto aéreo-digestivo superior (172-174).

En la cavidad bucal de pacientes alcohólicos se ha descripto un aumento en la susceptibilidad a la enfermedad periodontal, retraso en la cicatrización, candidiasis crónica y particularmente la aparición de procesos premalignos y malignos (439). El consumo de alcohol, puede estar relacionado con la enfermedad periodontal, independientemente de la condición de la higiene bucal.

(449, 453). Personas adictas al alcohol revelaron un alto porcentaje de pérdidas dentarias por caries y daños químicos en el esmalte y la dentina, como también cambios inflamatorios de todas las estructuras de la cavidad oral, la lengua, las mucosas y las glándulas salivales (449). Tezal y col (450), sugieren que el consumo de alcohol se asocia con moderado aumento de la severidad de la enfermedad periodontal por bolsas más profundas (450, 452, 454-456). Mientras que Susin y col (451), analizaron a 1115 sujetos, observando que las mujeres que reportaron beber >1 vaso/día eran más propensas a tener periodontitis, Odds ratio (OR) = 3,8; Intervalo de confianza (IC) del 95% = 01.04 a 10.01), mientras que las mujeres que reportaron beber hasta 1 vaso / d tienen menos de un 50% de probabilidades de tener periodontitis (OR = 0,5, IC 95% = 0,3-0,8). No se observaron asociaciones significativas entre el consumo de alcohol en general y la periodontitis en los hombres. En un análisis exploratorio, el consumo de vino se asoció con una menor probabilidad de periodontitis en los varones (OR = 0,2; IC del 95% = 0,1-0,5), pero no en las mujeres. Souza y col (453) evaluaron la influencia del consumo de alcohol a nivel del hueso alveolar asociada con la periodontitis en ratas que recibieron: una dieta alcohol 10% (10% de etanol, n = 12 y control, n = 12), o una dieta 20% de alcohol (20% de etanol, n = 12). Las ratas que recibieron 20% de etanol mostraron significativamente mayor pérdida ósea en comparación con las ratas de control o las que recibieron 10% de etanol. Estos resultados demuestran que el consumo de alcohol puede aumentar la pérdida de hueso alveolar en ratas de una manera dependiente con la dosis.

Existe en la literatura un cierto grado de controversia sobre si el alcohol por sí solo puede tener un impacto carcinogénico. Se le adjudica un efecto aditivo y facilitador de la entrada de los agentes carcinógenos a las células expuestas, alterando el metabolismo de las mismas (434). Estos cambios a nivel de la cavidad bucal se deben preferentemente a la ingesta simultánea del tabaco y el alcohol.

Con el fin de valorar la intensidad del consumo crónico de bebidas alcohólicas, los autores usan diferentes unidades para expresar su consumo: grados, g, mL, onzas, tragos (*drinks*), por día, semana, mes o por año.

La citada tabla ha sido confeccionada según lo declarado en los productos disponibles en comercios de Córdoba, Argentina, octubre 2014.

Tabla 1: Equivalencia en grados de alcohol según el tipo de bebida. (209).

BEBIDA	Alcohol % (rango)	Gramos por Litro. Medianas en g/l	Equivalente a un vaso/medida
VINO TINTO	12-14,5	130	150mL: 19,5g
VINO BLANCO	8-13	125	150mL: 19g
CERVEZA	3,5-5,2	49	330mL: 16g
FERNET	39-40	395	100mL: 39g
WHISKY	39-40	400	40mL: 16g

Numerosos estudios epidemiológicos han atribuido diferente riesgo para el cáncer oral según el tipo de bebida alcohólica consumida. Algunos autores afirman que la cerveza y el vino serían más riesgosos que el whisky (5, 180); otros que la cerveza y el whisky serían más riesgosos que el vino (3), y otros afirman que el whisky más que la cerveza y el vino (12, 441). Finalmente Franceschi S y col (24), concluyen en que el licor y el vino son más riesgosos que la cerveza. Como acabamos de describir los diferentes autores muestran controversias en sus resultados sobre cual de las bebidas alcohólicas, representa un mayor riesgo para el cáncer bucal.

El efecto solvente del etanol a nivel de la cavidad bucal es capaz de eliminar el contenido lipídico de la barrera que representa la mucosa bucal, formada por los lípidos derivados de la membrana que rodea los gránulos del estrato espinoso del epitelio (81, 24, 175). Otros autores han descrito un aumento en la permeabilidad de la mucosa, lo que podría permitir la penetración de carcinógenos, como por ejemplo la nitrosornicotina derivada del tabaco y otros cancerígenos químicos (hidrocarburos policíclicos), a través de la mucosa oral debido al aumento de la solubilidad de los mismos (8, 24, 83, 121, 175-181). Howie y col (179), en un

estudio con material de autopsias, encontraron que la permeabilidad aumentó con alcohol tópico al 20%, pero cuando la concentración de éste fue del 30% o más, el tejido se fija y no aumenta la permeabilidad.

Otros autores como Trigkas y col. (182), y Howie y col. (177), establecen que el incremento en la permeabilidad se debería a un reordenamiento de los elementos constituyentes de la membrana celular permitiendo al etanol aumentar la penetración de moléculas de alto peso molecular sin que exista una variación en su componente lipídico (1, 2). Las zonas de mucosa de revestimiento como mucosa yugal, piso de boca, borde y cara ventral de lengua y paladar blando, son consideradas más permeables que las queratinizadas como paladar duro y encía (8, 183-185). A pesar de ello algunos autores destacan que en seres vivos la exposición al alcohol es seguida de un proceso homeostático reparativo cuyos mecanismos aún no están totalmente descriptos. Howie y col. (177) demostraron en un estudio *in vitro*, realizado sobre mucosa en cara ventral de la lengua humana, un aumento de la permeabilidad a moléculas de alto peso molecular (sacarosa y albúmina) en presencia de alcohol.

El papel de la ADH proveniente de la microflora oral en la oxidación del etanol fue estudiado por Homann y col. (31, 33), quienes han demostrado la producción de mayor cantidad de AA durante el consumo de alcohol en sujetos con abundante flora aeróbica (*Streptococcus salivarius*, *viridans*, *neisseria*, *Corynebacterium*, hongos). El etanol parece incrementar la producción bacteriana de AA a partir de un consumo superior a 40 gr. de etanol por día (31, 35, 125, 139, 186, 187), mientras que en fumadores con un consumo diario de 20 cigarrillos, se estima que habría un 50-60% de aumento en la producción de AA salival (33). Se demostró que la producción alta de AA produce mayor incidencia de *Candida albicans*. (33, 35, 189-192). Kurkivuori y col. (187) investigaron la capacidad de los *Streptococcus Viridans* de la flora oral normal para producir AA *in vitro* durante la incubación en etanol, además de medir la actividad de ADH de las bacterias. Estos autores demostraron diferencias significativas entre las cepas bacterianas con respecto a la capacidad de producción de AA y la actividad ADH. Los *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus intermedius* y *Streptococcus mitis* producen altas cantidades de AA. Todas estas cepas bacterianas también mostraron una significativa actividad de ADH. En consecuencia, el estudio

demonstró que los *Streptococos* del grupo *viridans* puede jugar un papel en el metabolismo de etanol aumentando los niveles de AA en la boca.

Los pacientes con mal estado de salud bucal han mostrado concentraciones de AA salivales mayores que aquellos con mejor salud oral (35).

Esto implica que, incluso después de una moderada ingesta de alcohol, los fumadores producen una notable mayor concentración de AA en la cavidad bucal que los no fumadores. Estos antecedentes permiten concluir que el tabaquismo junto a la ingesta de alcohol, aumenta la producción de AA salival alrededor de un 100% en comparación con los no fumadores, no bebedores (129, 139, 187, 188,). Homann y col (33), en un análisis bacteriano, revelaron que las bacterias y levaduras aeróbicas principalmente gram-positivos se asociaron con una mayor producción de AA.

Lachenmeiery col (193), realizaron un estudio para evaluar el papel del AA que se encuentra como componente de las bebidas alcohólicas como un factor adicional en la etiología del cáncer oral. Se determinaron los niveles de AA salival de diferentes bebidas alcohólicas (cerveza, sidra, vino, jerez, vodka, el aguardiente de orujo, tequila, aguardiente de cerezas), sin tragarlas, para excluir el metabolismo del etanol sistémico. El enjuague de la boca durante 30 segundos con una bebida alcohólica es capaz de aumentar el AA salival encima de los niveles de hasta 1,000 μM en casos de bebidas con contenido de AA extremo. En general, la mayor concentración salival de AA se encontró en todos los casos en la saliva 30 segundos después de usar las bebidas (promedio 353 μM). La concentración media disminuyó después de 2-min (156 μM), 5-min (76 μM) y 10-min (40 μM). La concentración salival de AA depende principalmente de la ingestión directa de AA contenido en las bebidas en la toma de muestras de 30 segundos. Este estudio ofrece un mecanismo plausible para explicar el mayor riesgo de cáncer oral asociado con altas concentraciones de AA en ciertas bebidas.

El aumento en la producción local de AA salival microbiano entre los grandes fumadores y bebedores sería una explicación biológica para la acción carcinogénica del alcohol y el tabaco sobre la mucosa del tracto aerodigestivo superior (129, 139, 187, 188).

Está descrito también que el etanol, por ser una molécula pequeña, es capaz de atravesar las membranas celulares por simple difusión y esto permite que la actividad ADH de las células epiteliales orales lo transforme en AA el cual interfiere con la capacidad reparadora del ADN, aumentando el riesgo de desarrollar cáncer en boca (8, 124, 194-199, 201). También se ha demostrado que el fotocromo P450E1 (localizado en el retículo endoplásmico liso) participa en la oxidación del etanol y que, en caso de consumo crónico, se acumularía una mayor cantidad de AA celular siendo capaz de modo directo e indirecto de activar procarcinógenos e incrementar la producción de radicales tóxicos que favorece el desarrollo del cáncer bucal. El P450E1 participa en la oxidación del etanol cuando los niveles son superiores a 50-80 mg/dL (121). Se conocen dos polimorfismos genéticos para este citocromo: Rsa/Pst I, con dos alelos: c1 y c2; y el polimorfismo en DraI, con los alelos D y C (202). Varios estudios sugieren que los alelos variantes c2 y C están asociados con un aumento en la actividad enzimática del citocromo P450E1 (203-205) lo que implicaría una mayor acumulación de AA en el interior de las células epiteliales de la cavidad bucal incrementando el riesgo de desarrollo de cáncer oral.

Estos efectos han sido mayoritariamente estudiados en relación con el cáncer de colon; son necesarias más investigaciones que aproximen estos conocimientos al campo de la cavidad oral (121).

A pesar de que el papel del AA parece quedar bastante claro en el desarrollo del cáncer oral, se ha propuesto el papel de la carencia de retinoides en el desarrollo de lesiones precancerosas. El consumo crónico de etanol se encuentra asociado a niveles disminuidos de retinoides a nivel de la cavidad bucal (125). La vitamina A y sus derivados sintéticos, los retinoides, son moléculas pequeñas involucradas en distintas funciones biológicas, entre ellas regular el crecimiento y la diferenciación de una amplia variedad de células (125, 200, 206). Cualquier alteración en su metabolismo y activación va a repercutir en un incremento en la susceptibilidad de la mucosa oral a otros carcinógenos (200). En animales de experimentación se ha encontrado una asociación entre la deficiencia de vitamina A y una alta incidencia de cáncer, así como un incremento de la susceptibilidad a los carcinógenos químicos (200). Para que los retinoides puedan ejercer sus funciones se requiere una conversión enzimática del retinol (vitamina A) a un

ligando activo (ácido retinoico) que será capaz de unirse a los receptores de ácido retinoico localizados en el núcleo celular, controlando la expresión de los genes que median sus efectos (207). El etanol es un inhibidor competitivo del metabolismo del retinol, debido a que la misma enzima (ADH) se encarga de catalizar reacciones, por lo que se va a producir una acumulación de retinol, a expensas de la disminución de ácido retinoico que es la forma activa (125, 208, 211, 212). A su vez, el primer metabolito del etanol, el AA, también es capaz de inhibir la generación de ácido retinoico (206). El etanol parece inducir una deficiencia de ácido retinoico en el hígado, debido a un incremento en el catabolismo del mismo, mediado por la acción del citocromo P4502E1 (206). Los bajos niveles de ácido retinoico suponen una falta de control en el crecimiento de los epitelios lo que podría iniciar el desarrollo de lesiones malignas. Actualmente los retinoides se están empleando en el tratamiento de lesiones cancerosas y precancerosas habiéndose demostrado remisiones totales y parciales de ciertas lesiones de los pacientes en tratamiento con vitamina A sistémica, aunque su uso tópico parece tener un efecto limitado (200, 210-212).

El etanol a nivel de las glándulas salivales actúa alterando su morfología y función, el aumento bilateral simétrico e indoloro de la glándula parótida es un hallazgo frecuente (8, 28, 124, 213, 214, 216-220). Múltiples cambios histológicos sugieren que el parénquima y el estroma de las glándulas salivales mayores y menores son afectados en diverso grado por el consumo crónico de alcohol. (14, 15, 220, 221, 225, 226). También se demostró una reducción del flujo salival, atribuidos a la atrofia glandular (226), lo que produce una disminución en la autoclisis de la superficie de la mucosa, lo cual favorecería una mayor concentración de carcinógenos, incrementando el riesgo del cáncer bucal (2, 8, 28, 124, 213-215, 217, 220, 226-228).

Citomorfoimetría de la mucosa bucal en relación a consumidores de tabaco y alcohol:

La citología exfoliativa es una técnica de diagnóstico simple, no invasiva, que se puede utilizar para la detección temprana de lesiones potencialmente malignas (422). La citomorfoimetría evalúa parámetros tales como el área celular (aC), área nuclear (aN), la relación N/C. Estas técnicas cuantitativas permiten evaluar cambios celulares en forma precisa, objetiva y reproducible. Es también capaz de aportar datos para el diagnóstico precoz del cáncer bucal (245,423, 424, 425). En relación con las características citológicas de la mucosa bucal expuesta al etanol existen algunos trabajos cuyos resultados son variados y a veces se contraponen. La mayoría coincide en observar que el alcohol en contacto con la mucosa bucal es capaz de producir atrofia epitelial (8, 125, 214, 229, 230, 231, 232, 243) debido a la disminución del tamaño de las células basales y no a una disminución en el número de capas de células epiteliales (38, 229,231-233). Así también Mascres y col (230), en un estudio en ratas sometidas a la ingesta crónica de alcohol y con posterior biopsia de esófago, encontraron atrofia del epitelio, asociado a una disminución en el tamaño de las células basales y no a la disminución en el número de capas epiteliales. Mientras que Muller y col (231), observaron en la mucosa oral del conejo expuesto al alcohol, cambios displásicos con queratosis, aumento de la densidad de las capas de células basales e incremento en número de figuras mitóticas. Maier y col. (232), informaron que el efecto del consumo crónico de etanol en la mucosa oral de ratas, produjo un aumento significativo en el tamaño del núcleo de las células basales del piso de la boca y en el borde de la lengua. También observaron que el tamaño de la capa de células basales incrementó, y se modificó la estratificación de las células. El porcentaje de células en la fase S del ciclo celular fue significativamente mayor en las ratas con etanol ($p < 0,01$). En conclusión, los resultados reportados indican que, el consumo crónico de etanol provoca la atrofia de la mucosa oral, asociado con hiper-regeneración, lo que puede resultar en una mayor susceptibilidad del epitelio de la mucosa hacia carcinógenos químicos (232)

Diferentes autores han estudiado los cambios iniciales en la mucosa bucal en pacientes consumidores de tabaco y de alcohol: Reis y col (235) en células exfoliadas del borde lingual y mucosa bucal de 36 pacientes alcohólicos no

fumadores y 18 no consumidores ni de tabaco ni de alcohol, observaron alteraciones citológicas y de la relación núcleo/citoplasma siendo el área nuclear más grande que un tercio de la superficie citoplasmática, pero sin ser estadísticamente significativa. Valentine y col (229) analizaron en necropsias de seres humanos expuestos al tabaco y al alcohol, el epitelio de la 161 lengua y describieron una reducción del espesor epitelial provocada por una reducción en la capa de maduración, debido principalmente a la pérdida de células. También observaron aumento en el espesor de la capa de células basales debido a la hipertrofia en lugar de la hiperplasia. Concluyen en que la exposición crónica al etanol, puede asociarse con cambios citológicos carcinogénicos en la mucosa oral, inclusive en abstinencia de tabaco, aunque estos cambios se consideran más graves con el consumo de ambos hábitos (229).

Hashemipour y col. (239), estudiaron citologías exfoliativas de pacientes fumadores, adictos al opio y no fumadores. Dicho estudio indicó una disminución en el diámetro celular como así un aumento del tamaño nuclear y aumento de la relación núcleo / citoplasma en frotis tomados de los fumadores y en adictos al opio. Por el contrario, Seifi y col (240) analizaron en frotis citológicos (50 células por cada preparado), de la mucosa yugal, borde lateral de la lengua y piso de boca, en pacientes fumadores de cigarrillos, de pipa de agua y no fumadores. Se encontró un aumento del área del N (AN) y de la relación N/C (núcleo/citoplasma), y disminución en el tamaño del citoplasma de los fumadores en relación con los no fumadores.

Ogden y col. (244), observaron disminución significativa del área citoplasmática sin cambios en el área nuclear, en frotis de citologías exfoliativas de 55 pacientes con cáncer y 76 controles. Así mismo en otro trabajo dichos autores (1999), analizaron células de la mucosa bucal clínicamente normal de 50 pacientes alcohólicos y las comparó con un grupo control (bebedores sociales pero no bebedores crónicos). Seleccionaron 50 células al azar de cada grupo y no encontraron diferencias significativas entre la media de los valores de área nuclear y área citoplasmática para estos dos tipos de bebedores, a pesar de una marcada diferencia en unidades semanales consumidas. Se encontró reducción estadísticamente significativa en el área media citoplasmática y en el área nuclear

en el grupo de alcohol en comparación con los controles. Se determinó así una reducción del área celular total (241, 242, 244).

Khot y col (245) estudiaron 80 pacientes divididos en 20 no fumadores, 20 fumadores, 20 masticadores de mishri y 20 masticadores de tabaco. Analizaron por medio de citologías exfoliativas unas 50 células por cada muestra. Se observó disminución significativa en el área citoplasmática, como aumento en el área nuclear y de la relación núcleo-citoplasma (N/C) en los consumidores de tabaco (246).

Otros autores describen mayor frecuencia de micro-núcleos como evidencia de la injuria genotóxica del etanol y del tabaco (29, 235, 247, 249, 250, 253, 255, 259).

Reis y col. (235,238), realizaron citologías exfoliativas de pacientes no fumadores pero alcohólicos y observaron en ambos estudios un aumento aunque no significativo en la frecuencia de micronúcleos en lengua y mucosa yugal. Dórea y col (257) estudiaron células exfoliadas de veinte pacientes con cáncer oral y cuarenta individuos con mucosa bucal normal. El material se recogió a partir del epitelio de la mejilla en áreas con lesiones y las áreas sin anomalías; los micronúcleos se encontraron significativamente con más frecuencia en las células recolectadas de las lesiones que en las células de las zonas normales, independiente de la presencia/ausencia de cáncer (248). Otros autores como Casartelli y col (254) observaron el aumento de micronúcleos en células exfoliadas de lesiones precancerosas y en carcinoma de la mucosa bucal. La frecuencia de micronúcleos no varía con el sexo y la edad de los pacientes pero sí varía con el sitio anatómico de la lesión. Sugieren que los micronúcleos son biomarcadores de progresión neoplásica. Pellicoli y col (251) evaluaron anomalías citogenéticas a través de la cuantificación de micronúcleos en las células de la mucosa oral normal de individuos expuestos a tabaco y alcohol. Cuarenta sujetos fueron seleccionados con leucoplasia y carcinoma de células escamosas, dividido por consumo de tabaco / alcohol. Para los grupos de control y tabaco /alcohol, las células se obtuvieron de labio inferior, borde de lengua, y piso de la boca. Para la leucoplasia y los grupos de carcinoma de células escamosas, se analizaron mucosa contralateral y adyacente a las lesiones. El grupo con leucoplasia mostró aumento en el número de micronúcleos en comparación con los controles y el grupo tabaco / alcohol. Del mismo modo, el grupo de carcinoma presentó más micronúcleos en comparación con los controles (254). Por lo

contrario, Webber y col (252) evaluaron en frotis de borde de lengua y el piso de boca en 26 consumidores de cocaína, 29 alcohólicos y 35 controles, y observaron aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos en células exfoliadas de la lengua en consumidores de cocaína. Nuestros resultados sugieren que el uso de cocaína induce efectos clastogénicos. También se ha reportado aumento de micronúcleos en todas las formas de consumo de tabaco, así como en la fibrosis de la sub-mucosa (256,258).

Otros cambios citológicos tales como picnosis (P), cariorexis (KR), cariolisis (KL), broken eggs (BE), binucleación (BN), condensación de cromatina (CC) y displasia entre otros, se describen aumentados o disminuídos en la mucosa clínicamente sana o en leucoplasias y carcinomas bucales, con o sin registro de hábitos (235, 248-252, 259). Otros autores como Seifi y col (240), no observaron diferencias significativas en el porcentaje de cariorexis, vacuolización citoplasma, y núcleos multilobulados en mucosa del borde de lengua y piso de boca de los fumadores. Bohrer y col. (250), observaron similar número de células micronucleadas y cariorexis en la mucosa bucal normal, tanto en sujetos sin hábitos como en consumidores de tabaco y alcohol. Al analizar los sitios anatómicos, el número de células sometidas a cariorexis fue mayor en el labio inferior y menor en el borde de la lengua y en el piso de la boca. En el grupo control se observó un mayor número de “broken eggs” en comparación con los que consumían tabaco o tabaco y alcohol. Por el contrario, Webber LP y col (252) reportaron una mayor frecuencia de cariorexis observados en frotis de la mucosa bucal de pacientes alcohólicos en relación a los controles sin hábitos. Los autores opinan que estas características no indican acción carcinogénica y puede ser interpretada como una inducción de los procesos de queratinización con el fin de proteger la mucosa en especial la de revestimiento no queratinizada de la injuria del etanol y el consumo de tabaco en sus diferentes tipos (231, 260, 243, 258).

Los colutorios se han usado durante siglos con el fin de proporcionar salud oral o beneficios cosméticos, antisépticos, astringentes o calmantes (261-263). Actualmente, en la mayoría de los países, existe una gran variedad de formulaciones disponibles, algunas son soluciones acuosas y otros contienen alcohol. El alcohol se emplea en los colutorios, en principio, como un disolvente de otros ingredientes y como un conservante de la preparación (264,276-279). Los ingredientes activos, normalmente, son agentes antimicrobianos que tienen un

efecto temporal, reduciendo el total de los microorganismos presentes en la cavidad bucal (265, 266, 269). Se han usado diferentes formulaciones de colutorios durante años; sin embargo, recientemente se ha expresado la preocupación sobre si su contenido de alcohol podría ser una amenaza para la salud. La elevada cantidad de alcohol en algunos colutorios, así como el hecho de que permanecen en contacto con la mucosa oral durante más tiempo que una bebida alcohólica, motivó a los investigadores a estudiar su efecto local. El enjuague aumenta el tiempo de exposición de la mucosa al alcohol y se ha demostrado que colutorios con alto contenido de alcohol, el 25% o más, pueden producir lesiones blancas, desprendimiento del epitelio, pérdida de sustancia de la mucosa, sensación de ardor o dolor y lesiones petequiales tanto en hombres como en animales (267, 268, 272-275, 278-280). El uso de colutorios por pacientes que cuidan su boca, disminuiría la formación endógena de AA (2, 20, 271). Con los datos disponibles hasta ahora, no se ha podido establecer una relación causal entre el uso de colutorios con alcohol y el desarrollo de cáncer oral (261, 270, 271).

Cáncer y consumo de yerba mate

El mate es una bebida hecha de las hojas de un arbusto perenne de árboles (*Ilex paraguariensis*) nativas de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (282, 284, 297). Se consume de diversas maneras, el método más popular es mediante la colocación de la yerba mate en una calabaza o una copa de metal, plata, o vasija de cerámica con forma de jarra pequeña; se vierte el agua caliente en ella, y se bebe a través de una paja de metal llamada bombilla. Se bebe principalmente en Argentina, Brasil y Uruguay. El mate también puede ser una bebida fría y se llama tereré, un hábito común en Paraguay. El azúcar o un edulcorante artificial se pueden añadir también, aunque en algunas zonas, el mate es tradicionalmente amargo, sin azúcar.

El tiempo de ebullición del agua que se vierte en la misma porción de yerba mate difiere de acuerdo a las preferencias individuales. También se puede preparar y beber como un té común llamado "mate cocido". Un informe del Instituto Nacional de la Yerba Mate en Argentina ofrece detalles de la planta y su cultivo, los procesos de producción, la composición química de los productos comerciales resultantes y los diversos hábitos de consumo (54, 281). La yerba mate está ganando reconocimiento por sus propiedades antioxidantes, así como por su acción hipocolesterolemica, hepatoprotectora, diurética y estimulante del sistema nervioso central. También contiene minerales útiles, tales como fósforo, flúor, hierro y calcio, y vitamina C, B1 y B2, como también propiedades anticancerígenas, como poder tener efecto lipolítico (obesidad) (284, 293, 294, 296, 297, 310-314). Más del 50% de los hombres adultos y mujeres en algunos países consumen yerba mate y el consumo medio anual se estima en entre 5 y 8 Kg por persona (292, 296).

El mate es un hábito que predomina en América del Sur, pero los productos comerciales están entrando en los mercados de países fuera del continente. En 1991, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) evaluó su riesgo carcinogénico y concluyó que: (a) hay "evidencia limitada de riesgo de carcinogenicidad de mate caliente en los seres humanos;" clasificando al mismo como un "probablemente carcinógeno para los seres humanos (Grupo 2A), (b) "no hay datos disponibles sobre beber mate frío "; por lo que se lo considera como grupo 3 o no clasificable como carcinógeno (282).

Las tasas de incidencia de cáncer de esófago, laringe y cavidad bucal relacionados con la ingestión varían entre los países latinoamericanos.

El cáncer de esófago fue el primero en ser asociado con el consumo de mate (54, 56, 57). Uno de los primeros trabajos publicados en pacientes con cáncer de esófago fue en un hospital en Uruguay en 1985 (284). Se encontró una fuerte asociación en mujeres que reportaron beber 1L o más por día con un OR de 34,6; (IC) del 95%: 4.9- 246.5), mientras que para los hombres que consumen la misma cantidad, el riesgo era sólo el 4,8 (95% IC: 01.09 a 12.01) (283). También se ha relacionado la ingesta de mate con cánceres de la cavidad oral, faringe, laringe estómago, pulmón, cuello uterino, próstata, vejiga y riñón. Se sugiere que productos químicos, como el benzopireno, compuestos fenólicos, podrían ser los responsables del efecto carcinogénico de la yerba mate en los mencionados sitios de cánceres (54, 56,297-304).

Hay autores que sugieren una acción sinérgica entre el consumo de mate y el tabaquismo. A raíz de esto, la IARC ha coordinado algunos estudios adicionales en varios los países del hemisferio sur y encontraron diferentes resultados (285-287). Sewram y col (56), no encontraron ninguna relación entre la temperatura a la que los individuos reportaron beber el mate y los efectos. Resultados de este estudio sugieren que dos mecanismos independientes y competitivos podría estar en juego: en primer lugar, un efecto carcinogénico de agentes presentes en la yerba mate y, en segundo lugar, un papel de acción térmica crónica en el esófago como resultado del consumo de mate muy caliente.

El riesgo de cáncer de esófago para los bebedores de más de 1 litro de mate muy caliente tiene un aumento de 3 veces de aquéllos no consumidores de mate. Una asociación entre el consumo de mate y cáncer de esófago señalaron dos factores independientes: la temperatura y la cantidad diaria de mate bebido. El riesgo encontrado para los individuos con una mayor exposición acumulada de mate fue menor que los que estuvieron expuestos al alcohol y el tabaco (OR 1,52; IC del 95%: 0,88-2,62 frente OR 7, 1; IC del 95%: 3.75- 13.00) (56).

Un estudio piloto se llevó a cabo en varones sanos para investigar los efectos de las bebidas calientes en el esófago humano (288). Los exámenes histológicos realizados en la mucosa esofágica de bebedores diarios de mate caliente, así como en los no bebedores, mostraron casi el doble del número de esofagitis en los

bebedores; así se determinó que la causa del daño fue la acción térmica de la bebida (289). En Argentina, un estudio de casos y controles realizado por Castelletto y col (287), encontró aumento en el riesgo del cáncer de esófago asociado más con el tabaco y el consumo de alcohol, pero no con tomar mate; sin embargo, también encontraron que el riesgo de cáncer fue mayor para el grupo que bebía mate caliente o muy caliente en relación a los que no bebían. (OR1, 7; IC del 95%: 1,0 a 2,9).

En 1985, se evaluó la presencia de benzopirenos (BP) en muestras de marcas comerciales de la yerba mate (289). Las concentraciones de BP en la yerba mate es alto, de 461 mg / kg de yerba. También se evaluó la presencia de diferentes concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHA) encontrado en las hojas de yerba mate de diferentes marcas comerciales, al menos 15 compuestos de PHA se encuentran en diferentes variedades de yerba mate (58, 284). La hoja de la yerba del mate se somete a varios pasos de procesamientos antes de la venta incluyendo el uso de secado con humo de leña. El proceso de secado, tarda aproximadamente 8 a 24 horas, puede dar lugar a altas concentraciones de PHA en la yerba mate comercial (58, 284, 309). Estas observaciones podrían apoyar la hipótesis de que el riesgo de cáncer asociado al consumo de mate, podría ser relacionado no sólo con su temperatura, sino también con el nivel de compuestos carcinogénicos (56, 282, 290, 291, 297, 305-308).

La agresión térmica causada por bebidas calientes es muy difícil de investigar con precisión porque, en general, no existe una forma exacta, que dé una medición objetiva de la temperatura a la que se consume el mate. El papel que el consumo de bebidas calientes juega en el aumento del riesgo de cáncer del esófago, laringe y cavidad oral parece estar apoyada por los resultados de varios estudios epidemiológicos, llevados a cabo principalmente en los países de América del Sur. La temperatura podría actuar en dañar la mucosa, permitiendo en parte la acción sobre la mucosa de otros carcinogénicos como el tabaco y el alcohol. (52, 53, 285, 286, 295).

Reseña sobre carcinogénesis.

Se postula que el desarrollo del cáncer es el resultado de la acumulación de errores genéticos en un mismo tejido, donde también se encuentran implicadas la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor. En su desarrollo se mencionan factores genéticos, inmunológicos y ambientales. Los factores ambientales pueden a su vez ser físicos, biológicos y los más frecuentes los químicos (316, 317)

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

Período de latencia de la enfermedad: INICIACIÓN

Lesión Potencialmente maligna: PROMOCIÓN

Neoplasia benigna o Carcinoma In situ (CIS): CONVERSIÓN

Tumor maligno: PROGRESIÓN

La secuencia de mutación y crecimiento selectivo de nuevos fenotipos puede repetirse resultando en la aparición de tumores de mayor malignidad que son característicos de cada modelo (progresión) (315). (Fig 3)

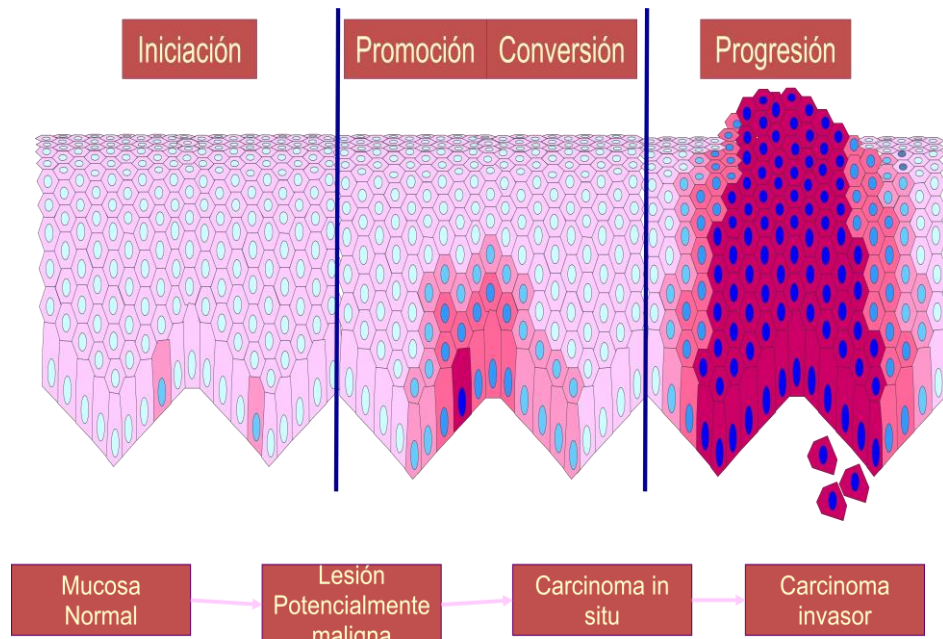


Fig 3: Etapas de la carcinogénesis.

Existen diferentes tipos de marcadores celulares y tisulares, que pueden proporcionar información adicional a la recopilada en el examen clínico, citológico y en el estudio histopatológico (365). El estudio de marcadores moleculares permite detectar alteraciones antes de que se produzcan cambios en la morfología celular y de que esos cambios sean clínicamente visibles (366).

Uno de los grandes desafíos de la patología bucal lo constituye la búsqueda de marcadores del estado de cancerización de campo. Ellos permitirían definir a la mucosa que presente cambios sub-clínicos de malignidad, que significarían un riesgo aumentado de que se produzcan en ellas tumores malignos en forma uni o multifocal (367-371). Su conocimiento resulta no solo de interés biológico, sino de aplicación en el diagnóstico precoz y en la prevención del cáncer bucal. Se han utilizado diversos métodos para la detección temprana de la cancerización de campo por medio de marcadores histoquímicos que son reacciones que asocian in-situ cambios bioquímicos con las estructuras celulares que los manifiestan (370).

Inflamación y cáncer:

En los últimos años la inflamación persistente ha sido identificada como un factor de riesgo para diversos tipos de cáncer, incrementando las posibilidades de desarrollar cáncer en los órganos involucrados. Esto se debería a que como parte de la función normal de defensa del huésped, los granulocitos secretan radicales libres reactivos y mediadores electrofílicos, exponiendo inevitablemente a células próximas del epitelio y del estroma, a sustancias con potencial mutagénico *in vitro* (318, 319, 325). Los granulocitos y los linfocitos generan por lo menos cuatro tipos de productos que son genotóxicos o mutagénicos: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxidrilos (OH^-) (320,321), óxido nítrico (ON), especies reactivas lipídicas y sus metabolitos. El óxido nítrico, por ejemplo actúa en la mutación o transformación celular, modificando o dañando al ADN, alterando la p53 (322-324.)

Los carcinógenos químicos, probablemente los más importantes, tienen frecuentemente órganos específicos, se dirigen a células epiteliales (target-cells) y causan daño genético, es decir son genotóxicos. Están relacionados químicamente con el daño al ADN y las consecuentes mutaciones somáticas, pueden ocurrir directamente ante la exposición ambiental o indirectamente por activación de mecanismos endógenos mutagénicos (316, 317). Entre ellos los compuestos nitrogenados, las nitrosaminas y su precursor el nitrato y el nitrito además del uso como conservantes alimenticios, también se encuentran en productos ahumados, productos enlatados y, particularmente, en aquellos a base de pescados, carnes o hierbas, en numerosos vegetales como la remolacha, el rabanito, el apio y espinaca, en bebidas alcohólicas, en el tabaco, etc (326). En cavidad bucal, el nitrato es parcialmente convertido en nitrito por la microflora oral, aproximadamente un 20% (327-329). El nitrito también ha sido estudiado en relación con la carcinogénesis, descubriéndose una acción mutagénica a nivel celular ya que actúa sobre el gen P53, el cual está estrechamente relacionado con los carcinomas espinocelulares de cabeza y cuello (330, 345, 350-354), es también un factor determinante muy importante en la nitrosación gástrica pudiendo contribuir a la etiología del cáncer en este órgano. Recientemente, una sobreexpresión de iNOS se observó en el carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) (345, 358-360). Yang y col (355), mostraron en CCEB que la expresión

de iNOS y p53 se correlacionó significativamente con las fases del tumor y el grado patológico de CCEB ($P < 0,05$). También hubo correlación entre la iNOS, la expresión de p53 y metástasis de ganglios linfático ($P < 0,05$). La tasa de supervivencia de los CCEB fue negativamente asociada con la expresión de iNOS, pero no con la de p53. Un aumento significativo en la expresión de la p53 se observó cuando la expresión de iNOS fue más baja. La inmunoexpresión de la iNOS se correlaciona con la tumorigénesis y la evolución del CCEB y puede servir como un marcador del pronóstico. En los últimos años se han desarrollado numerosos trabajos en el área, que intentan estudiar en profundidad su rol en la carcinogénesis humana, destacando la necesidad de continuar profundizando el tema.

El óxido nítrico (ON) es una especie inestable que está compuesta por un átomo de N y uno de O y fácilmente se transforma en nitrito (NO_2^-) o nitrato (NO_3^-) en tejidos infectados o inflamados, pudiendo contribuir al proceso de carcinogénesis a través de la generación de nitrosaminas. La participación del ON en la carcinogénesis puede explicarse desde diversos mecanismos, tales como daño al ADN y a través de la formación de nitrosaminas (331, 340, 342). Existen antecedentes bibliográficos que sugieren que el ON promovería la inactivación del gen supresor p53, además de permitir el crecimiento del tumor, la angiogénesis y favorecer las metástasis (332, 337, 343, 344, 348, 349, 361).

Existen mecanismos de daño directo al ADN por especies reactivas derivadas del ON. La formación endógena de N-nitrosaminas son compuestos químicos con potencial carcinogénico reconocido, debido a que pueden ser metabolizadas a fuertes agentes alquilantes (442). Existen diversos mecanismos que explican desde diferentes puntos de vista, los efectos mutagénicos del ON (Fig 4).

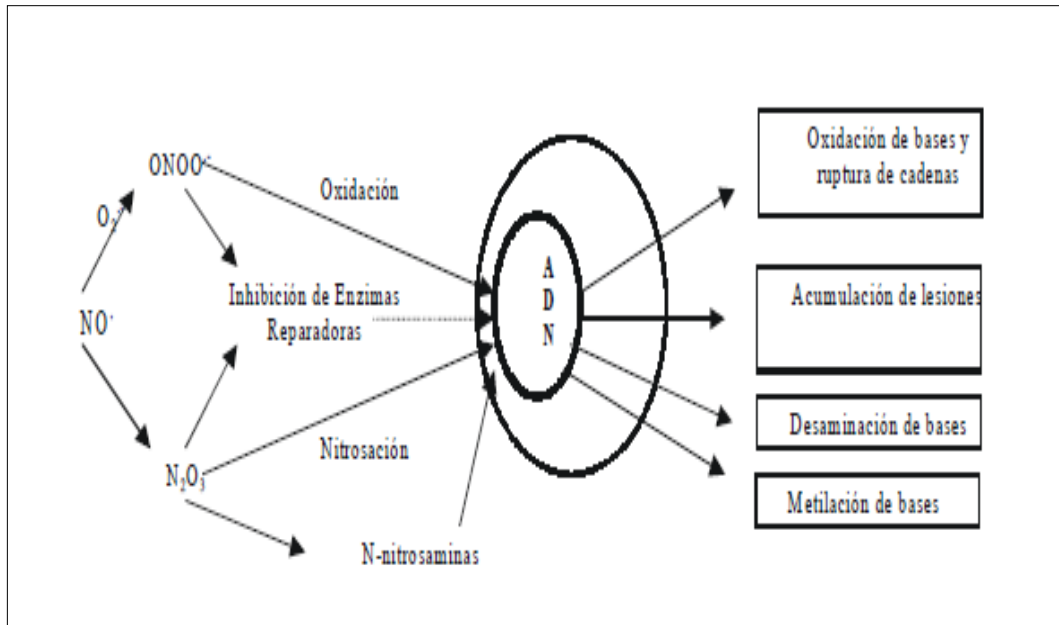


Fig 4: Mecanismo mutagénico del óxido nítrico mediado por sus especies reactivas.

Estas mutaciones pueden provocar la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes y de esta forma participar en diferentes etapas del proceso carcinogénico. Quizás el ejemplo más evidente de esto lo constituye el gen para la proteína p53, el cual se encuentra mutado en alrededor de 50 % de todos los tumores humanos (443). Estudios previos presentaron *in vitro* mutaciones de importancia biológica en el gen p53 inducidas por el ON y la metilación (444). Posteriormente se demostró que en estadios iniciales del carcinoma de pulmón existe una correlación significativa entre la actividad de ON y las mutaciones presentes en dicho gen (445). A partir de ello es suficiente para plantear que el ON, en situaciones como la inflamación, puede provocar la inactivación del gen p53 y favorecer al menos de este modo el surgimiento y desarrollo tumoral. La cantidad de óxido nítrico producido por los macrófagos activados y las células endoteliales en los sitios de inflamación se estima ser suficiente para la inducción de mutaciones (331, 446, 447). Las células inflamatorias, tales como los fagocitos, neutrófilos, y macrófagos han sido implicadas en la patogénesis de varias formas de desarrollo tumoral clínico y experimental. Se plantea la hipótesis de que este proceso está mediado por la producción de especies reactivas incluyendo ON, O₂, H₂O₂, y ONOO que infligen daños en el ADN (446).

El ON como radical libre es altamente reactivo, actúa en la defensa del huésped contra una variedad de patógenos (333) y además activa sistemas que regulan la transcripción de proteínas proinflamatorias tales como las citoquinas (334). Dicha molécula es sintetizada por la óxido nítrico sintetasa, (NOS) usando L-arginina y oxígeno como sustrato. Existen tres isoformas de NOS (Fig 5), que se transcriben a partir de tres genes separados y requieren de cofactores para activarse. Cada monómero contiene un sitio con dominio reductasa y oxigenasa. La calmodulina, el NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), el FAD (flavina adenina dinucleótido) y flavina mononucleótido (FMN) son los factores que se requieren para el dominio reductasa. Los electrones a partir de este sitio son transferidos al dominio oxigenasa del monómero adyacente; allí la tetrahidrobiopterina actúa como cofactor (BH₄), donde es catalizada la reacción entre O₂ y la L-arginina, dando como resultado la formación de ON y citrulina (335, 338, 341, 343, 344, 347, 357). Dos isoformas (endotelial o eNOS y neuronal o nNOS) son constitutivamente expresadas y son dependientes de la concentración de calcio y calmodulina. En el sistema vascular, el ON producido por eNOS es un potente vasodilatador y regulador del tono vascular en respuesta al estrés. Un tercer gen (NOS2), produce una isoforma inducible iNOS que es primariamente expresada en células inmunes, en especial en macrófagos y células derivadas de ellos. La iNOS se expresa en respuesta a estímulos inflamatorios que están bien caracterizados en células murinas. Entre dichos estímulos se cuentan citoquinas, lipopolisacáridos, interleuquina-6 (IL6), interferón- γ , IL1 β y factor de necrosis tumoral- α (FNT- α), además de algunas drogas como el taxol y el cisplatino (336, 343, 344, 347). También se expresan constantemente a lo largo del epitelio de las vías respiratorias, en la capa de queratinocitos basales de la piel normal (335) ejerciendo una importante función en la defensa contra patógenos y en conductos salivales normales donde se desconoce su rol. Shende y col (356), realizaron un estudio para detectar nitrato y nitrito en la saliva de casos con carcinoma, fibrosis de la sub-mucosa (FSM) y en personas normales sin hábitos. Encontraron aumento de nitrato y de nitritos salivales en los carcinomas orales y en FSM en relación con aquellos individuos sin hábitos; lo que permite demostrar que el aumento contribuye al desarrollo de la carcinogénesis oral a través de daño al ADN.

En tejidos normales el ON se expresa fuertemente en miocitos, músculo esquelético y células de Purkinje. La iNOS produce mayores cantidades de ON que las isoformas

expresadas constitutivamente. En ambientes con baja cantidad de arginina, la iNOS no puede transferir nitrógeno al oxígeno molecular y los electrones se combinan con oxígeno para producir O_2^- (superóxido). Existen numerosos trabajos que demuestran su incremento en las displasias epiteliales bucales, FSM y aún en los CCE de cabeza y cuello (330). Chen y col (339), estudiaron la presencia, caracterización y localización celular de iNOs en la bolsa de hámster induciendo la carcinogénesis con DMBA y encontraron inmunorreactividad en especial en los queratinocitos de las bolsas tratadas. Esto sugiere que una actividad de iNOs puede estar ligada a los estadios iniciales la carcinogénesis. Siendo este el primer estudio realizado en mucosa bucal clínicamente sana, expuesta a factores como el tabaco y el alcohol. Morelato y col. (362), analizaron la presencia de óxido nítrico sintetasa 2 (NOS2), en los márgenes histológicamente sanos CCEB, obteniendo como resultado una actividad positiva de NOS2, lo que indicaría una cancerización de campo en la mucosa histológicamente normal del tejido vecino al carcinoma.

Karthik y col. (346) observaron mayor expresión de la iNOS en pacientes con hábito de tabaco y carcinoma de células escamosas, no encontrando diferencias en relación a los carcinomas de células escamosas sin hábito. El consumo de tabaco puede estimular la producción de ON, probablemente a través de la regulación de la iNOS en células cancerígenas. Compuestos químicos carcinógenos del tabaco podrían contribuir al aumento de ON y de la iNOS en el cáncer, lo que favorecería la capacidad de las células cancerosas para proliferar y crecer.

Mastrángelo F y col. (364) observaron la actividad de la NOS2 en la patogénesis de lesiones orales precancerosas y cancerosas. Los resultados mostraron cambios en los niveles de actividad de la eNOS, que aumentaron en mucosa oral sana de CCEB, a través de diferentes niveles de displasia. Los niveles de actividad de iNOS se incrementaron en lesiones precancerosas en comparación con mucosa sana, donde iNOS estaba ausente, mientras que disminuyó en las lesiones de CCEB. Por otra parte, también se encontró un aumento gradual de la actividad de nNOS junto con la progresión de las lesiones.

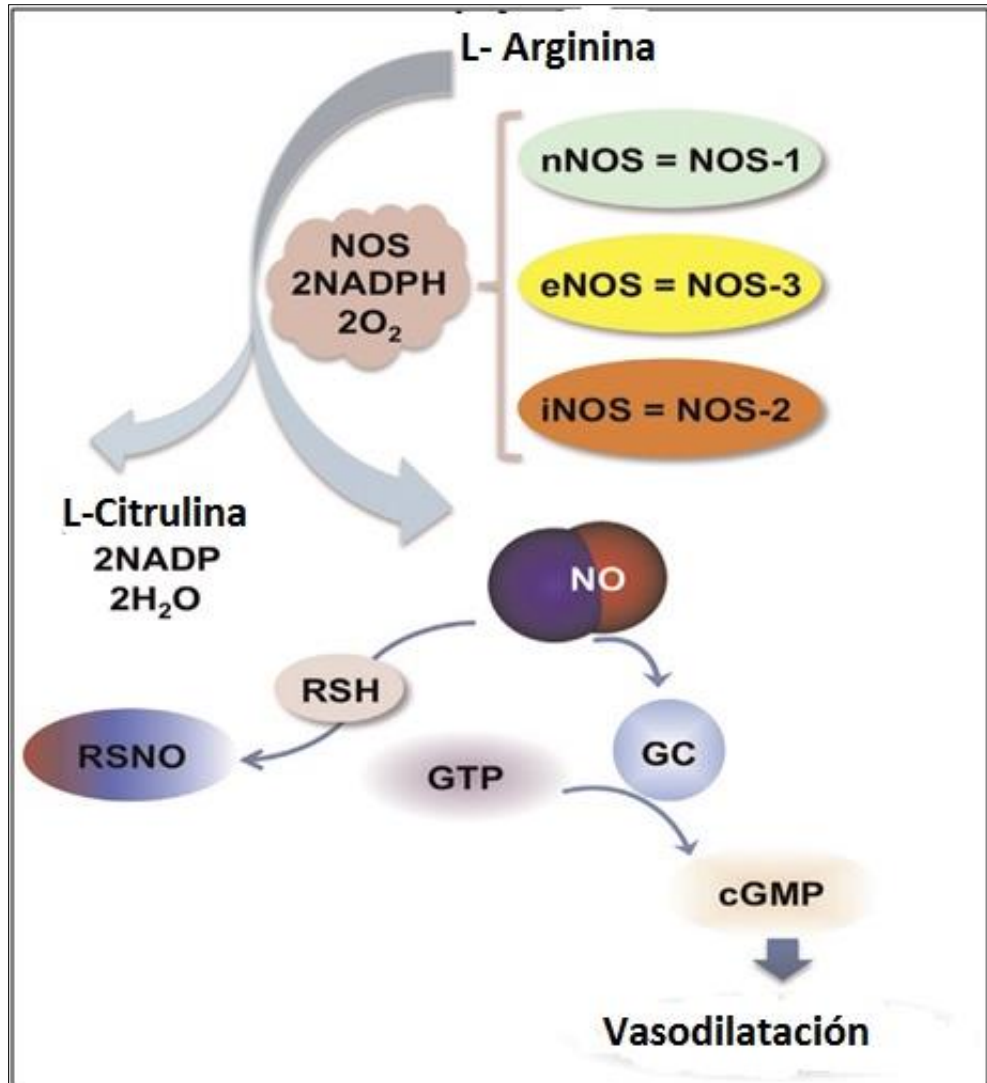


Fig 5: Biosíntesis de ON y su mecanismo de acción. NOS: oxido nítrico sintasa; nONS: oxido nítrico sintasa neuronal; eNOS: oxido nítrico sintasa endotelial; iNOS: oxido nítrico sintasa inducible; cGMP: guanosina monofosfato cíclico, ON. Oxido nítrico.

La hipoxia tumoral es un importante indicador de pronóstico en el cáncer, ya que se asocia al crecimiento agresivo, metástasis y resistencia a los tratamientos (372-374). Estas características se pueden vincular al papel de la hipoxia como regulador de la expresión de un conjunto particular de genes, entre los cuales la activación del complejo transcripcional HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) es el mediador principal (374-378, 418). HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades, una α (HIF-1 α , HIF-2 α , ó HIF-3 α) y una β . Mientras que la β se expresa constitutivamente y es idéntica al receptor aril hidrocarbano (AhR),

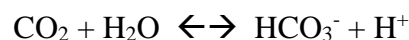
conocido como traslocador nuclear AhR (ARNT), la subunidad HIF-1 α es inducible por hipoxia. La estabilización y/o expresión de la subunidad alfa provoca la activación de HIF-1 (379-381).

Existen varios grupos diferentes de genes que son activados por hipoxia a través de la actividad del HIF, tales como transportadores de glucosa, enzimas glucolíticas, o factores de crecimiento angiogénico (374, 382-384).

Uno de los más importantes de estos grupos de genes es el que corresponde a las anhidrasas carbónicas (CAs), también llamada carbonato deshidratasa que fue descrita por primera vez en el eritrocito por Meldrum y col (419), que pertenece a la familia de metaloenzimas que utilizan Zn²⁺ como cofactor. Se conocen 16 isoenzimas o isoformas, que difieren entre sí según su localización subcelular, actividad catalítica y susceptibilidad a diferentes clases de inhibidores.

Algunas son citosólicas (CA I, II, III, VII y XIII), otras están incluidas en las membranas (CA IV, IX, XII y XIV), dos mitocondriales (CA VA y VB) y una es secretada en saliva (CA VI). También hay tres formas acatalíticas, llamadas proteínas relacionadas a CA (CARPs): CARP VIII, X y XI. En humanos, CAs están presentes en varios tejidos como el tracto gastrointestinal, tracto reproductivo, sistema nervioso, riñón, pulmón, piel y ojos, entre otros (385).

La acción de estas enzimas es la conversión reversible del dióxido de carbono a ión bicarbonato



CAs unidas a membrana, como carbonic anhydrase IX (CA-IX), tienen un sitio activo extracelular y pueden proveer iones H⁺ ó HCO₃⁻ formados durante el turnover catalítico para varios procesos fisiológicos, entre los que se cuenta la acidificación extracelular. Varias isoformas de CA están así envueltas en procesos celulares esenciales como la respiración y la regulación ácido-base, la secreción de electrolitos, la resorción ósea, la calcificación y las reacciones biosintéticas que requieren HCO₃⁻ como sustrato (386, 387) En el caso particular de la CA-IX, la importancia de su actividad está dada porque, junto con la isoforma XII, se halla implicada en procesos de cancerización (388).

En tejidos normales, CA-IX presenta una muy escasa expresión. En tejidos humanos, la expresión más fuerte de CA-IX se da generalmente en las superficies basolaterales de los enterocitos proliferantes de las criptas del duodeno, el yeyuno y la mucosa ileal (389). Se ha reportado también una expresión difusa y débil de la enzima en ductos eferentes de testículo humano y focos ocasionales en acinos pancreáticos (390, 391).

Se ha observado sobreexpresión de CA-IX en una variedad de tumores sólidos, como carcinomas renales y, particularmente, adenocarcinoma de células claras (392-395), carcinoma escamoso cervical (396,397), carcinoma de ovario (398), carcinoma colorrectal (399), carcinoma de esófago (400), carcinoma de vejiga (392), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (401) y mesotelioma (402). Se ha reportado también una correlación entre la sobreexpresión de CA-IX y mayor agresividad tumoral (403).

En las células tumorales, CA-IX cumple varias funciones. Por una parte, al excretar iones H^+ al medio extracelular, mantiene a éste más ácido y a la vez hace al pH interno ligeramente alcalino, al incorporar los iones HCO_3^- . Esta combinación, no sólo favorece el crecimiento de las células tumorales, sino que también facilita eventos tales como la transformación celular, cambios cromosómicos, ruptura de la matriz extracelular, migración e invasión, activación de proteasas y síntesis de factores de crecimiento (404, 405).

Por otra parte, CA-IX ha demostrado ser un buen marcador de hipoxia, no sólo en estudios *in vitro* (406), sino también *in vivo*, (374, 407), exhibiendo un patrón de tinción preminentemente perinecrótico, y con una distribución muy similar a la del pimonidazol, el más difundido de los marcadores exógenos de hipoxia. Algunos marcadores histoquímicos de comportamiento tumoral se expresan también en lesiones potencialmente malignas. Particularmente, los biomarcadores que pueden ser demostrados en biopsias de rutina histopatológica, constituyen una ayuda accesible en el pronóstico de estas lesiones y en el diagnóstico de cancerización de campo (362, 408-410). Si bien se ha estudiado la expresión y función de la CA-IX en tejidos tumorales, en muy pocas ocasiones se ha investigado la expresión o la actividad de esta enzima en lesiones preneoplásicas. Así, existen en la literatura escasos trabajos sobre lesiones premalignas de pulmón (401, 411), mama (412), cérvix (413, 414) y lesiones cutáneas (415), y, muy

recientemente, se ha reportado la presencia de CA-IX en leucoplasias de la mucosa oral (416,417), y no se han encontrado reportes sobre actividad de CA-IX en otra lesión potencialmente maligna como el líquen plano oral.

El proceso carcinogénico es complejo y en su desarrollo, están implicados genes y proteínas relacionadas con todas las fases del proceso neoplásico, desde la división y proliferación celular, hasta la destrucción tisular e invasión metastásica. De ahí la importancia del estudio de dicho marcador de hipoxia que hace que se profundice aún más en su estudio para así alcanzar un mayor conocimiento de su mecanismo de acción.

A pesar de las etapas de la carcinogénesis desarrolladas en el presente capítulo, algunos trabajos describen la falta de lesiones potencialmente malignas que precedan a la aparición del carcinoma a células escamosas bucal. Sin embargo, cerca del 80% de los pacientes relatan haber consumido tabaco y alcohol en exceso (Fig 6).

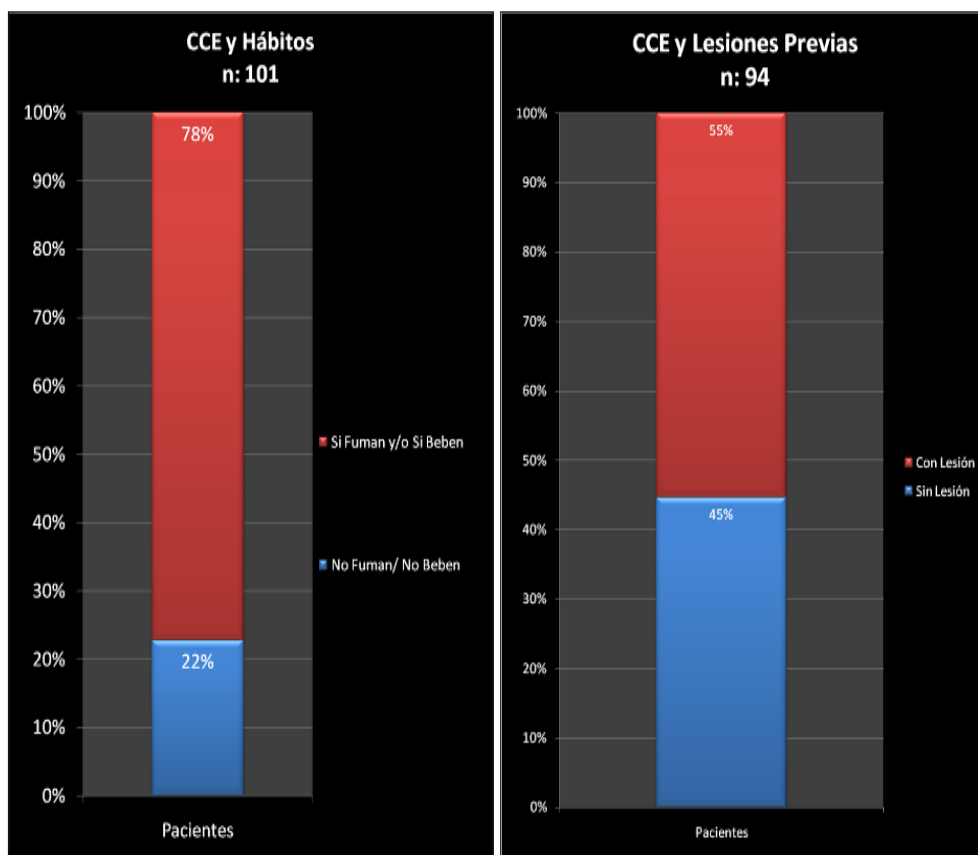


Fig 6: Distribución de los carcinomas a células escamosas según lesión cancerizable y factores de riesgo. (n: 109. Período 1/1990-3/2007) (461).

En la Fig. 6 se describe un estudio realizado en la cátedra de Clínica Estomatológica B Facultad de Odontología, UNC, en el que se analizó la distribución del CCEB según la lesión potencialmente maligna evidenciable al momento del diagnóstico, resultando que el 45 % de los pacientes no presentaba lesión previa. En relación con los factores de riesgo, se observó que el 78% consumían tabaco y alcohol, mientras que solo en el 22% restante no manifestó tener hábitos tóxicos.

Este hallazgo nos motivo a estudiar algunas características citológicas de la mucosa que evidencien el efecto relacionado a la intensidad de los hábitos tóxicos y su potencial carcinogénico.

HIPOTESIS

El consumo crónico de tabaco, alcohol y mate, se asocia a un aumento de los nitritos salivales y a cambios en la mucosa bucal de aspecto clínico e histológico normal detectables con citomorfometría y marcadores inmuno-histoquímicos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de marcadores de malignidad en células exfoliadas y biopsias de mucosa bucal, en voluntarios consumidores de tabaco, alcohol y mate.

Objetivos Específicos:

- 1- Estudiar la expresión de marcadores de malignidad mediante un estudio morfométrico de células de la mucosa bucal.

- 2- Estudiar la expresión de NOS2 y CA-IX como marcadores de malignidad en material de biopsias.

- 3- Estudiar la concentración de nitritos salivales.

- 4- Correlacionar los hallazgos con el consumo de tabaco, alcohol y mate, según la intensidad del hábito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrollaron en función de los Objetivos planteados:

El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de Facultad de Odontología CIEIS N°1619 año 2010. Los individuos fueron informados de los objetivos del mismo y antes de ser incluidos firmaron el consentimiento informado.

OBJETIVO 1:

Se incluyeron 80 individuos voluntarios adultos sanos, 41 de sexo femenino y 39 masculino, edad promedio 48 años con un rango de 18 a 87 años; que asistieron de forma espontánea a las cátedras de Estomatología A y B de la Facultad de Odontología de la UNC.

Se excluyeron: menores de 18 años, embarazadas, diabéticos, adictos a drogas de consumo ilegal, pacientes con cáncer o que hayan recibido terapia antineoplásica, inmunodeprimidos, y aquéllos con más de un año de haber dejado el consumo de tabaco y alcohol.

Luego de la firma del consentimiento informado, se les confeccionó una historia clínica completa con especial atención a los hábitos de:

Consumo de tabaco: el número total de cigarrillos fumados durante la vida, se calculó según el método de Biondi y col. (420), multiplicando el número de cigarrillos fumados por día por 365 y por el número de años que fumó. Se categorizó según la intensidad del hábito, resultando (Tabla 2).

Tabla 2: Categorización de tabaco según la intensidad

Categoría	Cigarrillos consumidos
1	< 100.000
2	100.000-200.000
3	> 200.000

Consumo de alcohol: una unidad alcohólica (drink) por día se consideró como exposición al alcohol, de acuerdo con Pentenero y col. (421). Se estimó la ingesta total de alcohol en gramos por día y el consumo aproximado de

alcohol por años de vida utilizando la Tabla 3 propuesta por Caciva y col. (209). Se categorizó según la intensidad del hábito (Tabla 4), resultando:

Tabla 3 Equivalencia en grados de alcohol según tipo de bebida, en Córdoba capital.

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

Tabla 4: Categorización de alcohol según la intensidad

Categorías	Consumo de Alcohol en g
1	< 200.000
2	200.000-400.000
3	> 400.000

Consumo de mate: se registró la temperatura del agua (caliente o tibia), el promedio de consumo diario (en cc) por día y el tiempo de consumo según Goldenberg y col 2002 (51). Se categorizó según la intensidad del hábito, como se expresa en las Tablas 5 y 6

Tabla 5: Categorización de mate según la temperatura de consumo y los cc consumidos por día.

Categoría (caliente)	Consumo de Mate en cc/día
1	0-500 cc
2	500-750 cc
3	> 750 cc

Tabla 6: Categorización de mate según la temperatura de consumo y los cc consumido por día.

Categoría (tibio)	Consumo de Mate en cc/día
1	0-1000 cc
2	1000-1500 cc
3	>1500 cc

Obtención y procesado de las muestras:

Se obtuvieron células con citobrush de tres zonas de la mucosa bucal clínicamente sana del lado derecho:

A-Piso de boca.

B- Mucosa yugal en el tercio posterior por encima de la línea de oclusión.

C- Paladar blando.

En caso de presentar lesión en el sector, se tomó del lado contralateral sano.

- Se fijaron con alcohol a 96° y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se colorearon con técnica de Papanicolaou (484)

- Los extendidos se observaron en un Fotomicroscopio Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss®, Jena - Germany) con software de procesamiento de imágenes (AxioVision LE 4.5.0.0, Carl Zeiss®, Jena - Germany) a una magnificación de 40x.
- Las imágenes digitales fueron tomadas con Cámara Cannon Powershot A 640 (®, Ōta. Tokio) (Fig. 7), y analizadas histomorfométricamente por medio del software de análisis de imágenes Image J (Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)

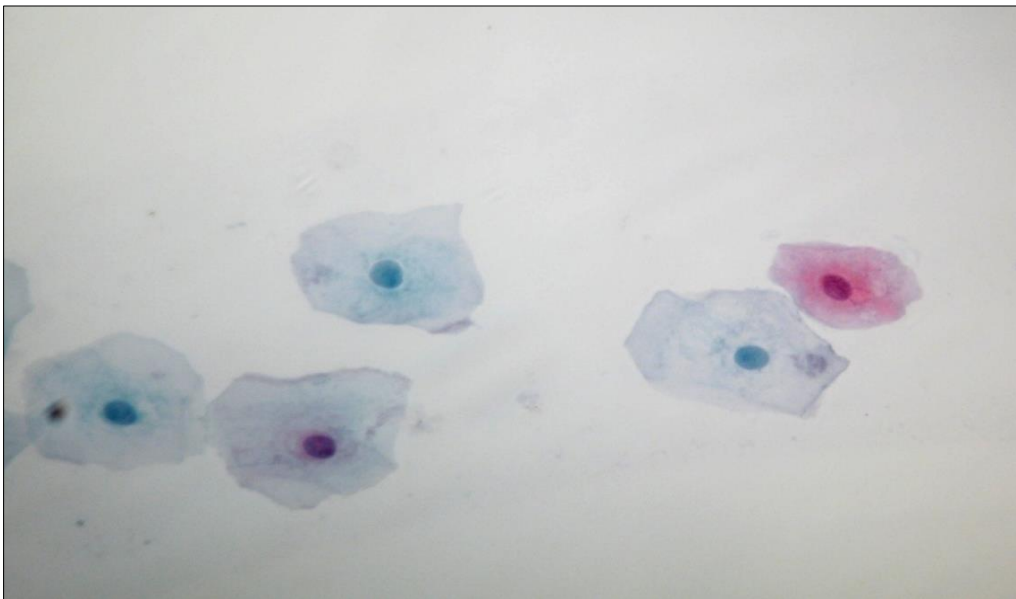


Fig 7: Fotomicrografía de células epiteliales exfoliadas del sector de piso de boca.
Coloracion de Papanicolaou (MO 40x).

El programa Image J arrojó las siguientes mediciones: área celular (a C), área nuclear (a N), perímetro del citoplasma (p C), perímetro del núcleo (p N). Se aplicó la siguiente fórmula: Porcentaje del área celular (a C) ocupada por el núcleo (N/C): (Fig. 8)

$$N/C = \frac{aN \times 100}{aC}$$

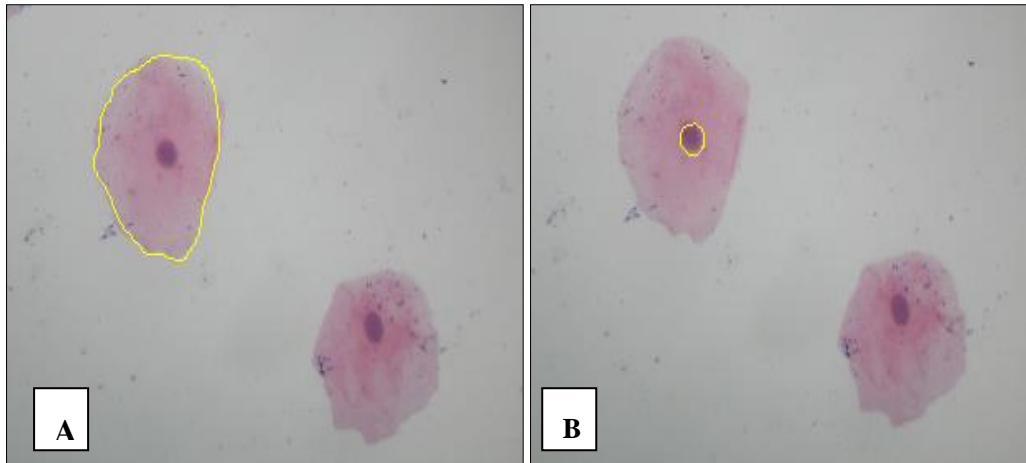


Fig 8: Fotomicrografía de un extendido de células epiteliales exfoliadas. A: Se marca el pC. B: Se marca el aN.

Se correlacionó el valor obtenido de la relación N/C, con los hábitos categorizados según intensidad, en cada localización.

Los valores obtenidos para cada hábito se estandarizaron (st) dividiendo cada registro por el valor máximo ($T/T_m = T_{st}$). De esta manera el valor máximo para cada hábito es 1 y corresponderá al paciente que obtuvo el mayor registro en dicho hábito. Con estos valores se generó el índice TAM (T: Tabaco, A: Alcohol, M: Mate), como el producto de los índices obtenidos para cada voluntario ($T_{st} \cdot A_{st} \cdot M_{st} = TAM_{st}$). Esto permitió a su vez determinar cuáles voluntarios consumen todos los factores de riesgo, (TAM si) y distinguirlos de los que consumen uno o dos solamente ya que en estos casos algún hábito tendrá el índice con valor 0 y, por lo tanto, el producto será 0 (TAM no). Una vez hecho esto, los valores de TAM fueron categorizados en cuatro clases: 0, 1, 2, 3 según su intensidad.

Para determinar si hubo diferencia en la relación N/C según categoría de TAM, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis en cada localización. Se utilizó el programa InfoStat / Professional, versión 1.1 de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

OBJETIVO 2

Análisis Inmunohistoquímico: Se evaluó la expresión inmunohistoquímica de óxido nítrico sintasa (NOS2) y anhidrasa carbónica IX (CA-IX). Se utilizaron sectores de mucosa bucal clínica e histológicamente normal contenidos como márgenes de seguridad en biopsias de pacientes tratados por lesiones hiperplásicas simples o neoplasias benignas que requerían tratamiento quirúrgico. Luego de la firma del consentimiento informado, se les confeccionó una historia clínica completa con especial atención a los hábitos de consumo de tabaco, alcohol y mate, idem al objetivo 1.

Las biopsias se fijaron en formol bufferado con PBS 10 %, pH 7.0 y se incluyeron en parafina según técnica de rutina. Se realizaron cortes de 10 micrones de espesor, que fueron desparafinados en xilol, pasados a alcohol 100 % y sometidos luego a los siguientes pasos para las demostraciones inmunohistoquímicas:

1. Inhibición de la peroxidasa endógena: 0,5% de H₂O₂ en metanol durante 30 min. y lavado en agua destilada.
2. Recuperación antigénica: Buffer Citrato pH 6.2 (CITRA Antigen Retrieval, Biogenex), en horno de microondas a 400W, 3 ciclos de 4 minutos cada uno.
3. Bloqueo de posibles uniones inespecíficas: PBS-Albúmina durante 2 hs.
4. Anticuerpos primarios: Para demostración de NOS2: anti-NOS2 humano, generado en conejo (Santa Cruz Biotechnology). Para demostración de CA-IX, anti CAIX humano, generado en conejo (Santa Cruz Biotechnology). Ambos anticuerpos se diluyeron 1:50. Se realizó incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. y lavado posterior en PBS.
5. Amplificación de la señal antígeno-Anticuerpo: kit de detección de estreptavidina-peroxidasa (Kit de Multilink, Biogenex), (Fremont, CA USA). Anticuerpo secundario (anti IgG varias especies) y anticuerpo terciario (streptavidina-peroxidasa) durante 1 hora cada uno a temperatura ambiente en cámara húmeda.

6. Revelado de la señal: Incubación en diaminobenzidina (DAB) al 0.01 % y H_2O_2 al 1% en PBS, 2 minutos y lavado en agua destilada.
7. Deshidratación y montaje en bálamo.

Como controles positivos, en cada grupo de coloración se incluyó un corte de un único bloque de un grupo de un granuloma apical reactivo para NOS2 o de un carcinoma de células escamosas reactivo para CA-IX, según correspondiere. Como controles negativos se procesaron cortes en los cuales el anticuerpo primario fue reemplazado por PBS

Se evaluó el patrón de expresión de las enzimas en cuanto a su localización intracelular, su ubicación en los distintos estratos epiteliales y la homogeneidad de la respuesta en todo el tejido epitelial disponible. La intensidad de la reacción se evaluó semicuantitativamente por comparación con el control positivo.

OBJETIVO 3:

Para estudiar la concentración de nitritos salivales se utilizó una sub-muestra constituida por 60 voluntarios sanos sin lesión bucal. Veinte (20) eran consumidores de alcohol y/o tabaco y cuarenta (40) no tenían estos hábitos

Se los citó en ayunas y se recolectó saliva sin estimular durante 5 minutos en tubos plásticos calibrados, estériles.

Inmediatamente, luego de la recolección de la saliva se estabilizó con NaOH 1M (20 μ L/1mL de saliva), desproteinizada con ZnSO₄ 0,15M (750 μ L/750 μ L de saliva) y centrifugado a 9000g durante 15 minutos. El sobrenadante se usó para la determinación de nitrito, mediante la reacción colorimétrica de Griess (99). Este método espectrofotométrico se basa en la formación de un azocromóforo coloreado entre una amina aromática y el nitrito contenido en la saliva, cuya absorbancia máxima ocurre a 540nm; la absorbancia se midió con un espectrofotómetro Shimadzu (Kyoto. Japan).

OBJETIVO 4:

Se correlacionaron los valores de N/C y de nitritos, con el consumo de T A y M categorizado. Debido a que los datos citomorfométricos no tuvieron distribución normal, se aplicó un test no paramétrico: la Prueba de Kruskal Wallis. En las muestras de saliva se aplicó test t para muestras independientes. Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat/Professional versión 1.1 (2008, actualizado 2014). (Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Nacional de Córdoba) statistical software package.

RESULTADOS:

OBJETIVO 1

Se estudió la expresión de marcadores de malignidad mediante un estudio morfométrico de células de la mucosa bucal.

En los 80 individuos voluntarios adultos incluidos, se analizaron 14.485 células, lo que correspondió a 181 células medidas con el programa Image J por paciente y 60 células analizadas por cada localización anatómica; se calculó la relación N/C y se la correlacionó con los hábitos categorizados.

Conforme a la distribución de la frecuencia en el consumo de T, A y M y teniendo en cuenta que la mayor parte de los voluntarios tenían la combinación de 2 ó más hábitos (Fig 9) se procedió a analizar cada hábito con sus asociaciones y por último en forma separada aquellos que consumieron solo mate y luego los que consumieron los tres hábitos en forma simultánea.

Cuando se analizó la combinación de los diferentes hábitos se observó que el 23% (n: 19) de los pacientes tienen la combinación de tabaco, alcohol y mate, seguido de tabaco y mate 20% (n: 16) y de alcohol y mate 15% (n: 12) (Fig. 9).

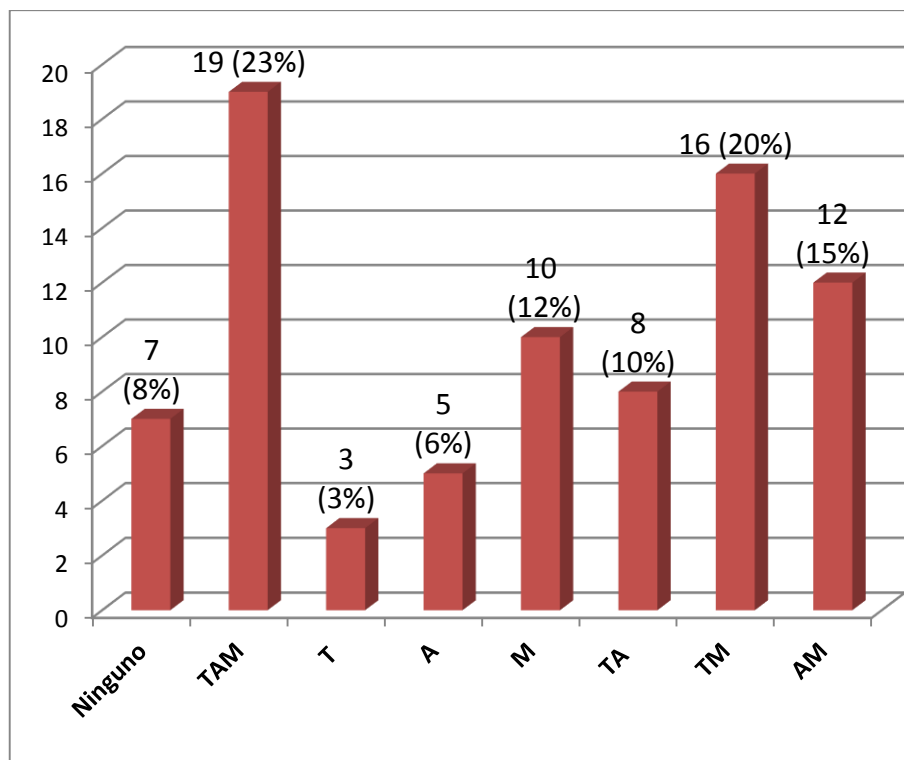


Fig. 9: Distribución de la frecuencia de hábitos: ninguno. T.A.M: tabaco, alcohol y mate; T: tabaco; .A: alcohol; M: mate; TA: tabaco y alcohol; TM: tabaco y mate; AM: alcohol y mate.

CONSUMO DE TABACO:

Al analizar el consumo de tabaco de un n: 80 voluntarios: 35 eran no fumadores, 45 consumían cigarrillos rubios con filtro, con un promedio total de cigarrillos fumados en la vida de 230.000 y un rango de 2190-830.000. El promedio de cigarrillos fumados por día fue de 21 y el promedio de años de consumo de 30.

Cuando se analizó la relación N/C según la intensidad del tabaco consumido podemos ver que en la localización en piso de boca, la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en los consumidores, independientemente de la intensidad del consumo (1, 2 o 3) (Fig. 10).

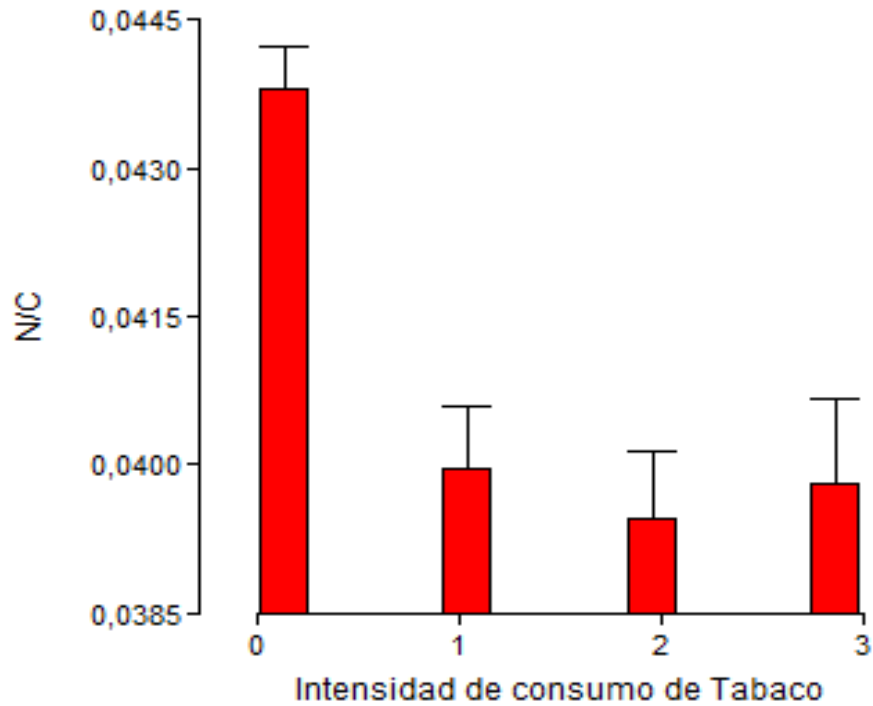


Fig 10: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según la intensidad de consumo de tabaco en piso de boca. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,002$.

$$0 \neq 1 = 2 = 3$$

Cuando se analizó la localización en mucosa yugal, se observa el mismo comportamiento que en la localización en piso de boca (Fig 11).

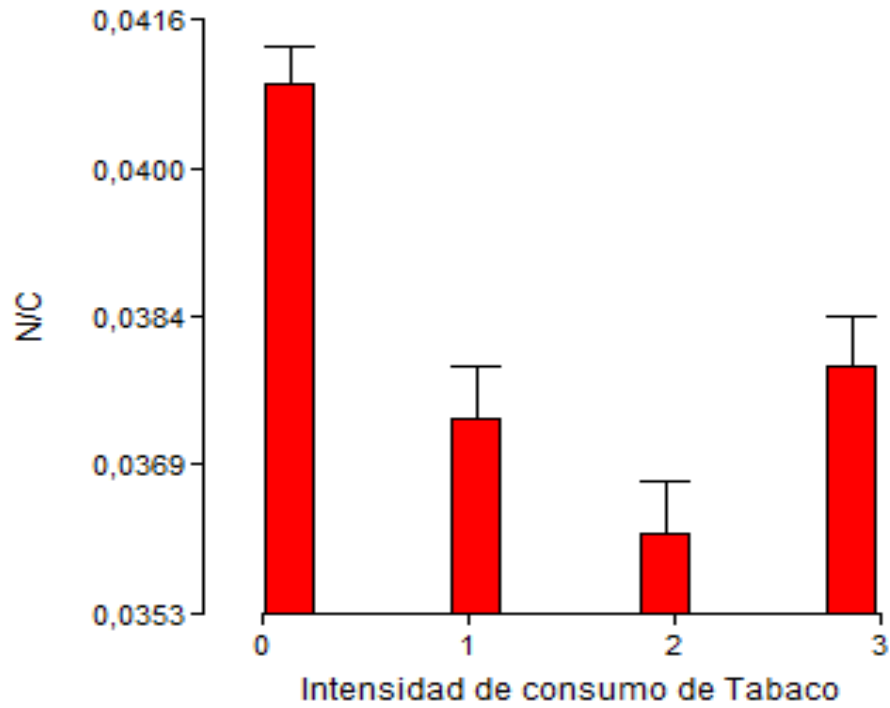


Fig 11: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según la intensidad de consumo de tabaco en mucosa yugal. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.

$$0 \neq 1 = 2 = 3$$

En la Fig 12 podemos observar que en la localización de: Paladar Blando, la tendencia es la misma.

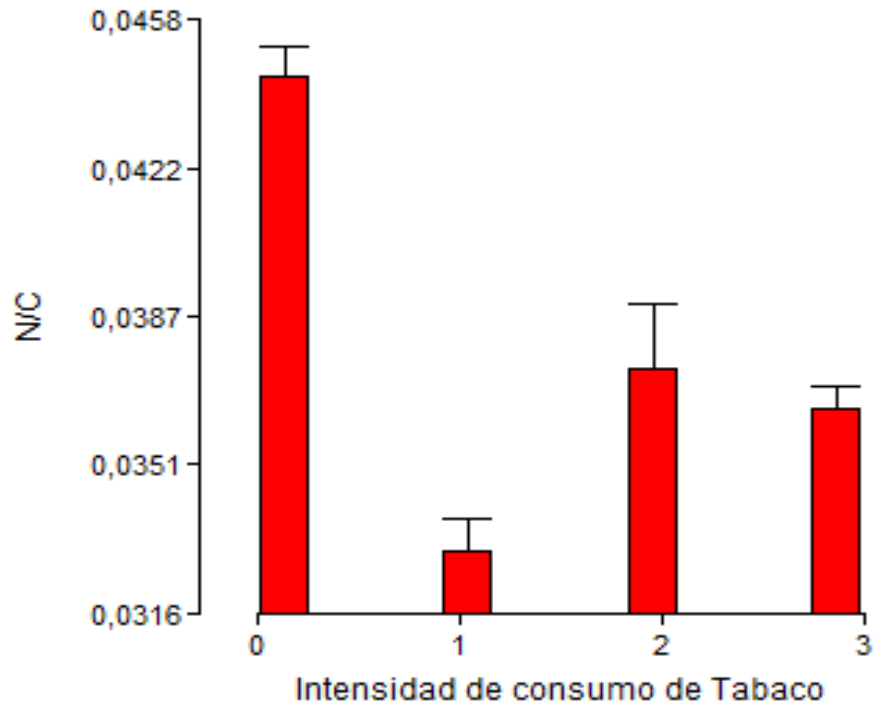


Fig. 12 Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de tabaco en: paladar blando. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.
 $0 \neq 1 \neq 2 = 3$

Se pudo observar en las tres localizaciones que el consumo de tabaco en todas sus intensidades produce una disminución de la relación N/C.

CONSUMO DE ALCOHOL:

Al analizar el consumo de alcohol de un n: 80 voluntarios: 44 eran consumidores de alcohol, siendo la bebida más consumida el vino tinto en un 43% (n: 19), seguido en un 13% de la combinación de bebidas (vino tinto, cerveza y fernet), y un 11% de consumo de cerveza y otras combinaciones (Fig.13), con un promedio total de 380.000 g de alcohol consumido en la vida. El promedio de años de consumo fue de 24 con una media de 43 g. por día.

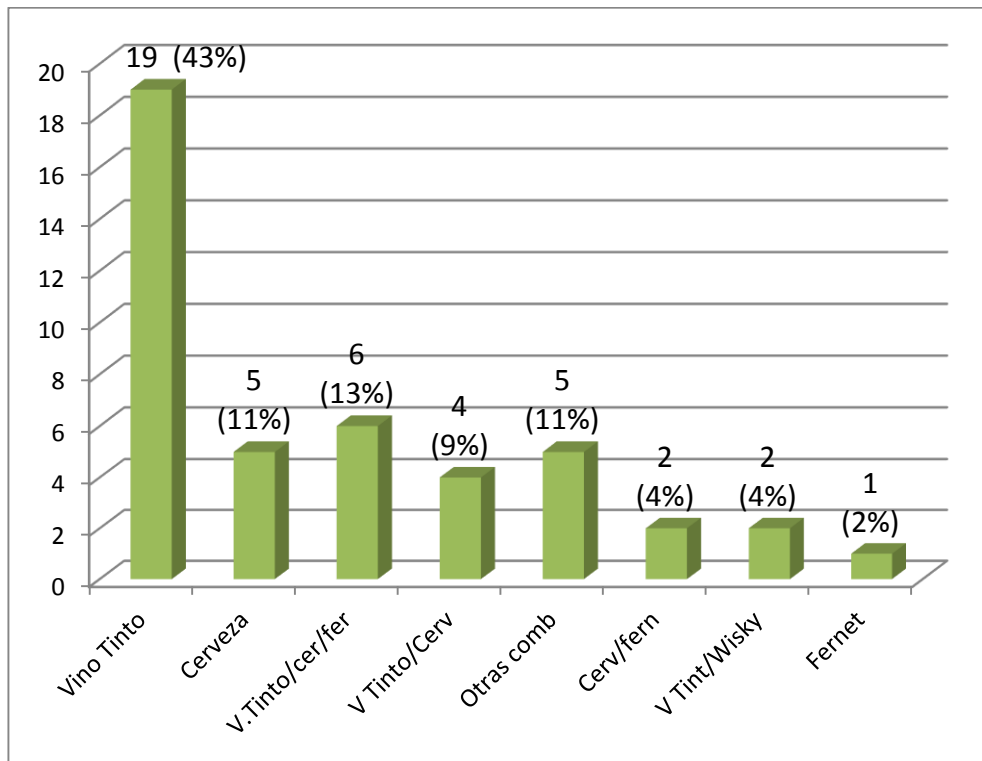


Fig.13: Tipo y porcentajes de bebidas alcohólicas consumidas por los pacientes bebedores (n: 44).

Cuando se analizó la relación N/C según la intensidad de alcohol consumido podemos ver que en la localización en piso de boca la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en los que consumen, independientemente de la intensidad (1, 2 o 3) (Fig. 14).

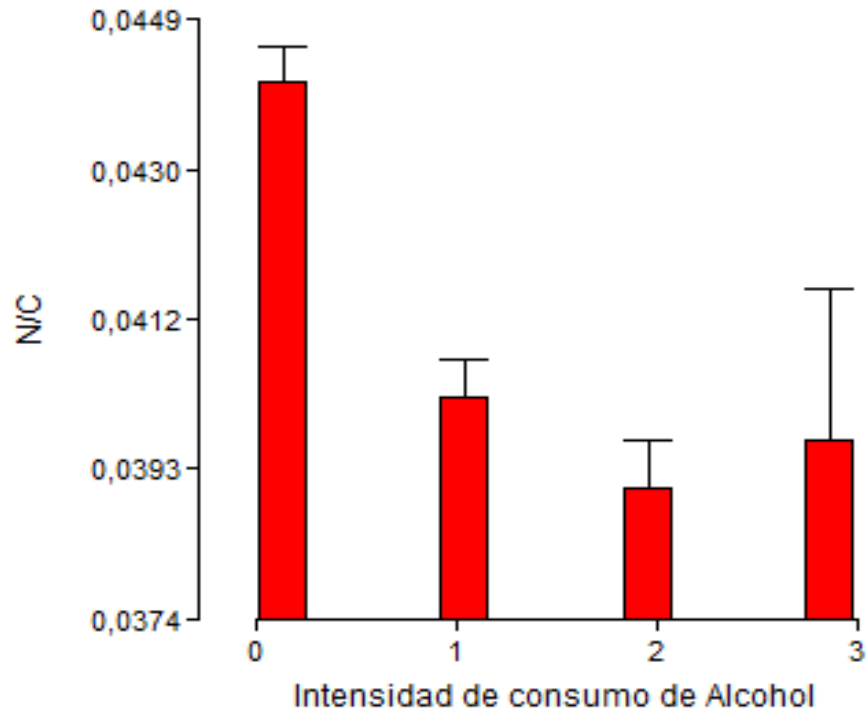


Fig. 14: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de alcohol.en piso de boca. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.

$$0 \neq 1 \neq 2 = 3.$$

Cuando se analizó la mucosa yugal se observó que la proporción de la célula ocupada por el núcleo no muestra diferencias (Fig. 15).

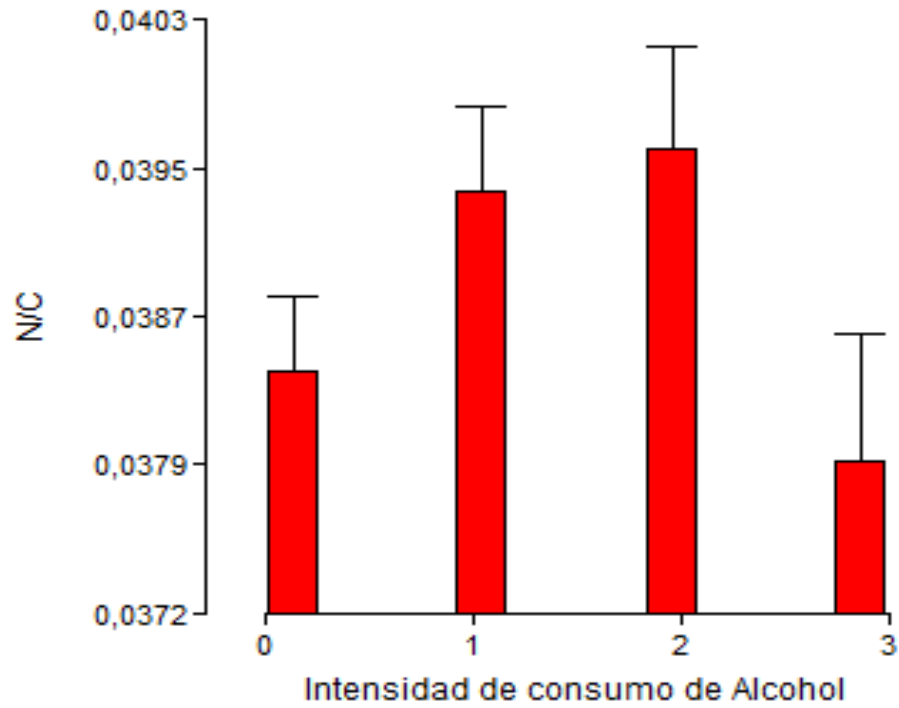


Fig.15: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de alcohol.en mucosa yugal. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,11$.

$$0=1=2=3$$

En el paladar blando la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en los consumidores en exceso (Fig. 16).

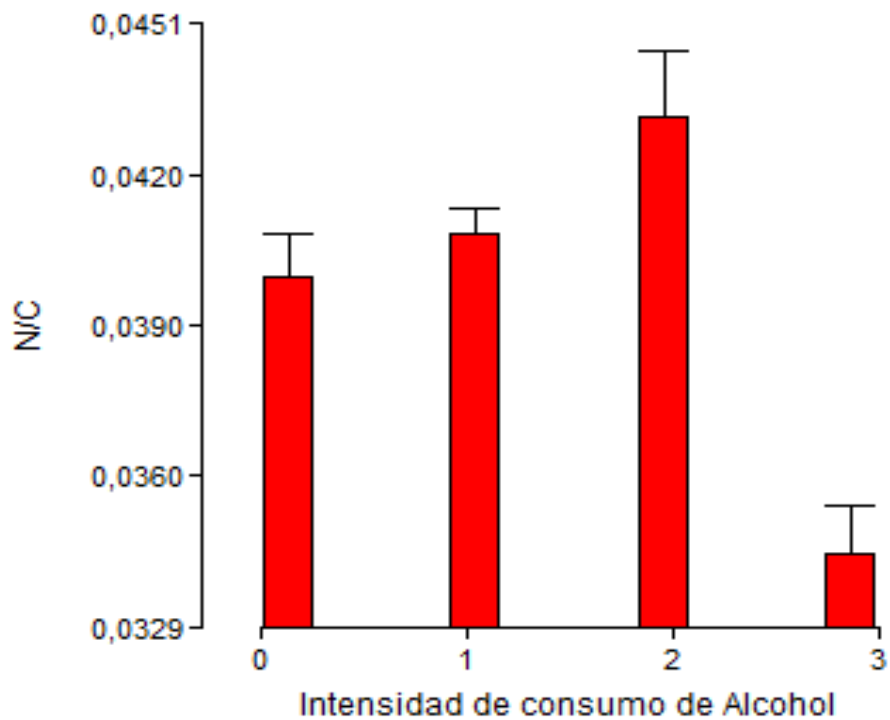


Fig.16: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de alcohol en paladar blando. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.

$$0 \neq 1 = 2 \neq 3$$

Se pudo observar que en piso de boca la relación N/C se reduce aun cuando el consumo de alcohol es bajo. En paladar blando la reducción de la relación N/C es más pronunciada en grandes bebedores.

CONSUMO DE MATE:

Al analizar el consumo de mate de un n: 80 voluntarios: 57 pacientes (71%) eran consumidores de mate, la mayoría lo tomaba caliente: 41 (72%).

El análisis de la relación N/C según la intensidad del consumo de mate en piso de boca, la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en los que consumen, no importando la intensidad (1, 2 o 3) (Fig. 17).

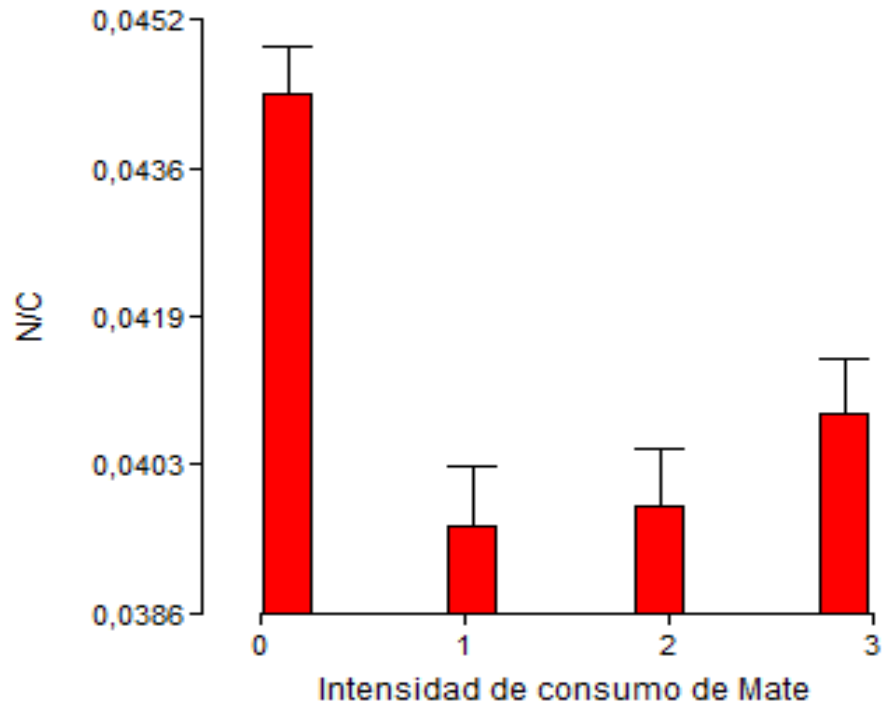


Fig.17: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de mate en piso de boca. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.

$0 \neq 1 = 2 = 3$.

En mucosa yugal la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en los consumidores de mate con mayor temperatura y/o cc de consumo diario (Fig. 18).

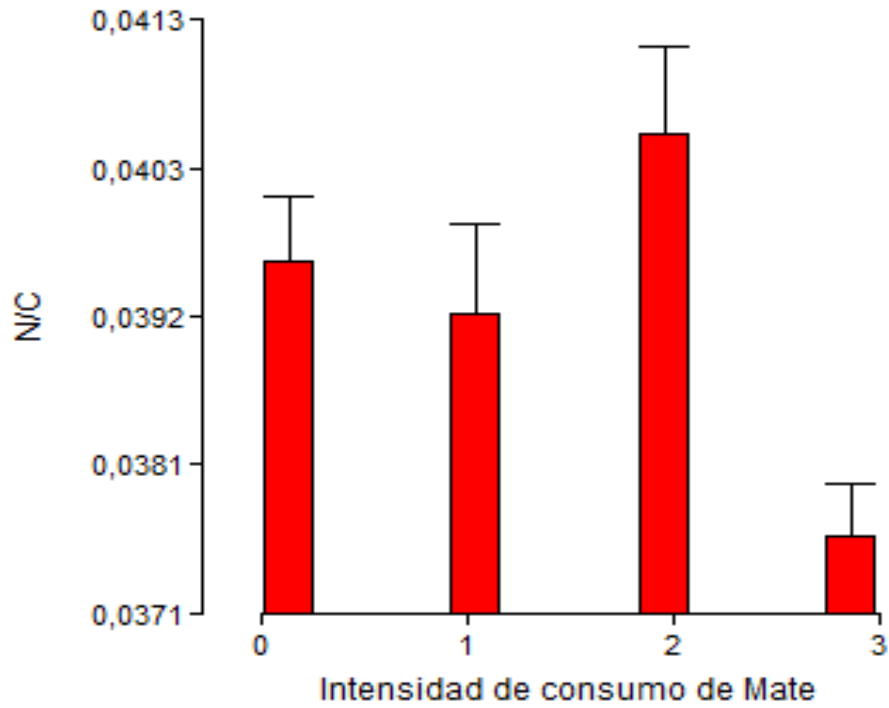


Fig.18: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de mate en mucosa yugal. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0008$.

$$0=1=2 \neq 3$$

En localización de paladar blando la proporción de la célula ocupada por el núcleo disminuye en relación con la intensidad (Fig. 19).

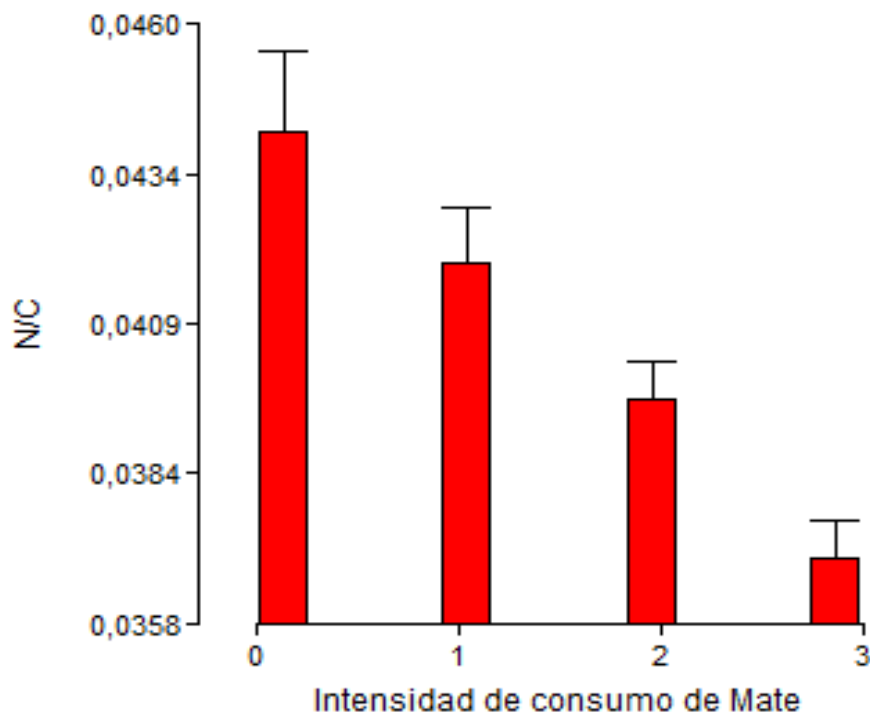


Fig. 19: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de mate en paladar blando. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.

$$0 \neq 1 = 2 \neq 3$$

Se puede observar que en piso de boca el efecto del mate se observa aun en intensidades bajas de consumo, mientras que en mucosa yugal sólo se observa en grandes consumidores y en paladar blando la reducción es gradual de acuerdo a la intensidad.

CONSUMO DE TABACO, ALCOHOL Y MATE (TAM)

Al analizar exclusivamente los voluntarios que consumían los tres hábitos (TAM) categorizados según la intensidad del hábito. En piso de boca se pudo observar que la disminución de la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en los que consumen con intensidad 1 y 2, siendo mucho mas pronunciada aún en la intensidad 3 (Fig. 20).

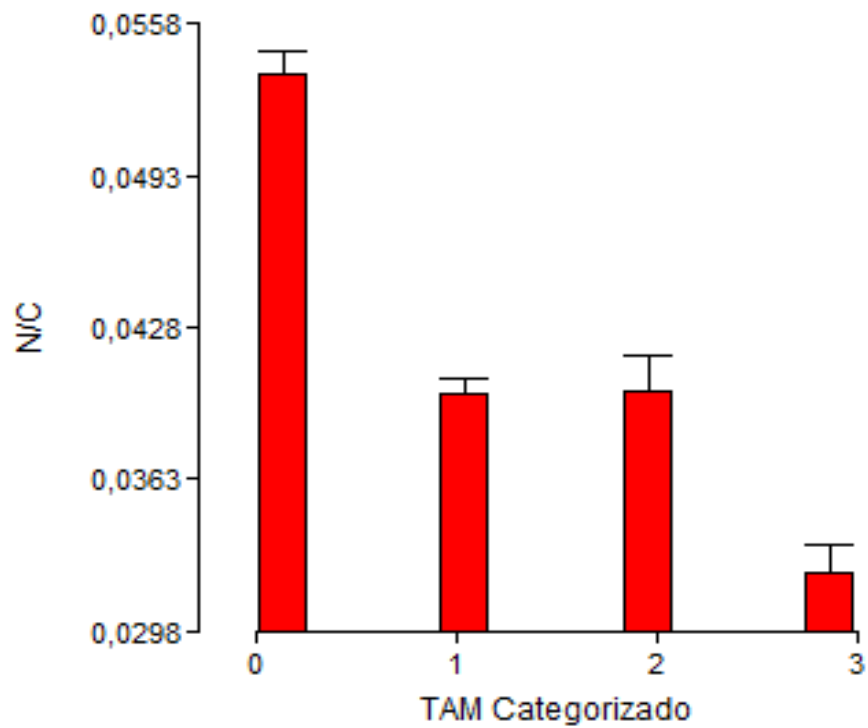


Fig. 20: Proporción de la célula ocupada por el núcleo de TAM Categorizado.en piso de boca. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.

$$0 \neq 1 = 2 \neq 3$$

En mucosa yugal, la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en aquellos que consumen en todas las intensidades (Fig. 21).

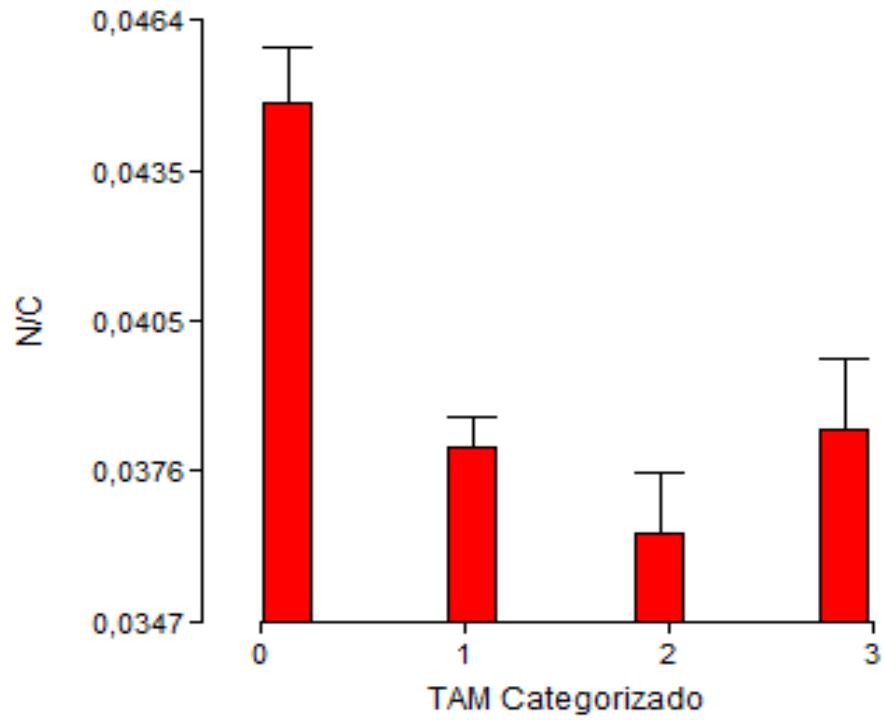


Fig. 21: Proporción de la célula ocupada por el núcleo de TAM categorizado en mucosa yugal. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$. $0 \neq 1 = 2 = 3$

En paladar blando, la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en los que consumen no importando la intensidad (1, 2 y 3) (Fig. 22).

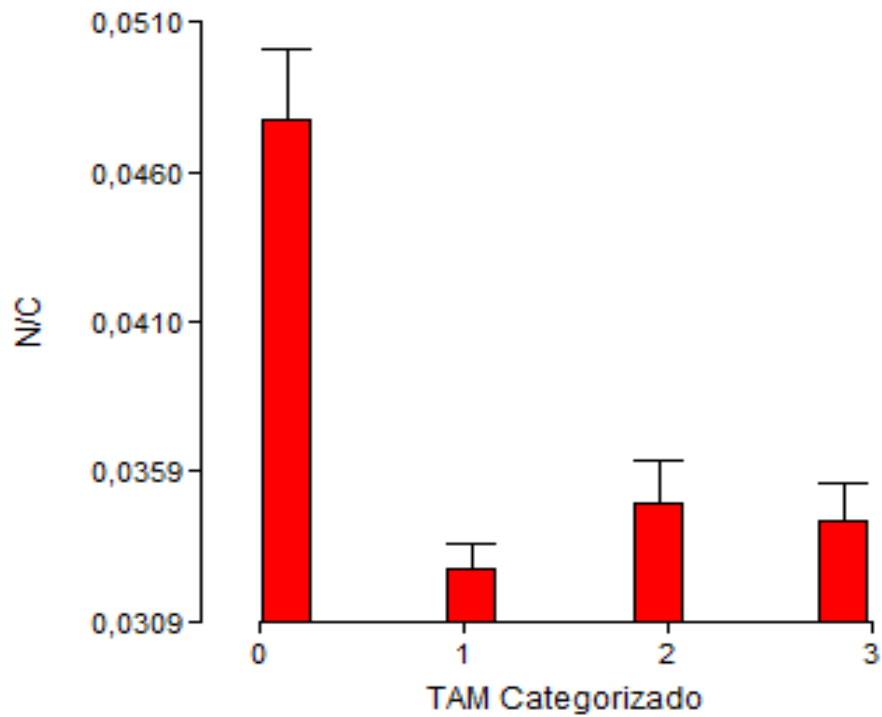


Fig. 22: Proporción de la célula ocupada por el núcleo de TAM categorizado en paladar blando. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$. $0 \neq 1 = 2 = 3$

A continuación se compararon aquellos voluntarios sin hábitos (TAM no) con los que consumían tabaco, alcohol y mate (TAM Si), así al analizar todas las localizaciones e intensidades juntas, se observa la marcada tendencia (Fig. 23).

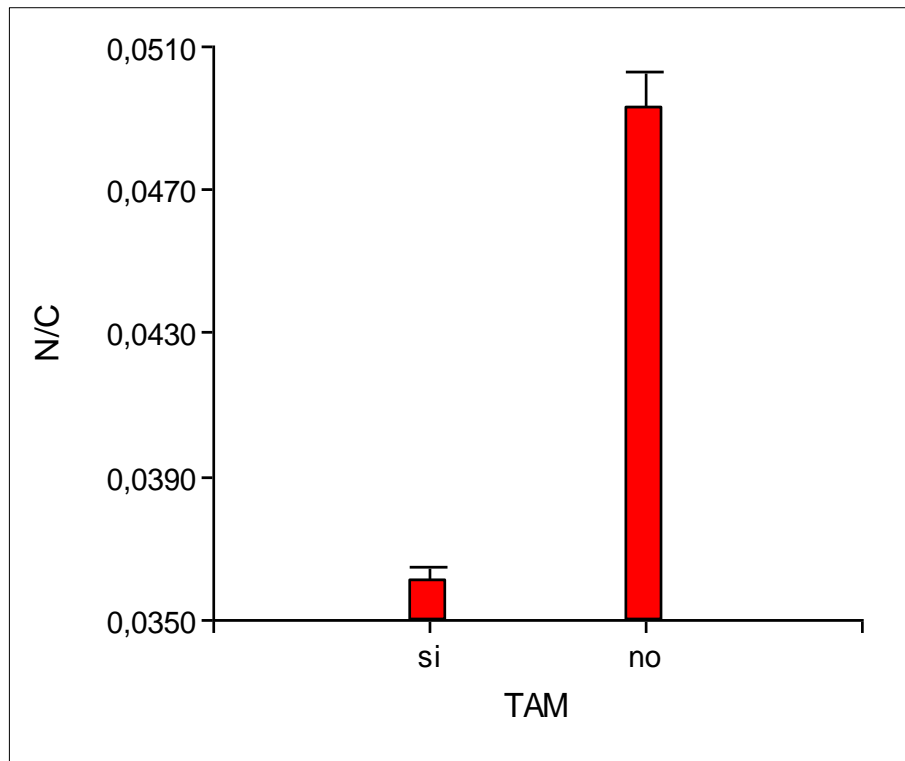


Fig. 23: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según TAM. Todas localizaciones e intensidades.

CONSUMO DE MATE ÚNICAMENTE

Por último se analizaron los voluntarios que consumían exclusivamente mate (n: 10) y se comparó la relación N/C con aquellos voluntarios sin hábitos (n: 8)

En piso de boca, la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en los voluntarios que consumen sin importar la intensidad. (Fig. 24)

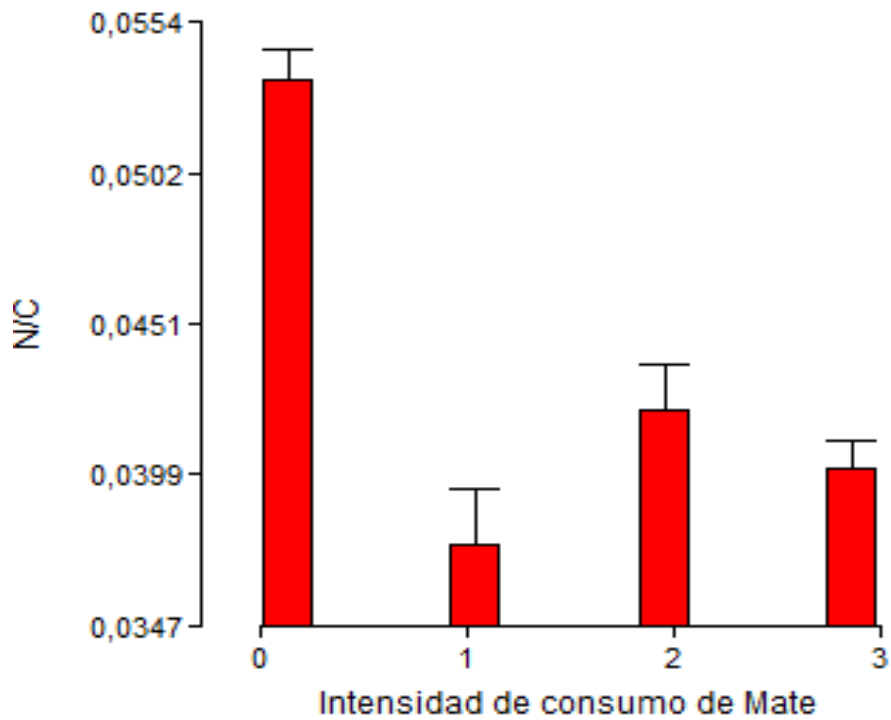


Fig 24: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de mate en piso de boca. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.

$$0 \neq 1 = 2 = 3$$

En mucosa yugal, la proporción de la célula ocupada por el núcleo fue variable, siendo menor en los que consumieron con intensidad 1 ó 3 (Fig 25).

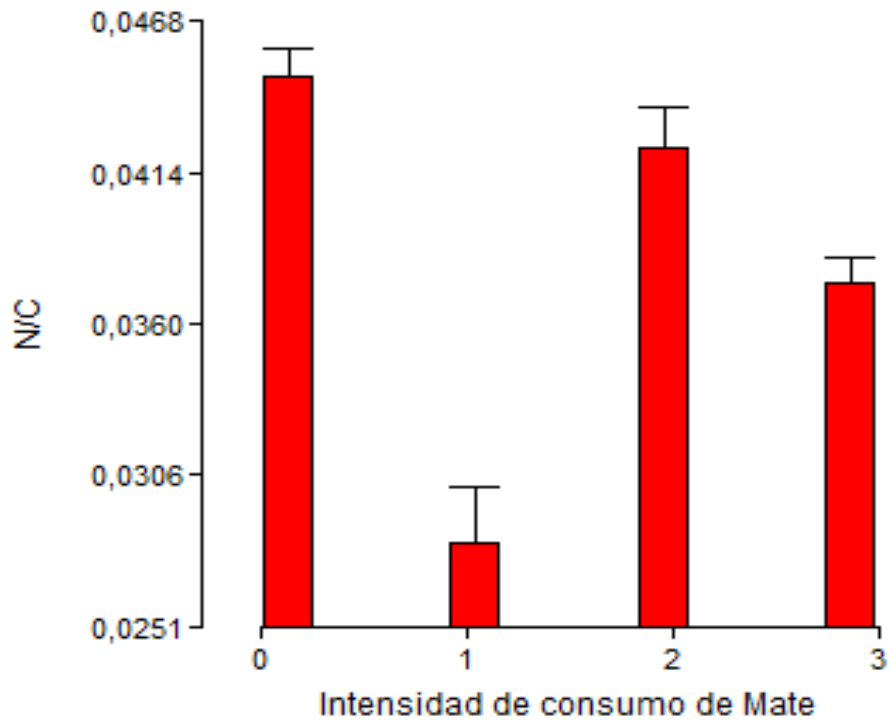


Fig. 25: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de mate en mucosa yugal. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.

$0=2 \neq 1 \neq 3$.

En paladar blando la proporción de la célula ocupada por el núcleo es significativamente menor en aquellos que consumen sin importar la intensidad (Fig. 26).

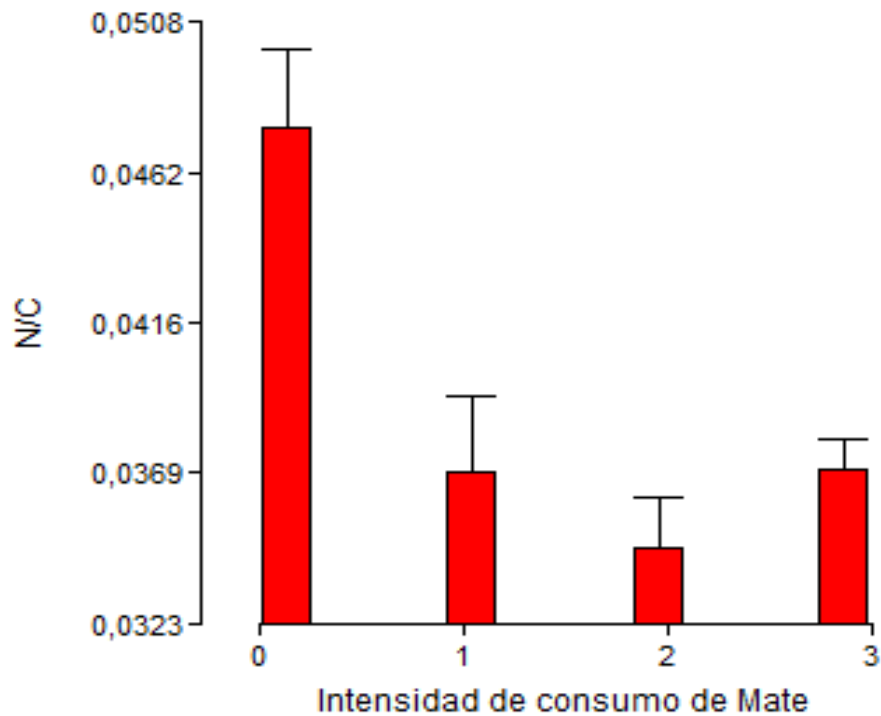


Fig. 26: Proporción de la célula ocupada por el núcleo según intensidad de consumo de mate en paladar blando. Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$.

$$0 \neq 1 = 2 = 3.$$

Del análisis de los voluntarios que sólo consumían mate se observó una disminución de la proporción de la célula ocupada por el núcleo muy pronunciado en todas las intensidades en las localizaciones de piso de boca y paladar blando.

OBJETIVO 2:

Estudiar la expresión de NOS2 y CA-IX como marcadores de malignidad en material de biopsias. El estudio de marcadores moleculares permite detectar alteraciones antes de que se produzcan cambios en la morfología celular y de que esos cambios sean clínicamente visibles.

Se obtuvo una muestra de 7 pacientes el 44% de sexo masculino con una edad promedio: 53 años (rango: 26-68), con un promedio de consumo de tabaco: 780000 cigarrillo y un promedio de 666000g de bebidas alcohólicas consumidas (Tabla 7). Los controles incluidos fueron nueve pacientes de los

cuales cuatro (45%) fueron del sexo masculino, con una edad promedio de 48 y un rango de 21-77 años, sin hábitos.

Tabla 7: Pacientes con hábitos de tabaco, alcohol y mate con sus intensidades.

Sexo	edad	tabaco	Int Tab	Alcohol g.	Int Alcohol	Mate cc	Int Mate
M	57	536550	3	219000	3	1440	3
M	35	175930	2	762850	3	0	0
M	66	396025	3	1679000	3	900	3
F	65	2774000	3	2920	1	0	0
F	26	0	0	0	0	2400	3
F	50	0	0	0	0	4000	1
M	68	17885	1	0	0	600	1

En la interpretación de las biopsias se tuvo en cuenta el patrón de expresión celular, el que se clasificó como: Pericelular (M) con localización en membrana celular, Citoplasmática (C) con expresión difusa en el citoplasma y Nuclear (N) cuando presentaban núcleos positivos.

La localización intraepitelial se clasificó como: B: reactividad en el estrato basal, M: reactividad en los estratos medios, considerando como tales los dos tercios del espesor epitelial por encima de la capa basal y S: reactividad en los estratos superficiales, considerando el tercio epitelial restante situado por debajo de la capa córnea. La homogeneidad de la respuesta se consideró como: Homogénea (H) cuando se expresaba en todo el epitelio disponible en la muestra y parcheada (P) cuando solo se expresaba en algunos sectores en alternancia con sectores negativos.

La intensidad de la reacción se evaluó subjetivamente por comparación con los controles positivos, asignándoles un puntaje de 3 a las reacciones de igual o mayor intensidad que los controles. 1 y 2 intensidades intermedias y 0: sin reacción.

En el análisis de las muestras de NOS2 se observó que en las mucosas con factores de riesgo todas las muestras resultaron positivas, la intensidad de la reacción es mayor en los estratos basales (Fig 27) Solo una muestra resultó negativa en los estratos superficiales. Todas las restantes resultaron positivas en todos los estratos epiteliales. La intensidad de la reacción fue variable (entre 2 y 3 puntos, en una escala semicuantitativa de 1 a 3), en los estratos basales, disminuyendo hacia los superficiales. La reacción es parchada, localizada preferentemente en la membrana celular y en algunos casos también en forma difusa en el citoplasma (Fig. 28)

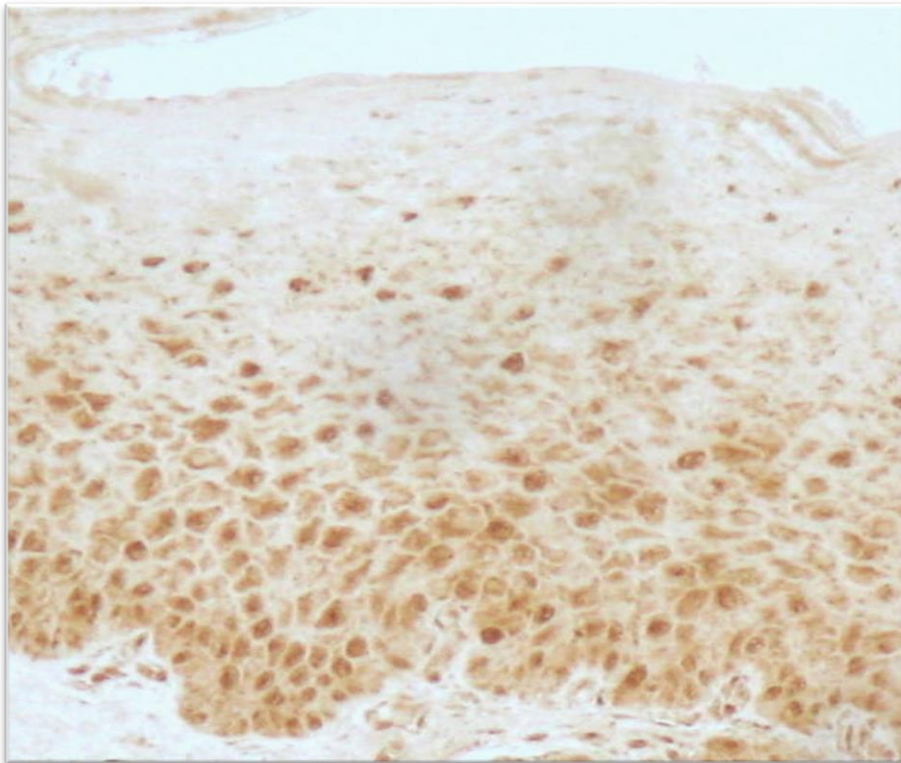


Fig. 27: NOS2. Reacción nuclear y citoplasmática, más intensa en estratos basales (MO 40 x)

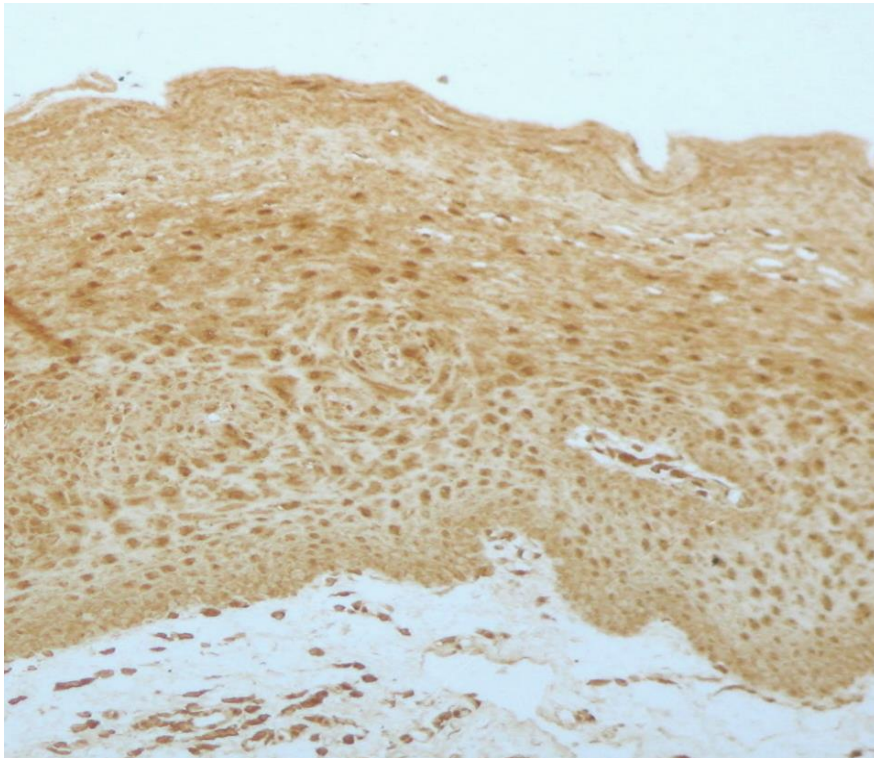


Fig: 28: NOS2. Reacción citoplasmática intensa en capa basal. En los estratos medio y superficial predomina la reacción nuclear. (MO 40x)

En las mucosas sin factores de riesgo, dos de las mucosas estudiadas resultaron muy débilmente positivas en estrato basal, con una reacción parchada en la zona basal. (Tabla 8)

Tabla 8: Análisis de muestras de biopsias NOS2. B: reactividad en el estrato basal; M: reactividad en los estratos medios; S: Reactividad en los estratos superficiales; P/H: Parcheada/Homogénea; N/C: Nuclear/ celular.

Caso	B	M	S	P/H	N/C
Pacientes sin factores de riesgo					
1	0	0	0		
2	1	0	0	P	N-C
3	0	0	0		
4	0	0	0		
5	0	0	0		
6	1	0	0	P	N-C
7	0	0	0		
Pacientes con factores de riesgo					
1	2	1	1	P	N-C
2	1	1	0	P	N-C
3	3	3	2	P	C
4	2	1	1	P	C
5	2	1	1	P	C
6	3	2	1	P	N-C
7	2	1	2	P	C
8	2	1	1	P	N-C
9	2	3	3	P	N-C

El análisis de la expresión de CA IX, reveló en todas las muestras de pacientes con factores de riesgo, que resultaron positivas (Fig.29), con la reacción más intensa en los estratos basales (Fig. 30), disminuyendo hacia los superficiales. Solo una muestra resultó negativa en el los estratos basal y superficiales y débilmente positiva en los estratos medios. La intensidad de la reacción fue variable (entre 1 y 2 puntos). La reacción es parcheada (P), localizada preferentemente en la membrana citoplasmática (Fig. 31) No se observaron

diferencias de reacción entre las mucosas con bajo y alto riesgo. En las mucosas sin factores de riesgos, tres resultaron débilmente positivas (graduación 1) con una reacción P en la zona B. (Tabla 9).

Tabla 9: Análisis de muestras de biopsias CA IX. B: reactividad en el estrato basal; M: reactividad en los estratos medios; S: Reactividad en los estratos superficiales; P/H: Parcheada/Homogénea; M/C: Pericelular/ Membrana celular citoplasmática

Caso	B	M	S	P/H	M/C
Pacientes sin factores de riesgo					
1	0	0	0		
2	0	0	0		
3	0	0	0		
4	0	0	0		
5	1	0	0	P	M/C
6	1	0	0	P	M/C
7	1	0	0	P	M/C
Pacientes con factores de riesgo					
1	3	2	1	P	C
2	2	1	2	P	M
3	2	1	1	P	M
4	2	3	3	P	C
5	2	1	1	P	M/C
6	1	1	0	P	M/C
7	3	3	2	P	M
8	2	1	1	P	M
9	2	1	1	P	M/C

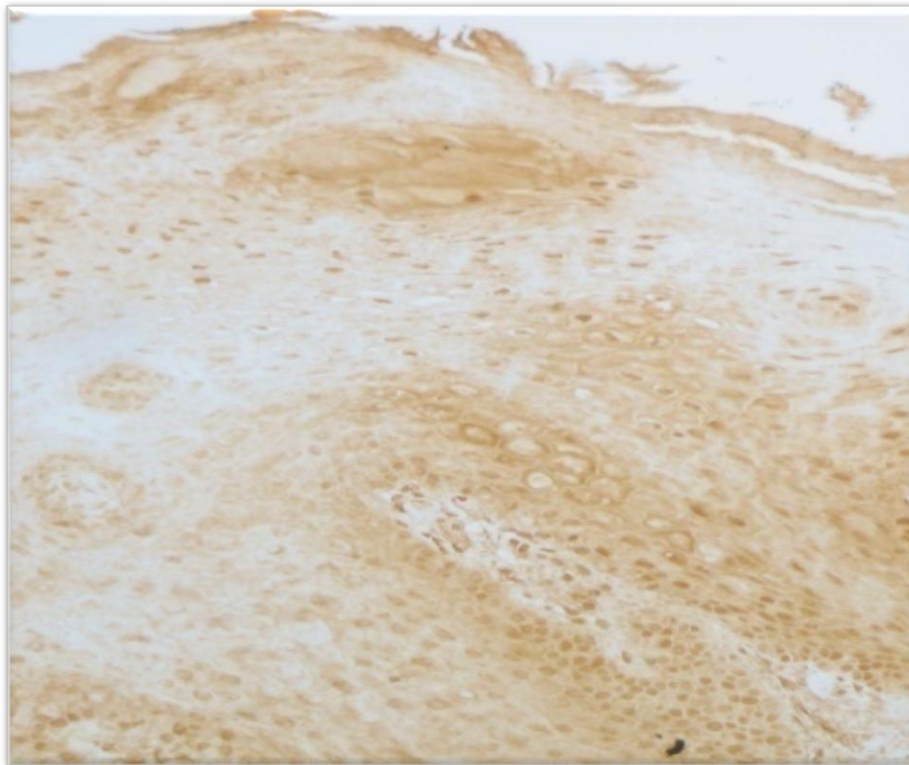


Fig. 29: CA-IX positividad en todo estrato epitelial. (MO 40x)

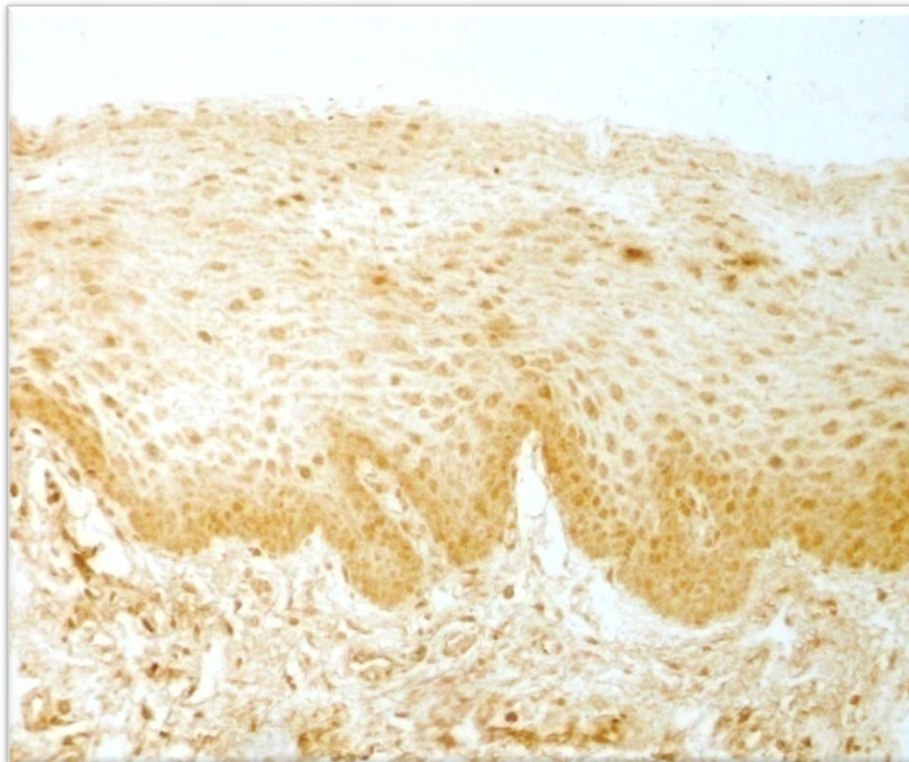


Fig. 30: CA-IX positividad intensa en estrato basal. (MO 40x)

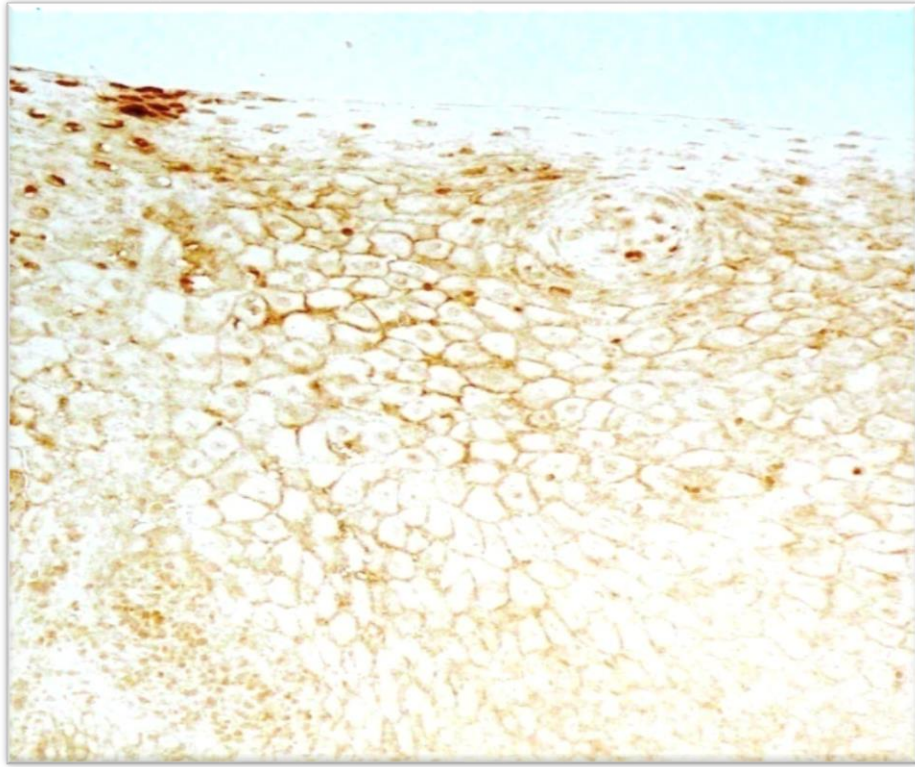


Fig. 31: CA-IX reacción parchada en membrana citoplasmática (MO 40x)

OBJETIVO 3:

Para la determinación de nitritos salivales se incluyeron 20 casos (Tabla 10) y 40 controles apareados por sexo y edad (Tabla 11).

Tabla 10: Pacientes consumidores de tabaco, alcohol, mate (según su intensidad), con valor de nitritos salivales.

Edad	Sexo	Inten. Tabaco	Inten. Alcohol	Inten. Mate	NO2
53	F	3	0	3	102,2
42	F	0	0	3	45,1
54	F	0	0	3	126,95
87	F	0	2	1	199,85
18	M	1	1	2	103
48	F	0	1	2	110,4
36	F	0	0	3	247,6
51	F	0	3	3	30,9
22	M	0	1	0	927,10
62	F	1	0	3	114,95
23	M	0	3	3	149,45
22	M	0	1	1	201,75
72	M	0	3	3	147,25
21	M	1	2	1	214,3
22	M	1	3	0	220,2
21	F	0	0	2	22,25
22	M	0	2	1	128,4
68	M	1	0	1	33,8
56	M	3	1	0	170,1
33	F	1	0	3	145,1

Tabla 11: Pacientes no consumidores de tabaco, alcohol, mate, con valor de nitritos salivales.

Edad	Sexo	NO2		Edad	Sexo	NO2
51	F	86,4		51	F	87,54
45	F	251		45	F	248,76
51	F	150,4		56	F	197,59
82	F	390,49		82	F	370,4
18	M	214		20	M	43,1
43	F	40,3		48	F	1408
36	F	298,82		36	F	199,9
49	F	256,4		50	F	117,1
24	M	102,7		19	M	29,2
60	F	259,8		65	F	153,1
19	M	177,1		25	M	296,5
20	M	43,15		18	M	52,9
76	M	468		71	M	328
19	M	121		18	M	213,4
24	M	115		24	M	433
24	F	73,55		18	F	155,8
27	M	41,85		34	M	25,7
62	M	131		65	M	169,4
56	M	135,3		56	M	135,3
38	F	215,86		33	F	129,9

Al analizar los nitritos salivales mediante el test “t” para muestras independientes se observó que la media de grupo de casos fue 172 μ M, mientras que los controles fue de 212 μ M (Tabla 12).

Tabla 12: Caso-control de nitritos salivales.

Grupo	n	Media \pm EE
casos	20	172,03\pm42,35
control	40	212,59\pm35,70

Se observó una amplia variabilidad interindividual sin diferencias significativas entre ambos grupos de estudio.

DISCUSION

El carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) es el tumor maligno más frecuente de la cavidad bucal y el sexto más común de los cánceres (474). La detección temprana es clave para mejorar la calidad de vida y aumentar la tasa de supervivencia. En nuestro medio la mayoría de los pacientes consultan en estadios avanzados, una de las razones más comunes es la demora en el diagnóstico debido al profesional o al desconocimiento del paciente. (461, 475- 477). Llama la atención que en países en vías de desarrollo como el nuestro la tasa de incidencia de cáncer bucal (CB) es inferior y la de mortalidad es notablemente superior que en los países desarrollados. El estudio realizado por Morelato RA y col (478) sobre la mortalidad por cáncer bucal en la provincia de Córdoba, mostró un incremento del 77% en mujeres en el período 1975-2000.

El CB es multifactorial y es en gran medida prevenible, los factores de riesgo más extensamente estudiados son el tabaco y el alcohol, en la actualidad se proponen otros como el consumo de mate, déficits alimentarios, la mala higiene bucal, el traumatismo crónico dentario o protético, el mal estado bucal y la inflamación crónica (8, 16,26, 31-37, 38, 43, 47, 51-58). La presencia de estos factores, su intensidad y combinación, le da características particulares a la distribución del CB en el mundo, y nos revela la importancia de los estudios regionales. Si bien la aparición del CB puede ser precedido por lesiones llamadas pre-cancerosas o potencialmente malignas, en nuestro medio, un alto porcentaje se presenta sobre mucosa sana. Teniendo en cuenta que la detección temprana es clave para un buen pronóstico, toma relevancia el estudio de los primeros cambios tisulares que pudieran estar asociados a malignidad. En este sentido y teniendo en cuenta que el defecto básico de la alteración de cualquier célula comienza a nivel molecular y desencadena una serie de reacciones que afectan a todo el sistema celular y por consiguiente a su morfología; numerosos autores han trabajado procurando definir dichos cambios, con el fin de poder utilizarlos como indicadores tempranos de malignidad o displasia epitelial.

Cowpe y col (481) relata la dificultad de establecer criterios de base de normalidad en los análisis cuantitativos morfométricos de células de la mucosa bucal normal en especial teniendo en cuenta la variabilidad según la edad y la localización y otros relacionados a deficiencias de hierro, vitamina B12 y ácido

fólico. Esta variabilidad puede adjudicarse a diferencias en el desarrollo y maduración de las células individuales. Existen trabajos que reportan cambios en células exfoliadas de consumidores de tabaco y alcohol valorados en forma individual en la mucosa oral clínicamente sana, cuyos resultados son variados y a veces se contraponen.

Cowpe y col (482), Demostraron que los cambios malignos en células exfoliadas podrían detectarse estimando la relación N/C. Desde ese momento numerosos estudios intentaron evaluar la influencia de diversos factores sistémicos y externos sobre las dimensiones de las estructuras celulares y nucleares, en especial el radio N/C usando técnicas cuantitativas. Pero los resultados son variados y controversiales.

La mayor parte de los autores enfatizan la importancia de reconocer en forma temprana los cambios celulares causados por el uso del tabaco, considerados cambios displásicos, para ser utilizados con fines preventivos.

Estudios previos han demostrado que el consumo de T y A, incluso después de un corto período inducen cambios en la arquitectura tisular y morfología de células epiteliales de la mucosa bucal, antes que los cambios clínicos sean evidentes. En el presente estudio realizado en voluntarios con mucosa bucal clínicamente sana, tuvo como objetivo la detección precoz de las alteraciones celulares en tres localizaciones diferentes, relacionadas con el tipo, la duración y la intensidad del consumo de tabaco, alcohol y mate. Los resultados de este trabajo demuestran una reducción en la relación N/C relacionada con el consumo de tabaco, de alcohol y de mate, en forma independiente y en forma asociada, aumentando la diferencia con la intensidad del hábito en piso de boca, mucosa yugal y en paladar blando. Los cambios fueron más evidentes cuando se compararon los voluntarios sin hábitos con aquéllos que tenían la combinación de los tres: T, A y M.

En relación al tabaco en el presente trabajo la mayoría de los voluntarios eran fumadores de cigarrillos rubios con filtro (n: 45), en los que se observaron cambios citológicos que mostraron una disminución de la relación N/C en los tres sitios anatómicos estudiados; mientras que otros autores en citologías de fumadores observaron un aumento de la relación Núcleo /citoplasma (239, 240, 245, 246); entre ellos Safoura y col (240), en un estudio de corte transversal incluyó individuos fumadores, usuarios de pipas de agua, y normales; tomaron

muestras citológicas de tres áreas diferentes: mucosa yugal, borde de lengua y piso de boca (derecho). Los resultados determinaron un aumento en el tamaño nuclear y de la relación N/C, destacándose una gran variabilidad de los parámetros estudiados. Así también demostraron los mismos efectos celulares en sujetos masticadores de tabaco y consumidores de mishri (245) y en adictos al opio (239) y en pacientes con carcinoma (246). Einstein y col. (483) concluyeron que los cambios observados en la morfometría, pueden ser atribuidos al tabaco y la liberación de productos tales como las nitrosaminas y la NNN. La diferencia en los resultados con el presente estudio, puede atribuirse a variabilidad de las mediciones relacionadas con el sitio de la muestra, la edad de los pacientes, el interrogatorio y la cuantificación de la intensidad de los hábitos analizados y en especial que nosotros analizamos los efectos de la combinación de hábitos.

En relación con el consumo de alcohol, Reis y col (235), estudiaron la relación N/C, frecuencia de micronúcleos, picnosis, cariorrexis y cariólisis en células exfoliadas en alcohólicos no fumadores (grupo etanol) y en no fumadores ni bebedores (grupo control). El grupo de etanol mostró un aumento significativo en la frecuencia de todas las alteraciones en las células del borde de la lengua cuando se comparó con el grupo control. Muller y col (231) estudiaron los efectos directos de diferentes concentraciones de alcohol (20%, 40%, 96%) sobre la mucosa bucal del conejo; observando que el alcohol a corto plazo conduce a un daño en la mucosa proporcional al grado de concentración de alcohol. Mientras que, la irritación del alcohol en estudios a largo plazo, produce displasia epitelial. Por último, Maier y col (232), investigaron el efecto del consumo crónico de etanol en la morfología de la mucosa oral de ratas Wistar macho que habían sido alimentados con dietas líquidas que contenían etanol o hidratos de carbono isocalóricas. El análisis morfométrico mostró un aumento del tamaño de los núcleos de las células basales. De manera que los resultados reportados indican que el consumo crónico de etanol provoca la atrofia de la mucosa oral, asociada a hiper-regeneración, lo que puede resultar en una mayor susceptibilidad del epitelio a carcinógenos químicos. Ogden G. y col (241,242) encontraron en células mucosa bucal clínicamente sana una reducción significativa en el área total de células, tanto en el área media citoplasmática como del área nuclear en comparación con los controles. Estas observaciones son similares a nuestros

resultados, en los que se observó una reducción del área nuclear con la combinación de T, A y M, sobre todo en la localización de piso de boca y paladar blando; mientras que con el consumo de mate y sus combinaciones se evidenció un aumento del área nuclear. Así también se observó un aumento del área citoplasmática en relación a la combinación de hábitos, existiendo a partir de esto una reducción en la relación N/C, asociada a la intensidad del hábito.

Al analizar el consumo de tabaco y alcohol se evidenció en nuestro trabajo que un 56% de los voluntarios fumaba, el 55% eran consumidores de bebidas alcohólicas; siendo esta una realidad que difiere de los últimos datos publicados por el Indec (2012). En Argentina el 22% de la población refirió consumir tabaco, en una proporción mayor en varones que en mujeres (29,6% vs 15,7%). El promedio de cigarrillos fumados por día fue de 12. En ciudad de Córdoba la prevalencia de fumadores fue de un 29 al 34% entre los años 2005-2011. En relación al consumo regular de alcohol a nivel nacional fue del 18%, se observó un mayor consumo en varones que en mujeres (11 y 5%). La prevalencia del consumo de alcohol episódico excesivo a nivel nacional fue del 10% para los años anteriormente informados. En la población adulta de la ciudad de Córdoba el 45% consumía bebidas alcohólicas, vino tinto, cerveza y fernet fueron las más consumidas en orden de frecuencia (462).

En relación al consumo de mate no ha sido informado por el Indec. Según un relevamiento realizado en la ciudad de Córdoba, estuvo presente en el 76% de la población adulta y en un 71%, de los voluntarios de nuestro trabajo, la mayoría lo consume a temperatura caliente. No existen en la literatura trabajos que evalúen los efectos del mate, ni de su combinación con el T y el A sobre células exfoliadas de la cavidad bucal. En el presente trabajo se analizó el consumo de mate como único factor, se pudo evidenciar un aumento del área nuclear en piso de boca y una disminución en paladar blando; por lo contrario el área citoplasmática aumentó tanto en piso de boca, como en paladar blando.

Bortoluzzi MC y col (473) evaluaron la frecuencia de micronúcleos de las células epiteliales exfoliadas de mucosa yugal de voluntarios sanos, expuestos al consumo de mate durante 7 días, no observando cambios. El rol del mate en la carcinogénesis aún no está esclarecido. Se ha relacionado la ingesta de mate con cánceres de la cavidad oral, faringe, laringe, esófago, entre otros y se sugiere que

productos químicos, como el benzopireno, compuestos fenólicos, podrían ser los responsables del efecto carcinogénico de la yerba mate en los sitios mencionados (54, 56,297-304), y que bebedores de mate caliente en forma diaria produciría una acumulación en el daño por la acción térmica de la bebida (289). El riesgo de cáncer de esófago para los bebedores de más de 1 litro de mate muy caliente tiene un aumento de 3 veces en relación a los no consumidores de mate. La temperatura podría actuar en dañar la mucosa, permitiendo en parte la acción sobre la mucosa de otros carcinógenos como el tabaco y el alcohol, no pudiéndose descartar una interacción con estos factores, se señala un incremento de 7 veces en el riesgo de cáncer de esófago (52, 53, 285, 286, 295). Estos resultados en el cáncer de esófago, nos revelan la importancia de considerar al consumo de mate y sus asociaciones con otros factores de riesgo en poblaciones como la nuestra que tiene más del 70% de consumidores de mate caliente (462). Ronco y col. (472) evaluaron la asociación de consumo de mate con el riesgo de cáncer de mama, analizando el consumo diario, la edad de comienzo, la duración del hábito, y los mL consumidos. Encontraron una asociación inversa entre el consumo de mate y el riesgo de cáncer de mama. Concluyen en que puede deberse a los efectos antioxidantes de los polifenoles presentes en la yerba mate.

Cuando se analizan todas las localizaciones e intensidades juntas en consumidores de T, A y M, se observa la importante magnitud de esta tendencia que reduce la relación N/C, revelando un probable efecto sinérgico. En resumen podemos establecer que en las personas que fuman, beben alcohol y toman más de medio litro de mate caliente, el porcentaje de área de la célula ocupada por el núcleo se reduce. Estos cambios podrían ser indicadores tempranos de daño celular, que de continuar con dichos hábitos podrían desarrollar lesiones potencialmente malignas, neoplasias epiteliales o asociarse a cambios tempranos de una cancerización de campo

Los resultados obtenidos constituyen un sólido fundamento que valoriza al cuestionario como herramienta económica y fácilmente aplicable en la atención clínica de pacientes. Los datos obtenidos nos permitirán alertarnos sobre la existencia de daños celulares que pueden existir frente a hábitos como T, A y M cuando aún no haya lesión clínica ni histopatológicamente evidente. Así también,

nos permite identificar a los pacientes de alto riesgo los cuales deberán incluirse en un protocolo de prevención y controles estrictos.

Cuando estudiamos con técnicas de inmunohistoquímica material de biopsias de mucosa normal se observó que todos los voluntarios consumidores de tabaco, alcohol y mate mostraron expresión positiva de NOS2. La tinción de la enzima fue más intensa en los estratos basales, disminuyendo en el resto del epitelio; mientras que las mucosas sin factores de riesgo no fueron reactivas. Estos resultados podrían ser coincidentes con los de otro estudio realizado por nuestro grupo donde se encontró positividad para NOS2 en los márgenes histológicamente sanos de CCEB, lo que indicaría una cancerización de campo en la mucosa histológicamente normal del tejido vecino al carcinoma, mucosa esta que también ha estado expuesta a factores como el T A y el M (362).

El consumo de tabaco puede estimular la producción de óxido nítrico, probablemente a través de la regulación de la NOS2 en células cancerígenas. Compuestos químicos carcinógenos del tabaco podrían contribuir al aumento de ON y de la NOS2 en el cáncer, lo que favorecería la capacidad de las células cancerosas para proliferar y crecer. Otros autores han informado la presencia de NOS2 en cánceres humanos incluyendo los de pulmón, próstata, mama, vejiga, cavidad oral, esófago y colon (330, 345, 350-354). Recientemente, una sobreexpresión de NOS2 se observó en el carcinoma de células escamosas oral; del mismo modo, los carcinomas y sarcoma de tejidos duros bucales también se asociaron con la expresión de la NOS2 pero esa expresión fue mayor en los carcinomas que en los sarcomas (345, 358-360). Mastrángelo F y col. (364) describieron niveles aumentados de actividad de NOS2 en lesiones precancerosas en comparación con mucosa sana. Por otra parte, se encontró un aumento gradual de la actividad junto con la progresión de las lesiones, lo cual podría ser coincidente con nuestros estudios ya que algunas de estas lesiones potencialmente malignas se relacionan con el consumo de tabaco y alcohol. Yang L y col (355) investigaron la expresión de NOS2 en biopsias de mucosa bucal normal y de CCEB. Este estudio demostró que la expresión de NOS2 se correlaciona con la diferenciación del grado tumoral y la tasa de proliferación del tumor; el tiempo de supervivencia a cinco años fue dramáticamente más corto en los pacientes con la expresión de NOS2. La NOS2 está asociada con una variedad de cánceres

humanos, pero su expresión y la interacción en CCEB no se han explorado completamente. La interacción de ON y NOS2 en el crecimiento del tumor y la angiogénesis requiere de más estudios, que nos revelen la posibilidad de su uso pronóstico. Augustine Dy col (464), estudiaron la expresión de la NOS2 en carcinomas y sarcomas de la cavidad oral para revelar su comportamiento biológico y correlacionar la expresión de NOS2 con metástasis en los ganglios linfáticos en los carcinomas y sarcomas. La mayoría de los carcinomas mostraron ser positivos para NOS2. Entre los sarcomas la positividad se observó en el 50% de los de tejidos duros; los sarcomas de tejidos blandos fueron negativos. La alta expresión de NOS2 en carcinomas, podría relacionarse al aumento de la angiogénesis para el crecimiento tumoral.

En este tópico es importante recordar que los radicales libres tales como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (ERN), inducen al estrés oxidativo, considerado uno de los principales inductores del carcinoma de células escamosas bucal. Otros metabolitos reactivos del oxígeno como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($\cdot OH$), malondialdehído y de las especies reactivas del nitrógeno como el óxido nítrico (ON), estarían involucrados en el proceso de la carcinogénesis, causando daños en las bases del ADN, provocando mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, que están implicados en la carcinogénesis bucal. Por lo tanto, los radicales libres actuarían como iniciadores y / o promotores de la carcinogénesis bucal (457-458). El ON se comporta como citostático o citotóxico que interactúa con un número de dianas moleculares dentro de las células. Se ha informado de que ON se calcula en términos de su producto final de nitrato + nitrito ($NO_2 + NO_3$) debido a la corta vida media (459). Hasta el presente, la identificación positiva de nitrosaminas puede ser hecha sólo por cromatografía gaseosa; como dichas técnicas son muy costosas y generalmente no están disponibles (467), la determinación de sus precursores, nitrato y nitrito ofrece una buena alternativa. En relación al cáncer bucal ciertos autores como Badawi y col 1998 (468) encuentran aumento en la concentración salival de nitrito en pacientes con cáncer comparada con la de un grupo control. En nuestro estudio también nos preguntamos si las especies reactivas del nitrógeno podrían estar aumentadas en los pacientes consumidores de T y A. Forman y col. (1985) (469) encontraron niveles más

bajos de nitrato en la saliva de fumadores en relación a las de no fumadores, ya que los primeros tienen niveles 3 o 4 veces más altos de tiocianato (SCN⁻), que se sabe puede inhibir la concentración de nitrato en saliva (470). Los mismos autores encontraron que los niveles de nitrito salival fueron incrementándose en grupos de mayor edad. Tanto en el tabaco como en el alcohol y el mate se han descrito compuestos nitrogenados los cuales podrían influir sobre la mucosa y con este fin estudiamos los nitritos en saliva. En relación a la determinación salival de compuestos nitrogenados, se pudo observar que existe una gran influencia de la matriz y de la química de dichos compuestos en las condiciones de almacenamiento y procesado. Es por ello que adquiere fundamental importancia controlar las condiciones de recolección, almacenamiento y procesado (471).

En nuestra muestra de 60 voluntarios estudiados, la amplia variabilidad interindividual determinó que las diferencias no fueran significativas entre consumidores y no consumidores. No obstante, un mayor número de estudios serán necesarios en este campo, para obtener resultados concluyentes.

En relación a CA-IX en las mucosas con factores de riesgo, todas resultaron positivas con la reacción más intensa en los estratos basales, disminuyendo hacia los superficiales. La intensidad de la reacción fue variable. No se observaron diferencias de reacción entre las mucosas de pacientes con bajo y alto riesgo. En las mucosas sin factores, tres resultaron débilmente positivas. Se ha observado sobreexpresión de CA-IX en variedad de tumores sólidos, como carcinomas renales, carcinoma de ovario, carcinoma colon-rectal, carcinoma de esófago, entre otros (392-395, 398-400), a su vez se atribuye la sobreexpresión a una mayor agresividad tumoral (403). Por otra parte en muy pocas ocasiones se ha investigado la expresión o la actividad de esta enzima en lesiones preneoplásicas bucales, muy recientemente, se ha reportado la presencia en leucoplasias (416,417), y no se han encontrado reportes sobre actividad de CA-IX en otra lesión potencialmente maligna. La CA-IX ha demostrado ser un buen marcador de hipoxia. La expresión de estos marcadores aplicados a biopsias de mucosa bucal, nos permite identificar aquellos pacientes con riesgo de malignización, aún cuando no presenten cambios citológicos ni histopatológicos. Pérez-Sayánsy col. (416) analizaron la expresión de CA-IX de CCEB y en displasias adyacentes al margen quirúrgico del tumor. Encontraron un 33% de displasia leve, 14% de los

casos de displasia moderada, 3% de displasia grave y 50% de casos de carcinoma in situ. En otra investigación los mismo autores (417), estudiaron el papel de la CA-IX en casos de leucoplasias y displasias adyacentes al margen del tumor. Encontraron una mayor positividad CA-IX en los no fumadores, eritroplasia y leucoplasia moteada, en lengua, y con múltiples lesiones, las leucoplasias 2-4 cm y en recurrencias sin diferencias significativas. Todas las lesiones sin displasia fueron negativas para CA-IX; sin embargo, en todas las categorías de displasia, los porcentajes de positividad y negatividad variaron. Con respecto a los valores del índice de diagnóstico, se encontró una sensibilidad del 32%, una especificidad del 100%, y un valor predictivo positivo del 100%. El marcador CA-IX se considera un marcador de hipoxia específico debido a su alta especificidad.

En otro estudio Pérez-Sayáns M y col (453) determinaron la expresión de CA-IX en casos de CCEB. En el 36% de los casos fue moderado, mientras que en el 46% intensa. En cuanto a la expresión CA-IX y la supervivencia, los pacientes con tumores que presentan una fuerte tinción tuvieron un menor tiempo de supervivencia. El diagnóstico precoz de estos tumores es esencial para mejorar la supervivencia de los pacientes. La expresión CA-IX aumenta con el aumento de la etapa del tumor, probablemente relacionado con el grado de hipoxia; por lo tanto, su medición se puede utilizar como un factor de pronóstico. Yang JS y col (465), investigaron la asociación entre la expresión de CA-IX en la membrana y las características clínico-patológicas en el CCEB. Se estudiaron 271 especímenes de CCEB por microarrays y se evaluó el efecto de la sobreexpresión de CA-IX sobre la migración de las células cancerosas orales in vitro. Se encontró que la expresión de CA-IX se asoció con estadios clínicos más avanzados y positivos en metástasis linfáticas. Es importante destacar que la expresión CA-IX se correlaciona con la sobrevida. Por último Brockton N y col (466) evaluaron expresión CA-IX del estroma de tejido tumoral de 61 pacientes con CCEB. Una alta expresión de CA-IX, se asoció con una reducción de la supervivencia significativa. Su expresión en el estroma podría identificar a los pacientes con peor pronóstico que permitirá planear las estrategias terapéuticas en el CCEB.

Las biopsias de mucosa bucal clínicamente normal de pacientes consumidores de tabaco, alcohol y mate, mostraron positividad de NOS2 y CA-IX en distintos grados a nivel epitelial. Mientras que las mucosas sin factores de riesgo con

ambos marcadores resultaron negativas o débilmente positivas con una reacción parcheada en el estrato basal. La expresión de estos marcadores podría estar asociada a un riesgo aumentado de malignización de la mucosa bucal antes que aparezcan los cambios morfológicos celulares, en aquellos pacientes expuestos a factores de riesgo como el tabaco, el alcohol y el mate.

Estos hallazgos con técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) como la NOS2 y la CA-IX nos confirman el daño celular asociado al consumo de tabaco, alcohol y mate, siendo además un aporte al conocimiento de la biología de los cambios iniciales de la carcinogénesis.

En los últimos años se han desarrollado numerosos trabajos en el área, que intentan estudiar en profundidad la carcinogénesis humana, destacando la necesidad de continuar profundizando el tema, a fin de aportar nuevos datos que puedan ayudar a la prevención de esta dolencia.

Si bien el cambio en las dimensiones de las estructuras, o daño celular fue muy evidente, la variabilidad individual y de las células de diferentes sectores de la mucosa, en las condiciones metodológicas estudiadas, nos conduce a no recomendar su aplicación con fines diagnósticos. Además, estos también se pueden usar una herramienta educativa para los programas de sensibilización de la población para ayudar a dejar de estos hábitos orales.

CONCLUSIONES

Al analizar los resultados de las citologías informadas según el grado de Papanicolaou se observó que no existía diferencia entre las de voluntarios con hábitos (T, A y M), y los no consumidores, de igual manera la histopatología de las biopsias incluidas fue en ambos grupos compatible con mucosa normal

Los resultados de la citomorfometría indican claramente que el consumo crónico y acumulado de T, A y M, así como sus asociaciones: TA, TM, AM y TAM, datos éstos obtenidos por un adecuado interrogatorio a los voluntarios, mostraron que el consumo en exceso y/o simultáneo de los factores de riesgo provocan en mucosas clínicamente sanas, cambios morfológicos celulares. Teniendo en cuenta que el consumo de TAM aumenta 4 veces (56) el riesgo de padecer cáncer bucal, tendremos en la clínica un argumento importante para sugerir el abandono de los hábitos.

El medir con precisión los diferentes parámetros de las células nos permitió detectar con regularidad cambios iniciales (progresivos) de sufrimiento o daño celular muy evidente relacionados con la intensidad de los hábitos. La variabilidad individual y de las células de diferentes sectores de la mucosa, en las condiciones metodológicas estudiadas, nos conduce a no recomendar su aplicación con fines diagnósticos.

Por otra parte, estos resultados también pueden ayudar a los profesionales a motivar a las personas a dejar el consumo de tabaco, alcohol y mate como factores de riesgo relacionados al cáncer bucal.

La expresión positiva de NOS2 y CA IX, nos permitió confirmar el daño observado con la citomorfometría.

Estos datos preliminares sugieren que la expresión de NOS2 y CA IX podría ser útil para el diagnóstico de cancerización de campo en aquellos pacientes con factores de riesgo pero que aún no han evidenciado lesiones clínicas en la mucosa bucal.

Teniendo en cuenta el hecho de que la concentración de nitrito en la saliva está asociada a la edad, la composición de la dieta y al consumo de tabaco y alcohol entre otros, consideramos que es importante continuar el trabajo ampliando la

muestra en la búsqueda de una posible asociación, y el probable aporte de nuevos conocimientos.

BIBLIOGRAFIA

1. Figuero-Ruiz E, Carretero-Peláez MA, Cerero-Lapiedra R, Esparza-Gómez G, Moreno-López LA. Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: Relación con el cáncer oral. *Med Oral* 2004; 9:14-23.
2. Riedel F, Goessler U, Hörmann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2003;17: 543–555.
3. Blot WJ, Mclaughlin Jk, Winn DM et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cáncer. *Cancer Reseach* 1988; 48: 3282-3287.
4. Maier H, Dietz A, Gewelke U et al. Tobacco and alcohol and the risk head and neck cancer. *Clinical Investigation* 1992; 70:320-327.
5. Mashberg A, Boffetta P, Winkelman R et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of thr oral cavity and oropharynx among US. veterans. *Cancer* 1993; 72:1369-1375.
6. Rothman K, Keller A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk cancer of the mouth andpharynx. *Journal of Chronic Disease* 1972; 25:711-716.
7. Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tabacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *International Journal of Cancer* 1988; 41:483-491.
8. Wigh AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer-a review. *Oral Oncology* 1998;3 4: 441-447.
9. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans, Vol 38. Tabacco Smoking. Lyons, France: International Agency for Research on Cancer, 1986.
10. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans, Vol 44. Alcohol Drinking. Lyons, France: International Agency for Research on Cancer, 1988.
11. Johnson NW; Warnakulasuriya KAAS. Epidemilogy and eatiology of the cáncer in the United Kingdom. *Community Dental Health* 1993; 10:13-29.

12. Wynder EL, Bross IJ, Feldman R. A study of the aetiological factors in cancer of the mouth. *Cancer* 1957;16:1300-1323.
13. Vincent RG Marchetta F. The relationship of the use of tobacco and alcohol to cancer of the oral cavity. *American Journal of Surgery* 1963; 106:501-505.
14. Keller AZ, Terris M. The association of alcohol and tobacco with cancer of the mouth and pharynx. *American Journal of Public Health* 1965; 55:1578:1585.
15. Rothman K, Keller A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *Journal of Chronic Disease* 1972; 25:711-716.
16. Graham S, Dayal H, Rohrer T, et al. Dentition, diet, tobacco and alcohol in the epidemiology of oral cancer. *Journal of National Cancer Institute* 1977; 59:1611-1618.
17. Schottenfield D. Alcohol as a co-factor in the aetiology of cancer. *Cancer* 1979; 43:1962-1966.
18. Marshall JR, Graham S, Haughey BP, et al. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *Oral oncology. European Journal of cancer* 1992;29B:9-15
19. Blot WJ, Devesa SS, Mclaughlin JK, Fraumeni JF. Oral and Pharyngeal cancers. *Cancer Surveys* 1994; 19:23-42.
20. Salaspuro MP. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2003;17:679-694.
21. Huang WY, Winn DM, Brown LM, Gridley G, Bravo-Otero E, Diehl SR, Fraumeni JF, Hayes RB. Alcohol Concentration and Risk of Oral Cancer in Puerto Rico. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 881- 877.
22. Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncology* 1999; 35:375-378.
23. Brugere J, Guenel P, Leclerc A, Rodriguez J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. *Cancer* 1986; 57:391-5.

24. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Baron AE, Negri E, Bidoli E, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res* 1990; 50:6502-07.
25. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An Analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncology* 2004; 40:304-313.
26. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G and Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Eur. J. Cancer Oral Oncol* 1997; 33:302-312.
27. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of chemicals to Humans, Vol 36. Alkyl, components, aldehydes, Epoxides and Peroxides. IARC, Lyon, pp101-132, 1988.
28. Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:80-85.
29. Reis SR, Soares LP, Rocha D, Setúbal MG. Assessment of micronucleus test for cytology tongue of alcoholic patients using Feulgen and Papanicolaou methods. *Rev Odonto Cienc* 2004, 46:367-371.
30. El tabaco, el alcohol y el riesgo de cáncer de las vías aerodigestivas superiores. *Rev Panam Salud Publica* 2000; 7:50-50.
31. Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncology* 2001; 37:153-158.
32. Moreno López LA, Esparza GG, Gonzales NA; Cerero LR; Gonzales MJ, Dominguez RV. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncology* 2000; 36:170-4.
33. Homann N, Tillonen J, Meurman JH, Rintamäki H, Lindqvist C, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21:663-668.

34. Kocaelli H, Apaydin A, Aydil B, Ayhan M, Karadeniz A, Ozel S, Yimaz E, Akgun B, Eren B. Evaluation of potential salivary acetaldehyde production from ethanol in oral cancer patients and healthy subjects. *Hypokratia* 2014; 18,3: 269-274.
35. Meurma JH, Uttamo J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2008; 66:321-326.
36. Leite IC, Koifman S. A review of factors for oral and pharyngeal cancer. *Rev. Bras. Cancerol* 1998; 44:317-25.
37. Franco EI. Risk Factors for second cancer of the upper respiratory and digestive system. *J Clin Epidemiol* 2000;44(3):
38. Orbak R, Bayraktar C, Kavrut F, Gundogdu C. Poor oral hygiene and dental trauma as the precipitating factors of squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*2005; 41:109-13.
39. Reis SR, Lima CR, Marchionni AM, Setubal MG. Risk Factors for oral and oropharyngeal cancer. I. Alcohol, tobacco and other determinants. *RPG rev. Pos-grad* 1997; 4:127-32.
40. Marshall JR, Boyle P. Nutrition and oral cancer. *Cancer Causes and Control* 1996; 7:101-11.
41. Kabat GC, Chang CJ, Wynder EL. The role of tobacco, alcohol use, and body mass index in oral and pharyngeal cancer. *International Journal of Epidemiology* 1994;23:1137-44.
42. McLaughlin JK, Gridley G, Block G, Winn DM, Preston-Martin S, Schoenberg JB, et al. Dietary Factors in oral and pharyngeal cancer. *JNCI* 1988; 80:1237-1243.
43. Guha N, Boffetta P, Filho VW, Neto JE, Shangina O, Zaridze D, Curado PM, Koifman S, Matos E, Menezes E, Dabrowska NS, Fernandez L, Mates D, Daudt AW, Lissowska J, Dikshit R, Brennan P. Oral Health and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck and Esophagus: Results of Two Multicentric Case-Control Studies. *American Journal of Epidemiology* 2007; 30: 1-15.
44. Righini CA, Karkas A, Morel N, Soriano E, Reyt E. Risk factors for cancers of the oral cavity, pharynx (cavity excluded) and larynx. *Presse Med.* 2008; 37:1229-40.

45. Rivera H; Nikitakis NG; Correnti M; Maissi S; Ponce JG. Oral and oropharyngeal cancer in a Venezuelan population. *Acta Odontol Latinoam* 2008; 21:175-80.
46. Sandoval M, Font R, Mañós M, Dicenta M, Quintana MJ, Bosch FX, Castellsagué X. The role of vegetable and fruit consumption and other habits on survival following the diagnosis of oral cancer: a prospective study in Spain. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 38:31-9.
47. Rooban T, Rao A, Joshua E, Ranganathan K. The prevalence of oral mucosal lesions in alcohol misusers in Chennai, south India. *Indian J Dent Res* 2009; 20: 41-6.
48. Abdoul Hossain Madani; Madhurima Dikshit; Debanshu Bhaduri; Teamur Aghamolaei; Seyed Hamid Moosavy; Ali Azarpaykan. Interaction of Alcohol Use and Specific Types of Smoking on the Development of Oral Cancer. *Int J High Risk Behav Addict*. 2014 March; 3(1): e12120. *Indian J Cancer*. 2014 Jan-Mar; 51(1):80-5.
49. Doll R, Peto R. *The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States*. New York, NY: Oxford University Press 1981.
50. Enwonwu CO, Meeks VI. Bionutrition and Oral Cancer in Humans. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 1995; 6(1):5-17.
51. Goldenberg D. Maté: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2002; 38: 646–649.
52. Dessanayake AP, Silverman AJ, Warnakulasuriya S. Mate Drinking and oral and oro-pharyngeal cancer a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2010 Feb; 46(2):82-6.
53. Loria D, Barrios E, Zanetti R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. *Rev Panam Salud Pública*. 2009; 25:530-9.
54. Stefani ED, Moore M, Aune D, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Boffetta P, Correa P, Acosta G, Mendilaharsu M, Luaces ME, Silva C, Landó G. Maté consumption and risk of cancer: a multi-site case-control study in Uruguay. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12(4):1089-93.

55. Dasanayake AP, Silverman AJ, Warnakulasuriya S. Maté drinking and oral and oro-pharyngeal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2010 Feb; 46(2):82-6.
56. Sewram V, De Stefani E, Brennan P, Boffetta P. Maté consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Jun; 12(6):508-13.
57. Lubin JH, De Stefani E, Abnet CC, Acosta G, Boffetta P, Victora C, Graubard BI, Muñoz N, Deneo-Pellegrini H, Franceschi S, Castellsagué X, Ronco AL, Dawsey SM. Maté drinking and esophageal squamous cell carcinoma in South America: pooled results from two large multicenter case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Jan; 23(1):107-16.
58. Golozar A, Fagundes RB, Etemadi A, Schantz MM, Kamangar F, Abnet CC, Dawsey SM. Significant variation in the concentration of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in yerba maté samples by brand, batch, and processing method. *Environ Sci Technol.* 2012 Dec 18; 46(24):13488-93.
59. Castellsague X, Quintana M J, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Amparo J, Monner A, Carreras M, Aguado A, Quer M, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 2004; 108: 741-749.
60. Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA. Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *BMJ* 1996; 313:716–21.
61. Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1995; 63: 769–73.
62. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001; 344:125–31.

63. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:709–20.
64. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, Eisen EA, Peters ES, McClean MD, Kelsey KT. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16- associated head and neck cancer. *J Natl. Cancer* 2007; 23: 1801-10.
65. Shillitoe Ej. The role of viruses in squamous cell carcinoma of the oropharyngeal mucosa. *Oral Oncol.* 2009; 45:351-5.
66. Eglin RP, Scully C, Lehner T, Ward-Booth P, McGregor IA. Detection of ARN complementary to herpes simplex virus in human oral squamous cell carcinoma. *Lancet* 1983; 2:766-8.
67. Zheng Y, Xia P, Zheng HC, Takahashi H, Masuda S, Takano Y. The screening of viral risk factors in tongue and pharyngolaryngeal squamous carcinoma. *Anticancer Res.*2010;30:1233-8.
68. KIs A, Feher E, Gall T, Tar I, Boda R, Toth ED, et al. Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population. *Eur J oral Sci.* 2009; 117:536-40.
69. Jayaprakash V, Reid M, Hatton E, Merzianu M, Rigual N, Marshall J, Gill S, Frustino J, et al. *Oral Oncology* 2011; 47:1048-1054.
70. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Pawlita M, Turek L. Complex Etiology Underlies Risk and Survival in Head and Neck Cancer Human Papillomavirus, tobacco, and alcohol: A case for Multifactor Disease. *Journal of Oncology* 2012:571862. doi: 10.1155/2012/571862.
71. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(2):467–475.
72. Schildt EB, Eriksson M, Hardell L, Magnuson A Oral infections and dental factors in relation to oral cancer: a Swedish case—control study. *Eur J Cancer Prev.*1998 7(3):201–206.

73. Kassim KH, Daley TD Herpes simplex virus type 1 proteins in human oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*1988 65(4):445–448.
74. Moustafa AE, Chen D, Ghabreau L, Akil N. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. *Med Hypotheses* 200973(2):184–186.
75. Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res.* 2007 Feb; 86(2):104-14.
76. Hussain Gadelkarim Ahmed. Aetiology of Oral Cancer in the Sudan.*J Oral Maxillofac Res.* 2013 Apr-Jun; 4(2): e3.
77. Lee YC, Marron M, Benhamou S, Bouchardy C, Ahrens W, Pohlman H, Lagiou P, Trichopoulos D, Agudo A, Castellsague X, Bencko V, Holcatova I, Kjaerheim K, Merletti F, Richiardi L, Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Talamini R, Barzan L, Canova C, Simonato L, Conway DI, McKinney PA, Lowry RJ, Sneddon L, Znaor A, Healy CM, McCartan BE, Brennan P and Hashibe M. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 3353-3361.
78. Hari Ram, Jayanta Sarker, Hermant Kumar, Rituraj Konwar, M L B: Bhatt, Shadab Mohammad. Oral Cancer: Risk Factors and Molecular Pathogenesis. *J Maxillofac. Oral. Surg* (Apr-June 2011); 10(2):132-137.
79. International Agency for Research on Cancer (2007). *Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines*. Lyon, France: World Health Organization International Agency for Research on Cancer; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 89.
80. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer:

pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007 May 16; 99(10):777-89. Erratum in: *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 6; 100(3):225.

81. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):733-44. Review. Erratum in: *Nat Rev Cancer.* 2004 Jan; 4(1):84.
82. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2004; 83:1-1438.
83. Squier CA, Johnson GK. Role of nicotine as cofactor in smokeless tobacco carcinogenesis in: *Smokeless tobacco or health an international perspective.* US. Dept of Health and Human Services. NIH publication N° 93-3461, September 1992: 153-74.
84. Chen YP, Johnson GK, Squier CA. Effects of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on hamster cheek pouch and gastric mucosa. *J Oral Pathol. Med* 1994; 23:251-5.
85. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P III. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol* (2009) 92:29–60. doi: 10.1007/978-3-540-69248-5_2.
86. Hukkanen J, Jacob P III, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* (2005) 57:79–115. doi:10.1124/pr.57.1.3
87. Schaal C, Chellappan SP. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Mol Cancer Res* (2014) 12:14–23. doi: 10.1158/1541-7786.
88. Sergei A, Grando SA. Connections of nicotine to cancer. *Nat Rev Cancer* (2014) 14:419–29.
89. International Agency for Research on Cancer. *A Review of Human Carcinogens. Part E: Personal Habits and Indoor Combustions.* IARC Monograph. (Vol. 100E). Lyon: International Agency for Research on Cancer (2012). 602 p.

90. International Agency for Research on Cancer. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines. IARC Monograph. (Vol. 89). Lyon: International Agency for Research on Cancer (2007). 641 p.
91. Boyle P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: A review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting (serial on line) 2010; 1(1)(24 screens).
92. Schulz M, Reichart PA, Ramseier CA, Bornstein MM. Smokeless tobacco: a new risk factor for oral health: A review Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2009; 119(11):1095-109.
93. Instituto Nacional de Cancerologia El Tabaquismo y sus efectos en la cavidad oral- Epidemiologia descriptiva del cancer de cavidad bucal.. Rev. Inst. Nal Cancerol. Mex 1997; 43.
94. Patricia Pérez Rios MA; Pérez CE, Becerril RA, Ocampo OA. Importancia de la Prevencion y Deteccion de las lesiones bucales por el uso de tabaco. Serv de Estomatologia de la Unidad de Dermatologia Hospital general de México 2003.
95. Squier CA, Mantz MJ, Wertz PW. Effect of menthol on the penetration of tobacco carcinogens and nicotine across porcine oral mucosa ex vivo. Nicotine Tob Res 2010; 12(7):763-7.
96. Liu X, Conner H, Kobayashi T. Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in Human Bronchial Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2005; 33:121–129.
97. Hoffmann D, Hoffmann I. Chemistry and Toxicology. National Cancer Institute, Smoking and Tobacco Control, Monograph 9: Cigars Health Effects and Trends 1998,55-104.
98. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. Lung Cancer. 2004;45 Suppl 2:S3–9.
99. Peele DM, Riddick MG, Edwards ME, Gentry JS, Nestor TB. Formation of tobacco-specific nitrosamines in flue-cured tobacco. Rec Adv Tobacco Sci 2001; 27: 3-12.
100. Shi H, Fannin FF, Burton HR, Bush LP. Factors affecting nicotine to nornicotine conversion in burley tobacco (abstract). Tobacco Chem Res Conf 2000; 54: 27.

101. Zedeck MS. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *J Environ Pathol Toxicol* 1980; 3: 537-67.
102. Benowitz NL, Sarnet JM. The Threat of Menthol Cigarettes to U.S. Public Health. *N Engl J Med* 2011; 364:23.
103. Sanderson RJ, Ironside JA: Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ* 2002, 325.
104. Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C, Boffetta P: Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer* 2003, 105(5):681-686.
105. Cogliano V, Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F: Smokeless tobacco and tobacco-related nitrosamines. *Lancet Oncol* 2004, 5(12):708.
106. American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Barcelona: Ed. Elsevier Masson; 2002.
107. Wynder E, Graham E. Tobacco smoking as a possible ethiological factor in bronchiogenic carcinoma. *JAMA* 1950; 143: 329-33.
108. Wynder E, Goodman M. Smoking and lung cancer: Some unresolved tissues. *Epidemiol Rev* 1983; 5: 177-207.
109. Pershagen G, Smokeless tobacco B. *Med Bull* 1996; 52(1): 50-57.
110. Hoffmann D, y Djordjevic MV. Chemical composition and carcinogenicity of smokeless tobacco. *Adv Dent Res*. 1997; 11(3): 322-329.
111. Wynder EL. Tumor enhancers underestimate factors in the epidemiology of Lifestyle-associated cancer. *Environmental Health Perspectives* 1983; 50:15-21.
112. Carles J, eds. La química del vino. Barcelona: Oikos-Tau Editores; 1972. p.32-9.
113. Mencías Rodríguez E, Mayero Franco LM, eds. Manual de toxicología básica. Madrid: Diaz Santos Editores; 2000. p. 335-51.
114. Secades Villa R, eds. Alcoholismo juvenil: prevención y tratamiento. Madrid: Pirámide Editores SA; 1996. p. 17-56.

115. II Congreso Internacional de alcohólicos rehabilitados. Cero grados, 2001; 7.
116. Hannuksela ML, Rämetsä ME, Nissinen AE, Liisanantti MK, Savolainen MJ. Effects of ethanol on lipids and atherosclerosis. *Pathophysiology*. 2004 Apr; 10(2):93-103.
117. Worrn N, Belz GG, Stein-Hammer C. Moderate wine consumption and prevention of coronary heart disease. *Dtsch Med Wochenschr* 2013; 138:2653-2657.
118. Juillié Y, Bosser G, Schwartz J. Wine: Good for all cardiovascular diseases. *Presse Med*. 2014 May 28.
119. McGovern PE. *Ancient wine: The search for the origins of viniculture*. Princeton: Princeton University Press, 2002: 314-315.
120. Mangado EO. Consumo de alcohol y salud laboral. Revisión y líneas de actuación. *Med Segur Trab*. 2011; 57. Suplemento 1:1-262.
121. Schüller, A. *Alcohol y enfermedad*. Madrid: Eudema Editores SA; 1991.p. 17-33 y p. 336-7.
122. Lieber CS, Baraona E, Leo MA, Garro A. Metabolism and metabolic effects of ethanol, including interaction with drugs, carcinogens and nutrition. *Mutation Research* 1987; 186:201-233.
123. Vale A. Alcohol intoxication and alcohol-drug interactions. *Medicine* 1995; 3:51-60.
124. Ogden GR, Wight AJ. Aetiology of cancer: Alcohol. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1998; 36:247-251.
125. Seitz HK, Matsuzaki S, Yocohama A et al. Alcohol and cancer. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 2001;25: 1375-1435.
126. Tuyn A. Epidemiology of alcohol and cancer. *Cancer Research* 1979; 39: 2840- 843.
127. Basron WF, Li TK. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 1986; 6:5 02-10.

128. Iwahashi K, Suwaki H. Ethanol metabolism, toxicity and genetic polymorphism. *Addict Biol* 1998; 3:259-59.
129. Salaspuro V, Salaspuro M. Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *Int J Cancer* 2004; 111:480-3.
130. Seitz HK Maurer B, Stickel F. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Dig Dis* 2005; 23:297-3003.
131. Yokoyama A, Maramatsu T, Ohmori T, et al. Alcohol related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholic. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1383-7.
132. IARC, Acetaldehyde IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Human. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide, vol 71, pp. 319-335. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1999.
133. Anderson P, Gual A, Colon J. Alcohol y atención primaria de la salud: informaciones clínicas básicas para la identificación y el manejo de riesgos y problemas. Washington, D.C.: OPS, 2008.
134. Visapää JP, Götte K, Benesova M, Li J, Homann N, Conradt C, Inoue H, Tisch M, Hörrmann K, Väkeväinen S, Salaspuro M, Seitz HK. Increased cancer risk in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase 1C*1 allele, possibly due to salivary acetaldehyde. *Gut* 2004; 53: 871–876.
135. Sanchis-Segura C, Correa M, Miquel M, Aragon CM. Catalase inhibition in the Arcuate nucleus blocks ethanol effects on the locomotor activity of rats. *Neurosci Lett*. 2005 Mar 7; 376(1):66-70.
136. Candina Héctor Ruiz Herrera Batista C. Aleida, Dra. Giselle Puldón. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012; 31(1):26-36.
137. Stilburkova B, Pavliková JS, Kozich V. Metabolic Syndrome, Alcohol consumption and Genetic Factors Are Associated with Serum Uric Acid Concentration. *Plos One* 2014 May, vol n° 9, 1-9.

138. Kissin B, Kaley MM, Su WH et al. Head and neck cancer in alcoholics. The relationship to drinking, smoking, and dietary patterns. *Journal of the American Medical Association* 1973; 224:1174-1175.
139. Homann N, Jousimies H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption; methodological aspects and pathogenic implications. *Carcinogenesis* 1997;18:1739-43.
140. Salaspuro M. Microbialmetabolism of ethanol and acetaldehyde and clinicalconsequences. *Addict Biol.* 1997 Jan; 2(1):35-46.
141. Salaspuro MP. Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003 Apr;40(2):183-208.
142. Homann N. Alcohol and upper gastrointestinal tractcancer: the role of local acetaldehyde production. *Addict Biol.* 2001 Sep;6(4):309-323.
143. Homann N, Kärkkäinen P, Koivisto T, Jokelainen K, Salaspuro M. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. *J Natl. Cancer Instit* 1997;89: 1692-7.
144. Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA. Alcohol and cancer. *Recent Dev Alcohol* 1998.14:67-95.
145. Harty LC, Caporaso NE, Hayes RB, Winn DM, Bravo-Otero E, Blot WJ, et al. Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J Natl Cancer Inst.*1997 Nov 19; 89(22):1698-705.
146. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.* 2004 May-Jun; 39(3):155-65.
147. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s007alco.pdf>.(2005), Report on Carcinogens. 11th edn. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program.
148. Dellarco.V.L. (1988) A mutagenicity assessment of acetaldehyde.*Mutat. Res.*, 195, 1–20.
149. Woutersen,R.A., Appelman,L.M., Van Garderen-Hoetmer,A. and Feron,V.J. (1986) Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III.Carcinogenicity study. *Toxicology*, 41, 213–231.

150. Ramchandani.V.A., Bosron,W.F. and Li,T.K. Research advances in ethanol metabolism. *Pathol. Biol.* (2001) (Paris), 49, 676–682.
151. López Jiménez J, Giménez Prats MJ, Boj Quesada JR., Caballero Herrera R. Alcoholismo: consideraciones estomatológicas. *Archivos de Odontoestomatología* 1999; 15:391-7.
152. Shukla S, Sun G, Gibson W, Savolainen MJ, Alling C and Hoek JB. Ethanol and lipid metabolic signalling. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research May Supplement* 2001; 25:33-9.
153. Rayo Llerena I, Marín Huerta E. Vino y corazón. *Revista española de cardiología* 1998; 51:435-49.
154. Blot W. Alcohol and cancer. *Cancer research* 1992;1: 2119-23.
155. Skliros EA, Papadodina SA, Sotiropoulos A, Xipnitos C, Kollias A, Spiliopoulou CA. Relationship between alcohol consumption and control of hypertension among elderly Greeks. The Nemea primary care study. *Hellenic J Cardiol* 2012; 53:26-36.
156. Randin D, Vollenweider P, Tappy L, Jéquier E, Nicod P, Scherrer U. Suppression of alcohol-induced hypertension by dexamethasone. *N Engl JMed*1995; 332:1733-1737.
157. Cheng CP, Cheng HJ, Cunningham C, Shihabi ZK, Sane DC, Wannenburg T, Little WC. Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents alcoholic cardiomyopathy. *Circulation* 2006; 114:226-236.
158. Noble JM, Weimer LH. Neurologic complications of alcoholism. 2014 Jun; 20 (3 *Neurology of Systemic Disease*): 624-41.
159. Bolet AM, Socarrás MM. El alcoholismo, consecuencias y prevención. *Rev Cubana Invest Bioméd.* Jul 2011; 05:22 (1).
160. Mark S Gold, MD; Mark D Aronson, MD; Thomas L Schwenk, MD. Screening for and diagnosis of alcohol problems. Last literature review versión 17.1. January 2009.
161. Vamvakas S, Teschener M, Bahner U. Alcohol abuse: potential role in electrolyte disturbance and kidney disease. *Clin Nephrol.*1998; 49(4):205-13.

162. Salas KM. Síndrome alcohólico fetal. *Medicina Legal de Costa Rica*, 28, 51-55.
163. Rosemberg A. Brain damage caused by prenatal alcohol exposure. *Science and Medicine*. 2006, July-August.
164. Thackray H. Fetal Alcohol Syndrome. *Pediatr Rev*. 22(2):47-55.
165. Rodríguez Sánchez I, Castillo Ledo I, Torres Lujo DJ, Jiménez Y, Zunita Pacheco D. Alcoholismo y adolescencia. *Tendencias actuales. Psiquiatría* 2007. Citado 21 junio 2008. www.paidopsiquiatria.com/numero8/art5.pdf.
166. Ringold S, Glass RM. Alcohol, abuse and alcoholism. *JAMA*. 2006; 295:2100-11.
167. DMS IV-TR. American Psychiatric Association Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales IV. Texto revisado. Masson, Barcelona 2002.
168. CIE-10. Trastornos mentales y del comportamiento. Décima revisión de las enfermedades mentales. 1992.
169. De la Torre ML, Escarabajal MD, Agüero A. Una revisión de la literatura experimental sobre los efectos motivacionales del alcohol y su modulación por factores biológicos y ambientales. *Anales de Psicología*. 2013, 29 (3):934-943.
170. Olivera DP, Areco KN, Silveira FD. Alcohol y alcoholismo entre adolescentes de la Red Estatal de la Enseñanza de Cuiabá, Mato Grosso. *Revista de Saúde Pública*.
171. Paniagua RH, García CS, Castellano BG, Sarrallé SR, Redondo FC. Consumo de tabaco, alcohol y drogas no legales entre adolescentes y relación con los hábitos de vida y el entorno. *Anales de Pediatría* 2001; 55(02):12128.
172. Mafla AC. Adolescencia: Cambios bio-psicosociales y salud oral. *Rev Colombia Méd*. 2008;39(1):41-57.
173. Harty LC, Caponase NE, Haysnb DM, Bravo Otero E, Block WJ, Kleinman DB, et al. Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral

cavity and pharyngeal cancers. *J National Cancer Inst.*1997;89(22):1698-705.

174. V Bagnardi, M Rota, E Botteri, Tramacere, F Islami, V Fedirko, L Scotti, M Jenab, F Turati, E Pasquali, C Pelucchi, C Galeone, R Bellocco, E Negri, G Corrao, P and C La Vecchia. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 2014:1-14.
175. Simanowski UA, Stickel F, Maier H et al. Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. *Alcohol* 1995;12: 111-115.
176. García-Pola Vallejo M^oJ, López Arranz JS. Criterios clínicos para calcular el riesgo de malignización de la lesión leucoplásica. *Avances en Odontología* 1991;7: 89-102.
177. Howie NM, Williams DM. The effect of ethanol on the permeability of oral mucosa to albumin and sucrose. *J Dental Research* 1995; 74: 889.
178. Squier CA, Cox P & Hall BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence ethanol. *Journal of oral Pathology* 1986; 15: 276-279.
179. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, et al. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Diseases* (2001) 7, 349-354.
180. McCoy GD, Wynder EL, Aetiological and preventive implications in alcohol carcinogenesis. *Cancer Research* 1979;39:2844-2850.
181. Squier CA. The Permeability of oral mucosa. *Critical Reviews in Oral Biology.Medicine* 1991;2: 13-32.
182. Trigkas TK., Cruchley AT., Williams DM, Wertz P, Squier. Human oral mucosal permeability is increased by short term exposure to ethanol. *J Dental Research* 1993;72: 694.
183. Squier CA, Cox P, Wertz PW. Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. *Journal of Investigative Dermatology* 1999; 96:123-126.

184. Wertz PW, Squier CA. Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1991; 8:237-269.
185. Lieber CS. Herman award lecture, 1993: a personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. *Am J Clin Nutr* 1993; 58(3):430-42.
186. Pikkarainen PH, Baraona E, Jauhonen P, Seitz HK, Lieber CS. Contribution of oropharynx microflora and of lung microsomes to acetaldehyde in expired air after alcohol ingestion. *J Lab Clin Med.* 1981 May; 97(5):631-6.
187. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Gronroos L, Meurman JH, Salaspuro M. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncology* 2007; 43: 181-186.
188. Salaspuro V, Hietala J, Kaihovaara P, Pihlajarinne L, Marvola M, Salaspuro M. Removal of acetaldehyde from saliva by a slow-release buccal tablet of L-cysteine. *Int J Cancer.* 2002 Jan 20; 97(3):361-4.
189. Arendorf TM, Walker DM, Kingdom RJ, Roll JR and Newcombe RG. Tobacco and smoking and denture wearing in oral candidal leukoplakia. 1983. *Br. Dent. J.* 155:340-343.
190. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra oral distribution of *Candida albicans* in man. 1980. *Arch. Oral Biol* 1980; 25:1-10.
191. Holmstrup P and Besserman M. Clinical, therapeutic and pathogenetic aspects of chronic oral multifocal candidiasis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol* 1983; 56:388-395.
192. Tillonen J, Homann N, Rautio M, Jousimes-somer H, Salaspuro M. Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23:1409-15.
193. Lachenmeier DW, Monakhova YB. Short-term salivary acetaldehyde increase due to direct exposure to alcoholic beverages as an additional cancer risk factor beyond ethanol metabolism. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011 Jan 6; 30:3.

194. Hsu TC; Furlong C & Spitz MR. Ethyl alcohol as a cocarcinogen with special reference to the aerodigestive tract: a cytogenetic study. *Anticancer Research* 1991;11: 1097-1101.
195. Mufti SI. Alcohol acts to promote incidence of tumours. *Cancer Detection and Prevention* 1992; 16:157-162.
196. Garro AJ, Espina N, Farinati F et al. The effects of chronic ethanol consumption on carcinogen metabolism and on O-methylguanine transferase-mediated repair of alkylated DNA. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 1986; 10: 735- 775.
197. Mufti SI, Salvagnini M, Lieber CS et al. Chronic ethanol consumption inhibits repair of dimethylnitrosamine-induced DNA alkylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988; 52:423-431.
198. Espina N, Lima V, Lieber CS & Garro AJ. In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O-methylguanine transferase. *Carcinogenesis* 1988;9:761-766.
199. Fang JL & Vaca CE. Development of a ³²P-postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2-deoxyguanosine-3-monophosphate and DNA. *Carcinogenesis* 1995;16:2177-2185.
200. Contreras EG, Bagán JV, Gavaldá C, Torres F. Retinoides: su aplicación en las lesiones precancerosas y el cáncer oral. *Medicina Oral* 2001;6:114-23.
201. Faron VJ, Kuper CF, Spitz BJ et al. Glass fibers and vapour phase components of cigarette smoke as cofactors in experimental carcinogenesis in experimental respiratory tract carcinogenesis. *Carcinogen Com Surv* 1985;8:93-118.
202. Bouchardy C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward P, Dayer P, Benhamou S. Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-4502E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int J Cancer* 2000;87:734-40.

203. Uematsu F, Kikuchi H, Sagami I, Kanamaru R, Abe T, Satoh K, et al. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P-450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:254-6.
204. Watanabe J, Hayashi S, Kawajari K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *J. Biochem (Tokio)* 1994;116:321-6.
205. Seitz HK, Mueller S. Alcohol and cancer: an overview with special emphasis on the role of acetaldehyde and cytochrome P450 2E1. *Adv Exp Med Biol.* 2015;815:59-70.
206. Seitz H. Alcohol and retinoid metabolism. *GUT* 2000;47:748-50.
207. Duester G. Genetic dissection of enzymes control retinoid signalling during development, *Chem Biol Interact.* 2001 Jan 30;130-132(1-3):469-80. Review. <http://www.burnham.org/reports/4.duester.97.html>.
208. Schwartz S, Doody D, Dawn E, Ricks S, Porter P, Chen C. Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. *Cancer Epidemiol, Biomark & Prevent* 2001;10:1137-44.
209. Caciva RC, Belardinelli PA et al. ¿Alcohol y salud! ¿Alcohol y salud? Revisión bibliográfica. *Claves de Odontología* 2015; 74: 41-46.
210. Albano E, Parola M, Comoglio A, Dianzani MU. Evidence for the covalent binding of hydroxyethyl radicals to rat liver microsomal proteins. *Alcohol Alcohol* 1993; 28:453-459.
211. Althausen, T. L., Uyeyama, K., and Loran, M. R. Effects of alcohol on absorption of vitamin A in normal and gastrectomized subjects. *Gastroenterology*, 38: 942-945, 1960.
212. Smith, F. A., and Lindenbaum, J. Human serum retinol transport in mal absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 27: 700-705, 1974.
213. Mandel L. Salivary glands-Alcoholic sialoadenosis. *Oral and Maxillofacial Surgery*, Columbia University, School of Dental & Oral

Surgery,

Disponible

en

http://cpmcnet.columbia.edu./dept/dental/OMS/OMS_salivary010.html.

214. Maier H, Mayer B, Adler D, Mall G, Born IA. Lipomatous atrophy of the parotid gland in chronic alcohol consumption. *Laryngorhinootologie* 1990; 69:600-4.
215. Simanowski UA, Suter P, Stickel F, Maier H, Waldherr R, Smith D, et al. Esophageal epithelial hyperproliferation following long-term alcohol consumption in rats: effects of age and salivary gland function. *J Nat Cancer Institut* 1993;85:2030-3.
216. Mandel L; Baurmash H. Parotid enlargement due to alcoholism. *Journal of thr American Dentistry Association* 1971; 82:369-373.
217. Abelson DC, Mandel ID & Karmioli M. Salivary studies in alcoholic cirrhosis. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 1976; 41:188-192.
218. Borsanyi S, Blanchard CL. Asymptomatic enlargement of the parotid glands. *JAMA* 1960; 174:20-3.
219. Seifert G, Mietilke A, Haubrich J, Chilla R. Diseases of the salivary glands. Stuttgart: Georg Thieme-Verlag, 1986:78-84.
220. Scott J, Burns J, Flower EA. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. *J Clin Pathol* 1988; 41: 837-840.
221. Carda C, Gómez de Ferrari ME, Arriaga A, Carranza M, Peydró A. Sialosis parotídea alcohólica: Estudio estructural y ultraestructural. *Med Oral* 2004; 9:24-32.
222. Rodrigo Gomez JM. La hipertrofia parotídea en la cirrosis hepática. *Rev Esp Enf Ap Digest.* 1973; XLI:751-70.
223. Marco J. Patología de la Parótida, eds. En: *Symposium sobre patología de la parótida*. Dpto. de Otorrinolaringología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia: Fund. García Muñoz Editores; 1980. p. 82-6.

224. Gómez de Ferrari ME, Carranza M, Ferraris R, Filli T. Variaciones estructurales en glándulas salivales de pacientes alcoholistas crónicos. *Rev. Fac. Odontol. (Córdoba)* 1992; 19:59-68.
225. Carda C, Carranza M, Arriaga A, Díaz A, Peydró A, Gómez de Ferrari ME. Diferencias estructurales entre las sialosis parotídea de etiología diabética y alcohólica. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10: 309-14.
226. Maier H, Born IA, Veith S, Adler D, Seitz HK. The Effect of chronic alcohol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1986;10:425-427.
227. Nishioka H, Nishi K, Kyokan EK. Human Saliva inactivates mutagenicity of carcinogens. *Mutation Research* 1981;85:323-333.
228. Stich HR, Rosin MP, Bryson L. The inhibitory effect of whole and deproteinised saliva on mutagenicity and clastrogenicity resulting from a model nitrosation reaction. *Mutation Research* 1982; 97:283-292.
229. Valentine JA, Scott J, West CR, St Hill CA. A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *J Oral Pathol* 1985; 14:654-65.
230. Mascres C, Ming-Wen F, Joly JG. Morphologic changes of the esophageal mucosa in the rat after chronic alcohol ingestion. *Experimental Pathology* 1983;25: 147-153.
231. Muller P, Hepke B, Meldau U, Raabe G. Tissue damage in the rabbit oral mucosa by acute and chronic direct action of different alcohol concentrations. *Experimental Pathology* 1983; 24: 171-181.
232. Maier H, Weidauer H, Zöller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G, Born IA. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 8:387-91.
233. Born IA; Zoller J, Weidauer H, Maier H. Effects of chronic alcohol drinking on mouth mucosa. A morphometric study. *Laryngorhinootologie* 1996; 75 (12):754-8.

234. Luo LZ, Werner KM, Gollin SM, Saunders WS. Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutat Res*2004;4:375-85.
235. Reis-almeida SR, Sadigursky M, Andrade GM, Soares PL, Santo LR, Boas DS. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Braz Oral Res* 2006;20:97-102.
236. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martínez E, Lobos-Jaimes-Freyre N, Ortega-Pinto AV. Evaluación del grado de queratinización y el recuento de AgNORs en citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores. *Med Oral* 2004; 9:197-203.
237. Leyva Huerta ER, Vega Memije E, Ramírez Macías M, Zarate Daza A. Marcador de regiones de organizadores nucleolares en lesiones epiteliales de cavidad bucal. *Rev Esp Patol*2004; 37: 287-293.
238. Reis-almeida SR, Sadigursky M, Andrade GM, Soares PL, Santo LR, Boas DS. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. *Pesqui Odontol Bra* 2002;16:221-225.
239. Hashemipour MA, Aghababaie M, Mirshekari TR, Asadi-Shekaari M, Tahmasbi-Arashlow M, Tahmasbi-Arashlow F, Gandjalikhan Nassab SA. Exfoliative cytology of oral mucosa among smokers, opium addicts and non-smokers: a cytomorphometric study. *Arch Iran Med*. 2013 Dec; 16(12):725-30.
240. Seifi S, Feizi F, Mehdizadeh M, Khafri S, Ahmadi B. Evaluation of cytological alterations of oral mucosa in smokers and waterpipe users. *Cell J*. 2014 Winter;15(4):302-9. Epub 2013 Nov 20.
241. Ogden GR, Wight AJ, Rice P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med*. 1999 May;28(5):216-20.
242. Ogden GR, Wight AJ, Cowpe JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Anal Quant Cytol Histol* 1999; 21:126-30.

243. Feng L, Wang L. Effects of alcohol on the morphological and structural changes in oral mucosa. *Pak J Med Sci*. 2013 Jul; 29(4):1046-9.
244. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Detection of field change in oral cancer using oral exfoliative cytologic study. *Cancer*. 1991 Oct 1;68(7):1611-5.
245. Khot K, Deshmane S, Bagri-Manjarekar K, Warke D, Kotak K. A cytomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. *J Nat Sci Biol Med*. 2015 Aug; 6(Suppl 1):S22-4.
246. Sharma D, Sandhu SV, Bansal H, Gupta S. Distinct perturbations of oral squamous cell carcinoma patients: A quantitative cytomorphometric analysis. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2015 Jul;9(3):283-91.
247. Konopacka M. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. *Neoplasma* 2003; 50:380-2.
248. Ramirez A, Saldaña HP. Investigación del micronucleus de pacientes alcohólicos con carcinomas orales. *Genet. Mol. Res* 2002, 3: 246-260.
249. Nersesyan A, Muradyan R, Kundi M, Knasmueller S. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis*. 2011 Mar;26(2):295-301.
250. Bohrer PL, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados PV. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol*. 2005 May-Jun;49(3):265-72.
251. Pellicoli AC, Visioli F, Ferreira LA, Danilevicz CK, Carrard VC, Rados PV. Cytogenetic abnormalities in exfoliated oral mucosal cells and their association with oral cancer. *Anal Quant Cytol Histol*. 2011 Oct;33(5):271-6.
252. Webber LP, Pellicoli A, Magnusson AS, Danilevicz CK, Bueno CC, Sant'Ana Filho M, Rados PV, Carrard VC. Nuclear changes in oral mucosa of alcoholics and crack cocaine users. *Hum Exp Toxicol*. 2016 Feb; 35(2):184-93.

253. Mr P, Guruprasad Y, Jose M, Saxena K, K D, Prabhu V. Comparative Study of Genotoxicity in Different Tobacco Related Habits using Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. *J Clin Diagn Res.* 2014 May;8(5):ZC21-4.
254. Casartelli G, Bonatti S, De Ferrari M, Scala M, Mereu P, Margarino G, Abbondandolo A. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2000 Dec;22(6):486-92.
255. Lima CF, Oliveira LU, Cabral LA, Brandão AA, Salgado MA, Almeida JD. Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. *J Oral Pathol Med.* 2010 Jul;39(6):441-6.
256. Joshi MS, Verma Y, Gautam AK, Parmar G, Lakkad BC, Kumar S. Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Arch Oral Biol.* 2011 Jan;56(1):63-7.
257. Dórea LT, Meireles JR, Lessa JP, Oliveira MC, de Bragança Pereira CA, Polpo de Campos A, Cerqueira Ede M Chromosomal damage and apoptosis in exfoliated buccal cells from individuals with oral cancer. *Int J Dent.* 2012;2012:457054.
258. Roberts DM. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. *Acta Cytol.* 1997 Jul-Aug;41(4):1008-14.
259. Oliveira LU, Lima CF, Salgado MA, Balducci I, Almeida JD. Comparative study of oral mucosa micronuclei in smokers and alcoholic smokers. *Anal Quant Cytol Histol.* 2012 Feb;34(1):9-14.
260. Abdelaziz MS, Osman TE. Detection of Cytomorphological Changes in Oral Mucosa among Alcoholics and Cigarette Smokers. *Oman Medical Journal* 2011.26 (5):349-352.
261. Carretero-Peláez MA, Esperanza-Gómez GC, Figuero-Ruiz E, Cerero-Lapiedra R. Colutorios con alcohol y su relación con el cáncer oral. Análisis crítico de la literatura. *MedOral* 2004;9:116-23.

262. Barbé C, Halbaut L. Otras formas farmacéuticas de administración por vía bucofaríngea, ocular, nasal y auricular. En: Faulí C, Trillo I, eds. Tratado de farmacia galénica. 1ª edición. Luzán 5, DL; 1993. p. 825-37.
263. García Pola MJ. Formulación Magistral en Odontoestomatología. SmithklineBeecham; 1997.
264. Sissons CH, Wong L, Cutress TW. Inhibition by Ethanol of the Growth of Biofilm and Dispersed Microcosm Dental Plaques. Archs Oral Biol 1996; 41:27-34.
265. Otomo-Corgel J. Over-the-Counter and Prescription Mouthwashes. An Update for the 1990s. Compend Contin Educ Dent 1992; 13:1086-96.
266. Ciancio SG. Use of mouthrinses for professional indications. J Clin Periodontol 1988; 15:520-3.
267. Moghadam BKH, Gier R, Thurlow T. Extensive Oral Mucosal Ulcerations Caused by Misuse of a Commercial Mouthwash. Cutis 1999;64: 131-4.
268. Bernstein ML, Carlisle R. The induction of hyperkeratotic white lesions in hamster cheek pouches with mouthwash. Oral Surg 1979;48:517-22.
269. Sisson CH, Wong L, Cutress TW. Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaques 1996. Arch Oral Biol;41:27-34.
270. Lopez de Blanc SA, Baruzzi MA. Mouthrinses containing alcohol and oral cancer. Revision of epidemiological studies. Braz Oral Res 2007;21: 16-22.
271. La Vecchia C. Mouthwash and oral cancer risk: An update. Oral Oncol 2008; 10: 1016-18.
272. Lamster IB, Alfano MC, Sieguer MC, Gordon JM. The effects of Listerine antiseptic on reduction of existing plaque and gingivitis. Clin. Prev Dent. 1983;5:12-6.
273. Lorca-Sarañer A, Carrasquer-Burguesa A. Efecto de los colutorios con contenido alcohólico: revisión de la literatura. RCOE. 2005;10:407-12.

274. Madan PD, Sequeira PS, Shenoy K, Shetty J. The effect of three mouthwashes on radiation-induced oral mucositis in patients with head and neck malignancies: a randomized control trial. *J Cancer Res Ther.* 2008;4(1):3-8.
275. Bolanowsky SJ, Gescheider GA, Sutton SVW. Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses. *J Periodontal Res.* 1995;30:192-7.
276. Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80:432-9.
277. Reidy JT, McHugh EE, Stassen LF. A review of the role of alcohol in the pathogenesis of oral cancer and the link between alcohol-containing mouthrinses and oral cancer. *J Ir Dent Assoc.* 2011;57:200-2.
278. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P and Boyle P. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2008; 122: 155-164.
279. Moghadam BKH, Gier R, Thurlow T. Extensive Oral Mucosal Ulcerations Caused by Misuse of a Commercial Mouthwash. *Cutis.* 1999;64;131-4.
280. Kowitz GM, Lucatorto FM, Cherrick HM. Effects of mouthwashes on the oral soft tissues. *J Oral Med.* 1976;31;47-50.
281. Instituto Nacional de la Yerba Mate. Available from: <http://www.inym.org.ar/inym/imagenes/TrabajoRealizados/recopilacion.pdf>. Accessed on 15 August 2008.
282. International Agency for Research on Cancer. Coffee, tea, methylxantines and methylglyoxal. In: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans.* IARC;1991. (Scientific Publication 51).
283. Vassallo A, Correa P, De Stefani E, Correa P, Cendan M, Zavala D et al. Esophageal cancer in Uruguay: a case control study. *J Natl Cancer Inst.* 1985;75(60):1005-9.

284. Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci* 2007;72(9):R138–51.
285. Victora CG, Muñoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and esophageal cancer in Southern Brazil: a case control study. *Int J Cancer*. 1987;39:710–6.
286. De Stefani E, Muñoz N, Estève J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Research*. 1990;50:426–31.
287. Castelletto R, Castellsague X, Muñoz N, Iscovich J, Chopita N, Jmelnitsky A. Alcohol, tobacco, diet, mate drinking, and esophageal cancer in Argentina. *Cancer Epidemiol Biom Prev*. 1994;3:557–64.
288. Muñoz N, Victora CG, Crespi M, Saul C, Braga NM, Correa P. Hot maté drinking and precancerous lesions of the esophagus: an endoscopic survey in southern Brazil. *Int J Cancer*. 1987;39:708–9.
289. Ruschenburg U. Benzo[a]pyrene content of coffee and some other foodstuffs. In: 11e Colloque Scientifique International sur le Café. Paris: Association Internationale du Café. 1985. Pp. 205–212.
290. Zuin VG, Montero L, Bauer C, Popp P. Stirbar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *J Chromatogr*. 2005;1091:2–10.
291. Kamangar F, Scantz MM, Abnet CC, Fagundes RB, Dawsey SM. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:1262–8.
292. Victora CG, Munoz N, Horta BL, Ramos EO. Patterns of mate drinking in a Brazilian city. *Cancer Res* 1990;50(22):7112–5.
293. Silva JF, Bidinotto LT, Furtado KS, et al. Mate attenuates DNA damage and carcinogenesis induced by diethylnitrosamine and thermal injury in rat esophagus. *Food Chem Toxicol* 2009;47(7):1521–9.

294. Gonzalez de Mejia E, Song YS, Ramirez-Mares MV, Kobayashi H. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. *J Agric Food Chem* 2005;53(6):1966–73.
295. Oreggia F, De Stefani E, Correa P, Fierro L. Risk factors for cancer of the tongue in Uruguay. *Cancer* 1991;67(1):180–3.
296. Bracesco N, Sanchez A, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J Ethnopharmacol.* 2011; 136(3):378–384.
297. Castellsague X, Munoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolon PA. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int J Cancer.* 2000;88(4):658–664.
298. De Stefani E, Fierro L, Mendilaharsu M, Ronco A, Larrinaga MT, Balbi JC, et al. Meat intake, 'mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: a case-control study. *Br J Cancer.* 1998; 78(9):1239–1243.
299. Szymanska K, Matos E, Hung RJ, Wuensch-Filho V, Eluf-Neto J, Menezes A, et al. Drinking of mate and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. *Cancer Causes Control.* 2010; 21(11):1799–1806.
300. De Stefani E, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Correa P, Ronco AL, Brennan P, et al. Non-alcoholic beverages and risk of bladder cancer in Uruguay. *BMC Cancer.* 2007; 7:57.
301. Bates MN, Hopenhayn C, Rey OA, Moore LE. Bladder cancer and mate consumption in Argentina: A case-control study. *Cancer Letters.* 2007; 246(1–2).
302. De Stefani E, Fierro L, Correa P, Fontham E, Ronco A, Larrinaga M, et al. Mate drinking and risk of lung cancer in males: A case-control study from Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996; 5(7):515–519.

303. Dasanayake AP, Silverman AJ, Warnakulasuriya S. Mate drinking and oral and oro-pharyngeal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology*. 2010; 46(2):82–86.
304. Goldenberg D, Golz A, Joachims HZ. The beverage mate: A risk factor for cancer of the head and neck. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*. 2003; 25(7):595–601.
305. Fagundes RB, Abnet CC, Strickland PT, Kamangar F, Roth MJ, Taylor PR, et al. Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *BMC Cancer*. 2006; 6:139.
306. Islami F, Boffetta P, Ren J-S, Pedoeim L, Khatib D, Kamangar F. High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk-A systematic review. *Int J Cancer*. 2009; 125(3):491–524.
307. Kamangar F, Schantz MM, Abnet CC, Fagundes RB, Dawsey SM. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;7(5):1262–1268.
308. Kamangar F, Chow WH, Abnet CC, Dawsey SM. Environmental causes of esophageal cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2009; 38(1):27–57.
309. Vieira MA, Maraschin M, Rovaris AA, Amboni RD, Pagliosa CM, Xavier JJ, Amante ER. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010;27(6):776–782.
310. Filip R, Ferrano GE (2003) Researching on new species of Bmate:*Ilex breicuspis*: phytochemical and pharmacology study. *Eur J Nutr*42:50–54.
311. Gonzalez A, Ferreira F, Azguez A, Moyna P, Paz EA (1993) Biological screening of Uruguayan medicinal plants. *JEthnopharmacol* 39:217–220.
312. Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM (2005) Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxidedependent mechanism. *Clin Nutr* 24:360–366.

313. Andersen T, Fogh J (2001). Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *J Hum Nutr Diet* 14:243–250.
314. A. Łukomska & K. Jakubczyk & D. Maciejewska & I. Baranowska-Bosiacka & K. Janda & M. Goschorska & D. Chlubek & B. Bosiacka & I. Gutowska. The Fluoride Content of Yerba Mate Depending on the Country of Origin and the Conditions of the Infusion. *Biol Trace Elem Res* (2015) 167:320–325.
315. Schult-Hermann R, Grasl KB, Bursch W. Tumor development and apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 363-367.
316. Boyd NM, Reade PC. Factors associated with the development of neoplasia. *J Oral Pathol* 1988; 17: 2002-207.
317. Weston A, Harris CC. Chemical carcinogenesis. In: Holland JF, Frei E, Bast R, et al., eds. *Cancer medicine*, 6th ed. Ontario: BC Decker, Inc., 2003: 267.
318. Lewis JG, Adams DO. Inflammation, oxidative DNA damage, and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1987;76: 19-27.
319. Tamatini T, Turk P, Weitzman S, Oyasu R. Tumorigenic conversion of a rat urothelial cell line by human polymorphonuclear leukocytes activated by lipopolysaccharide. *Jpn J Cancer Res* 1999;90: 829-836.
320. Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 1994;344: 862-863.
321. Lin X, Ramamurthi K, Mishima M, Kondo A, Howell SB. p53 interacts with the DNA mismatch repair system to modulate the cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 2000;58: 1222-1229.
322. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allens JS. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 15-11-1991; 254: 1001-1003.
323. Tnguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cell exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1-4-1992; 89: 3030-3034.

324. Felley BE. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 25-37.
325. Fitzpatrick FA. Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1651-1667.
326. Westfelt UN, Benthin G, Lundin S, Stenqvist O, Wennmalm A. Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man. *Br J Pharmacol* 1995;114: 1621-1624.
327. Tannenbaum SR, Sinsky AJ, Weismas M, Bishop W. Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation. *J Natl Cancer Inst* 1974;53: 79-84.
328. Spiegelhalder B, Eisenbrand G, Preussmann R. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol* 1976;14: 545-548.
329. Schuller PL. Daily dietary intakes of nitrate, nitrite and volatile N nitrosamines in the Netherlands using the duplicate portion sampling technique. *Oncology* 1980;37: 203-210.
330. Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1995; 113: 541-9.
331. Ohshima H, Bartsch. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Reserch* 1994; 305: 253-64.
332. Chen Y, Hsuen S, Lin L. Expression of inducible nitric oxide synthase in human oral premalignant epithelial lesions. *Archives Oral Biology* 47 (2002),387-392.
333. Hill, MJ. Endogenous N-nitrosation. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5: 47-50.
334. Oates JC, Gilkeson GS: The biology of nitric oxide and other reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2006; 121: 243-250.

335. Shimizu Y, Sakai M, Umemura Y, Ueda H: Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. *J Dermatol* 1997; 24: 80-87.
336. Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor L, Cox G, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 1995; 182: 1683-93.
337. Connelly ST, Macabeo Ong M, Dekker N, Jordan RC, Schmidt BL. Increased nitric oxide levels and iNOS overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41:2617.
338. Foerstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995 Oct;352(4):351-64.
339. Chen YK, Lin LM. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase in DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2000 Mar;36(2):221-4.
340. Palmer RMJ, Ferrige AS, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
341. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journals* 1994;298:249-58.
342. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vivo. *Proceeding of the National Academy of Science. USA* 1992;89:3030-4.
343. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006;6:521-34.
344. Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol.* 2005;15:277-89.
345. Connelly ST, Macabeo- Ong M, Dekker N, Jordan RC, Schmidt BL. Increased nitric oxide levels and iNOS over-expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41:261-7.

346. B. Karthik, D. K. Shruthi, Jasmin Singh, Anand S. Tegginamani, Shailesh Kudva. Do tobacco stimulate the production of nitric oxide by up regulation of inducible nitric oxide synthesis in cancer: Immunohistochemical determination of inducible nitric oxide synthesis in oral squamous cell carcinoma. A comparative study in tobacco habitués and nonhabitués. *J Cancer Res Ther.* 2014 Apr-Jun;10(2):244-50.
347. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dualrole of iNOS in cancer. *Redox Biol.* 2015 Dec6:334-43.
348. Ambs S.; Hussain S.P.; Harris C.C. Interactive effects of nítrico xide and the p53. Tumor suppressor gene in carcinogénesis and tumor progression, *FASEBJ.* 11, (1997)443–448.
349. Ridnour LA, Thomas DD, Switzer C, Flores-Santana W, Isenberg JS, Ambs S, Roberts DD, Wink DA. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide.* 2008 Sep;19(2):73-6.
350. Brennan, P. A. Dennis S., Poller D., Quintero M., Puxeddu, R. and G. J. Thomas, “Inducible nitric oxide synthase: correlation with extracapsular spread and enhancement of tumor cell invasion in head and neck squamous cell carcinoma,” *Head & Neck*, vol. 30, no. 2, pp. 208–214, 2008.
351. Vakkala M., Kahlos K., Lakari E, P. P’ä’äkk’o, V. Kinnula, and Y. Soini. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas, *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no. 6, pp. 2408–2416, 2000.
352. Brennan PA., Sharma S., Bowden. JR., and Umar T., “Expression of inducible nitric oxide sythase in bone metastases,” *European Journal of Surgical Oncology*”, vol. 29, no. 7, pp. 619–623, 2003.
- 353 H. Broholm, I. Rubin, A. Kruse et al., “Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in human brain tumors. *Clinical Neuropathology*, vol. 22, no. 6, pp. 273–281, 2003.
354. Speranza L., M De Lutiis. A., Shaik Y. B. et al. Localization and activity of iNOS in normal human lung tissue and lung cáncer tissue, *International Journal of Biological Markers*, vol. 22, no. 3, pp. 226–231, 2007.

355. Lan Yang, Youyuan Wang, Lvhua Guo, Liping Wang, Weiliang Chen and Bin Shi. The Expression and Correlation of iNOS and p53 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2015;2015:637853.
356. Shende V, Biviji AT, Akarte N. Estimation and correlative study of salivary nitrate and nitrite in tobacco related oral squamous carcinoma and submucous fibrosis. *J Oral Maxillofac Pathol* 2013;17:381-5.
357. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA. Roles of nitric oxides in tumor growth. *Proc Natl Acad Sc.* 1995;92:4392-6.
358. Mastumoto M, Furihata M, Kurabayashi A, Araki K, Sasaguri S, Ohtsuki Y. Association between inducible nitric oxide expression and p53 status in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2003;64:90-6.
359. Park SW, Lee SG, Song SH, Heo DS, Park BJ, Lee DW, *et al.* The effect of nitric oxide on cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in head and neck cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003;107:729-38.
360. Naidu SK, Suryakar AN, Swami SC, Katkam RV, Kumbar KM. Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian J Clin Biochem* 2007;22:140-4.
361. David A. Wink^{1,5}, Yoram Vodovotz¹, Jacques Laval², Françoise Laval³, Mark W. Dewhirst⁴ and James B. Mitchell. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* vol.19 no.5 pp.711–721, 1998.
362. Morelato Rosan; Itoiz María-Elina; Guiñazú Natalia; Piccini Daniel; Gea Susana; Silvia López-de Blanc. Nitric oxide synthase 2 (NOS2) expression in histologically normal margins of oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014 May 1; 19 (3):e242-7.
363. Weiming xu, Li zhi liu, Marilena loizidou, Mohamed ahmed, Ian g charles. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research* (2002); 12(5-6):311-320.

364. Mastrangelo F, Vinci R, Falco G, Tettamanti L, Tetè S, Tagliabue A, Gherlone E. Nitric oxide synthase evaluation in oral precancerous and cancerous lesions. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014 Oct-Dec;28(4):767-73.
365. Küstner EC, Costa IF, López JL. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9:377-84.
366. Acha A, Ruesga MT, Rodríguez MJ, Martínez MA, Aguirre JM. Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) en el cáncer y precáncer oral. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10:95-102.
367. Maarten PT, Ruud HB, Henrique JR, Jacqueline EW, Gordon BS, C.R.L., Boudewijn JM. Multiple Head and Neck Tumors Frequently Originate from a Single Preneoplastic Lesion. *Am J Pathol* 2002; 161: 1051–1060.
368. Rautava J, Luukkaa M, Heikinheimo K, Alin J, Grenman R, Happonen RP. Squamous cell carcinomas arising from different types of oral epithelia differ in their tumor and patient characteristics and survival. *Oral Oncology* 2007; 43:911-919.
369. Tabor M, Brakenhoff R, Ruijter-Schippers H, Braakhuis B. Multiple head and neck tumors frequently originate from preneoplastic lesion. *Am J Pathol* 2002; 161: 1051-1060.
370. Itoiz ME, Perez MA. Marcadores histoquímicos de cancerización de campo en la mucosa bucal. *Rev. Fac. Odon. (Bs As)* 2004; 19:9-13.
371. Califano J, Van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransk D. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Research* 1996; 56: 2488-2492.
372. Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996; 56:4509-4515.
373. Brizel D, Scully S, Harrelson J, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1996; 56: 941-943.

374. Wykoff C, Beasley N, Watson P et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60: 7075-7083.
375. Koong A, Denko N, Hudson K et al. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 2000; 60: 883-887.
376. Maxwell P, Dachs G, Gleadle J et al. Hypoxia inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94: 8104-8109.
377. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*.1998 Jul 30;394(6692):485-90.
378. Ryan H, Lo J, Johnson R. HIF-1 is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998; 17: 3005-3015.
379. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19: 176-182.
380. Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 2007; 405: 1-9.
381. Brahimi-horn MG, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007; 581: 3582-3591.
382. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature (Lond.)* 1992; 359: 843-845.
383. Ebert B, Firth J, Ratcliffe P. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct *cis*-acting sequences. *J Biol Chem* 1995; 270: 29083-29089.
384. Semenza G, Roth P, Fang H, Wang G. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994; 269: 23757-23763.

385. Thiry A, Dogné JM, Masereel B, Supuran CT. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *TRENDS in Pharmacol Sci* 2006; 27 (11): 566-573.
386. Supuran CT. Carbonic anhydrases: catalytic and inhibition mechanisms, distribution and physiological roles. Boca Raton: CRC Press, 2004; Pp 1-23.
387. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 168-181.
388. Potter C, Harris A. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer* 2003, 89: 2-7.
389. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila A, et al. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 497-504.
390. Karhumaa P, Kaunisto K, Parkkila S, et al. Expression of the transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in the human male excurrent ducts. *Mol Human Reprod* 2001; 7: 611-616.
391. Kivela A, Parkkila S, Saarnio J, et al. Expression of the transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumors. *Histochem Cell Biol* 2000; 114: 197-204.
392. Uemura H, Kitagana H, Hirso Y, Okajama E, Debruyne F, Oosterwijk E. Expression of tumor-associated antigen MN/G250 in urologic carcinoma: potential therapeutic target. *J Urol* 1997; 157 (suppl): 377.
393. Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J, Stanbridge EJ. Identification of MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 1997; 57: 2827-2831.
394. Mckiernan JM, Buttyan R, Bander NH, et al. The detection of renal carcinoma cells in the peripherals blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9. *Cancer (Phila)* 1999; 86: 492-497.

395. Murakami y, Kanda k, Tsuji m, Kanayama h, Kagawa s. Gene expression as a potencial biomarker in renal cell carcinoma. *BJU Int* 1999; 83: 743-747.
396. Brewer CA, Liao SY, Wilczynski SP et al. A study of biomarkers in cervical carcinoma and clinical correlation of the novel biomarker MN. *Gynecol Oncol* 1996; 63: 337-344.
397. Liao SY, Stanbridge EJ. Expression of the MN antigen in cervical papanicolau smears is an early diagnostic biomarker in cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 549-557.
398. Zavada J, Zavadova Z, Pastorekova S, CiampoRF, Pastorek J, Zelnik V. Expression of Ma Tu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. *Int J Cancer* 1993; 54: 268-274.
399. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, et al. Immunohistochemical study of colorrectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* 1998; 153: 279- 285.
400. Turner JR, Odze RD, Crum CP, Resnik MB. MN antigen expression in normal, preneoplastic and neoplastic oesophagus: a clinicopathological study of a new cancer-associated biomarker. *Hum Pathol* 1997; 28: 740-744.
401. Vermylen P, Roufosse C, Burny A et al. Carbonic anhydrase IX antigen differentiates between preneoplastic malignant lesions in non-small cell lung carcinoma. *Eur Respir J* 1999; 14: 806-811.
402. Capkova L, Koupkova L, Kodet R. Expression of Carbonic anhydrase IX (CAIX) in malignant mesothelioma. An immunohistochemical and immunocytochemical study. *Neoplasia* 2014; 61 (2): 161-169.
403. McDonald P, Winum JY, Supuran C, Dedhar S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget* 2012; 3: 84-97.
404. Parks S, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol* 2011; 226:299-308.

405. Swietach P, Hulikova A, Vaughan-jones R, Harris A. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumor pH regulation. *Oncogene* 2010; 29: 6509-6521.
406. Olive P, Aquino-parsons C, Macphail S, et al. Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8924-8929.
407. Beasley N, Wykoff C, Watson P, et al. Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis and microvessel density. *Cancer Res* 2001; 61: 5262-5267.
408. Schwint AE, Savino TM, Lanfranchi HE, Marschoff E, CABRINI RL, Itoiz ME. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of human oral mucosa. *Cancer* 1994;73: 2674-2679.
409. Gandolfo M, Keszler A, Lanfranchi HE, Itoiz ME. Increased subepithelial vascularization and VEGF expression reveal potentially malignant changes in human oral mucosa lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 111 (4): 486-493.
410. Monti-hughes A, Aromando R, Pérez MA, Schwint AE, Itoiz ME. The hamster cheek pouch model for field cancerization studies. *Periodontology* 2000 2014; 66: 1-21.
411. Polosukhin VV, Lawson WE, Milstone AP, et al. Association of progressive structural changes in the bronchial epithelium with subepithelial fibrous remodeling: a potential role for hypoxia. *Virchows Arch* 2007; 451: 793-803.
412. Chen CL, Chu JS, Su WC, Huang SC, Lee WY. Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression for HIF-1alpha, GLUT1 and CAIX. *Virchows Arch* 2010; 457: 53-61. 413.
413. Liao SY, Rodgers WH, Kauderer J et al. Carbonic anhydrase IX (CAIX) and high-risk human papillomavirus (H-HPV) as diagnostic biomarkers of cervical dysplasia/neoplasia in Japanese women with a cytologic

diagnosis of atypical glandular cells (AGC): a Gynecologic Oncology Group (GOG) Study. *Br J Cancer* 2011; 104: 353-360.

414. Mikami Y, Minamiguchi S, Teramoto N, Naqura M, Haga H, Konishi I. Carbonic anhydrase type IX expression in lobular endocervical glandular hiperplasia and gastric-type adenocarcinoma of the uterine cervix. *Pathol Res Pract* 2013; 209: 173-178
415. Syrjänen L, Luukkaala T, Leppilampi M et al. Expression of cancer-related carbonic anhydrases IX and XII in normal skin and skin neoplasms. *APMIS* 2014; 122 (9): 880-889.
416. Pérez-sayans M, Suárez-peñaranda J, Torres-lópez M, et al. Expression of CA IX in dysplasia adjacent to surgical resection margins of oral squamous cell carcinoma. *Biotech Histochem* 2014; 89: 91-97.
417. Pérez-Sayans M, Suárez-Peñaranda J, Torres-López m, et al. The use of CA-IX as a diagnostic method for oral leukoplakia. *Biotech Histochem* 2015; 90 (2): 124-131.
418. Carmelie T P, Dor Y, Herbert J, et al. Role of HIF-1 in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature (Lond.)* 1998; 394:485-490.
419. Meldrum NU, Roughton FJ. Carbonic anhydrase its preparation and properties. *J Physiol* 1933;80:113-142.
420. Biondi K, Belloni S, Velasco M, Robledo G, Gallardo A, Femopase F, et al. Correlation between oral precancer and cancer and tobacco. *J Dent Res* 1998;77:5. 421. Pentenaro M, Broccolatti R, Carbone M, Corotto D, Gandolfo S. The prevalence of oral mucosal lesions in adults from the turin area. *Oral Diseases* (2008) 14,356-366.
422. Buch AC, Patel SS, Chandanwale SS, Kumar H, Patel KM, Sunita A. Study of oral exfoliative cytology in tobacco chewers of western India. *Int J Pharma Bio Sci.* 2014;4:138-43.
423. Rajesh S, Reddy SB, Shriniwas K. Cytomorphometric analysis of obtained squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral submucous fibrosis. *J Indian Acad Oral Med Radiol.* 2012;24:200-5.

424. Goregen M, Akgul HM, Gundogdu C. The cytomorphological analysis of buccal mucosa cells in smokers. *Turk J Med Sci.* 2011;41:205–10.
425. Bhonsle RB, Murti PR, Daftary DK, Mehta FS. An oral lesion in tobacco-lime users in Maharashtra, India. *J Oral Pathol.* 1979;8:47–52.
426. Cohen SM, Ellwein LB. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 1990;249:1007-11.
427. Ziegler RG. Alcohol-nutrient interactions in cancer etiology. *Cancer* 1986;58:1942-8.
428. Ogden GR, Cowpe JG. Quantitative cytophotometric analysis as an aid to the detection of recurrent oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1989 Jun;27(3):224-8.
429. Einstein TB, Sivapathasundharm B. Cytomorphometric analyses of the buccal mucosa of tobacco users. *Indian J Dent Res.* 2005;16:42–46.
430. Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: Review of methods of assessment. *J Oral Pathol Med.* 1997;26:201–5.
431. Rioboo R. *Odontología preventiva y Odontología comunitaria. Tomo II. Cap 40 Estudios epidemiológicos de las enfermedades y alteraciones buco-dentales.* Ediciones Avances 2002:1103-25.
432. Franceschi S y cols. Risk Factors for Cancer of the Tongue and the Mouth. *Cancer* 1992;0: 2227-33.
433. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993 Nov; 22(10):459-62.
434. McCoy GD A biochemical approach to the aetiology of alcohol related cancers of the head and neck. (1978) *Laryngoscope* 88:59–62.
435. Qandil R, Sandhu HS, Matthews DC. Tobacco smoking and periodontal diseases. *J Can Dent Assoc* 1997; 63(3): 187-92, 194-95.
436. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblast in vitro. *J Periodontology* 1995; 62(12): 1056-64.

437. Souza DM, Ricardo LH, Kantoski KZ, Rocha RF. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res.* 2009 Jul-Sep;23(3):326-32.
438. Souza DM, Rocha RF. Low caloric value of ethanol itself increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in male rats. *Braz Oral Res.* 2009 Oct-Dec;23(4):460-6.
439. Pereira Vasconcelos DF, Dias da Silva MA, Rocha Marques M, Gibilini C, Cardoso Guimarães Vasconcelos AC, Pereira Barros S. Effects of simultaneous nicotine and alcohol use in periodontitis progression in rats: A histomorphometric study. *J Clin Exp Dent.* 2013 Apr 1;5(2):e95-9.
440. Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP, Sallum EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol.* 2000 Sep;71(9):1460-4.
441. Kabat GC, Wynder EL. Type of alcoholic beverage and oral cancer. *International Journal of Cancer* 1989;43:190-194.
442. Wall BM, Dmochowski RR, Malecha M. Inducible nitric oxide synthase in the bladder of spinal cord injured patients with a chronic indwelling urinary catheter. *J Urol* 2001; 165(5):1457-61.
443. Murata J, Tada M, Iggo RD, Sawamura Y, Shinohe Y, Abe H. Nitric oxide as a carcinogen: analysis by yeast functional assay of inactivating p53 mutations induced by nitric oxide. *Mutat Res* 1997;379(2):211-8.
444. Oren M. Re-regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 1999;274(51): 36031-4.
445. Fujimoto H, Sasaki J, Matsumoto M, Suga M, Ando Y, Iggo R, et al. Significant correlation of nitric oxide synthase activity and p53 gene mutation in stage I lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1998;89(7):696-702.
446. Rojas-Walker T., Tamir S., Ji H., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA, *Chem. Res. Toxicol.* 8_1995. 473-477.

447. Lewis R.S, Tamir S., Tannenbaum S.R., Deen W.M, Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro, *J. Biol. Chem.* 270 1995. 29350–29355.
448. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) *Arch.Biochem. Biophys.* 288, 481–487.
449. Surtel A, Klepacz R, Wysokińska-Miszczuk J. Alcohol dependence syndrome--symptoms in the oral cavity. *Postepy Hig Med Dosw* (Online). 2014 Jun 17; 68:828-33.
450. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol.* 2001 Feb;72(2):183-9.
451. Susin C, Wagner MC, Haas AN, Oppermann RV, Albandar JM. The association between alcohol consumption and periodontitis in southern Brazilian adults. *J Periodontal Res.* 2014 Nov 17. doi: 10.1111/jre.12242.
452. Shimazaki Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Yamashita Y. Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama Study. *J Periodontol.* 2005 Sep;76(9):1534-41.
453. Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Pilar GD, Supuran CT, Pastorekova S, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García A. Expression of CA-IX is associated with advanced stage tumors and poor survival in oral squamous cell carcinoma patients. *J Oral Pathol Med.* 2012 Oct; 41(9):667-74.
454. Nishida N, Tanaka M, Sekine S, Takeshita T, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S. Association of ALDH2 genotypes with periodontitis progression. *J Dent Res.* 2010 Feb;89(2):138-42.
455. Lages EJ, Costa FO, Lages EM, Cota LO, Cortelli SC, Nobre-Franco GC, Cyrino RM, Cortelli JR. Risk variables in the association between frequency of alcohol consumption and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2012 Feb;39(2):115-22.
456. Amaral Cda S, Vettore MV, Leão A. The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: a systematic review. *J Dent.* 2009 Sep; 37(9):643-51.

457. Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol* 2002;40:1213-32.
458. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward. *Bio Chem J* 2007;401:1-11. 11.
459. Rasheed MH, Beevi SS, Geetha A. Enhanced lipid peroxidation and nitric oxide products with deranged antioxidant status in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007;43:333-8.
460. Pavanello MB, Prado FA, Balducci I, Brandão AA, Almeida JD. Cytologic analysis of alterations induced by Smoking and by alcohol consumption. *Acta Cytol.* 2006 Jul-Aug;50(4):435-40.
461. Bolesina NJ, Femopase FL, Morelatto RA, Olmos MA, López de Blanc SA. Oral squamous cell carcinoma. Clinical considerations. In: Kalu UE Ogbureke, editors. *Oral Cancer*. United State: In-Tech, Croatia: 2012; p. 21-46. ISBN 979-953-307-610-1.
462. Belardinelli P. Título: Cáncer bucal: asociación entre variables de laboratorio y factores carcinogénicos. Tesis doctoral inédita. Facultad de Odontología, UNC. Cordoba. Argentina. 2016.
463. Avci A, Tüzüner-Oncül AM, Gökcan MK, Namuslu M, Oztürk A, Durak I. Nitric oxide metabolism in cancerous and non-cancerous oral gingivomucosal tissues: possible implications of nitric oxide in cancer process. *J Oral Pathol Med.* 2009 Mar; 38(3):304-6.
464. Augustine D, Sekar B, Murali S, Ramesh M, Madhavan RN, Patil SG, Rao RS. Expression of inducible nitric oxide synthase in carcinomas and sarcomas affecting the oral cavity. *South Asian J Cancer.* 2015 Apr-Jun; 4(2):78-82
465. Yang JS, Lin CW, Chuang CY, Su SC, Lin SH, Yang SF. Carbonic anhydrase IX overexpression regulates the migration and progression in oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2015 Dec; 36(12):9517-24.
466. Brockton NT, Klimowicz AC, P Bose, Petrillo SK, Konno M, L Rudmik, Dean M, Nakoneshny SC, Matthews TW, Chandarana S, Lau HY, Magliocco AM, Dort JC. Alta expresión de la anhidrasa carbónica IX del estroma se asocia con metástasis ganglionar y la disminución de la

supervivencia en pacientes con carcinoma de células escamosas cavidad oral tratado quirúrgicamente. *Oral oncol.* 2012 Jul; 48 (7): 615-22.

467. Groenen PJ, Jonk RJ, van IC, ten Noever de Brauw MC: Determination of eight volatile nitrosamines in thirty cured meat products with capillary gas chromatography high-resolution mass spectrometry: the presence of nitrosodiethylamine and the absence of nitrosopyrrolidine. *IARC Sci Publ* 1976; 321-331.
468. Badawi AF, Hosny G, El-Hadary M, Mostafa MH. Salivary nitrate, nitrite and nitrate reductase activity in relation to risk of oral cancer in Egypt. *Dis Markers* 1998; 14: 91-7.
469. Forman D., Al-Dabbagh S, Doll, R. Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain. *Nature* 1985; 313: 620-625.
470. Boyland E, Walker SA. Effect of thiocyanate on nitrosation of amines. *Nature*, 1974; 248: 601-602.
471. Packer PJ, Leach SA, Duncan SN, Thompson MH, Hill MJ. The effect of different sources of nitrate exposure on urinary nitrate recovery in humans and its relevance to the methods of estimating nitrate exposure in epidemiological studies. *Carcinogenesis* 1989; 10: 1989-1996.
472. Ronco AL, Stefani ED, Mendoza B, Deneo-Pellegrini H, Vazquez A, Abbona E. Mate Intake and Risk of Breast Cancer in Uruguay: a Case-Control Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016; 17(3):1453-61.
473. Bortoluzzi MC, Campagnoli EB, Milan JR, Reinheimer A, Masson M, Capella DL. Frequency of micronucleus in oral epithelial cells after exposure to mate-tea in healthy humans. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014 Jul 1; 19(4):e345-9.
474. Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Corrêa L, de Sousa SO. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci.* 2010; **52**: 267 – 273.
475. Maraki D, Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33:398–404.
476. WHO. Global action plans for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. (2013).

477. Gonzalez-Segura I, Secchi DG, Carrica A, Barelo R, Arbelo D, Dericia J, Brunotto M, Zarate AM. (2014) Exfoliative cytology as a tool for monitoring premalignant and malignant lesions based on combined stains and morphometry techniques. *J Oral Pathol Med.* 44:178-84.
478. Morelato RA, Lopez de Blanc SA. Oral cáncer mortality in province of Cordoba. Argentine Republic in the period 1975-2000. A comparative study with other populations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2006; 11:E1-5.
479. Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Jan; 77(1):95-9.
480. Diana Sugey Vera Izaguirre, Zynthia Salinas Camacho, Pablo César González Sánchez, Ramón F. Fernández Martínez, Roberto Arenas. Cultivo con Citobrush: un método para el diagnóstico de onicomicosis en personal militar mexicano. *Dermatología.* MQ2011; 9 (3): 181-185.
481. Cowpe JG. Quantitative exfoliative cytology of normal and abnormal oral mucosal squames: preliminary communication. *J R Soc Med.* 1984; 77: 928-31.
482. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J R Soc Med.* 1985; 78:995-1004.
483. Einstein TB, Sivapathasundaram B. Cytomorphometric analysis of buccalmucosa of tobacco users. *Ind J Dent Res.* 2005; 16: 4-26.
484. Papanicolaou GN. Massachusetts: Harvard University Press; 1954. Atlas of Exfoliative Cytology.
- .
- .

ANEXOS:

Difusión de resultados parciales durante la realización de la tesis:

- 1) Expositor de Postres: Marcadores Histoquímicas de malignidad relacionados con el consumo de tabaco, alcohol y mate. Presentado en XL Reunión Anual de la S.A.I.O, sobre: Mar del Plata. 18 a 20 de octubre de 2008.
- 2) Autor de Presentación Oral: “Hábitos y factores de riesgo para la Salud Bucal de la población de Córdoba.” Presentado en XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. 13 al 15 de noviembre 2014.
- 3) Expositor de Poster.” Consumo de tabaco, alcohol y mate en la población de Córdoba. Informe parcial.” Presentado en las IX Jornadas Internacionales de Salud Pública, organizado por la Escuela de Salud Pública, dependiente de la Facultad de Medicina de la UNC. 5 de diciembre del 2014.
- 4) Elaboración de un Artículo Titulado: “Alcohol y Salud!! Alcohol y Salud? Revisión Bibliográfica” Publicado en la Revista a CLAVES de Odontología. Circulo Odontológico de Córdoba. Edición Nro. 74, mayo de 2015. (Claves de Odontología 2015; 74:41-46).
- 5) Expositor del trabajo: Parámetros morfométricos de las células de la mucosa bucal en relación al consumo de tabaco, alcohol y mate. Presentado en XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. 12 al 14 de noviembre 2015.
- 6) Autor de la exposición oral del trabajo: Expresión de Anhidrasa Carbónica-IX en mu cosa bucal de pacientes consumidores de tabaco y alcohol. Presentado en XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. 12 al 14 de noviembre 2015.

- 7) Autor del poster: Cytomorphometric parameters of oral mucosa of tobacco, alcohol and mate consumers. The global oral cáncer fórum.Challenges in the Global Burden of Oral Cancer: Progress in Early Diagnosis and Prevention. March 4-5th, 2016. New York University's Kimmel Center New York City, USA.

- 8) Autor del poster: Paramétros Citomorfometricos de la mucosa oral en consumidores de tabaco, alcohol y mate. Presentado: Simposio Internacional Programa RAICES. “Ganando la guerra contra el cáncer”.Universidad de Buenos Aires.12 y 13 de Mayo de 2016. Buenos Aires, Argentina.