

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
MAESTRÍA EN MEDICINA ESTOMATOLÓGICA

CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS DE LA MUCOSA BUCAL Y  
MANDIBULA DE RATAS EXPUESTAS AL HUMO DE  
CIGARRILLOS

Trabajo especial presentado ante la  
ilustre Universidad Central de  
Venezuela por la Odontólogo Alba M.  
Flete Estrada para optar al título de  
Magíster Scientiarum en Medicina  
Estomatológica.

Caracas, Mayo 2009.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
MAESTRÍA EN MEDICINA ESTOMATOLÓGICA

CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS DE LA MUCOSA BUCAL  
Y MANDIBULA DE RATAS EXPUESTAS AL HUMO DE  
CIGARRILLOS

Autora: Alba M. Flete E.

Tutora: Dra. Mariana Villarroel

Caracas, Mayo 2009.

## INDICE GENERAL

	Pág.
Dedicatoria .....	v
Agradecimientos .....	Vii
Resumen .....	xii
I. Antecedentes de la Investigación.....	15
1.1. Tabaquismo.....	15
1.2. El Tabaco.....	19
1.2.1. Componentes del tabaco.....	19
1.2.2. Tipos de Consumo.....	23
1.2.3. Efecto de los componentes del tabaco en el organismo.....	28
1.3. Lesiones bucales producidas por el consumo del tabaco.....	34
1.3.1. Leucoplasia.....	35
1.3.2. Eritroplasia.....	38
1.3.3. Estomatitis Nicotínica.....	39
1.3.4. Melanosis del fumador.....	40
1.3.5. Queratosis del tabaco no fumado.....	40
1.3.6. Carcinoma de células escamosas.....	41
1.4. Cambios histopatológicos producidos por el consumo del tabaco.....	44

1.4.1. Cambios en la mucosa bucal.....	44
1.4.2. Cambios en el hueso alveolar.....	62
II. Justificación.....	66
III. Objetivos de la Investigación	
3.1. Objetivo General.....	69
3.2. Objetivos Específicos.....	69
IV. Materiales y Métodos.....	71
4.1. Población Animal.....	71
4.2. Materiales.....	72
4.3. Diseño Experimental.....	79
4.4. Análisis Estadístico.....	92
V. Resultados.....	93
5.1. Análisis descriptivo de la mucosa lingual.....	93
5.1.1. Características histopatológicas del epitelio.....	93
5.1.2. Características histopatológicas del corion.....	110
5.2. Análisis descriptivo del tejido óseo.....	115
VI. Discusión.....	118
VII. Conclusiones.....	142
VIII. Referencias Bibliográficas.....	145
IX. Lista de Figuras.....	154
X. Lista de Gráficos.....	158

## DEDICATORIA

Gracias a Dios por su grandeza. El es fiel, hoy puedo decir “No faltó palabra de todas las buenas promesas que había hecho, TODO se cumplió”... Siempre me acompañó y dispuso todas las cosas para ayudarme a entender su creación tanto animal como humana.

A mis padres, Reinaldo y Alba, que son la fuente de mi inspiración, mi mayor ejemplo de perseverancia para alcanzar las metas por difíciles que parezcan, porque han formado mi carácter y siempre han estado presentes a pesar de la distancia.

A mis hermanos, Reinaldito y Martha Alejandra, que son los mejores amigos que he tenido en mi vida y me han tendido la mano en lo que he necesitado. A ustedes cuatro que son y seguirán siendo mi apoyo y alegría les dedico este logro.

A mi familia Estrada por animarme a seguir adelante, por estar pendiente de mi regreso y apoyarme aún con detalles que parecían sencillos pero que fueron de gran importancia para éste proyecto.

A mi amiga, consejera, tutora y madrina Mariana Villarroel Dorrego, a quien Dios puso en mi camino para impulsarme a seguir adelante y brindarme el apoyo en todos los aspectos, tanto personal como profesional y estar pendiente del más mínimo detalle

A todos ustedes dedico el logro que Dios hoy me permite alcanzar!

## AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento a las Instituciones y personas que hicieron posible la realización de esta investigación:

En primer lugar le agradezco a la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, porque en sus aulas recibí la formación de parte de los docentes adjuntos de la Maestría en Medicina Estomatológica, que me facilitaron las herramientas y el conocimiento para desarrollar un proyecto de tal magnitud.

A todos gracias, en especial a mis docentes Mariana Villarroel, Jeaneth López, María Victoria Lugo, Aura Yolanda Osorio, Aubert Brito y Vilma Tovar, que en el momento oportuno me dieron su apoyo incondicional y confiaron que podía llegar al punto donde ahora me encuentro.

A la Fundación Sigma Dental, y al Dr. Carlos Marrero por su disposición para apoyar económicamente e incentivar el desarrollo de investigaciones científicas odontológicas, que nos permiten prepararnos más cada día, brindar salud y bienestar a aquellos que son la razón de nuestra vocación: “Los Pacientes”.

Al Instituto de Biología Experimental, en especial al Dr. Gilberto Payares, quien no sólo abrió las puertas del Bioterio para albergar, cuidar, proveer el espacio y los materiales necesarios para llevar a cabo una fase tan importante para esta investigación, sino que también estuvo siempre dispuesto para aclarar y enseñar todo lo referente al cuidado especial de mis ratas.

Igualmente gracias, a Yosmen Camejo y Grecia Pumar, encargados del Bioterio, por cuidar de las ratas y acompañarme en los momentos más duros, la limpieza y el sacrificio de quienes fueron nuestras compañeras por cuatro meses.

A mi amigo, cirujano Alejandro Cáribas, quien bondadosamente dispuso de tiempo para atender a sus pacientes más especiales “mis ratas” y para ayudar, enseñar y aconsejar, como un compañero que comprende cada circunstancia que se presenta en el camino.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, en especial a las Dras. Yuraima Reyes y Raquel Céspedes, quienes cordialmente participaron en el adiestramiento para el sacrificio de animales de experimentación.

Al Lic. Marcelo Rossi y demás personal del Instituto Anatomopatológico “Dr. José O’daly”, quienes estuvieron dispuestos para apoyar el trabajo multidisciplinario, que contribuyeron en el aprendizaje para el procesado de las muestras.

A la Dra. Adalsa Hernández y el personal adscrito al departamento de Imagenología de la Clínica Félix Boada, quienes tomaron parte de su tiempo laboral para realizar los estudios radiográficos necesarios.

A Klenda Suárez, Yilda Cortez, Efraín Morales y Eduardo Landaeta quienes con su aporte y solidaridad en detalles que parecían pequeños pero fueron de gran importancia para que la investigación no se detuviera y siguiera su curso hasta llegar a su fin.

A todos los residentes de la Maestría que me brindaron su apoyo, y estuvieron dispuestos a escuchar las ocurrencias de cada fase de la tesis, quienes compartieron los momentos buenos y no tan buenos, en especial agradezco a mis compañeros y amigos Maythé Gamboa, Enrique Allende, Alexis Graziani, Daymar Avilés, Yulis Romero y María Alejandra Snijder. Igualmente a quien sin ser redinte de esta Maestría me brindaron su apoyo y compañía Deiby Ramírez.

A Luis Dugarte, quien ha sido un compañero desde que se inició el transitar en la universidad y continuó acompañándome en esta segunda fase como profesionales. Gracias por escuchar en silencio todas las experiencias de cada semana.

A mis grandes amigas, Sra. Virginia, Eva, Isbelia y Yamnelis, por acompañarme en silencio, enseñándome a valorar cada circunstancia de la vida, sin importar si era buena o mala, a reconocer que de todo siempre se aprende algo que nos ayuda a crecer como persona.

## RESUMEN

El Tabaquismo ha sido catalogado por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad crónica caracterizada por una dependencia a la nicotina, que se desarrolla principalmente asociada al tabaco inhalado, produciendo efectos tanto en consumidores activos como en las personas que inhalan el humo de forma pasiva.

El propósito de esta investigación fue evaluar el efecto del humo del cigarrillo en la mucosa y el tejido óseo de la cavidad bucal en un modelo animal con ratas.

La población estuvo constituida por 20 ratas *Sprague Dawley*, divididas en 2 grupos de 10 animales distribuidos al azar, un grupo estuvo expuesto al humo de 10 cigarrillos diarios por 16 semanas y un grupo control no expuesto. Las ratas fueron sacrificadas y se extrajo la lengua unida a la mandíbula para el estudio histopatológico.

Se observaron cambios en el epitelio de la mucosa lingual en el grupo expuesto al humo de cigarrillos con diferencias estadísticamente significativas como: hiperplasia basal ( $p= 0,001$ ), acantosis ( $p= 0,0001$ ), hiper cromatismo y picnosis nuclear ( $p= 0,010$  y  $0,014$  respectivamente), de acuerdo a estas características se pudo hacer el diagnóstico de hiperplasia epitelial en 2 casos, displasia epitelial leve en 7 casos y sólo una muestra evidenció displasia epitelial moderada.

En el corion de la mucosa del grupo expuesto al humo de cigarrillos se observó infiltrado inflamatorio crónico leve y moderado. Aunque no hubo incremento en el número de vasos sanguíneos, es importante resaltar la ubicación de los mismos muy próxima al epitelio. En el hueso el promedio del número de lagunas óseas fue mayor en el grupo expuesto al humo de cigarrillos pero estadísticamente no fue significativo ( $p= 0,395$ ).

Se concluye que los componentes del humo del tabaco inducen cambios precoces en la arquitectura y morfología de células epiteliales de la mucosa bucal que varían desde hiperplasia epitelial hasta displasia epitelial moderada que pudieran progresar a carcinomas si la exposición a los carcinógenos del cigarrillo persiste.

## **I. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.1. EI TABAQUISMO**

#### **1.1.1. Definición.**

La adicción al consumo de cigarrillos hoy en día ya no es considerada como un simple hábito sino que ha sido catalogada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad denominada Tabaquismo, que se define como una enfermedad crónica caracterizada por una dependencia a la nicotina que cursa con períodos de abstinencia y recaídas.

Ya para el año de 1992, la Organización Panamericana de la Salud publicó un Boletín con la información sobre la situación de los países de América con respecto al uso del tabaco, señalando que los cambios socioeconómicos que se estaban generando en la época estaban incidiendo de manera directa sobre la tendencia que tenía el tabaquismo, debido a que muchas mujeres ya se estaban incorporando a la economía activa y con esto también adoptaban patrones de consumo de cigarrillo similar al de los hombres.

Así mismo, muchos adolescentes comenzaron a experimentar el uso del tabaco, haciendo que el inicio de la enfermedad se ubicara en una edad más temprana (Peruga y cols, 2002).

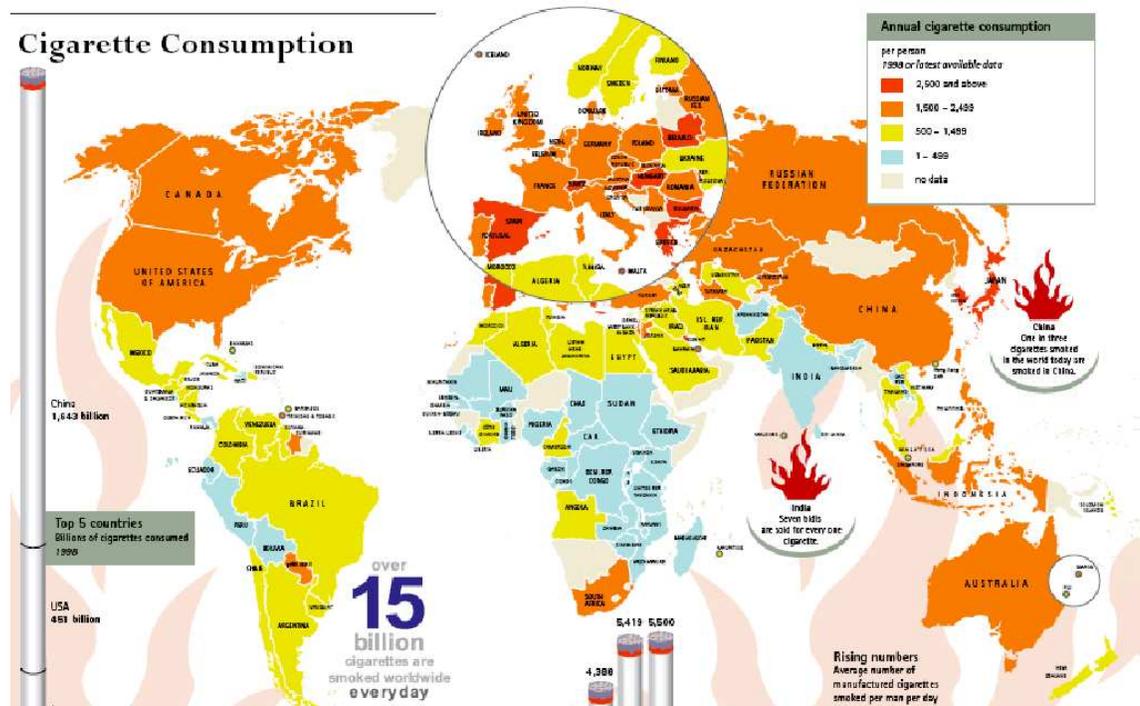
A pesar de que los análisis de tendencias y de mortalidad proporcional atribuibles al tabaquismo eran difíciles de interpretar, a través de los registros del cáncer recopilados por la Organización Panamericana de la Salud, se pudo obtener que hubo un incremento en el número de muertes por cáncer de pulmón tanto en hombres como en mujeres entre 45 y 60 años de edad, de lo que se dedujo que en esos grupos de edad no podía haber otra causa que provocara este tipo de cáncer que no fuera el cigarrillo (Boletín de OPS, 1992; Peruga y cols, 2002).

Con el paso del tiempo, la epidemia del tabaquismo se fue extendiendo y es así como en el año de 1998, la Organización Mundial de la Salud publica unas nuevas estadísticas, reportando que para la fecha ya existían más personas con tabaquismo, y los fumadores estaban consumiendo un mayor número de cigarrillos por día.

En esa oportunidad se realizó un estimado de consumo anual por persona en todo el mundo, y en los países de América Latina,

incluyendo Venezuela se encontró que cada persona consumía entre 500 y 1499 cigarrillos al año (Fig.1).

**Fig. 1. Consumo de Cigarrillo a nivel mundial.**

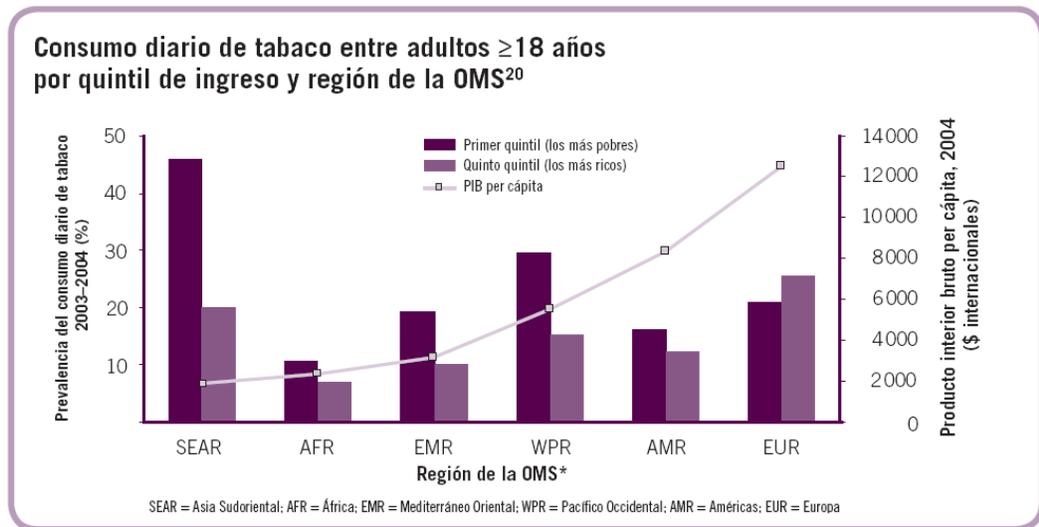


**Fuente: Atlas del Tabaco. Organización Mundial de la Salud. 2002.**

Debido a la situación alarmante en el aumento del consumo del cigarrillo y que cada vez más personas sean diagnosticadas de Tabaquismo, los organismos internacionales de salud continuaron realizando estudios epidemiológicos y para el año 2007, la Organización Panamericana de la Salud publica un boletín sobre Estadísticas Sanitarias Mundiales, sobre 10 problemas de salud pública donde incluye el tabaquismo (Fig. 2).

En dicho boletín se resalta el hecho de que el consumo de tabaco es mayor en los estratos más pobres de la sociedad, y este patrón se repite en las 6 regiones mundiales incluidas en el estudio, pese a que a las compañías tabacaleras se les asigne una alta suma de impuestos, para hacer que el producto tenga un alto costo y de alguna manera sea inaccesible pero ocurre un desvío de recursos hacia la compra de los mismos.

**Figura 2. Consumo diario de tabaco según la Organización Panamericana de la Salud.**



**Fuente: Estadísticas Sanitarias Mundiales. OPS. 2007**

## **1.2. EL TABACO.**

### **1.2.1. Componentes.**

La mayoría de los productos del tabaco son elaborados de la planta *Nicotiana tabacum*, de esos componentes, 55 han sido identificados por la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer (IARC) los cuales muestran suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales de laboratorio y en humanos. Los principales carcinógenos que se han identificados son: las nitrosaminas, numerosos hidrocarburos aromáticos policíclicos, polonio radioactivo y benzene.

El humo del tabaco es una mezcla compleja de cerca de 5000 compuestos químicos. Los componentes del tabaco están representados en cuatro grupos principalmente: Carbohidratos (40% de su peso seco), los componentes nitrogenados (10%), ácidos carboxílicos (10%) y compuestos fenólicos en un 5-10% (Préfontaine y cols, 2006).

El humo que es inhalado bucalmente por el fumador activo, es un aerosol constituido por dos fases, una gaseosa y una particulada que contiene los carcinógenos (hidrocarburos aromáticos

policíclicos, aldehídos), que son generados a una temperatura de combustión de aproximadamente 800 a 900 °C. De todas las partículas inhaladas un 80% son depositadas en el tracto respiratorio, en especial en la región traqueo - bronquial (Kuper y cols, 2002; Husgafvel - Pursiainen, 2004).

El producto de la combustión de la celulosa y otros carbohidratos son principalmente los aldehídos, ácidos orgánicos y fenoles. Las proteínas y aminoácidos del cigarrillo son los precursores de aminos alifáticos, pirroles, y aminos aromáticos heterocíclicos, tales como, indol, imidazol, piridina (Préfontaine y cols, 2006).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, que incluyen el Benzopirene, son formados por la combustión incompleta del cigarro durante el fumar y son bien reconocidos como carcinógenos que han sido inductores de tumores de pulmón en animales de laboratorio expuestos por inhalación. El pulmón humano puede metabolizar este compuesto por una vía que conduce a una modificación covalente del ADN (formación de ADN aducto), lo cual ha sido corroborado por estudios que han reportado los cambios mutacionales en el gen p53 que causa este componente (Hecth, 1997; Kupper y cols, 2002).

Una vez que los carcinógenos del cigarrillo han sido inhalados y alcanzan el torrente sanguíneo, requieren una activación metabólica para surtir sus efectos dañinos, los que afortunadamente son contrarrestados por mecanismos protectores que posee el organismo para lograr la detoxificación de los mismos. Cuando ocurre un desbalance entre estos dos mecanismos es cuando aumenta el riesgo para desarrollar cáncer (Kupper y cols, 2002).

La Nicotina es uno de los principales constituyentes del cigarrillo y es absorbida rápidamente por las pequeñas vías respiratorias y en el pulmón debido a la gran área de superficie proporcionada por los alvéolos y la dilución facilitada de este componente por el pH de los fluidos corporales, lo que permite que atraviese las membranas celulares con una tasa de absorción pulmonar similar a una administración intravenosa (Lakind y cols, 1999).

Una vez que la nicotina es absorbida, es aclarada rápidamente del torrente sanguíneo como resultado de un rápido metabolismo y captación de los tejidos. Este componente tiene una vida media en el organismo de 2 horas pero al ser metabolizada (oxidada) por las enzimas hepáticas forma un metabolito denominado Cotinina, el cual tiene una vida media más prolongada de 20 a

24 horas, siendo éste el responsable de la formación de ADN aducto, formado por una unión covalente entre la cotinina y el ADN de la células (Woodward y Al-Delaimy, 1999). La Nicotina conforma del 0,05 al 4% del cigarrillo y los fumadores extraen de 1 a 2 mg de nicotina por cigarrillo (Kuper y cols, 2002).

### **1.2.2. Tipos de Consumo del Tabaco.**

Existen diferentes tipos de consumo del tabaco y puede variar de una región geográfica a otra, actuando de manera influyente la cultura de cada una. El consumo se realiza de dos formas principales que son: la forma de tabaco inhalado o combustible que representa el 85% de consumo a nivel mundial y el tabaco no inhalado o no combustible.

En la primera forma de consumo, es necesaria la combustión de las virutas del tabaco, para generar un humo constituido por una fase gaseosa y una fase particulada, en las cuales se diluyen los componentes que luego son inhalados y pasan al torrente sanguíneo alcanzando concentraciones plasmáticas suficientes para causar efectos locales y a distancia (Kupper y cols, 2002).

Este humo se genera de de dos fuentes, una principal la cual es inhalada por quien fuma activamente y una fuente secundaria la cual se desprende del extremo encendido y que pasa directamente al medio ambiente para ser inhalados por otros.

El tabaco combustible es preparado en diferentes presentaciones, entre ellas se encuentran el tabaco que es fumado a través de pipas; los cigarrillos, que consisten en múltiples virutas enrolladas en papel de celulosa y los cigarros puros que son manufacturados y estas virutas son envueltas en una hoja seca del tabaco. Estas presentaciones del tabaco son fumados de manera directa aunque, en algunas regiones del mundo, incluyendo Venezuela, existe todavía la tendencia de fumar de forma invertida, con el extremo encendido hacia la porción interna de la boca, lo cual produce altas temperaturas intrabucales que causan efectos locales sobreañadidos (Kupper y cols, 2002).

Por otra parte, el tabaco no inhalado también posee diferentes formas de presentación y diversas maneras de consumo. Este puede utilizarse en forma de pasta para masticar o ser colocado en distintas zonas de la cavidad bucal por largo tiempo hasta que sea disuelto. Esta pasta puede ser de tabaco solamente o

también suele ser mezclada con otros productos como la nuez de betel, cal, aceite de sésamo e incluso chocolate.

A pesar de las distintas maneras de consumo del tabaco anteriormente expuestas, el consumo del tabaco fumado o combustible, es hoy en día el responsable de una pérdida del 20% aproximadamente de las expectativas de vida y sus efectos negativos sobre la salud no sólo se aplican a los fumadores por sí mismos sino que también puede causar serios problemas en fumadores pasivos (Bozkurt y cols, 2006).

El humo ambiental derivado del tabaco, está constituido en un 85% por el gas que se expele producto de la combustión del extremo ardiente del cigarrillo y que pasa directo al aire ("Sidestream Smoke") y un 11% de pequeñas contribuciones de otras fuentes incluyendo el humo espirado por los fumadores activos (Mainstream Smoke). Los constituyentes químicos de ambos son los mismos pero existen diferencias en la tasa de emisión puesto que intervienen factores como la temperatura de combustión del tabaco, pH y grado de dilución con el aire (Husgafvel - Pursiainen, 2004).

La fuente secundaria del humo derivado del cigarrillo “sidestream smoke” es producido a una temperatura aproximada de 600 °C y en condiciones menos ricas en oxígeno, en consecuencia, el producto de la combustión es distinto al inhalado por el fumador activo. Éste contiene más anhídrido carbónico (CO), menos dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y altos niveles de productos como aminos y nitrosaminas (Woodward y Al- Delaimy, 1999; Husgafvel - Pursiainen, 2004).

Este gas es menos ácido que el humo inhalado bucalmente (pH 7) y esto es debido a las elevadas cantidades de amonio, y como resultado, la nicotina está presente en grandes cantidades en la forma no ionizada, por lo que es más rápidamente absorbida en el organismo. El tamaño de las partículas en el sidestream smoke varía de acuerdo a muchos factores, incluyendo la edad del que fuma, temperatura del ambiente y humedad; generalmente las partículas en este gas son más pequeñas que las presentes en el humo inhalado por el fumador activo, y debido a esto se dispersan más rápidamente en espacios cerrados. El Sidestream smoke, es una mezcla emitida directamente al medioambiente (Kuper y cols, 2002).

De los miles de componentes químicos presentes en el humo del tabaco, alrededor de 400 han sido cuantificados y por lo menos 200 han sido identificados como tóxicos y carcinógenos tanto para el humano como para los animales de laboratorio. Si bien la mayoría de estos componentes se encuentran en la fase particulada que principalmente es absorbida por los fumadores activos también han sido encontrados en la porción gaseosa que es aspirada pasivamente por los que rodean a un fumador, es así como, que en fumadores pasivos la absorción de la nicotina ha sido reportada en un 60% a 80% (Husgafvel- Pursiainen, 2004).

Al respecto, Woodward y Al- Delaymi (1999) señalan que la deposición de las partículas del humo derivado del tabaco, es influenciada por las variables biológicas concernientes a la manera de inhalación y a la configuración del tracto respiratorio, por tanto, la fracción de las partículas del humo del tabaco ambiental son depositadas en el tracto respiratorio en un porcentaje estimado entre el 10 y 20 %, en contraste con las partículas, producto de la inhalación del fumador activo las cuales varían en un porcentaje entre el 70 y 90%.

### **1.2.3. Efecto de los componentes del tabaco en el organismo.**

La Nicotina es el componente del tabaco responsable de la adicción o dependencia a éste, lo cual es un trastorno que afecta los procesos cerebrales, emocionales, perceptuales y motivacionales.

En el sistema nervioso central existe una serie de Receptores nicotínicos para Acetilcolina, los cuales son pentámeros constituidos por una subunidad alfa ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  o  $\alpha 9$ ) o una combinación de una subunidad  $\alpha$  con una  $\beta$  como el  $\alpha 4\beta 2$ , que es el receptor más frecuentemente encontrado. En condiciones fisiológicas la Acetilcolina, que constituye el ligando endógeno se une a éstos receptores y cambian su conformación abriendo canales catiónicos que permiten la entrada de iones al interior de las neuronas (Paradiso y Steinbach, 2003).

Cada cigarrillo contiene 0,9 mg de nicotina y cuando una persona inhala el humo de forma activa, este componente alcanza una concentración plasmática aproximada de 0,5 microgramos, los cuales son suficientes para atravesar la barrera hematoencefálica y actuar como un agonista de la Acetilcolina

uniéndose a sus receptores, de ésta manera los activa y de forma directa o indirecta permite la liberación de dopamina, que es la responsable de la sensación de bienestar que experimentan los fumadores (Paradiso y Steinbach, 2003) .

Esta liberación de dopamina inducida por la nicotina, favorece y refuerza la adicción al cigarrillo, puesto que interviene el sistema mesolímbico dopaminérgico que se encuentra ubicado en una zona del cerebro conocida como mesencéfalo.

Dos zonas muy importantes para la dependencia de sustancias son el área tegmentaria ventral, que es rica en neuronas que contienen el neurotransmisor dopamina cuyos cuerpos celulares envían proyecciones hacia regiones del cerebro implicadas en la emoción, el pensamiento, la memoria, la planificación y ejecución de los comportamientos; y una zona con la que está comunicada, denominada núcleo accumbens, que es el área del cerebro implicada en la motivación, el aprendizaje y en el señalamiento del valor motivacional de los estímulos. La nicotina aumenta la liberación de dopamina en el núcleo accumbens, y se cree que esto es un acontecimiento importante en el reforzamiento (Vaccarino y Rotzinger, 2005).

La disponibilidad que pueda existir de la nicotina hace que todos los receptores se activen de forma sincronizada, pero la exposición crónica y a concentraciones bajas mantenidas hace que algunos de estos receptores adopten una conformación en reposo o de inactividad por tiempo prolongado, lo que conlleva a un incremento en la cantidad de los mismos sobre la superficie de la membrana para compensar la oferta o alta disponibilidad del metabolito. Esto explica la tolerancia que se desarrolla luego de cada cigarrillo, lo que trae como consecuencia que sea necesario aumentar la cantidad de nicotina para lograr el efecto de placer (Paradiso y Steinbah, 2003; Dani & Heinemann, 1996).

Por este mismo mecanismo, cuando en una persona disminuye la concentración de nicotina de forma considerable, bien sea durante el sueño, en períodos de abstinencia o incluso entre cada cigarrillo, los receptores nicotínicos que se encontraban inactivos recuperan su conformación original (Vaccarino y Rotzinger, 2005).

Debido a la cantidad aumentada de los mismos se desarrolla una respuesta exagerada por hiperexcitabilidad a la acetilcolina, lo que conduce a la aparición de los síntomas de irritabilidad y malestar asociados a la abstinencia y al estar implicado el

sistema mesolímbico dopaminérgico se induce una conducta de búsqueda del cigarrillo para suplir la necesidad.

La dependencia a la nicotina está reforzada por la acción de otros componentes del tabaco que pueden intervenir en el mecanismo de búsqueda de gratificación y bienestar, estudios han demostrado que en el cerebro de fumadores existen inhibidores de la Monoamino oxidasa B, enzima que se encarga de la degradación de la dopamina, permitiendo que el efecto de placer provocado por acción de la nicotina sea potenciado (Dani y Heinemann, 1996).

Los productos carcinogénicos del tabaco pueden ser absorbidos por inhalación o ingestión y de allí pasar a la circulación. Una vez dentro del organismo, estos componentes son metabolizados en el hígado en dos fases, en una primera fase, son convertidos en metabolitos electrofílicos activos por enzimas oxidativas y luego en una segunda fase las enzimas producen conjugados que hacen estos metabolitos más hidrofílicos y por lo tanto pueden ser excretados por la célula más fácilmente (Kuper y cols, 2002)

Desafortunadamente, los metabolitos producidos en la fase I son más potencialmente dañinos para el ADN que los productos químicos originales, la activación de éstos carcinógenos es catalizada principalmente por el citocromo P 450, el cual acepta selectivamente moléculas derivadas de los carcinógenos químicos, como sustratos, los cuales se intercalan con el ADN de las células que se están formando, pues se une de una forma covalente, produciendo así un daño al material genético y la activación de oncogenes y además la formación de epóxidos que no son fácilmente degradados por la epóxido hidrolasa, la glutatión transferasa o cualquier otra enzima detoxificadora (Parke, 1994).

Las células que contienen ADN aducto, suelen evadir los mecanismos de reparación celular lo que conduce que éste error genético persista y produzca una mutación, además, el cigarrillo produce la liberación de radicales libres que también puede inducir daños al ADN (Kuper y cols, 2002).

En fases tempranas de la carcinogénesis ocurren cambios en la naturaleza química de los proteoglicanos y glucocálix de la célula, lo que trae como consecuencia que se pierda la adhesión y se formen brechas entre las uniones intercelulares permitiendo

que químicos tóxicos alcancen el estrato basal del epitelio, ocasionando daños en el ADN de las células progenitoras (Parke, 1994)

La exposición al humo ambiental derivado del tabaco también puede inducir daños a nivel del ADN nuclear y mitocondrial, además de causar la formación de ADN y Hemoglobina aductos por la unión covalente entre los componentes nucleicos y proteicos con los derivados del cigarrillo como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. La Cotinina puede también unirse covalentemente a proteínas sanguíneas como la Hemoglobina (Kuper y cols, 2002).

Tales efectos han sido estudiados en investigaciones con roedores que han sido expuestos a cuerpo completo al humo de cigarrillos, como es el caso de Lee y cols (1992), que posterior a la exposición al humo por catorce días consecutivos encontraron la formación de ADN aducto en células de pulmón y corazón, lo que evidencia los efectos de los componentes del tabaco (Husgafvel- Pursiainen, 2004).

El ADN aducto resulta de la unión covalente entre éste y los productos carcinogénicos, y se produce como resultado del

proceso de activación; si persisten las regiones críticas de los genes sin reparar, ellos pueden causar cambios en oncogenes, genes de supresión tumoral y otros genes implicados en el sistema del control del crecimiento celular (Hetch, 1997).

Otras investigaciones también han demostrado que la exposición de forma pasiva al humo del tabaco puede inducir en el organismo la presencia de células con micronúcleos o picnosis en la médula ósea o en sangre periférica como eritrocitos normocrómicos y en macrófagos alveolares pulmonares (Balansky y cols, 1999). Así mismo, la exposición al humo de cigarrillos en roedores ha provocado alteraciones a nivel del gen *p53* (Dumble y cols, 2004).

### **1.3. LESIONES BUCALES PRODUCIDAS POR EL CONSUMO DEL TABACO**

El uso del tabaco ha sido asociado como factor etiológico predominante en ciertas enfermedades, entre las que resaltan las enfermedades respiratorias, cardiovasculares y el cáncer, siendo especialmente ligado al cáncer de pulmón.

Así mismo, existen diferentes lesiones en cavidad bucal que son producidas por el consumo de tabaco bien sea inhalado o en forma de pasta para masticar, muchas de las cuales tienen un potencial para evolucionar hacia la malignidad, sin dejar a un lado aquellas francamente malignas como lo son el carcinoma de células escamosas incluyendo el Verrucoso (Bánóczy y Squier, 2004).

Entre las lesiones bucales causadas por el consumo de tabaco se encuentran:

### **1.3.1. Leucoplasia.**

Esta lesión representa un 80 % de los desórdenes potencialmente malignos, y se define como una placa blanca que no puede ser caracterizada ni clínica ni histopatológicamente como cualquier otra enfermedad y que no está asociada a cualquier agente físico o químico excepto al tabaco (Bouquot y cols, 2006; Van der Waal, 2008).

Al igual que en el cáncer bucal, el tabaco es el principal factor etiológico asociado a la leucoplasia, existiendo una estrecha

relación no sólo con su origen sino también con la progresión hacia la malignidad.

Esta lesión aparece más frecuentemente en el borde bermellón del labio, en la mucosa del carrillo, borde lateral de lengua y en piso de boca. Clínicamente se clasifica en: Homogénea (generalmente una placa delgada, de color uniforme) y No Homogénea, de superficie irregular, o nodular, y en algunas ocasiones el color blanco se entremezcla con áreas eritematosas, denominándose Eritroleucoplasia (Bouquout y cols, 2006; Bánóczy y Squier, 2004; Neville y Day, 2002).

Histopatológicamente la leucoplasia puede abarcar un rango muy amplio, puesto que microscópicamente pueden exhibir desde una hiperqueratosis y/o acantosis, hasta distintos grados de displasia epitelial, por lo que pueden ser subdivididas en displásicas o no displásicas, dependiendo si los cambios en la arquitectura del tejido van acompañado o no de atipia celular.

Es posible que el efecto irritante local de los componentes del cigarrillo pueda modificar la producción de mediadores inflamatorios o citoquinas que regulan la proliferación celular, e

inducir hiperplasia epitelial en los tejidos expuestos (Ringdahl y cols, 1997).

La Organización Mundial de la Salud (2005) estableció 5 estadios para el diagnóstico de la patología epitelial observada microscópicamente en lesiones leucoplásicas, que son:

- Estadío I. Hiperplasia: En la cual puede haber una acantosis y/o hiperplasia basal, sin mostrar cambios de atipia celular.
- Estadío II. Displasia epitelial leve: La arquitectura del epitelio se ve alterada sólo en el tercio basal, acompañado de cambios citológicos.
- Estadío III. Displasia epitelial moderada: La arquitectura del epitelio abarca tanto el tercio inferior o basal y medio.
- Estadío IV. Displasia epitelial severa: Todo el epitelio se encuentra alterado, observándose cambios citológicos de atipia en forma generalizada.
- Estadío V. Carcinoma in Situ: Se puede observar gran desorganización del epitelio con atipia celular bien marcada, sin invasión al tejido conectivo subyacente, para algunos patólogos no existe distinción entre este estadio y el anterior (Barnes y cols, 2005).

Estudios han establecido que la tasa de transformación maligna que tiene la leucoplasia que varía entre el 1 y el 28%, pudiendo darse esta transformación en meses o en años. La forma clínica no homogénea es la que más frecuentemente ha tenido mayor tasa de transformación maligna (Bouquot y cols, 2006).

### **1.3.2. Eritroplasia.**

Se define como una placa eritematosa que no puede ser atribuible a cualquier otra enfermedad conocida, ni asociada a un factor traumático, vascular o inflamatorio (Bouquot y cols, 2006).

Clínicamente pueden presentar una superficie lisa o en algunos casos granular. Se ubican con mayor frecuencia en cara ventral de lengua, piso de boca y paladar blando. Se considera una lesión con un alto potencial de malignidad puesto que al examen microscópico generalmente revela un carcinoma in situ o un carcinoma superficialmente invasivo.

Las eritroplasias no tienen distinción por género y afectan principalmente a individuos adultos mayores.

### **1.3.3. Estomatitis Nicotínica.**

Es una alteración de la mucosa del paladar por efecto del uso del cigarrillo, bien sea de forma convencional o invertida, lo cual hace que la misma comience a engrosarse observándose clínicamente como una placa blanquecina, que en ocasiones pueden desarrollarse en la superficie elevaciones papulares, en la que los conductos excretores de las glándulas salivales menores se encuentran eritematosos (Taybos, 2003; Neville y Day, 2002).

Estos cambios han sido asociados a las altas temperaturas intrabucales que se producen por la combustión del cigarrillo. Histopatológicamente, se puede observar hiperqueratosis, ectasia ductal, sialodiquitis, sialoadenitis y displasia epitelial (Messadi y cols, 2003).

### **1.3.4. Melanosis de fumador.**

Es una pigmentación anormal de la mucosa bucal que es producida por efecto de los componentes del tabaco, bien sea fumado o del tabaco en pasta para ser masticado, los cuales estimulan a los melanocitos a producir más melanina. La mucosa

del carrillo es el sitio más frecuentemente afectado seguido del paladar.

Microscópicamente se distingue por la aproximación de la abundancia de melanocitos en la capa basal del epitelio. Dicha lesión no requiere tratamiento puesto que al cesar el consumo del tabaco los cambios revierten a la normalidad. (Mirowski y Waibel, 2002).

#### **1.3.5. Queratosis del Tabaco no fumado.**

Es otra alteración asociada al consumo de tabaco masticado, que se produce en la mucosa sobre la cual es colocada la pasta, que generalmente es la mucosa del carrillo, en el fondo del vestíbulo y la mucosa labial, que es dependiente de la cantidad de tabaco colocado, el tiempo de permanencia en contacto con la mucosa y la susceptibilidad de cada individuo (Messadi y cols, 2003).

Inicialmente la mucosa se observa ligeramente blanquecina pero con un aspecto translúcido que tiende a desaparecer cuando la misma es distendida, con el paso de tiempo llegan a formarse verdaderas placas engrosadas, blancas con algunas zonas grisáceas. Microscópicamente, se puede observar una

hiperqueratosis y acantosis (Messadi y cols, 2003; Neville y Day, 2002).

### **1.3.6. Carcinoma de Células Escamosas.**

Como se ha mencionado anteriormente, el consumo de tabaco ha sido estrechamente asociado al cáncer bucal. Estudios epidemiológicos han demostrado que existe un riesgo de 5 a 9 veces mayor para desarrollar cáncer bucal en los fumadores, y éste riesgo aumenta conforme lo hace el número de cigarrillos consumidos por día. Sin embargo, el mayor riesgo para desarrollar cáncer está ligado al consumo de tabaco fumado que al masticado (Neville y Day 2002).

Clínicamente se puede presentar como lesiones tumorales de superficie irregular o como lesiones ulcerativas, de bordes elevados y engrosados, que se ubican con mayor frecuencia en el borde lateral de la lengua y en el piso de la boca, pero también se pueden presentar en la encía, paladar duro y labio. Este tumor crece rápidamente y se extiende en profundidad, pues tiene una gran capacidad invasiva y metastatiza rápidamente, en primer lugar a los ganglios linfáticos regionales (Bouquot y cols, 2006; Taybos, 2003; Neville y Day 2002).

Estos tumores suelen ser asintomáticos, pero con el avance de la enfermedad pueden aparecer signos y síntomas asociados a la invasión de estructuras anatómicas adyacentes a la lesión como músculos, huesos y piel, presentándose así dificultad para hablar, deglutir, abrir la boca.

Microscópicamente se puede evidenciar una diferenciación escamosa variable, interrupción de la membrana basal con extensión hacia los tejidos subyacentes. Se distinguen tres grados de diferenciación, que son: Bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado (Bouquot y cols, 2006; Barnes y cols, 2005).

En los carcinomas bien diferenciados, las células epiteliales se asemejan al tejido que les dio origen, llegando a ser evidente la formación de perlas de queratina. En los moderadamente diferenciados, las células demuestran pleomorfismo nuclear e intensa actividad mitótica, incluyendo mitosis atípica y en los pobremente diferenciados, están constituidos por células inmaduras e indiferenciadas, siendo éstos los de peor pronóstico (Barnes y cols, 2005).

Además de todas estas lesiones, el consumo del tabaco influye de manera negativa sobre las estructuras de soporte dentario. En un estudio realizado por Tanaka y cols (2005), encontró una asociación positiva entre la exposición al humo de tabaco ambiental y la pérdida de dientes, sobretodo en mujeres que estaban expuestas en el hogar, a más de 10 cigarrillos por día, comparadas con resultados similares obtenidos en aquellas que fumaban activamente en las que parecía haber una relación dosis – respuesta, siendo mayor la pérdida dental cuando aumenta la cantidad de cigarrillos por día.

A pesar de las observaciones antes mencionadas, los autores señalan no precisar las causas exactas que puedan atribuir de forma directa la pérdida de dientes al cigarrillo, sabiendo que la exodoncia es el último status de la historia de enfermedad dental toman en consideración, que entre los mecanismos potenciales de los efectos del cigarrillo sobre la salud bucal son tanto locales como sistémicos, tales como: vasoconstricción local de los tejidos, la inmunosupresión y la respuesta inflamatoria exagerada, así como la disminución de las concentraciones séricas de IgA e IgG (Tanaka y cols 2005).

## **1.4. CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS PRODUCIDOS POR EL CONSUMO DEL TABACO.**

### **1.4.1. Cambios en la Mucosa Bucal.**

Como se ha mencionado anteriormente, el cigarrillo es el principal factor etiológico asociado a desórdenes potencialmente malignos como la leucoplasia y eritroplasia, las cuales se caracterizan por presentar alteraciones en la arquitectura del epitelio y en las características morfológicas celulares de este tejido así como también a la patología epitelial francamente maligna como los carcinomas en cavidad bucal.

Debido a las variaciones que pueden presentarse en la interpretación de la patología epitelial por parte de los patólogos, se han sido establecidos criterios para el diagnóstico de la Displasia Epitelial, la cual se clasifica en:

- Displasia epitelial leve o Grado I
- Displasia epitelial moderada o Grado II
- Displasia epitelial severa o Grado III (Barnes y cols, 2005).

Además de estas características de estratificación irregular, también se han aceptado como criterios para las displasias epiteliales, la pérdida de polarización de las células basales,

incremento en el número de mitosis, queratinización prematura (disqueratosis), perlas de queratina dentro de los mamelones epiteliales y la apariencia bulbosa de los mismos, debido esta última característica al aumento de la proliferación celular en esa zona que hace que adopten una forma redondeada (Barnes y cols, 2005).

Así mismo, existen alteraciones específicas en las que las células adoptan características primitivas e inmaduras, que también son incluidas como elementos diagnósticos en las displasias epiteliales, tales como: variación anormal en el tamaño del núcleo (anisonucleosis), hiper cromatismo nuclear, variación anormal en la forma del núcleo (pleomorfismo nuclear), variación anormal en el tamaño y forma de la célula (anisocitosis y pleomorfismo celular, respectivamente), incremento en la proporción núcleo-citoplasma, figuras mitóticas anormales no sólo en forma sino también de ubicación inusual sobre la capa basal, incremento en el número y tamaño de nucléolos (Barnes y cols, 2005).

La mucosa bucal está recubierta por un dinámico epitelio que se encuentra en un constante proceso de recambio y proliferación de sus células basales. Por consiguiente, para el mantenimiento

de la estructura y función epitelial, los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis en estos tejidos deben estar sometidos a una estricta y delicada regulación (Loro y cols. 2005).

Los acontecimientos moleculares que se observan durante el crecimiento celular son complejos y consisten en un despliegue creciente de moléculas y vías intracelulares, siendo estos de suma importancia ya que las anomalías de esas vías pueden ser la base del crecimiento incontrolado del cáncer, así como de las respuestas celulares anormales que se producen en diversas enfermedades.

Todas las rutas que conducen a la estimulación e inhibición de la proliferación celular convergen en un solo punto denominado ciclo celular, el cual se cumple en el núcleo de todas las células y que está regulado por ciertos genes específicos. Dicho ciclo consta de cuatro fases que son: Fase G1; en la cual las células aumentan su tamaño y sintetizan todas las enzimas necesarias para la replicación del ADN, una Fase S o de Síntesis en la cual ocurre la replicación del material genético; una tercera Fase denominada G2, en la cual la célula se prepara nuevamente mediante la síntesis de proteínas y enzimas necesarias para la

división celular y finalmente la Fase de Mitosis, donde ocurre división de las células con formación de una célula idéntica a la que le dio origen (Panno, 2005).

La apoptosis o muerte celular programada es una forma de muerte celular cuyo objetivo es el de eliminar las células del huésped que ya no son necesarias a través de la activación de una serie coordinada y programada de acontecimientos internos, que se inicia por un grupo de productos génicos cuya función específica es precisamente ésta. Este es un importante mecanismo de defensa en la prevención y eliminación de las células malignas, por consiguiente, su alteración pudiera contribuir al desarrollo y crecimiento cancerígeno (Okazaki y cols, 2002).

En la regulación del ciclo celular participan dos grupos principales de genes, los protooncogenes, que son los encargados de regular la división y proliferación celular, que cuando están alterados se denominan Oncogenes. Y están los denominados Genes de Supresión Tumoral, los cuales inhiben la proliferación celular y evitan que las células adquieran características malignas (Perwes y cols, 2001).

Actualmente se ha identificado que la carcinogénesis implica una inactivación de genes de supresión tumoral simultáneamente a una activación de oncogenes (Perwes y cols, 2001).

Toda la información necesaria para que una célula se transforme en una célula neoplásica puede ser atribuida a cambios en el genoma; basado en el hecho de que en el mismo reside toda la información relacionada a cualquier proceso celular (Grizzi y cols, 2006).

La carcinogénesis se da en múltiples fases que implican un cambio de tejidos sanos a desórdenes potencialmente malignos y que posteriormente adquieren un fenotipo de tumor maligno metastásico (Kim y cols, 2001; Chimeneos y cols, 2004; Tsantoulis y cols, 2007).

Esta progresión se ha asociado a una inestabilidad genómica en las células, por lo que se postula que el desarrollo del cáncer es el resultado de la acumulación de errores genéticos en un mismo tejido (Kim y cols, 2001; Chimeneos y cols, 2004; Tsantoulis y cols, 2007).

Una gran cantidad de información en un genoma olvidado es la contenida en las mitocondrias. Esta organela produce casi la totalidad de la energía requerida para la función celular, y es inevitable que en este proceso se formen y liberen radicales reactivos del oxígeno, los cuales dañan a los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. El genoma mitocondrial es menos protegido y tiene un mecanismo reparador menos eficiente comparado con el del genoma nuclear, no sorprende entonces que el genoma mitocondrial tiene un alto porcentaje de mutación que podría jugar un papel importante en la carcinogénesis (Dakubo y cols, 2007).

Los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello han sido sugeridos como ejemplos para la carcinogénesis, proceso que se da en múltiples pasos en un campo de tejidos expuestos a carcinógenos (Shin y cols, 2001).

Donde lesiones potencialmente malignas son observadas en áreas adyacentes a las lesiones francamente malignas. Uno de los pasos en ese proceso que conduce a la formación del cáncer es la “acumulación del daño genético” que depende de la frecuencia y el grado de exposición a los carcinógenos, la

sensibilidad inherente al individuo y la reactividad del tejido a dichos carcinógenos (Shin y cols, 2001).

La inestabilidad genómica ha sido propuesta como el principal factor determinante en la tasa de acumulación de daños genéticos específicos en varios cánceres humanos (Shin y cols, 2001).

El desarrollo del cáncer requiere la adquisición de propiedades fundamentales: autoproliferación, insensibilidad a las señales antiproliferativas, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, mantenimiento de la vascularización, invasión a los tejidos y metástasis (Rakoff- Nahoum, 2006).

Este proceso encierra tres fases principales que son: iniciación, promoción y progresión. La Iniciación, está dada por cambios en el genoma de la célula, como pueden ser, mutaciones puntuales, delección y amplificación de la señal de genes y reordenamientos cromosómicos que conducen a cambios celulares irreversibles (Rakoff- Nahoum, 2006).

Luego el desarrollo del tumor es “promovido” por la supervivencia y expansión clonal de éstas células iniciadas y finalmente “prograsa” por un crecimiento sustancial en tamaño y metástasis (Rakoff- Nahoum, 2006).

No obstante, la adquisición de propiedades autónomas por parte de la célula cancerígena no es suficiente para el crecimiento completo del tumor sino que este proceso involucra tanto a células anormales como células no alteradas, constituyendo así una población heterogénea, lo cual explica la necesidad de la angiogénesis para el crecimiento de tumores, con la contribución implícita de las células endoteliales en dicho proceso (Rakoff- Nahoum, 2006).

Así mismo, Coussens y Hanahand (1999), señalan que el crecimiento de ciertos tumores es similar al proceso de cicatrización, que comprende dos fases, una primera fase en donde el organismo trata el tumor en sus inicios como una herida y el mismo crece por acción del estroma “control indirecto”, como ocurre en el proceso fisiológico reparativo, en el cual ciertas moléculas como el factor de crecimiento endotelial puede iniciar la angiogénesis. Luego en una segunda fase más tardía comienzan aparecer factores pro- inflamatorios que son

derivados directamente de las células tumorales y que permiten la promoción y progresión del mismo.

Para la promoción del cáncer no solamente es necesaria la supervivencia de las células sino también su expansión clonal, como se mencionó anteriormente, por lo que ciertos mediadores inflamatorios como las citoquinas y eicosanoides son capaces de estimular la proliferación tanto de las células no alteradas como las tumorales (Rakoff- Nahoum, 2006).

El paso decisivo en la carcinogénesis implica el irreversible cambio cualitativo en una o más características genéticas de las células, aunque ésta modificación dirige la transformación de una célula normal a una neoplásica, puede o no conducir a cambios visibles en su aspecto citológico o histológico (Grizzi y cols, 2006).

Estudios estadísticos de aspectos moleculares sugieren que hacen falta entre 6 y 10 alteraciones genéticas, para que se produzca una transformación maligna de la mucosa bucal. Existen diferentes tipos de marcadores celulares y tisulares, que, desde una perspectiva molecular, pueden proporcionar

información adicional a la recopilada en el examen clínico y en el estudio histopatológico (Chimenos y cols, 2004).

Las células con ADN dañado son usualmente destruidas a través de la apoptosis, sin embargo, las células aberrantes pueden escapar del control de crecimiento normal y por mutaciones adquiridas pueden evadir la apoptosis y desarrollarse un cáncer. La carcinogénesis requiere de múltiples cambios genéticos que pueden ocurrir en el mismo sitio por exposiciones repetidas a los productos genotóxicos del tabaco (Kuper y cols, 2002).

La complejidad de la mezcla de los diversos constituyentes del tabaco puede influir de manera distinta en cada individuo, es decir, diferentes carcinógenos pueden causar distintos tipos de daños (Kuper y cols, 2002).

Las células de los mamíferos poseen mecanismos de protección contra la transformación neoplásica que está normalmente latente y que sólo son activadas cuando confrontan señales proliferativas aberrantes, tal como la señal dada por un oncogen activado. Estos mecanismos genéticos consisten en la eliminación por si mismos de células oncogénicamente estresadas del pool de células proliferativas. Esto puede ser

hecho por activación de la muerte celular a través de la Apoptosis inducida por Oncogenes (OIA) o por ejecución de otro mecanismo que conduce a un permanente arresto del ciclo celular conocido como Senescencia inducida por Oncogenes (Collado y Serrano, 2005).

La proteína antiapoptótica Bcl-2 se encuentra en la membrana mitocondrial. Es una familia de proteínas que constituyen la pieza central del programa apoptótico, las mismas exhiben dos dominios BH1 y BH2, que regulan la formación de dímeros entre antagonistas de la apoptosis (*Bcl -2* y *Bcl – X*) y Agonistas (Familia *Bax*).

Altas concentraciones de Bcl-2 pueden prevenir la inducción de varias formas de apoptosis (Whyte y cols, 2002), dando lugar al desarrollo de carcinomas, favoreciendo la aparición de mutaciones y progresión tumoral. La función de la BAG1 es inversa a la de Bcl-2 (Panno, 2005).

Las proteínas de la familia Bcl-2 contienen miembros tanto proapoptóticas como antiapoptóticas y regulan la muerte celular controlando la permeabilidad de la membrana mitocondrial. La desregulación de la integridad mitocondrial es crucial para facilitar la activación de la cascada de la caspasa que conduce a

cambios morfológicos de apoptosis. Bcl-2 funciona como el prototipo antagonista de la activación de la cascada de la caspasa por bloqueo de Bax, el cual conduce a la pérdida de la integridad de la mitocondria (Deng y cols, 2004).

Se sabe que algunas proteínas inductoras de apoptosis, tales como Bax y Bad, pueden inactivarse en lesiones cancerígenas. Se ha evidenciado en lesiones de carcinoma bucal que la proteína Bax está disminuida (Préfontaine y cols, 2006). En una reciente publicación se hace referencia a que la nicotina, uno de las principales sustancias del cigarrillo, produce la supervivencia celular por inactivación de la proteína Bax (Zhang y cols, 2006).

Slaughter y cols (1953), introducen el término de “Cancerización del Campo” para describir la existencia de carcinógenos generalizados que inducen tempranamente cambios genéticos en el epitelio en el cual ocurren múltiples lesiones independientes, conduciendo al desarrollo de tumores multifocales.

Esta teoría intenta explicar el por qué se dan las recurrencias del cáncer bucal posterior a la eliminación quirúrgica del tumor, y es que cuando ocurre una exposición a carcinógenos crea un amplio campo de células preneoplásicas molecularmente alteradas en el epitelio del tracto aerodigestivo del cual se desarrollan múltiples

tumores y permanecen aún cuando clínicamente se observen sin lesión (Dakubo y cols, 2007).

La “Cancerización del Campo” indica dos niveles para la progresión del cáncer: una progresión molecular en la que las células se muestran con una apariencia normal pero van adquiriendo un daño genómico acumulativo y una progresión fenotípica en donde las células neoplásicas con alteraciones genómicas acumuladas comienzan a evidenciar cambios estructurales (Dakubo y cols, 2007).

Hay tres defectos en los mecanismos regulatorios de las células, que se presumen son conducentes a la inestabilidad genómica, especialmente los que ayudan a éstas a responder ante el estrés como lo son: defectos en la proliferación celular, defectos en los procesos de reparación del ADN y defectos en la maquinaria para la replicación del ADN y segregación cromosómica.

La función de *p53* ha sido reportada que es de gran importancia en todos estos procesos, por ejemplo, en células normales expuestas a carcinógenos generalmente ocurre un arresto o demora para entrar a la fase  $G_1$  del ciclo celular antes de entrar a la fase S. Esta demora ha sido propuesta, como un importante punto de control necesario que permite reparar las zonas

dañadas del ADN antes que éste sea replicado (Shin y cols, 2001)

Las aberraciones del gen *p53* son las alteraciones genéticas más frecuentes en el cáncer oral. La detección de esta proteína suele indicar la ineficacia de los mecanismos estabilizadores, es decir, hay una pérdida de la función proapoptótica, lo que da lugar a un crecimiento continuo tumoral (Tsantoulis y cols, 2007).

En condiciones fisiológicas, esta proteína protege la integridad del ADN ya que al detectarse la presencia de material genético alterado, la misma inhibe la entrada de la célula a la fase de Síntesis del Ciclo Celular y con esto previene que se duplique la información genética errada, igualmente restringe el paso de la fase G2 a la Fase de Mitosis impidiendo con esto que se prolongue la estirpe celular alterada.

Dichas restricciones son posibles debido a que *p53* regula la expresión de otros genes, induciendo así arresto celular por la expresión de *p21* o cuando se ha ocasionado un daño irreparable del ADN induce Apoptosis al incrementar la expresión del gen *bax* y bloqueando la expresión de *Bcl - 2* (Panno, 2005).

La desregulación de este gen se ha encontrado en muchos tipos de tumores y ocurre en un 57 % de todas las neoplasias bucales, pero recientemente también ha sido encontrada en áreas distantes macroscópicamente normales, lo que corrobora la hipótesis de que alteraciones en la expresión de este gen constituye uno de los cambios más precoces en el desarrollo de lesiones malignas (Tsantoulis y cols, 2007).

Las mutaciones del gen *p53* ocasionan principalmente pérdida de la función en la supresión de tumores y muy raramente producen que éste adquiera una actividad oncogénica. El fumar cigarrillos ha sido establecido como el factor principalmente asociado al cáncer de pulmón. Los codones principalmente afectados por mutación son el 157, 158, 248, 249 y 273. La mayoría de esas mutaciones encontradas en esos codones están representadas por transversiones entre la Guanina y la Timina, y éstas han sido asociadas a los bezopirenes del cigarrillo (Perwez y cols, 2001). Los benzopirenos han sido los principalmente asociados a la causa de la mutación del gen *p53* y los codones más frecuentemente afectados son el 157, 248 y 273, y estos autores apoyan que las mutaciones son de tipo transversiones en las posiciones de la timina y la guanina (Bitton y cols, 2005).

Debido a que estudios *in vitro* han indicado que el producto del gen *p53* está críticamente involucrado en la desregulación de los puntos restrictivos claves del ciclo celular después de una variedad de injurias celulares, quizás participa en los mecanismos de supervivencia para la detección del ADN dañado, por lo que ha sido propuesto que las células con la función de *p53* alterado podrían mostrar un incremento de la inestabilidad genómica después del insulto celular. En los tejidos expuestos a carcinógenos (como por ejemplo, el tracto aerodigestivo superior en pacientes fumadores) con alteración de la función de *p53* podría esperarse que muestre un incremento en la inestabilidad genómica y acelerar la tasa de alteraciones genéticas (Shin y cols, 2001).

Para Cruz y cols (2002), la expresión de la proteína *p53* en biopsias donde existen displasias orales y carcinomas *in situ* es precedida por cambios histológicos malignos en meses o semanas, la inmunolocalización de la *p53* aparece en estadios muy precoces del carcinoma de células escamosas. En todo caso, la mutación de la *p53* o su sobreexpresión no son suficientes, para que se desarrolle el carcinoma oral. Esta alteración se encuentra en una proporción que varía entre el 11 y el 80% de los carcinomas aerodigestivos (Kok y cols, 2006). En

estudios realizados por Kato y cols (2001), se ha encontrado que en un 63% de los carcinomas bucales se sobreexpresa la p53 y en un 36% hay mutaciones de la p53.

En un estudio realizado por Voravud y cols (1993), se determinó la tasa de acumulación de daño genético en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y en las desórdenes potencialmente malignos adyacentes a través de las aberraciones numéricas de los cromosomas y encontraron que el epitelio bucal de personas que no fumaban y por tanto libres de cáncer no poseían polisomías cromosómicas mientras que el epitelio de los tejidos histológicamente normales y adyacentes tanto a las lesiones malignas como a las potencialmente malignas exhibió tal aberración, lo que sugiere que la inestabilidad genómica es el comienzo en el tejido preneoplásico en el cual se desarrollará el tumor.

Estudios muy tempranos acerca de los cambios morfológicos de la capa basal en desórdenes potencialmente malignos, señalan que en los tejidos expuestos crónicamente a carcinógenos puede ocurrir un aumento en el espesor de la capa progenitora posiblemente explicado por el aumento de actividad metabólica, expresado por un aumento en el área nuclear de dichas células

por incremento en la síntesis de ADN, así como también, por el aumento en el número de células (Shabana y cols, 1987).

Parke (1994), señala que la activación metabólica de los carcinógenos químicos por parte del citocromo P4501, producen un daño al material genético de la célula progenitora que coincide con la activación de la proteína kinasa C, lo que aumenta la replicación del ADN e induce Hiperplasia logrando que la falla genética sea preservada y perpetuada en un clon de células con ADN defectuoso.

#### **1.4.2. Cambios en el Hueso Alveolar.**

El tabaquismo es el principal factor de riesgo asociado a la enfermedad periodontal, caracterizada por la destrucción del tejido de soporte del diente, con pérdida de los mismos y de la inserción, así como también la formación de sacos (César – Neto y cols, 2006; Van Dyke y Dave, 2005).

A nivel óseo, se ha encontrado que la nicotina muestra un efecto bifásico, con efectos antiproliferativos de los osteoblastos y en muy bajo nivel un efecto estimulante.

El extracto del humo del cigarrillo inhibe la proliferación de las células osteoprogenitoras y la diferenciación a células osteoblásticas. La respuesta quimiotáctica para ambos tipos de células por la fibronectina y el factor de crecimiento plaquetario, ambas importantes moléculas para la reparación y remodelado óseo, fueron inhibidas por el extracto del humo del cigarrillo (César – Neto y cols, 2006).

Diversos estudios se han realizado para evaluar los efectos de los componentes del cigarrillo, siendo la nicotina uno de los principales, se ha encontrado que, in vitro, inhibe el crecimiento de los fibroblastos, la producción de fibronectina y colágeno e impide la formación de los nódulos mineralizados por los osteoblastos puesto que estimula la diferenciación de los osteoclastos y la resorción del fosfato de calcio (Katono y cols, 2009; Henemyre y cols, 2003).

Estudios previos realizados por estos autores, demostraron que la nicotina inhibe la producción de proteínas de la matriz extracelular como osteopontina y colágeno tipo I por los osteoblastos. (Katono y cols, 2009).

Al continuar indagando sobre la materia, demostraron que los niveles de expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular como las Metaloproteinasas 1, 2 y 3 son incrementados cuando es añadida la nicotina a los medios de cultivos celulares, mientras que un efecto contrario ocurría con los Inhibidores de las Metaloproteinasas, los cuales disminuían en presencia del componente tabáquico antes mencionado (Katono y cols, 2009).

Esto sugiere que la digestión del Colágeno tipo I de la matriz orgánica ósea por la metaloproteinasas 1, es el primer paso en la reabsorción del tejido óseo, la cual es completada por la acción de las metaloproteinasas 2, que degrada aún más los fragmentos de las proteínas desnaturalizadas (Katono y cols, 2009).

Los osteoblastos están involucrados en la diferenciación de los osteoclastos, y lo hacen a través de un contacto célula a célula, puesto que los precursores de los osteoclastos expresan en su membrana un receptor activador de NF- $\kappa$ B (RANK), que reconoce un ligando RANKL de la membrana de los osteoblastos y que induce la diferenciación en presencia del Factor

estimulante de colonia de macrófagos y monocitos (Tanaka y cols, 2006).

La expresión del ligando RANK en los osteoblastos es modulada por la paratohormona (PTH), 25 dihidroxivitamina D3, Prostaglandina E2 y la interleuquina 11. La función de este ligando no sólo se limita a la diferenciación de los precursores a osteoclastos maduros sino que también está asociado a su supervivencia, fusión y activación.

Por otra parte, la Osteoprotegina, es una proteína soluble, miembro de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (FNT), que actúa cubriendo al receptor, interfiriendo así en la señal RANK – RANKL.

Tanaka y cols, (2006), realizaron un estudio para establecer el efecto de la adición de nicotina sola y nicotina asociada a Lipopolisacárido a cultivos de células osteoblásticas y células parecidas a osteoclastos, obteniendo resultados interesantes para entender la explicación del mayor índice de reabsorción ósea alveolar en pacientes fumadores que en no fumadores. La adición de nicotina en estos cultivos de osteoblastos, produjo una disminución de la proliferación celular y de la actividad de la

fosfatasa alcalina, lo que sugiere una formación y mineralización de hueso menor.

De la misma manera, la nicotina aumenta la producción de Prostaglandina E2, lo que a su vez conlleva a una mayor expresión del Ligando RANK y disminución de Osteoprotegina lo que favorece la unión RANK- RANKL, lo cual es potenciado por la mayor producción del FEC- MC, logrando la diferenciación de osteoclastos con la consiguiente reabsorción (Tanaka y cols, 2006).

## II. JUSTIFICACIÓN

El tabaquismo es considerado actualmente como una de las principales causas de morbilidad y muerte en nuestra sociedad moderna. En los últimos años, el desarrollo de esta enfermedad ha tomado un gran auge de tal manera que se ha extendido como una epidemia en todo el mundo, lo cual ha sido influenciado por los cambios socioeconómicos.

Actualmente los patrones de consumo del tabaco han evolucionado, de tal manera que la prevalencia en el consumo de cigarrillos es igual tanto en hombres como en mujeres y la edad de inicio de la enfermedad es cada vez más temprana, ubicándose en los primeros años de la adolescencia. En este sentido, estudios han demostrado que en las personas que inician más precozmente el consumo de tabaco es mayor y los intentos para abandonarlo tienen menor éxito, lo que hace que aproximadamente la mitad de los fumadores activos fallecen por enfermedades relacionadas con su consumo, reduciendo entre 20 y 25 años la esperanza de vida de los individuos que presentan esta adicción (Morabia y cols, 2002).

En las últimas décadas se ha demostrado claramente que el tabaco es el principal factor involucrado en el proceso de carcinogénesis bucal. Más de 4.000 sustancias pueden ser aisladas de un cigarrillo, siendo la nicotina la sustancia responsable de la adicción y de diversos

efectos dañinos. Esta sustancia es rápidamente absorbida por el tracto respiratorio, la mucosa bucal y la piel, sus efectos varían según la dosis y el tipo de célula. También puede alterar algunas funciones celulares, como el crecimiento, la adhesión y la síntesis de proteínas (Taybos, 2003).

Estas sustancias interactúan directamente y en primera instancia con los queratinocitos de la mucosa bucal, por tanto, la alteración de estas células contribuye al desarrollo de cambios histopatológicos que posiblemente se inician con una hiperqueratosis, pasando por varios grados de displasia hasta llegar a un carcinoma in situ o francamente invasivo (Winn, 2001).

Si bien son alarmantes todos los efectos dañinos que producen los derivados del tabaco en el organismo de los que consumen activamente, actualmente también se ha demostrado que la exposición al tabaco ambiental produce efectos similares en aquellos que nunca han fumado.

Es por ello que, las Organizaciones Internacionales de Salud en conjunto con los organismos gubernamentales en cada país realizan esfuerzos para lograr el control del consumo de tabaco y proteger a quienes no fuman del humo de los demás.

Existe por tanto la necesidad conocer los cambios microscópicos de la mucosa bucal y del tejido óseo mandibular, sometidos a la acción química de los componentes químicos del cigarrillo que son inhalados de forma pasiva, aun cuando no exista evidencia clínica de patología alguna, con la finalidad de incidir positivamente en la reducción y prevención de nuevos casos, así como también apoyar las acciones que conlleven al cese del tabaquismo.

Por otra parte, el estudio del modelo animal nos permitiría conocer el proceso de carcinogénesis bucal lo cual implica un impacto en el tratamiento adecuado y descenso de la tasa de mortalidad y morbilidad.

### **III. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1. Objetivo General.**

Evaluar el efecto del humo del cigarrillo en la mucosa y el tejido óseo de la cavidad bucal en un modelo animal con ratas.

#### **3.2. Objetivos Específicos.**

1. Identificar y comparar los cambios arquitectónicos y citológicos epiteliales de la mucosa bucal de ratas expuestas y no expuestas al humo de cigarrillos.
2. Determinar y comparar las características histopatológicas del corion de la mucosa bucal de ratas expuestas y no expuestas al humo de cigarrillos.
3. Evaluar y comparar los cambios en el corion relacionados al infiltrado inflamatorio de la mucosa bucal de ratas expuestas y no expuestas al humo de cigarrillos.
4. Evaluar y comparar el número de vasos sanguíneos en la mucosa bucal de ratas expuestas y no expuestas al humo de cigarrillos.

5. Determinar y comparar las características histopatológicas del tejido óseo de la cavidad bucal de ratas expuestas y no expuestas al humo de cigarrillos.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Población animal:

Se incluyeron en el estudio 20 ratas hembras *Rattus norvegicus*, de la cepa *Sprague Dawley*, entre 250 y 300 gramos de peso (Fig. 3), las cuales fueron adquiridas en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y trasladadas al Bioterio de el Laboratorio de Inmunología y Quimioterapia, del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias de la UCV, para el cuidado y mantenimiento de los animales bajo las Normas de cuidado y uso de animales con propósitos científicos (2004), donde se llevó a cabo la fase experimental.



**Fig. 3. Género: *Rattus*, Especie: *norvegicus*; Cepa: Sprague Dawley.**

Una vez trasladadas a este centro, se esperó una semana para permitir la adaptación de las ratas al nuevo ambiente (Fig. 4)



**Fig. 4. Género: *Rattus*, Especie: *norvegicus*; Cepa: Sprague Dawley.**

## **4.2. Materiales.**

**4.2.1. Jaulas Metálicas:** Las ratas se mantuvieron en cajas metálicas de 48 x 40 x 15 centímetros, provistas por el bioterio. Se utilizó una caja para cada grupo de estudio, siendo albergadas en las mismas un número de diez (10) ratas en cada una, respetando el área de superficie mínima por cada animal a fin de evitar estrés por hacinamiento.

La porción superior de la misma estaba constituida por una rejilla para permitir la respiración adecuada de los animales, y el piso cubierto con aserrín para conformar el lecho o cama que garantiza el confort y absorbe los desechos biológicos, siendo cambiadas de forma interdiaria (Fig. 5).



**Fig. 5. Caja metálica con depósito para alimentos y agua.**

**4.2.2. Cigarrillos:** Se seleccionó la marca Belmont, como la marca comercial más frecuentemente utilizada por la población venezolana. Se usó un total de 35 cajetillas grandes que contienen 20 cigarrillos y fueron administrados una cantidad exacta de 676 cigarrillos.

**4.2.3. Succionador de Gleras:** Para generar el humo a partir de los cigarrillos se utilizó un succionador Marca Medi Pump el cual funcionó a una presión mínima de 80 mm de Hg (Figuras 6 y 7).

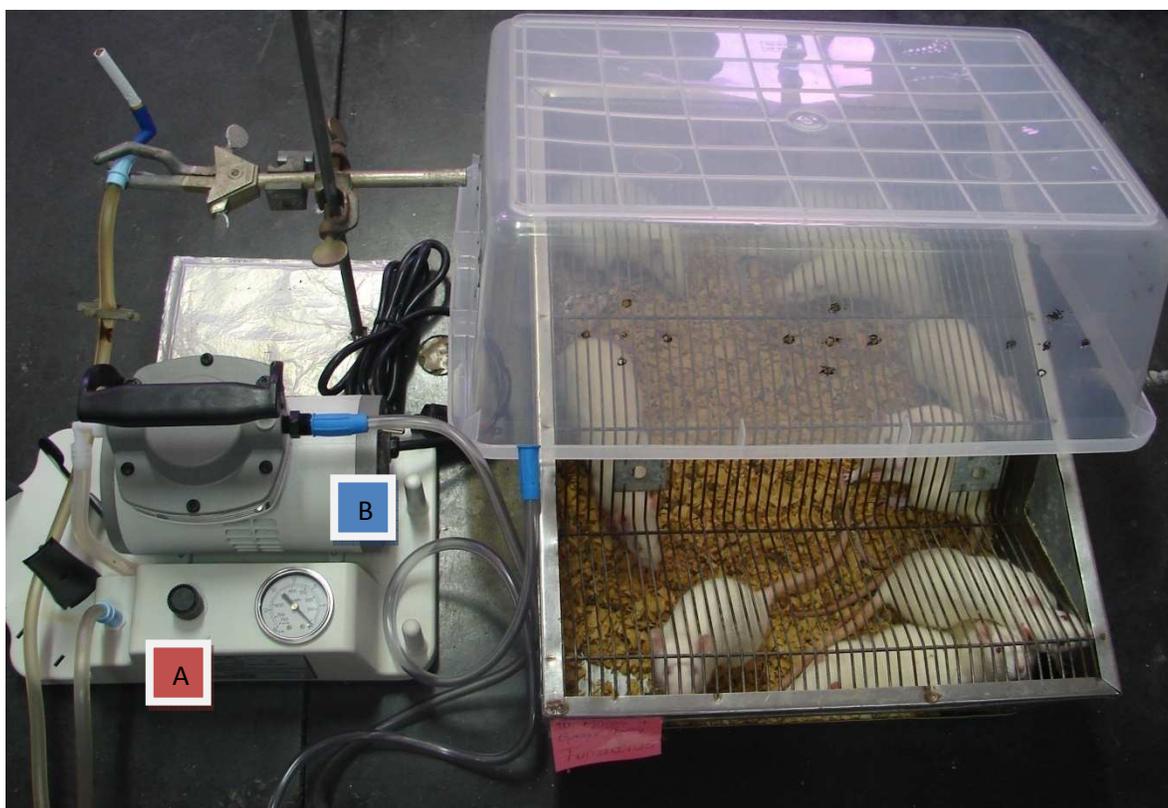


**Fig. 6. Succionador de Gleras. Vista Lateral**

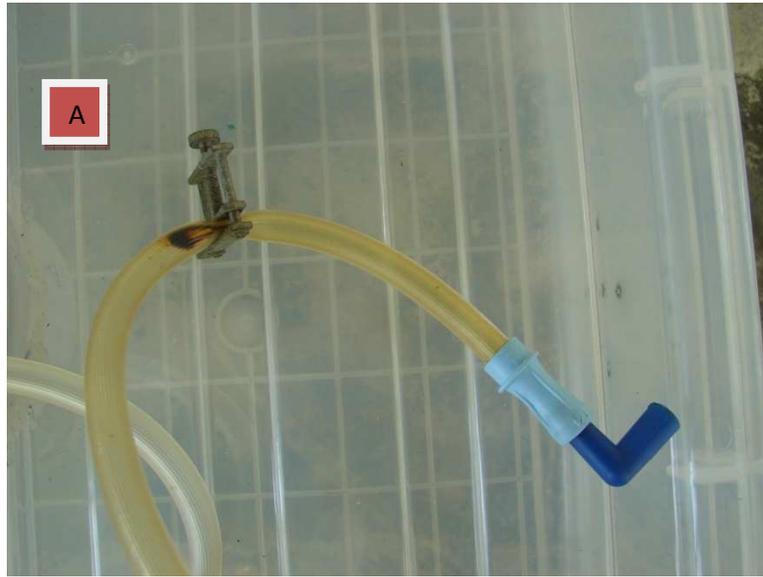


**Fig. 7. Succionador de Gleras. Vista Superior**

**4.2.4. Mangueras plásticas:** Se utilizaron dos (2) mangueras de 1 metro de longitud y 0,8 cms de diámetro, para llevar el humo desde el extremo del filtro del cigarrillo al succionador y de la válvula de escape de éste a la jaula con las 10 ratas experimentales. Asimismo, se utilizó una llave para aumentar la resistencia y a su vez disminuir la presión de aspiración en la manguera a la cual se conectaba el cigarrillo (Figuras 8 y 9).



**Fig. 8. A. Manguera de aspiración en la cual se introducía el cigarrillo, B. Manguera para expulsión del humo en el interior de la jaula.**



**Fig. 9. Llave para control de presión de aspirado del cigarrillo:  
A. Vista lateral. B. Vista Frontal.**

**4.2.5. Caja plástica:** Se utilizó una caja plástica de 48 x 40 x 15 centímetros, a la cual se le hicieron múltiples orificios en cada pared para cubrir la jaula durante la exposición al humo de los cigarrillos y permitir un mayor tiempo de permanencia dentro de la misma (Fig. 10).



**Fig. 10. Caja Plástica con múltiples orificios laterales.**

**4.2.6. Solución Anestésica:** Para el sacrificio de los animales se utilizó una solución de Nembutal Sódico preparado a una doble concentración. La solución estuvo constituida químicamente por 225 ml de agua destilada, 25 ml de alcohol absoluto y 3 gr de Nembutal Sódico.

**4.2.7. Formalina tamponada al 10%:** La fijación de las muestras se realizó por inmersión en solución de formalina, con un pH de 7.4 y constituida por: 6 g de fosfato sódico monobásico, 9,75 g de fosfato sódico dibásico, 1350 ml de agua destilada, 150 ml de formol al 10%.

**4.2.8. Hematoxilina y Eosina.**

### 4.3. Diseño Experimental:

#### 4.3.1. Primera Etapa

La fase experimental tuvo una duración de 16 semanas lo que equivale a 74 días de exposición. Las ratas fueron separadas en 2 grupos al azar. Cada grupo se trató de la siguiente manera:

**Grupo 1:** Grupo control (n=10), el cual no estuvo expuesto al humo de los cigarrillos durante la etapa experimental. Las ratas se mantuvieron en una jaula metálica con acceso libre a comida y agua (ad libitum) (**Figura 11**).



**Fig. 11. Grupo Control no expuesto al humo de cigarrillos.**

**Grupo 2:** Grupo expuesto al humo del cigarro (n=10), el cual se expuso al humo de 10 cigarrillos diarios durante la etapa experimental. Las ratas se mantuvieron en una jaula metálica con iguales dimensiones de la del grupo anterior. Los animales tuvieron acceso libre a comida y agua (ad libitum)(**Figuras 12 y 13**).

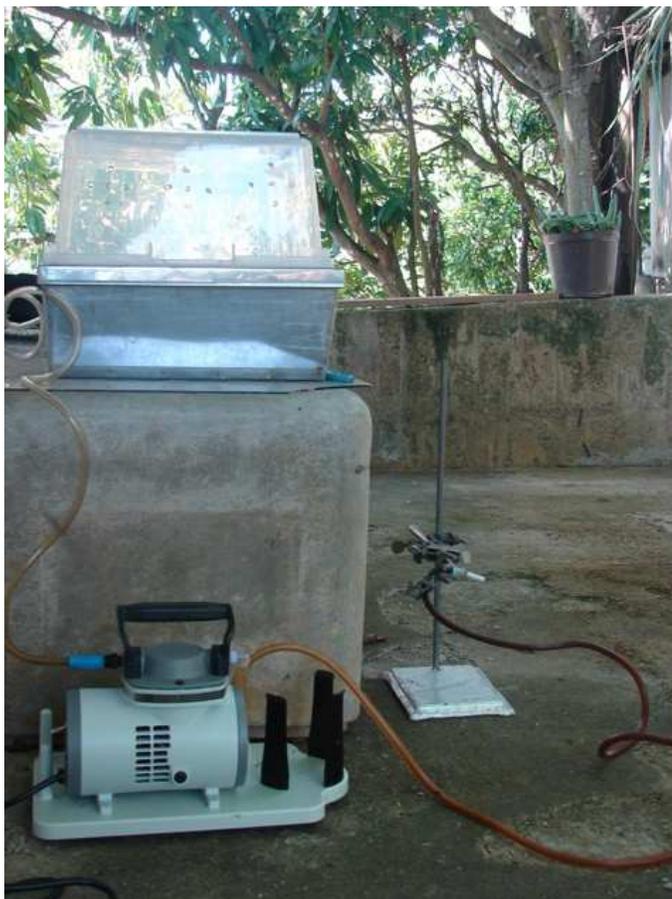


**Fig. 12. Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos.**



**Fig. 13. Grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos. Vista más cercana.**

La administración del humo de cigarrillos se realizó por medio de un succionador de Gleras, el cual aspiró un cigarrillo con una presión mínima de 80 mm de Hg, en un minuto aproximadamente, expulsando el humo a través de una válvula y con la ayuda de una manguera el mismo se llevó al interior de la jaula metálica que se mantuvo parcialmente cerrada para lograr la permanencia del humo en contacto con las ratas por un tiempo mínimo estimado de 5 minutos (**Figura 14**).



**Fig. 14.** Diseño experimental para administración del humo de cigarrillos.

Los cigarrillos fueron administrados aumentando la cantidad de forma progresiva, comenzando con un cigarrillo hasta llegar a un máximo de 10 cigarrillos diarios, cantidad que se mantuvo en un período de 16 semanas. El tiempo de contacto con el humo de cada cigarrillo fue de 6 minutos aproximadamente (1 minuto de consumo del cigarrillo más 5 minutos para la dispersión del humo) lo que dio un total de 60 minutos diarios, para sumar 68 horas y 20 minutos de exposición en todo el tiempo que duró la fase experimental **(Fig15)**.



**Fig. 15. Exposición al humo de cigarrillos. Vista superior.**

El humo de cigarrillos fue administrado en 74 días, que en términos de vida media, equivale un tiempo promedio de 5, 16

años en el humano, dado que la vida media de las ratas *Sprague Dawley* es de 2.75 años.

#### **4.3.2. Sacrificio de los animales.**

Culminada la fase de experimentación las ratas fueron sacrificadas utilizando sobredosis de Nembutal Sódico, por una punción intraperitoneal de 3ml a una doble concentración del medicamento (Fig. 16). Los animales murieron al cabo de 10 minutos y la muerte era confirmada por dislocación cervical (Fig. 17).



**Fig. 16. Punción Intraperitoneal del Nembutal Sódico.**



**Fig. 17. Dislocación Cervical del animal 10 minutos después de la colocación del anestésico.**

#### **4.3.3. Disección de Órganos.**

Posterior a la muerte se colocó al animal en posición cúbito dorsal, sobre una lámina de anime, sujetándolo con la ayuda de alfileres en las 4 extremidades para facilitar la disección (**Fig. 18**).



**Fig. 18. Colocación del animal en posición cúbito dorsal.**

Posteriormente se procedió a realizar una incisión longitudinal, en forma de cruz, partiendo desde la porción inferior hasta la

región buco-facial, seccionando el labio inferior para proceder a exponer la mandíbula (**Figura 19**).



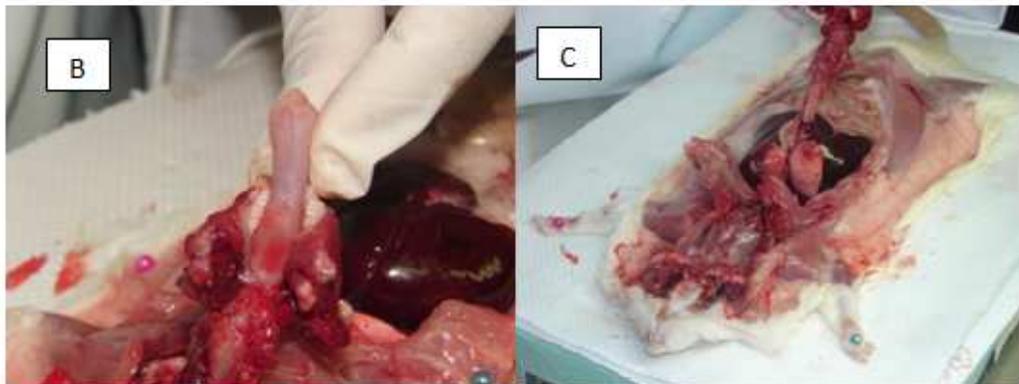
**Fig. 19. Incisión longitudinal sobre la piel: A. Punto de partida porción inferior. B. Extensión hasta labio inferior. C. Separación de la piel y serosa.**

De la misma manera se realizó otra incisión para acceder a las cavidades abdominal y torácica, retirando el esternón y parte de las costillas siguiendo en línea recta a través de la tráquea hasta alcanzar la porción bucal (**Fig. 20**).



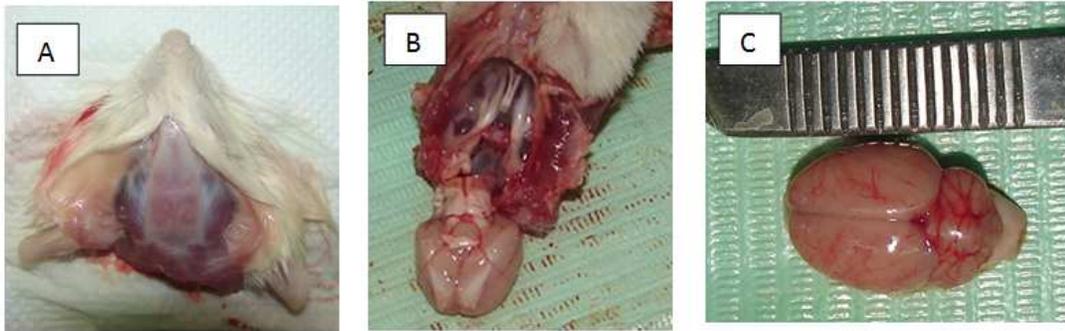
**Fig. 20. Incisión longitudinal para acceder a las cavidades abdominal y torácica.**

Se disecaron los músculos mandibulares hasta alcanzar la articulación témporo-mandibular, liberándola de ambos lados y así extraer la mandíbula unida a la lengua, esófago, laringe, tráquea, pulmones y corazón, seccionando en la porción distal del esófago **(Fig. 21)**.

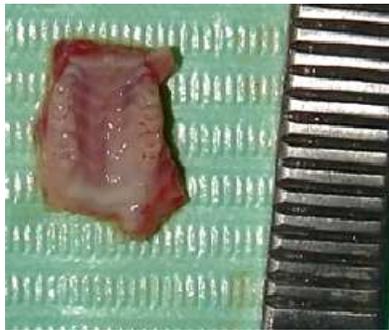


**Fig. 21. A. Disección de músculos mandibulares y liberación de articulaciones temporomandibulares. B. Mandíbula y lengua adosada a piso de boca. C. Sistema cardio – respiratorio.**

Finalmente, se separó la cabeza del cuerpo seccionando a nivel cervical y se realizó una incisión sobre el cráneo, para luego fragmentarlo y extraer el cerebro y cerebelo **(Figuras 22)**. Por último se extrajo el paladar con la mucosa que lo recubre **(Figura 23)**



**Fig. 22. A. Incisión lineal sobre el cráneo. B. Desalojo del Cerebro. C. Cerebro y Cerebelo.**



**Fig. 23. Paladar.**

Seguidamente se extrajeron otros órganos abdominales como hígado, bazo, páncreas y riñones (**Figura 24**).



**Fig. 24. Riñones, Bazo, Páncreas, Hígado, Pulmones, Corazón, Tráquea, Lengua y Mandíbula.**

#### **4.3.4. Preparación Histológica de Tejidos.**

Posterior a su extracción, los órganos fueron sumergidos en una solución de formalina tamponada al 10%, preparada a un pH de 7.4, similar al pH interno de las ratas para garantizar la fijación de las estructuras celulares y tisulares lo más parecido a su condición en vida (**Figura 25**).



**Fig. 25. Fijación por inmersión en formalina tamponada al 10%.**

Las muestras de tejido lingual fueron colocadas en casetes e introducidas en una máquina procesadora de tejidos, marca Start Tissue – Tek II, en la cual se cumplieron las siguientes fases:

1. Deshidratación con alcoholes de gradación creciente.
2. Aclaramiento con xilol, que desplaza el alcohol para permitir  
la miscibilidad con la parafina fundida.
3. Embebimiento en parafina líquida.
4. Inclusión en parafina.
5. Cortes de 5 micrómetros con un microtomo y montaje en láminas portaobjeto.
6. Tinción con Hematoxilina y Eosina.

De la misma manera se procedió al procesado de las hemimandíbulas. Previamente fueron descalcificadas en Osteomoll (ácido nítrico al 7%) por 5 días, y luego se continuó con el proceso anteriormente descrito para la técnica de preparación de los tejido.

#### **4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó mediante el uso del software SPSS versión 17.0, por medio de éste se determinó la frecuencia de cada variable y se realizó el análisis descriptivo y comparativo de las variables.

El análisis descriptivo de las variables cuantitativas como el número de vasos sanguíneos en el corion de la mucosa lingual y el número de lagunas óseas en hueso mandibular se realizó al observar las características y cuantificar el número de éstos en cada campo microscópico a una magnificación de 40x, y se obtuvo el promedio de un total de 10 campos estudiados. Dichas variables fueron comparadas mediante la prueba de t de student.

Las variables cualitativas fueron estimadas y los datos comparados mediante la Prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

El nivel de significancia ( $p$ ) valores menores a 0,05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

## **V. RESULTADOS**

### **5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUCOSA LINGUAL.**

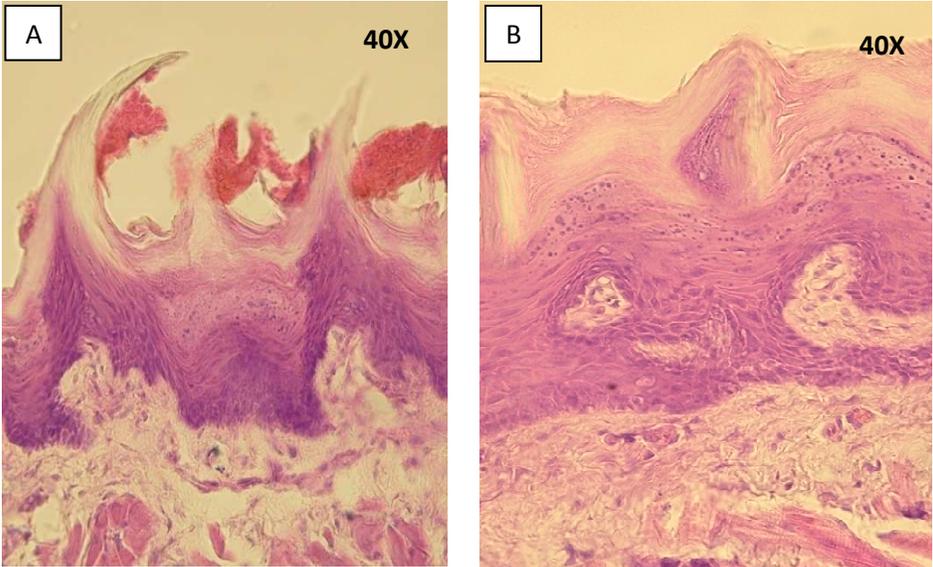
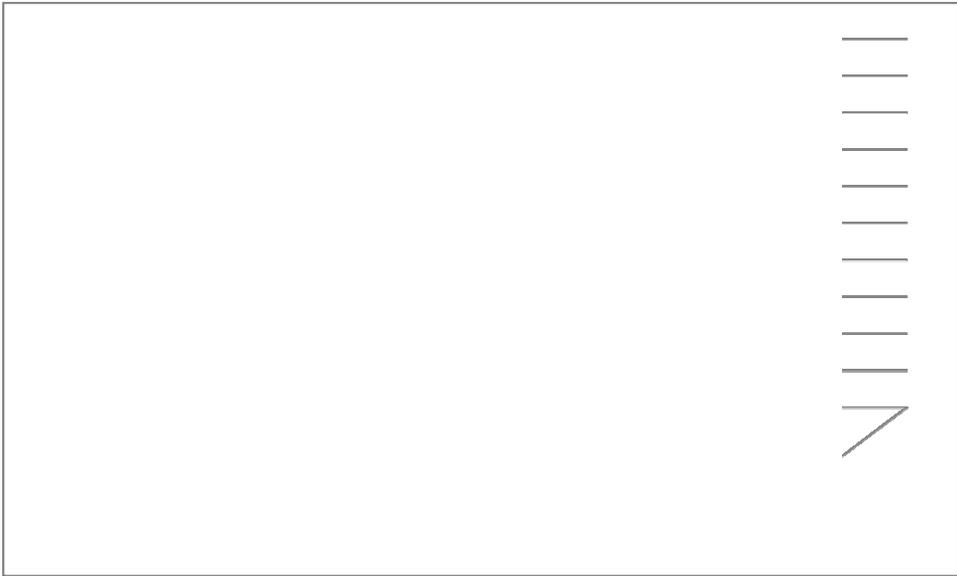
#### **5.1.1. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL EPITELIO.**

El análisis descriptivo del epitelio de la mucosa lingual fue dividido en: las características atribuibles a la arquitectura del tejido, características morfológicas celulares de cada capa de dicho epitelio y caracterización de la patología epitelial presente.

##### **5.1.1. a. Queratinización.**

La mucosa lingual de las ratas está constituida por un epitelio plano estratificado queratinizado, que generalmente es del tipo ortoqueratinizado pero en algunas zonas puede mostrar un patrón de paraqueratinización. En este estudio un 100% de las muestras analizadas (n= 20), es decir, la totalidad del grupo control y del grupo expuesto al humo del cigarrillo exhibieron un patrón de ortoqueratinización **(Gráfico 1 y Figura 27)**.

**Gráfico 1. Frecuencia del patrón de queratinización en la Población Animal.**

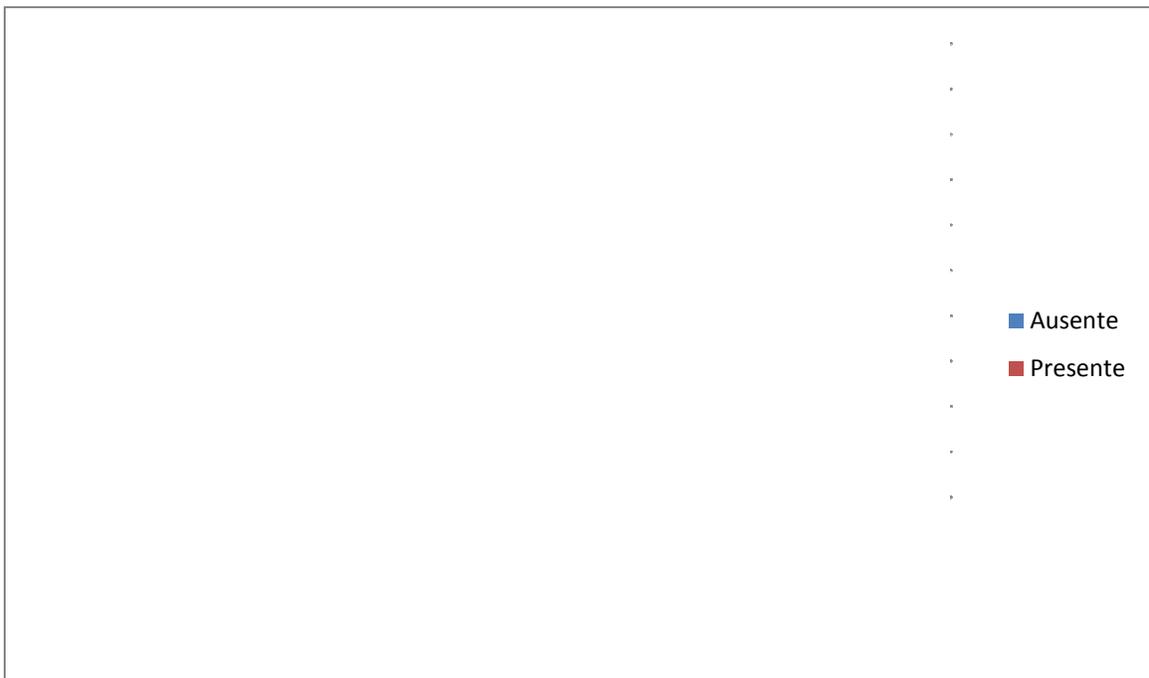


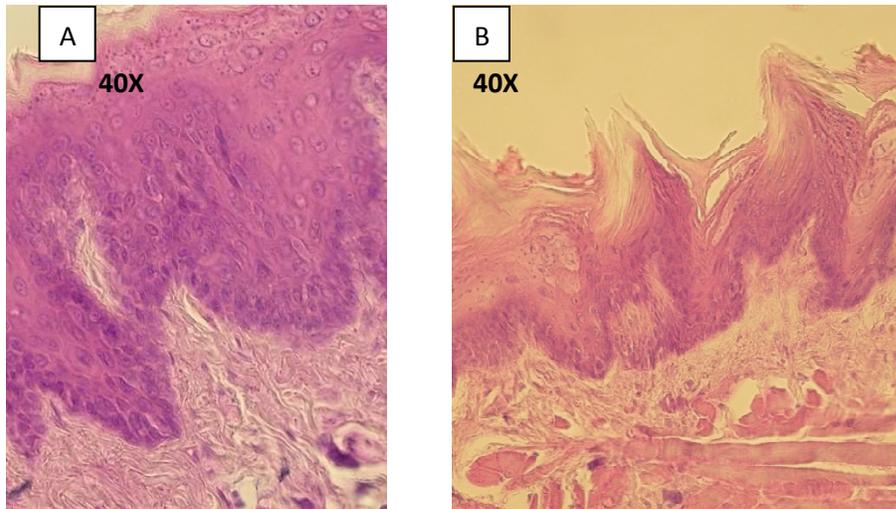
**Figura 26. Muestra de Mucosa Lingual. Epitelio plano estratificado ortoqueratinizado: A. Grupo expuesto al humo de cigarrillos, B. Grupo Control.**

### 5.1.1.b. Estrato Espinoso.

Al estudiar las características de las capas celulares del epitelio se observó una marcada acantosis presente en un 40% de la totalidad de las muestras, correspondiendo este valor a 8 de las 10 muestras analizadas pertenecientes al grupo expuesto al humo de cigarrillos, estando ausente en la totalidad de las muestras del grupo control, demostrando una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos con un valor de  $p=0,0001$  (**Gráfico 2 y Figura 28**).

**Gráfico 2. Distribución de la presencia de acantosis según el grupo de estudio.**





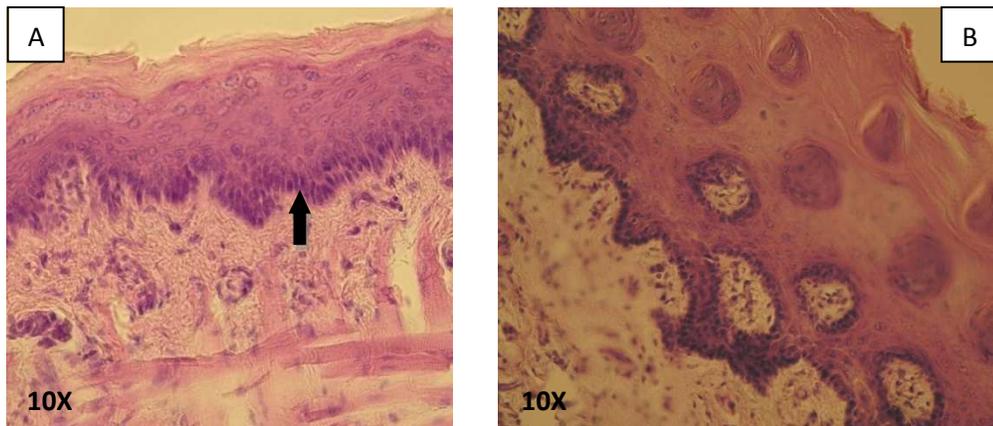
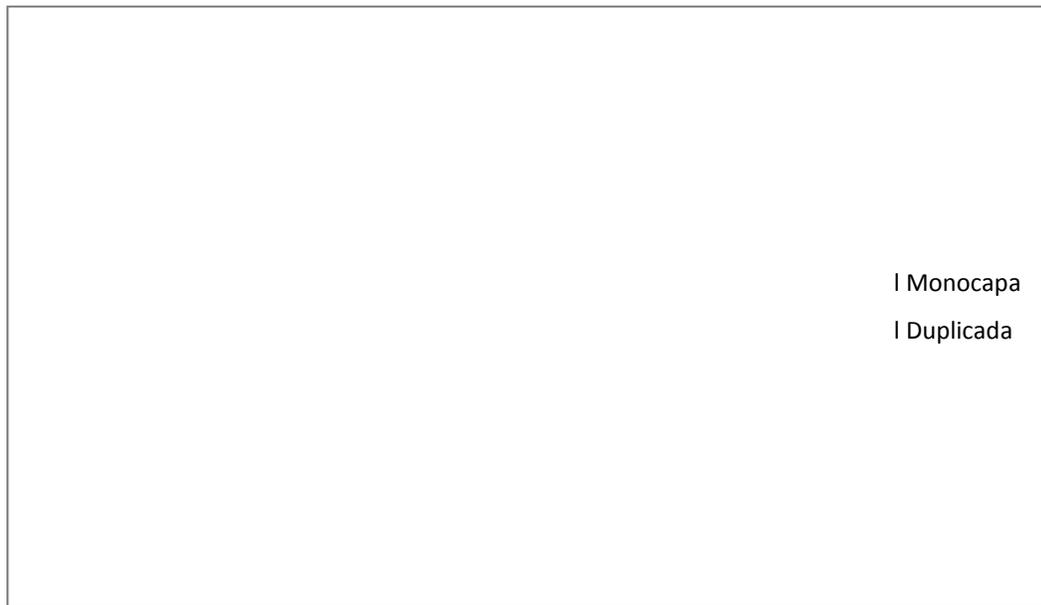
**Figura 27. Muestra de mucosa lingual. Acanthosis presente en el Grupo expuesto al humo de cigarrillos (A), y ausente en el Grupo control (B).**

#### **5.1.1. c. Capa Basal.**

Con respecto al estudio de la capa basal o progenitora, en el epitelio normal tanto del humano como de los roedores estas células componen una capa única, constituida por células cilíndricas que tienen la capacidad de dividirse para formar nuevas células. En el análisis de las muestras se encontró que sólo un 35% (n=7) de todas las muestras analizadas mostraron una duplicación de esta capa progenitora, lo cual es conocido como hiperplasia basal, sin embargo, aunque con respecto a toda la población es un porcentaje relativamente bajo, es importante resaltar que representa un 70% de las muestras pertenecientes al grupo experimental, lo cual equivale a 7 de 10 casos estudiados, por lo que se observó una diferencia

estadísticamente significativa con respecto al grupo control ( $p= 0,001$ ) (**Gráfico 3 y Figura 29**).

**Gráfico 3. Distribución de la hiperplasia basal según el grupo de estudio.**

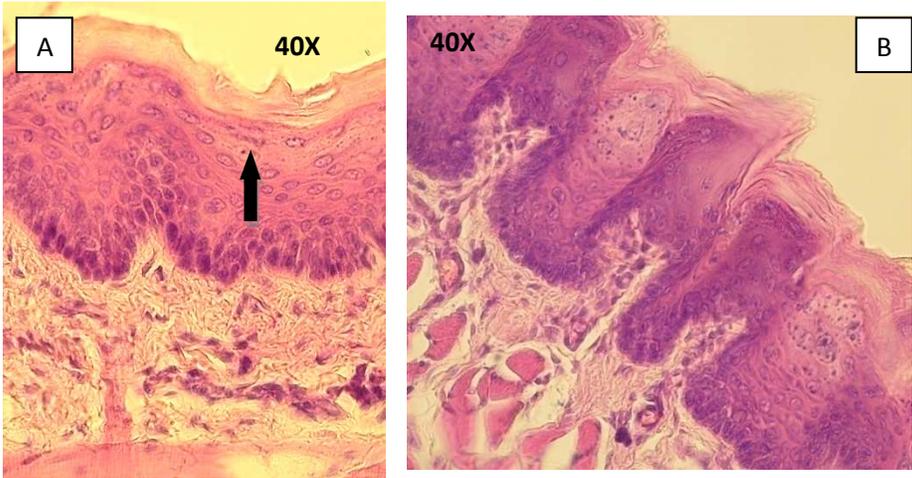
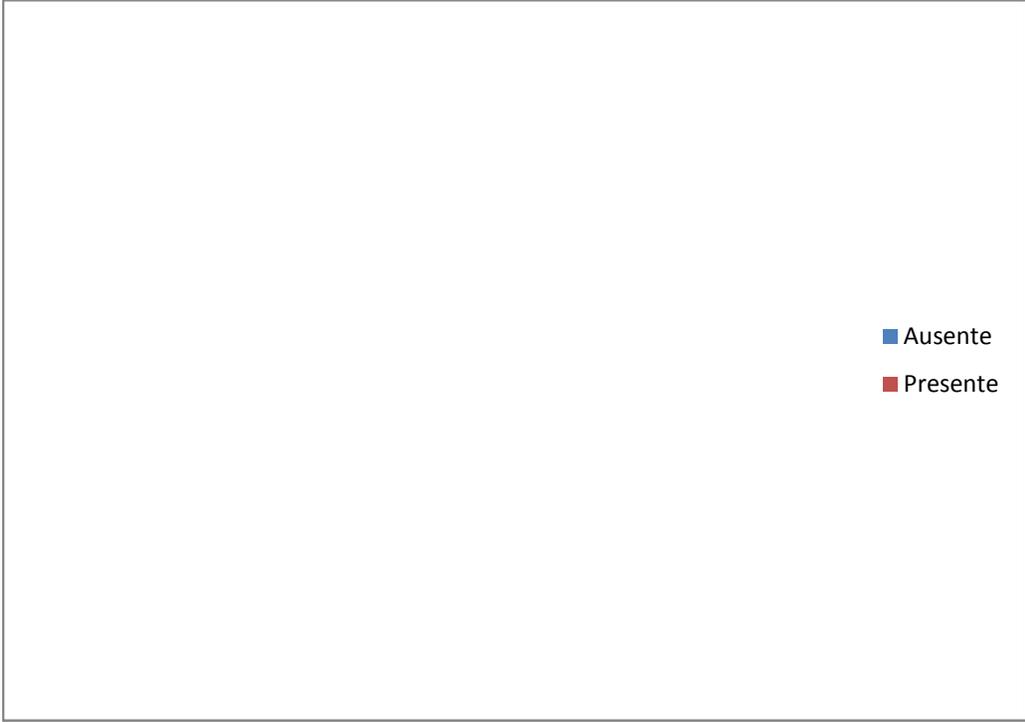


**Figura 28. Muestra de mucosa lingual. Hiperplasia basal presente en el Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos (A), y ausente en el Grupo Control (B).**

#### **5.1.1.d. Tamaño del Núcleo.**

Al analizar las muestras se encontró que un 60% (n= 12) de toda la población animal, es decir, 4 del grupo control y 8 del grupo expuesto al humo del cigarrillo presentaron un aumento en el tamaño nuclear (anisonucleosis), alterando la relación núcleo-citoplasma normal de las células epiteliales. Para el grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos, 8 de las 10 láminas evaluadas presentaron células con núcleos aumentados de tamaño sobretodo en la capa basal pero este hallazgo también estuvo presente en 4 muestras del grupo control por lo que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,068$ ) **(Gráfico 4 y Figura 30).**

**Gráfico 4. Distribución de la anisonucleosis según el grupo de estudio.**

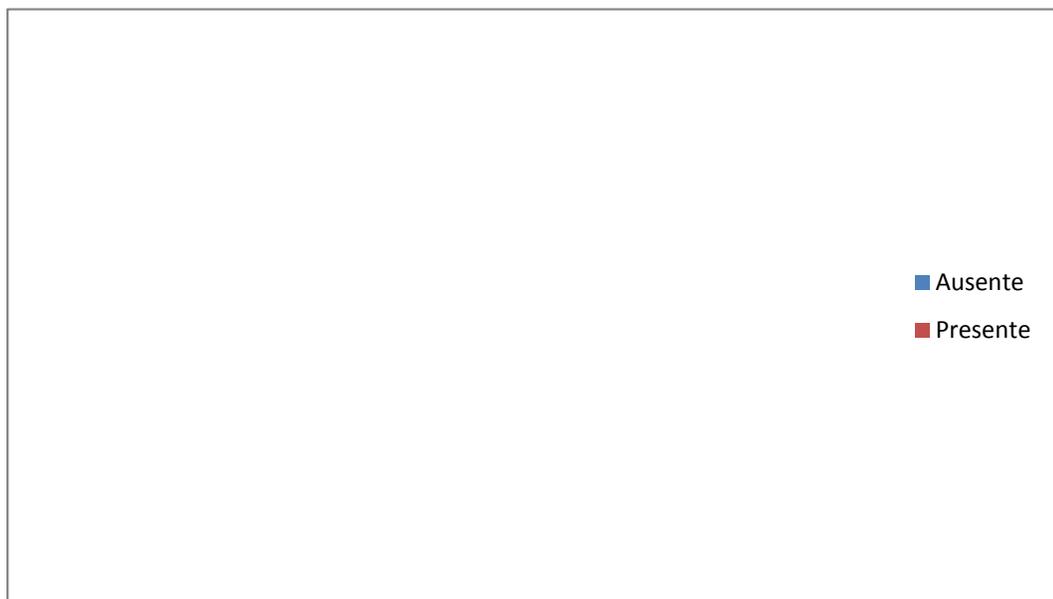


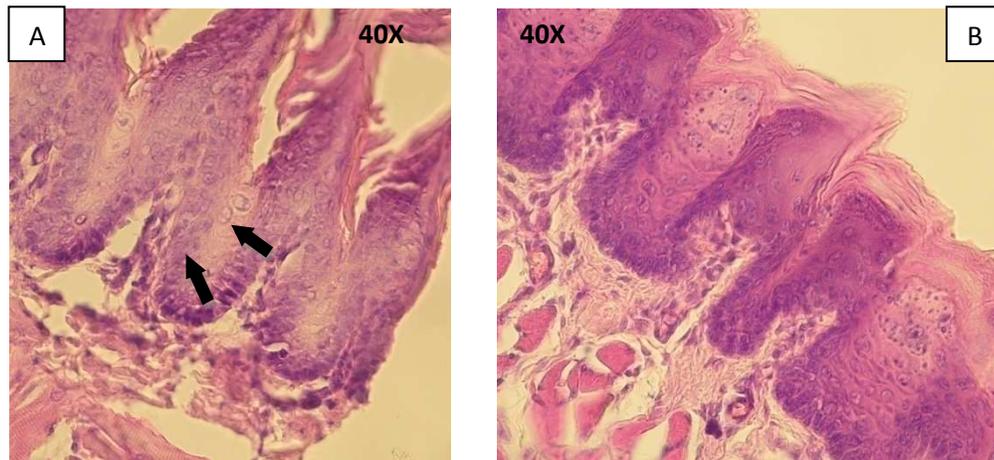
**Figura 29. Muestra de mucosa lingual. Anisonucleosis en células de la capa basal presente en el Grupo expuesto al humo de cigarrillos (A), y ausente en el Grupo Control (B).**

### 5.1.1. e. Hiperchromatismo Nuclear.

En el análisis de las muestras se encontró que un 50% de los casos analizados (n=5) correspondientes al grupo expuesto al humo de cigarrillos evidenciaron la presencia de hiperchromatismo nuclear, estando ausente esta característica en el 100% (n=10) de las muestras del grupo control por lo que hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p= 0,010$ ) **(Gráfico 5 y Figura 31)**.

**Gráfico 5. Distribución del hiperchromatismo nuclear según el grupo de estudio.**



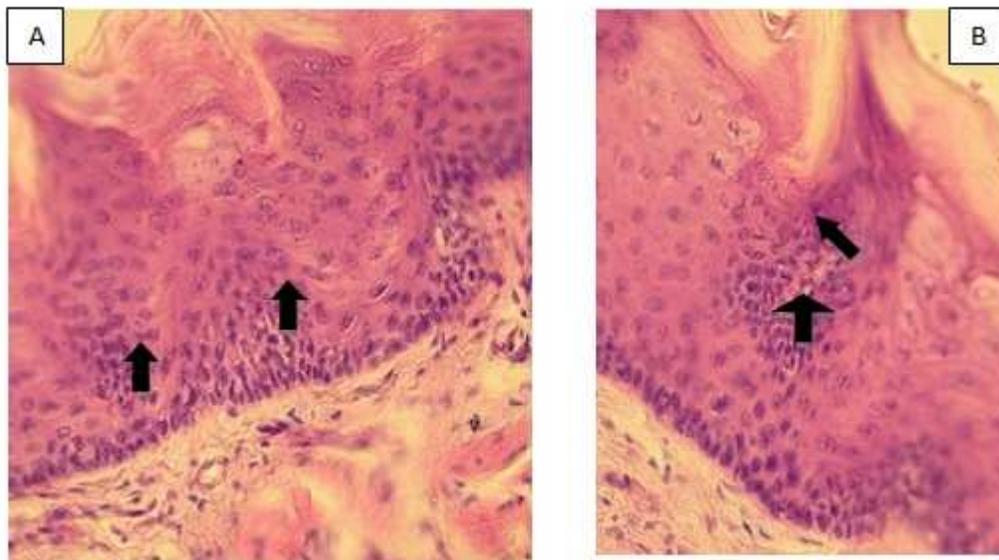
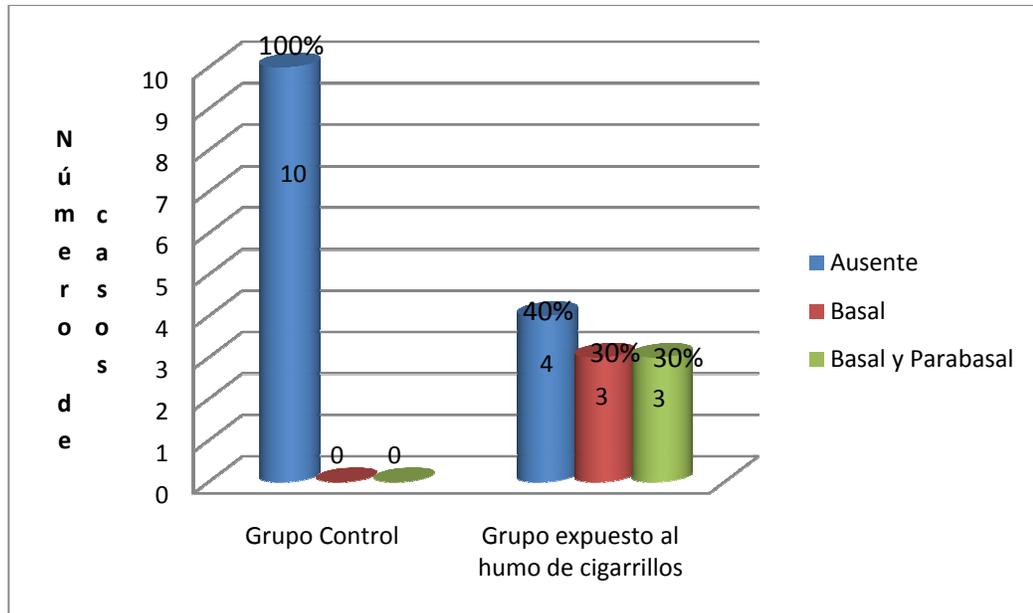


**Figura 30. Muestra de mucosa lingual. Hiperchromatismo nuclear presente en el Grupo expuesto al humo de cigarrillos (A), y ausente en el Grupo Control (B).**

#### **5.1.1. f. Picnosis.**

Continuando con el análisis de las características morfológicas referentes al núcleo de las células se observó que la picnosis estuvo presente en un 60% de las muestras correspondientes al grupo expuesto al humo de cigarrillos, en el cual 6 de los 10 casos analizados demostraron la presencia de picnosis tanto en células de la capa basal como en capas parabasales, mientras que en el grupo control estuvo ausente en la totalidad (n=10) de los casos analizados, lo que determinó una diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,014$ ) cuando ambos grupos de estudios fueron comparados (**Gráfico 6 y Figura 32**).

**Gráfico 6. Distribución de la presencia de picnosis según los grupos de estudio.**

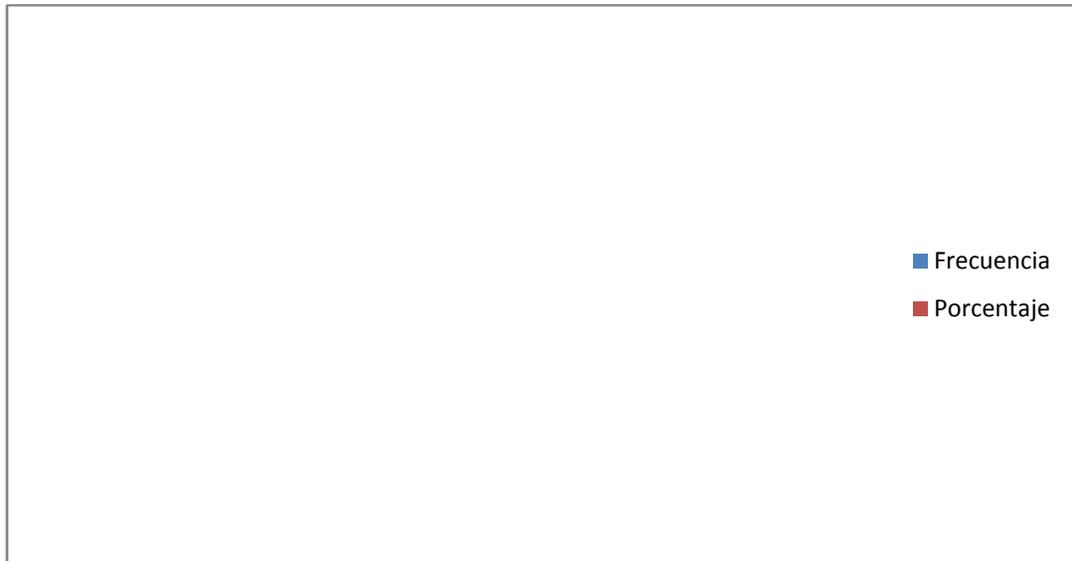


**Figura 31. Muestra de mucosa lingual. Obsérvese picnosis presente en el Grupo expuesto al humo de cigarrillos: (A) en células de capas basal, parabasal, (B) y en estratos superiores del epitelio.**

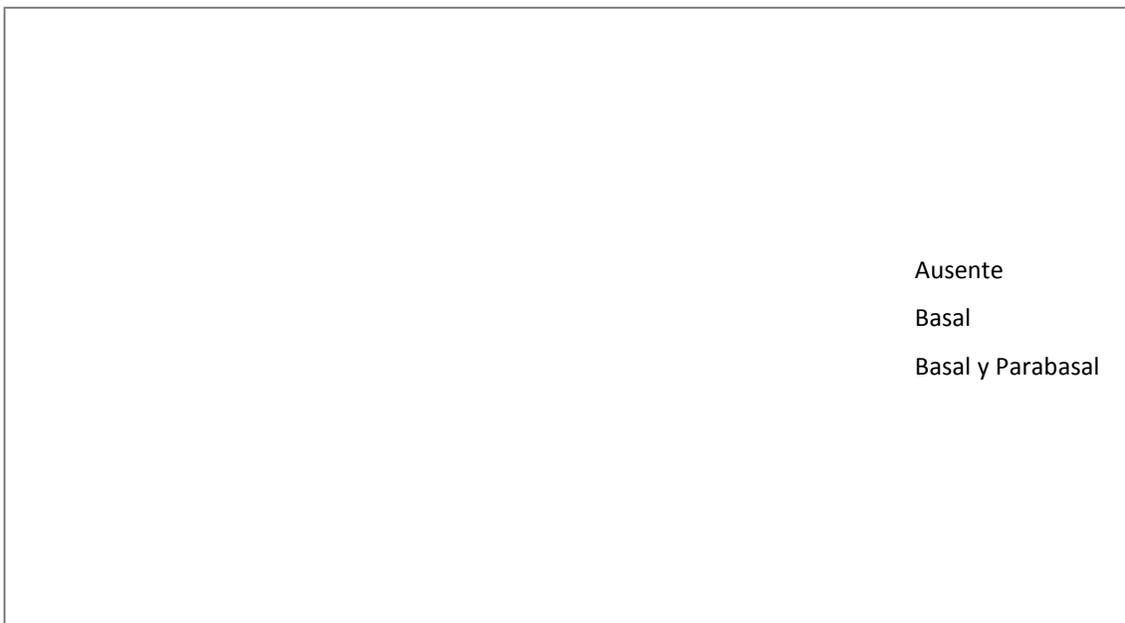
### **5.1.1. g. Mitosis.**

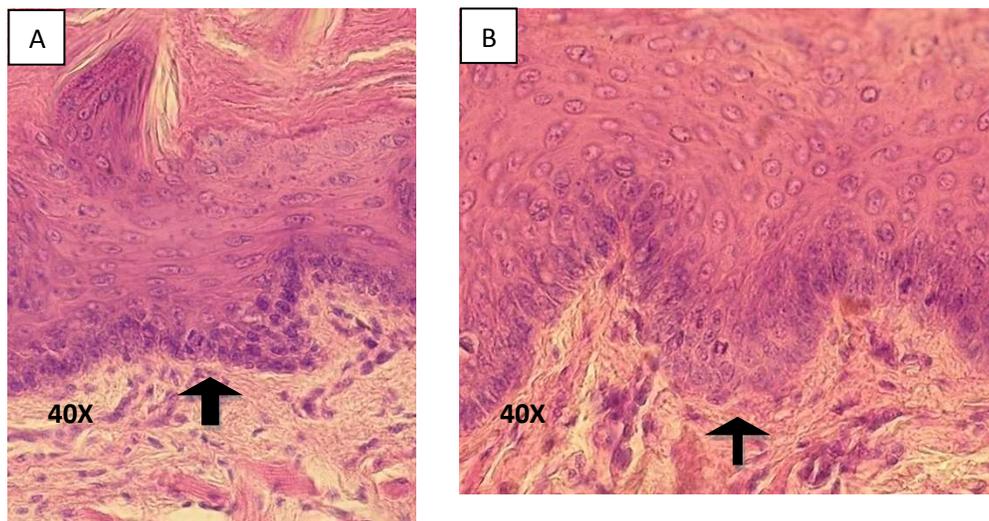
En cuanto a la actividad replicativa en la mucosa lingual, en el grupo expuesto al humo de cigarrillos se observó que un 60% de las muestras (n=6) exhibieron mitosis en la capa basal del epitelio mientras que en el grupo control se observó en 7 de los 10 casos analizados. Mitosis parabasales fueron observadas en un 20% (n=2) de las muestras del grupo expuesto al humo de cigarrillos y en un 10% (n=1) de las muestras del grupo control, esto representa un 80% (n=16) de toda la población lo que demuestra que 8 de 10 muestras analizadas en cada grupo de estudio evidenciaron la presencia de mitosis, estando el mayor porcentaje de ellas en la capa basal del epitelio (65%). Esto refleja que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p= 0,815$ ) (**Gráficos 7, 8 y Figura 33**).

**Gráfico 7. Frecuencia de Mitosis en la población animal.**



**Gráfico 8. Distribución de la presencia de mitosis según el grupo de estudio.**





**Figura 32. Muestra de mucosa lingual. Obsérvese mitosis presente en el Grupo expuesto al humo de cigarrillos: (A) en células de capa basal (B) y en capa parabasal del epitelio.**

#### **5.1.1.h. Patología Epitelial.**

Luego de analizar las características y determinar los cambios tanto citológicos como en la arquitectura del epitelio en las muestras, se estableció el diagnóstico de la patología epitelial presente, de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (Barnes, y cols 2005), demostrando que el 50% (n=10) de la totalidad de las láminas analizadas, que corresponden al 100% de las muestras pertenecientes al grupo expuesto al humo de cigarrillos presentaron algún tipo de patología epitelial, desglosándose de la siguiente manera: un 10 % (n= 2) de las muestras analizadas

correspondientes al grupo experimental presentaron hiperplasia epitelial (**Figura 34, A**), un 35% (n= 7) presentaron displasia epitelial leve (**Figura 34, B**) y sólo 1 (5%) evidenció una displasia epitelial moderada (**Figura 34,C**), en ninguna muestra se observó displasia epitelial severa ni carcinomas invasivos.

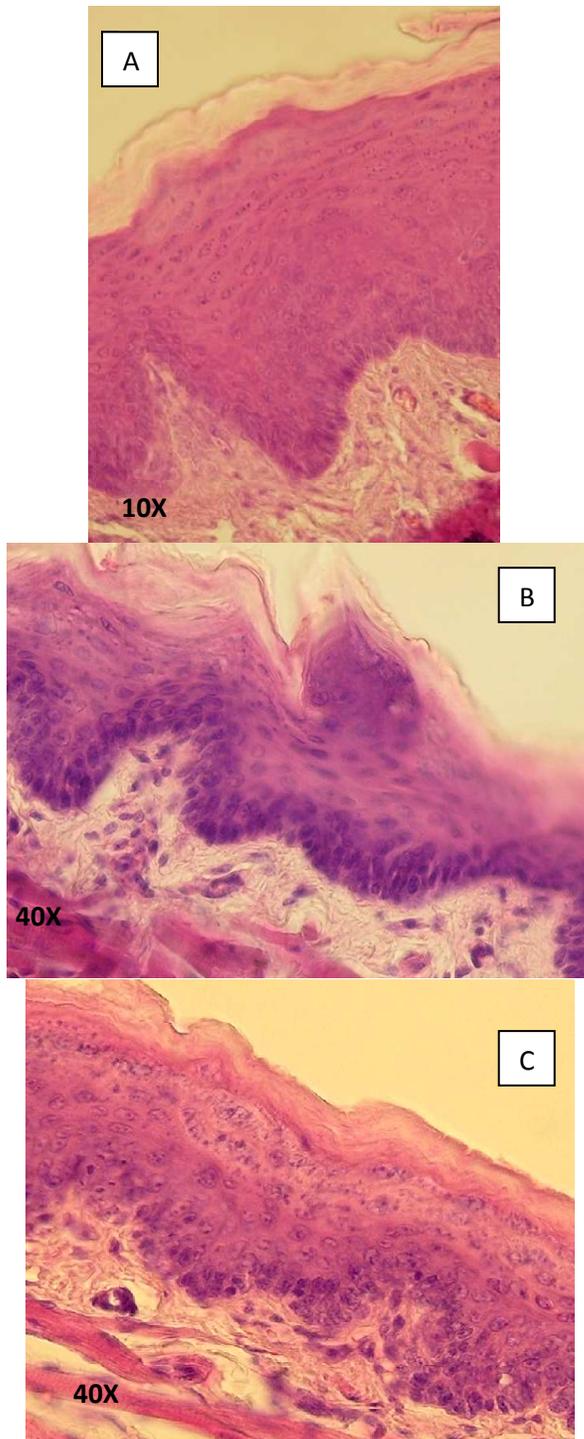
Por su parte todas las muestras del grupo control no exhibieron cambios en la arquitectura ni alteraciones citológicas displásicas epiteliales demostrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ( $p= 0,0001$ ) (**Gráficos 9 y 10**).

**Gráfico 9. Frecuencia de patología epitelial en la población animal de estudio.**



**Gráfico 10. Distribución de la patología epitelial según el grupo de estudio.**





**Figura 33. Muestra de mucosa lingual del Grupo expuesto al humo de cigarrillos. Obsérvese (A) Hiperplasia epitelial, (B) Displasia epitelial leve, (C) Displasia epitelial moderada.**

### **5.1.2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL CORION**

En el análisis descriptivo de la lámina propia o corion se tomaron en consideración dos aspectos principalmente: las características relacionadas al Infiltrado Inflamatorio y al número de Vasos Sanguíneos presentes por campos microscópicos.

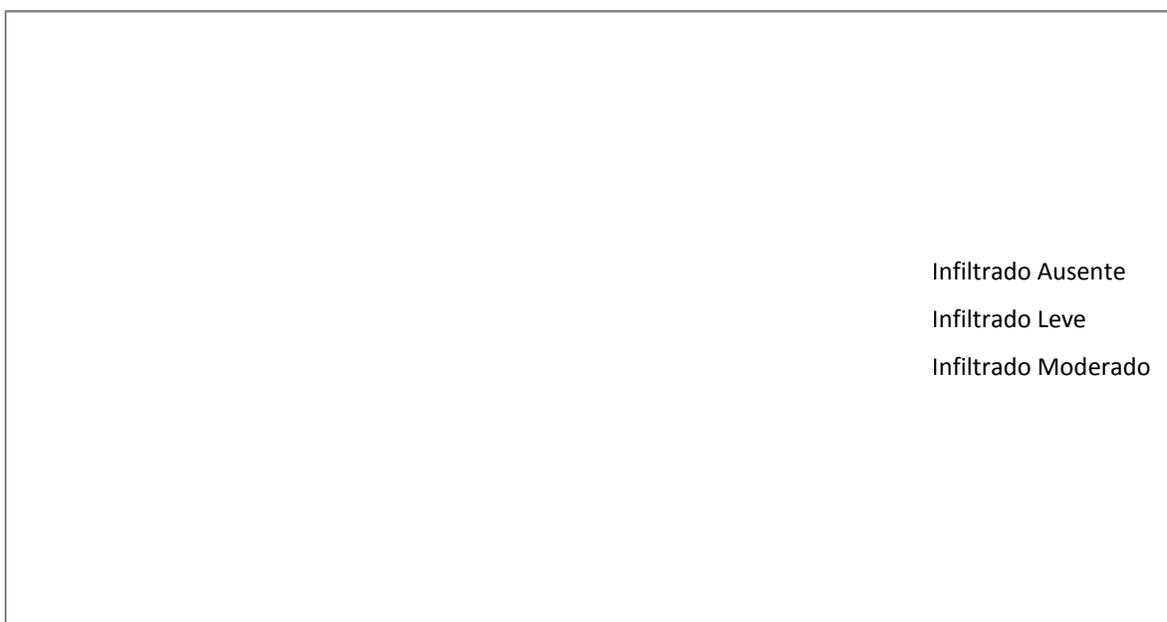
#### **5.1.2.a. Características relacionadas con el infiltrado inflamatorio.**

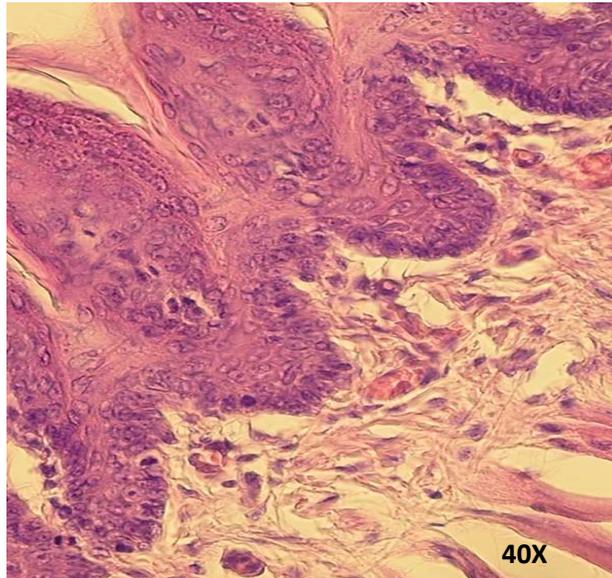
Al estudiar las características del infiltrado inflamatorio, se encontró que en las muestras analizadas el infiltrado presente era de tipo crónico, siendo su intensidad variable, dependiendo del grupo de estudio: en el grupo expuesto al humo de cigarrillos la intensidad del mismo era mayor con respecto a la observada en el grupo control, puesto que la tendencia fue de leve en un 50% (n=5) a moderado igualmente en un 50% y distribuyéndose en el corion muy cercano al epitelio y de forma perivascular.

En el grupo control la tendencia en cuanto a la intensidad fue de ausente a leve con similar distribución de las frecuencias, es

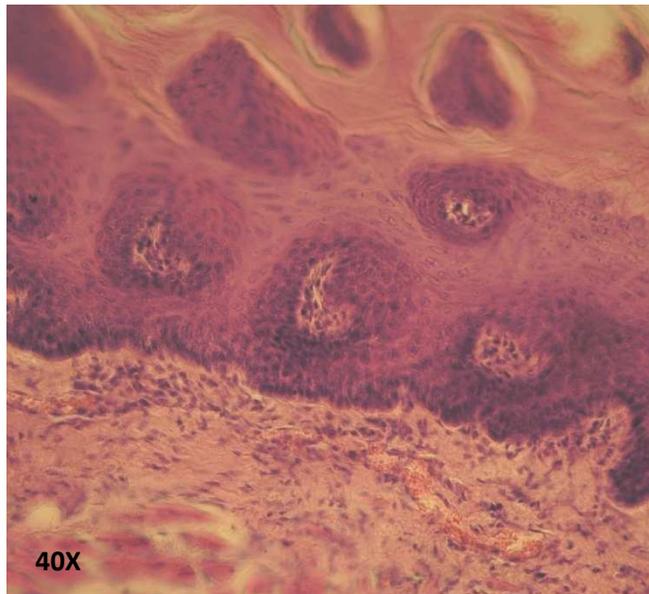
decir, 50% de las muestras para cada nivel. Esta diferencia es manifiesta estadísticamente significativa ( $p= 0,007$ ) (**Gráfico 11 y Figuras 35 y 36**).

**Gráfico 11. Distribución de la intensidad del infiltrado inflamatorio según el grupo de estudio.**





**Figura 34. Grupo expuesto al humo de cigarrillos. Infiltrado inflamatorio leve.**



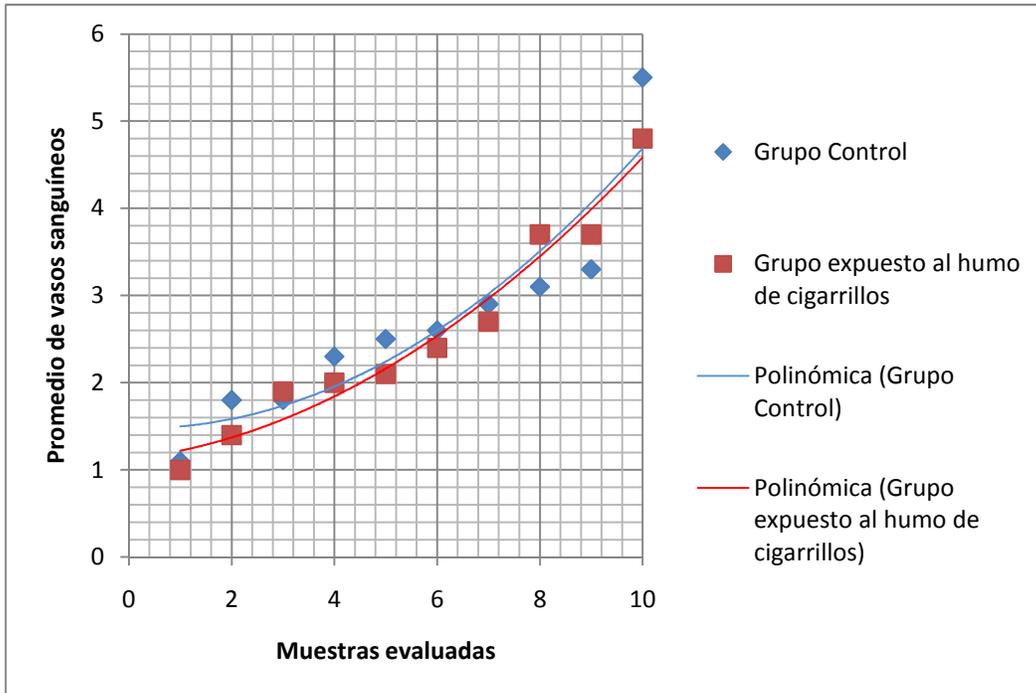
**Figura 35. Grupo expuesto al humo de cigarrillos. Infiltrado inflamatorio moderado.**

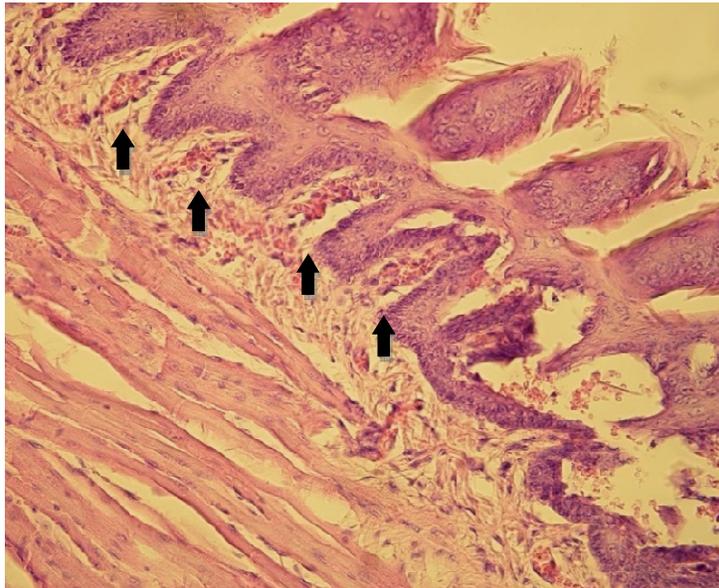
### **5.1.2. b. Características relacionadas a los vasos sanguíneos.**

El análisis descriptivo de los vasos sanguíneos reflejó que en el grupo expuesto al humo de cigarrillos se observó un valor mínimo de 1 vaso por campo y un valor máximo de 4.8 con un promedio de  $2.57 \pm 0.37$ , mientras que en grupo control se observó valor mínimo de 1.1 vaso por campo y un valor máximo de 5.5 con un promedio de  $2.69 \pm 0.37$ . Al comparar ambos grupos de estudio se tiene una media de  $2.45 \pm 0.257$  y no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.274$ ), debido a que los mismos presentaban características uniformes en cuanto al tamaño y forma, así como también en la cantidad (**Gráfico 12**).

Sin embargo, a pesar de que numéricamente no hubo diferencias notables, se observó como un dato resaltante la distribución que presentaban estos vasos sanguíneos en las muestras pertenecientes al grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos, en las cuales los elementos vasculares se encontraban muy cercanos al epitelio, sobre todo en los vértices de las papilas dérmicas del tejido conjuntivo (**Figura 37**).

**Gráfico 12. Comparación de promedios de vasos sanguíneos entre grupo expuesto al humo de cigarrillos y grupo control.**





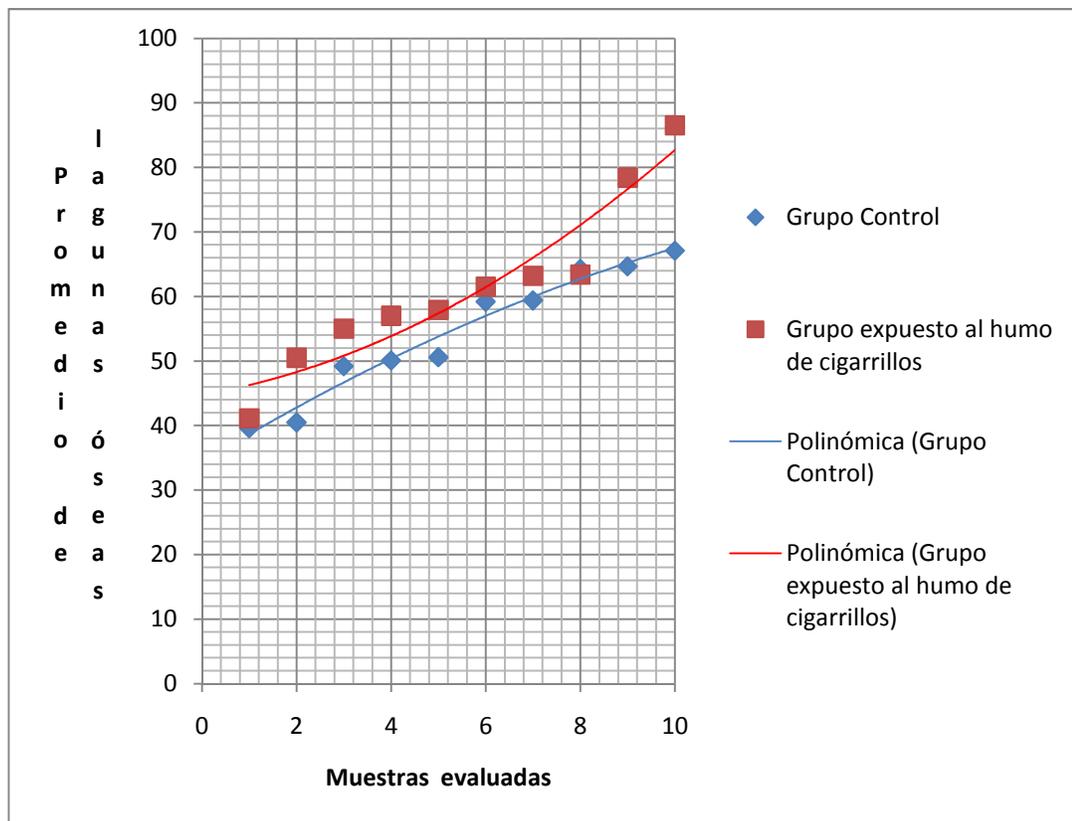
**Figura 36. Muestra de mucosa lingual. Obsérvese vasos sanguíneos en papilas dérmicas presentes en el grupo expuesto al humo de cigarrillos.**

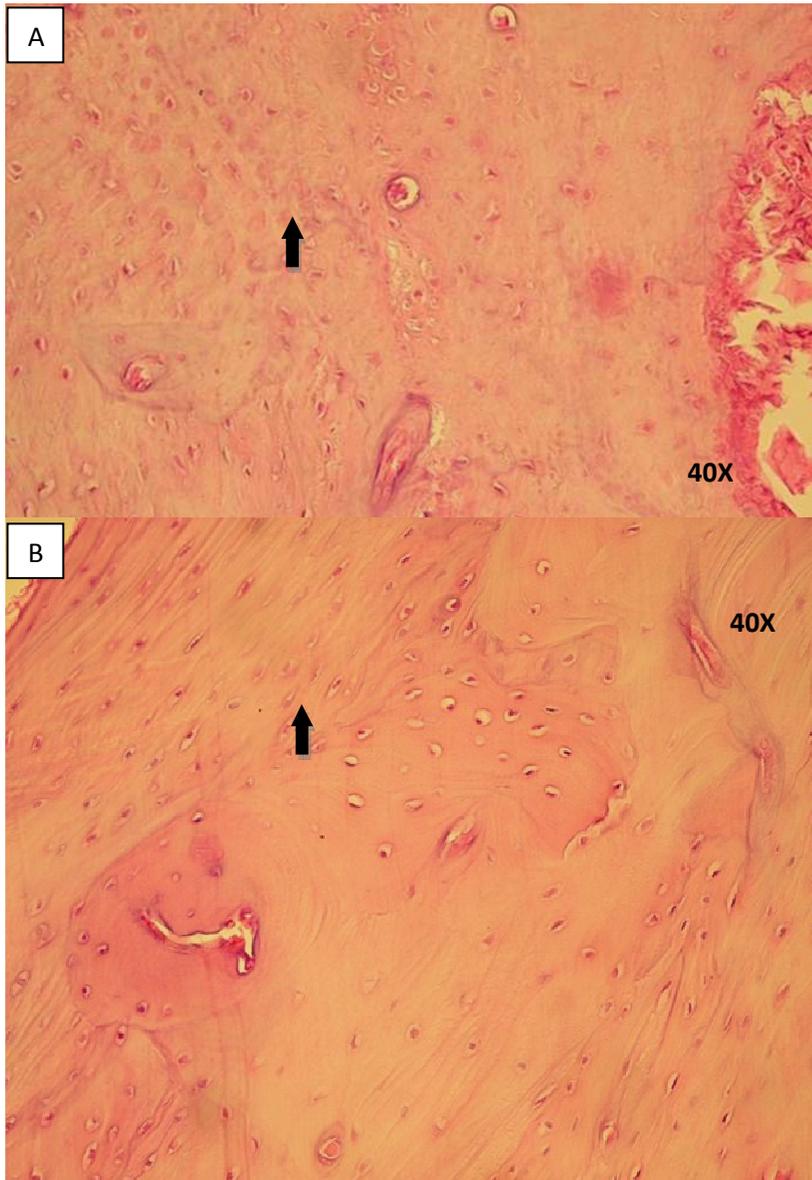
## **5.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL TEJIDO ÓSEO.**

En las muestras analizadas correspondientes al grupo expuesto al humo de cigarrillos se observó un mayor número de lagunas óseas, presentando un valor mínimo de 41.1 lagunas óseas por campo y un valor máximo de 86.5 por campo, con un promedio de  $61.45 \pm 4,12$ , mientras que en el grupo control se presentó un valor mínimo de 39.6 lagunas óseas por campo y un valor

máximo de 67.1 por campo, con un promedio de  $54.47 \pm 3,13$ . Al comparar ambos grupos de estudio se tiene una media de  $58,55 \pm 2.64$ , a pesar del mayor promedio en el número de lagunas óseas observadas en el grupo expuesto al humo de cigarrillos la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.395$ ) (**Gráfico 13, Figura 38**).

**Gráfico 13. Comparación de promedios de lagunas óseas entre grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos y grupo control.**





**Figura 37. Muestra de mandíbula. (A). Grupo expuesto al humo de cigarrillos. (B) Grupo control. Flechas indican lagunas óseas.**

## VI. DISCUSIÓN

La proliferación celular es un proceso biológico de vital importancia para todos los seres vivos, no solo en el inicio de formación intrauterina sino también a lo largo de toda la vida. Este ciclo está bajo el control de una serie de proteínas codificadas por genes de supresión tumoral y oncogenes, cuando ocurre una desregulación en alguno de los dos grupos es cuando se origina el cáncer.

A raíz del incremento en el número de personas con tabaquismo alrededor del mundo, se han realizado diversas investigaciones para evaluar los efectos que tienen los componentes del humo del cigarrillo sobre la mucosa bucal tanto en fumadores activos como en quienes inhalan de forma pasiva, estableciendo modelos experimentales en animales para inducir la formación de tumores, siendo los roedores los mayormente utilizados.

A pesar de que ha sido difícil reproducir el humo ambiental que es inhalado por humanos, estudios experimentales han simulado y diseñado la generación de dicho humo a partir de cigarrillos para valorar los efectos causados por la exposición crónica al humo del tabaco en roedores, y se han encontrado efectos similares sobre los tejidos los cuales han sido medidos a través de pruebas específicas como la formación de ADN aducto, para demostrar la carcinogenicidad de los productos del tabaco sobre animales de experimentación (Lee y cols, 1992; Izzotti y cols, 1999; Husgafvel- Pursiainen, 2004).

Al respecto, Izzotti y cols (1999), reportaron que altos niveles de ADN aducto fueron detectados en distintos órganos de ratas expuestas en cuerpo completo al humo de cigarrillos. Tales efectos también han sido reportados en otras investigaciones con roedores que han sido expuestos al humo de cigarrillos, como es el caso de Lee y cols (1992), que posterior a la exposición al humo por catorce días consecutivos encontraron la formación de ADN aducto en células de pulmón y corazón, lo que evidenciaba los efectos de los componentes del tabaco.

Partiendo del hecho que la carcinogénesis bucal es un proceso que se da en múltiples fases, Hoffmann y cols (1983), propusieron que los componentes de la fase particulada del humo del tabaco, como por ejemplo los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los compuestos fenólicos, suelen actuar como iniciadores en dicho proceso, mientras que los que componen la fase gaseosa pueden jugar un rol de promotores o cocarcinógenos, que estimulan a células que ya han sido iniciadas.

El hecho de que en la fase gaseosa existan componentes que funcionan como promotores reviste especial interés en la exposición al humo del tabaco ambiental. Si bien es cierto que los fumadores pasivos no tienen contacto directo con los carcinógenos que puedan iniciar el proceso, se sabe que el cáncer es multifactorial y por lo tanto pueden existir, en el organismo de quien no fume, células iniciadas por otros agentes oncogénicos que sean estimuladas o promovidas, favoreciendo

así su expansión clonal y perpetuar el daño genético en varias células hijas.

La distribución de las lesiones moleculares y celulares depende de varios factores como lo son: la toxicocinética y fenómeno del primer paso hepático, metabolismo local de cada órgano, eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN y remoción de ADN aducto y la tasa de proliferación celular que influencia el reemplazo de las células pro-mutagénicas por células no afectadas. Todos los organismos poseen un sistema antioxidante de defensa para prevenir que radicales libres del oxígeno produzcan estrés oxidativo, tejidos dañados y mutaciones, siendo directamente dependiente de la concentración de glutatión transferasa en los tejidos (Parke, 1994).

De esta manera, los pequeños roedores consumen la glutatión transferasa de los tejidos en los procesos de detoxificación, mientras que los animales más grandes y los humanos utilizan el

agua, y la epóxido hidrolasa para dicho proceso, siendo ésta una de las razones que hace a los roedores más susceptibles a los efectos tóxicos de los radicales libres derivados de procesos oxidativos para la activación de carcinógenos químicos, exhibiendo así más posibilidades de desarrollar cánceres espontáneos (Parke, 1994).

Estudios han señalado que las células epiteliales que delinean las vías respiratorias tanto intratorácicas como extratorácicas, así como también la mucosa bucal y nasal, exhiben un patrón similar en la expresión de genes en respuesta al humo del cigarrillo, en lo que respecta a aquellos responsables de la detoxificación, regulación del ciclo celular y adhesión celular, lo que indica que el fumar induce cambios en un campo común de células dañadas a través de las vías respiratorias (Sridhar y cols, 2008).

Reportes anteriores avalan los resultados obtenidos en la presente investigación (Pressentin y cols, 1999; Kitakawa y cols, 2006; Caldeira y cols, 2007), en ellos se presentan cambios en el

epitelio posterior a la exposición a carcinógenos derivados del tabaco, bien sea por vía inhalatoria, por vía oral o por colocación de forma tópica sobre las mucosas, evidenciando que si se produce un estímulo para que los queratinocitos reaccionen, aumentando la tasa de proliferación celular y desarrollando cambios citológicos que indican una mayor actividad nuclear.

Un ejemplo lo observamos en un estudio realizado en roedores por Pressentin y cols (1999), donde se evaluó la mutagenicidad de algunos carcinógenos presentes en el tabaco (benzopirene, benzantracene, nitrosaminas, nitrosonornicotina) sobre los tejidos de la cavidad bucal.

Posterior al sacrificio de los animales se pudo constatar que todos los compuestos tuvieron efectos mutagénicos sobre la lengua y el resto de tejidos de la cavidad bucal, con efectos similares en otros órganos como el pulmón, lo que demuestra su

capacidad para actuar como iniciadores en el proceso de carcinogénesis bucal y pulmonar.

Es así como, Gebel y cols, (2004), en una investigación realizada en ratas *Sprague Dawley*, que fueron expuestas al humo de cigarrillos, demostraron el efecto que tiene la inhalación de los componentes del humo del tabaco sobre la inducción de los genes que codifican tanto la Fase I de activación como la Fase II de metabolismo de los carcinógenos químicos.

Una principal ruta sugerida por este autor para la inducción del cáncer relacionado al humo del tabaco, es por la activación de los genes de la fase I, principalmente el citocromo P450 dependiente de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales forman reactivos intermedios biológicamente activos que interfieren con un locus específico del ADN resultando en mutaciones que son iniciadoras de la carcinogénesis, siendo el blanco principal la mutación del gen *p53* y *ras*.

Genes de la fase II, tales como *Ygcs* y *nqol* son inducidos por los compuestos fenólicos del humo del tabaco, sugiriendo que derivados del catecol y la hidroquinona están fuertemente asociados a la activación de la respuesta de los genes de esta fase de detoxificación en tejidos expuestos al humo del tabaco. La acción de estos genes protege a las células de los radicales libres, además estabilizan a la proteína *p53* en presencia de estrés oxidativo lo que juega un rol importante en la prevención del cáncer (Gebel y cols, 2004).

Así mismo, se ha encontrado en células del epitelio nasal de ratas expuestas al humo del tabaco, proteínas codificadas por los genes de la fase II o de detoxificación, que intervienen en el aclaramiento de xenobióticos lipofílicos a través de su glucoronidación, lo que los hace solubles en agua y más fácilmente eliminados de organismo. Sin embargo, Gebel y cols, (2004), resaltan un dato de interés observado en los tejidos de las ratas, y es el hecho de la disminución de la expresión de los

genes de la fase II en respuesta al estrés oxidativo relacionado al humo del tabaco en aquellas ratas que fueron expuestas por tres semanas en contraste con aquellas que fueron expuestas sólo 3 horas, a pesar de que, estos genes recuperan sus funciones luego de 20 horas que se suspende el aporte de los carcinógenos.

Esto sugiere que a pesar de que se desarrolla una respuesta adaptativa de los genes durante exposiciones crónicas, puede ocurrir una disminución de la sensibilización para ser activados por exposiciones repetidas lo que conlleva a una respuesta inadecuada ante el estrés oxidativo relacionado al humo del tabaco.

En este sentido, la alteración de estos genes en roedores por exposición crónica al humo de cigarrillos puede explicar los cambios observados en la presente investigación, en la mucosa bucal de las ratas del grupo experimental, en las cuales se pudo observar alteraciones en la arquitectura del epitelio y en la morfología de los queratinocitos.

Si bien se ha demostrado que no todos los componentes del humo del cigarrillo inducen los mismos cambios en todos los seres vivos, el perfil genético que varía de un individuo a otro también influye de manera significativa en la forma en la que responde cada tejido a los carcinógenos químicos derivados del tabaco, esto hace que exista una variabilidad en el desarrollo de patologías epiteliales, pudiendo presentarse en unos una hiperplasia en el epitelio y en otros displasias, existiendo también variaciones aún en el grado de severidad de éstas.

En un estudio realizado en ratas por Kitano, (2000), para evaluar como influía el perfil genético individual en el control de la susceptibilidad o resistencia para desarrollar carcinomas en lengua por carcinógenos químicos, señala que en la carcinogénesis por químicos hay un número de pasos que se dan bajo el control genético como lo son: la activación metabólica y

catabolismo de los carcinógenos químicos, su acceso a los tejidos blancos, susceptibilidad de las células blanco, características patofisiológicas del tejido epitelial y la capacidad para reparar el ADN.

Las diferencias en el polimorfismo genético que influye en tales pasos es lo que determina la susceptibilidad y resistencia de cada individuo para desarrollar lesiones potencial o francamente malignas. Esto corrobora los resultados obtenidos en esta investigación, al observar que bajo las mismas condiciones experimentales de tiempo de exposición y dosis de cigarrillos los cambios en el epitelio se presentaron de tres maneras distintas: como hiperplasia epitelial, displasia epitelial leve y displasia epitelial moderada.

En cuanto al efecto del humo de cigarrillos sobre el epitelio, varios estudios han demostrado que la exposición crónica a tales componentes produce alteraciones morfológicas en los tejidos de

la cavidad bucal no sólo por la acción local sino también por un efecto sistémico de estos productos sobre las células de la mucosa, siendo los queratinocitos los principalmente afectados. Tal y como lo demuestra Caldeira y cols, (2007), en un estudio realizado recientemente donde evaluaron las alteraciones morfológicas ocurridas en la mucosa bucal de ratas que recibieron nicotina por vía sistémica en un lapso de 90 días.

A través de este estudio se demostró el efecto sistémico que tiene la nicotina sobre los queratinocitos de la mucosa bucal, ya que se evidenció una disminución del espesor del epitelio (atrofia) en la mucosa de las ratas expuestas a la nicotina con respecto al del grupo control, acompañado de alteraciones citológicas en la capa basal caracterizada por disminución en el tamaño del núcleo y del área citoplasmática. Así mismo, alteraciones a nivel ultra-estructural fueron encontradas en las células de la capa basal tales como desorganización de la membrana basal, núcleo irregular e incremento en el espacio intercelular.

Aunque los resultados obtenidos por Caldeira y cols, (2007), difieren con los del presente estudio, se demuestra que existe un

efecto sistémico de los componentes del tabaco sobre las células epiteliales de la mucosa bucal. En contraste con los cambios arrojados por ese estudio, los que se presentan en esta investigación corresponden más bien a un aumento en el espesor del epitelio, observándose una acantosis marcada en la totalidad de los casos pertenecientes al grupo expuesto al humo de cigarrillos.

De la misma manera, se observaron cambios citológicos y estructurales en la capa basal del epitelio, pero en este caso existió una hiperplasia basal y se evidenció aumento del tamaño nuclear (anisonucleosis) en algunas células de esta capa.

En este orden de ideas, Kitakawa y cols, (2006), publican un estudio en el cual compararon ensayos de carcinogénesis en lenguas de ratas y hámsters utilizando dos carcinógenos, administrados por dos vías distintas.

Los resultados obtenidos revelaron que pasadas las 4 primeras semanas de tratamiento tópico con el benzantracene, la mucosa exhibió hiperqueratosis e hiperplasia, con un aumento en el espesor de la capa espinosa (acantosis). A las 12 semanas la patología epitelial había progresado hacia una displasia epitelial moderada y severa con alteraciones citológicas como pleomorfismo e hiper cromatismo. Y finalmente a las 20 semanas se observó la presencia de carcinomas de células escamosas bien diferenciados.

A pesar de que el diseño experimental difiere del utilizado en la presente investigación, se puede apreciar el efecto que ejerce un componente presente en el humo del tabaco sobre las células epiteliales de la mucosa lingual. Si bien, no se determina la cantidad exacta a la que pudo estar expuesta la población animal al inhalar el humo de cigarrillos los cambios histopatológicos son similares en la misma mucosa de estudio, puesto que luego de 16 semanas de exposición se pudo observar hiperplasia epitelial, así como también, displasia epitelial leve y displasia epitelial moderada.

Otro estudio realizado por Tang y cols, (2004), en el cual diseñaron un modelo experimental de carcinogénesis bucal en roedores, utilizando 4- nitroquinolina- 1- óxido (4NQO), administrándola a un grupo por vía oral en el agua de consumo diario y a otro grupo de forma tópica, encontraron la presencia de lesiones tumorales después de 16 semanas, tanto en la mucosa lingual como en el esófago. Histopatológicamente exhibieron incremento en el espesor del epitelio (hiperplasia epitelial), displasia epitelial, carcinoma *in situ* y carcinomas de células escamosas, identificados por la invasión hacia el tejido conjuntivo.

Debido a que la nitroquinolina es un carcinógeno que induce mutagénesis, las lesiones precancerosas y cancerosas en la lengua de los roedores se desarrollaron después de un período de tratamiento y de exposición continua posiblemente por el resultado de la acumulación de mutaciones genéticas, progresando en el tiempo desde hiperplasia y displasias epiteliales a carcinomas invasivos, con evidencias de aumento en la proliferación de las células de la mucosa lingual.

Parke (1994), señala que la activación metabólica de los carcinógenos químicos por parte del citocromo P4501, producen un daño al material genético de la célula progenitora que coincide con la activación de la Proteína kinasa C, lo que aumenta la replicación del ADN e induce Hiperplasia logrando que la falla genética sea preservada y perpetuada en un clon de células con ADN defectuoso.

Estudios muy tempranos acerca de los cambios morfológicos de la capa basal en desórdenes potencialmente malignas, señalan que en los tejidos expuestos crónicamente a carcinógenos puede ocurrir un aumento en el espesor de la capa progenitora posiblemente explicado por el aumento de actividad metabólica, lo que igualmente puede ser expresado por un aumento en el área nuclear de dichas células por incremento en la síntesis de ADN, así como también, por el aumento en el número de células (Shabana, 1987).

Dado que los componentes del cigarrillo son carcinógenos químicos que al ser inhalados y pasar al torrente sanguíneo

pueden alcanzar las células de la mucosa bucal, los estudios anteriormente mencionados pueden explicar los cambios histopatológicos observados en la presente investigación, en cuanto a la respuesta celular ante la exposición crónica al humo del cigarrillo.

El aumento en la actividad metabólica para reparar el ADN, se puede evidenciar por la anisonucleosis, hiperchromatismo lo que a su vez se tradujo una duplicación de la capa basal y una acantosis que produjeron una hiperplasia epitelial, pero conforme la exposición se mantuvo en el tiempo, las células cedieron demostrando picnosis. Así mismo, la actividad replicativa aumentado se hizo manifiesta a través del número de mitosis las cuales se presentaron de ubicación inusual en las capas parabasales del epitelio.

En un estudio realizado por Derka y cols, (2006), en los que indujeron carcinogénesis bucal por químicos en un grupo de 40 hamsters *Syrian golden*, se evaluaron las características histopatológicas y su asociación con la expresión de Ki-67, Bcl-2 y Bax, en la mucosa y tumores formados posterior a la aplicación tópica.

Los autores reportaron que en el grupo que menor tiempo estuvo expuesto al carcinógeno evidenciaron displasia epitelial, observándose estadios más avanzados de invasión temprana y carcinomas bien y moderadamente diferenciados conforme aumentó la cantidad de tiempo en contacto con el benzantraceno.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, puesto que hubo cambios histopatológicos de displasia epitelial en 8 de las 10 muestras analizadas del grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos.

Por otra parte, sumado al incremento en la proliferación celular que se manifiesta como una hiperplasia epitelial, otro de los cambios citológicos que evidencian la presencia de displasia epitelial es la transformación degenerativa del núcleo o picnosis, lo cual ha sido demostrado por Balansky, (1999), y fue observado en el presente estudio en el grupo de ratas expuestas al humo de cigarrillos.

En un estudio realizado por Coggins y cols, (1992), reportaron que un grupo de ratas *Sprague Dawley* expuesto a la mayor concentración de humo de cigarrillos se evidenció cambios histopatológicos en la zona más anterior de la mucosa nasal, correspondientes a hiperplasia epitelial e infiltrado inflamatorio crónico con escasos polimorfonucleares.

Se han realizado investigaciones para analizar la relación existente entre la presencia de infiltrado inflamatorio en los tejidos y el desarrollo del cáncer y se ha encontrado una asociación positiva en aquellos tejidos que son expuestos a una irritación crónica por el humo del cigarrillo que inducen una inflamación subsecuente (Rakoff- Nahoum, 2006).

En cuanto a las características del infiltrado inflamatorio observado en la presente investigación se tiene que a pesar que el grado de intensidad fue mayor en el grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos en comparación con el grupo control, se pudo notar que hubo una variación con respecto a lo

reportado en otras investigaciones, ya que infiltrado inflamatorio de leve a moderado se observó en asociación a las patologías epiteliales de menor severidad como hiperplasia y displasia epitelial leve, mientras que en la displasia epitelial moderada estuvo presente un infiltrado inflamatorio leve.

Se han realizado diversas investigaciones sobre la respuesta inflamatoria a los componentes del humo del tabaco en las vías aéreas y pulmones que son los primeros tejidos que tienen contacto con los componentes de este gas y ha sido postulado que el humo del tabaco induce a los macrófagos y a las células epiteliales pulmonares a secretar agentes quimiotácticos que son capaces de atraer más células inflamatorias al sitio afectado (Nie y cols, 2008; Kubo y cols, 2005).

En vista que la inflamación inducida por el humo del tabaco juega un rol importante en el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, se ha reportado que en esta

enfermedad hay un incremento en el número de células CD8 en el epitelio y submucosa, y además estos leucocitos expresan el receptor CXCR3 el cual se une a su ligando específico produciendo un mayor reclutamiento de células T bajo la acción del humo del tabaco (Nie y cols, 2008).

Bajo la acción del humo del tabaco sobre los tejidos los leucocitos infiltran las vías aéreas y pulmones desencadenando el proceso inflamatorio y promueven el daño tisular por la producción de diversas citoquinas tales como IL-4, IL-8, IFN $\gamma$  y FNT $\alpha$ .

Los elevados niveles de IL-8 en ratones pueden estimular una respuesta citotóxica en los linfocitos CD8 manteniendo su memoria y asegurando su supervivencia. En el estudio realizado por Nie y cols, (2008) para evaluar la respuesta inflamatoria posterior a la exposición al humo del tabaco a corto plazo en ratones con delección del gen CXCR3, se encontró que a pesar del estímulo proinflamatorio del humo hubo una disminución en la cantidad de linfocitos CD8 tanto en las vías aéreas como en el pulmón.

Sin embargo, otros reportes muestran el efecto inductor del estroma, y es que las células inflamatorias, proveen de nutrientes y señales proliferativas necesarias para el crecimiento de las nuevas células que han adquirido un ADN dañado, aunque, en un primer contacto, el huésped tiene un mecanismo de defensa dedicado a percibir y eliminar las células transformadas (Rakoff- Nahoum, 2006).

Así mismo se ha observado que la infiltración de células inflamatorias está asociada a la presencia de lesiones malignas, el cual se incrementa conforme va progresando la patología epitelial, es decir en la evolución desde una hiperqueratosis progresando a displasias epiteliales hasta llegar al carcinoma de células escamosas (Gannot y cols, 2002).

Estos autores señalan que, estas fases hacia la malignidad tienen distintos perfiles inmunológicos, cuando el status histopatológico progresa y adquiere características de malignidad el infiltrado inflamatorio cambia de células no especializadas a Linfocitos T y B, pero este cambio es gradual, y

alcanza un pico máximo con las lesiones que exhiben displasia epitelial moderada o severa.

En este sentido, Liu y cols, (2007), reportaron que existen ciertas células inflamatorias asociadas a las células tumorales de los carcinomas de células escamosas, tales como macrófagos y linfocitos. Los macrófagos asociados a tumores pueden representar hasta el 70% de las células leucocitarias presentes en el estroma y ha generado controversias sobre su papel en la promoción o inhibición en la progresión tumoral.

Últimamente se ha conocido que estos macrófagos son una importante fuente de factores proangiogénicos, que estimulan la proliferación de las células endoteliales, su migración y su diferenciación. La angiogénesis también es facilitada por proteasas liberadas por los macrófagos, tales como las metaloproteinasas 1, 2, 3, 9, 12 y la uroquinasa activadora del plasminogéno (Liu y cols, 2007).

La acción de todas estas proteasas degradan la membrana basal de las células endoteliales y otras proteínas de la matriz extracelular, desestabilizando la vasculatura local y permitiendo

la migración y proliferación de las células endoteliales formando así nuevos vasos que sigan nutriendo a las células tumorales. Esta actividad proteolítica también favorece la migración y extravasación de estas células tumorales en el proceso metastásico (Liu y cols, 2007).

La angiogénesis o neoformación de vasos sanguíneos es un factor fundamental en el crecimiento, invasión y metástasis de un tumor. Un significativo aumento de la vascularidad ocurre durante la transición de una mucosa normal, pasando por los diferentes grados de displasia hasta llegar al carcinoma de células escamosas invasivo (Liu y cols. 2007, Hanahan y Weinberg, 2000).

Se ha demostrado que un adecuado aporte sanguíneo es necesario para el desarrollo de los tumores (Liu y cols. 2007), sin embargo, llama la atención que en el presente estudio no se observó aumento en el número de vasos sanguíneos en el grupo expuesto al humo de cigarrillos.

Si bien algunos autores han apoyado el incremento de la vascularidad por estímulos de los productos del cigarrillo, otros autores han señalado a través de estudios *in vitro* y en humanos la disminución del número de vasos subepiteliales, principalmente en las vías aéreas y el parénquima pulmonar, y también de forma sistémica (Yamada y cols, 2008; Nagai y cols, 2005).

En un estudio comparativo realizado por los autores anteriormente citados, donde se evaluó la microvasculatura subepitelial entre fumadores y no fumadores se encontró una disminución de la densidad y en el diámetro de los vasos sanguíneos en los fumadores lo que podía sugerir además una disminución en el flujo sanguíneo local.

Esto puede explicar, en parte, el hallazgo en relación a los vasos sanguíneos presentados en esta investigación, a pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de vasos en las muestras pertenecientes al grupo expuesto al humo de cigarrillos con respecto al grupo control, la ubicación tan próxima al epitelio, de manera característica en el vértice de las papilas dérmicas podría proveer el aporte

sanguíneo necesario para suplir la demanda de nutrientes requeridos por las células proliferando de forma incrementada.

Con respecto, a los cambios en el tejido óseo investigaciones han reportado que existe un efecto antiproliferativo sobre los osteoblastos y las condiciones para la reabsorción ósea se ven favorecidas por inducción de la nicotina en la producción de proteasas que degradan las fibras de la matriz extracelular y además estimulan la diferenciación, activación y fusión de los osteoclastos lo que se traduce en una menor formación de hueso y reabsorción ósea incrementada (Katono y cols, 2009; Tanaka y cols, 2006; César – Neto, 2006; Henemyre y cols, 2003).

En la presente investigación no se presentaron cambios estadísticamente significativos en relación al número de lagunas óseas entre el grupo experimental y el grupo control, pero a través de la representación gráfica se puede inferir que el tejido del grupo expuesto al humo del cigarrillo pudiese demostrar un mayor número de lagunas con una mayor exposición tanto en tiempo como en dosis de cigarrillos.

## VII. CONCLUSIONES

La exposición crónica al humo del cigarrillo produjo cambios en la mucosa bucal de ratas, que alteró la arquitectura del tejido epitelial, por inducción de la proliferación celular que se hizo manifiesta a través de la duplicación de la capa basal y aumento del espesor del estrato espinoso, sin afectar el patrón de queratinización.

Los componentes del humo del cigarrillo estimularon una mayor actividad nuclear que condujo a la manifestación de alteraciones citológicas en los queratinocitos lo cual fue expresado como hiper cromatismo y picnosis nuclear.

El humo del cigarrillo no fue capaz de alterar la tasa de mitosis del epitelio de la mucosa lingual, sin embargo, cambios nucleares como picnosis fueron inducidos.

El humo del cigarrillo produjo cambios en el epitelio que variaron desde una hiperplasia epitelial, displasia epitelial leve hasta una displasia epitelial moderada, sin producir lesiones clínicamente evidentes.

La exposición repetida al humo del cigarrillo indujo una respuesta inflamatoria crónica en el corion de la mucosa bucal, provocando la infiltración de células inflamatorias que variaron de intensidad leve a moderada dependiendo de los cambios epiteliales.

No se observaron cambios relacionados al tamaño y número de vasos sanguíneos en el corion de la mucosa bucal por efecto del humo de cigarrillos, sin embargo, la exposición crónica a los componentes tabáquicos pudo influir en la ubicación de estos en proximidad al epitelio, lo cual sugiere que debido a la intensa actividad metabólica de las células que experimentan cambios por efecto de los componentes del tabaco necesitan un mayor aporte de nutrientes para suplir la demanda.

Los cambios histopatológicos por efecto del humo del cigarrillo en el tejido óseo de la cavidad bucal de las ratas del grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos sugieren que existe una tendencia a demostrar cambios en el número de lagunas óseas directamente proporcional al tiempo de exposición al humo de cigarrillos.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, JM., Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-1326.

Balansky, R., Agostini, F., De Flora, S. (1999). Induction, persistence and modulation of cytogenetic alterations in cells of smoked-exposed mice. *Carcinogenesis*. 20. 1491-1497.

Bánóczy, J., Squier, C. (2004). Smoking and oral disease. *European Journal of Dental Education*. 8 (Suppl. 4). 7-10.

Barnes, L., Everson, JW., Reichart, PA., Sidransky, D. (2005). World Health Organization classification of tumours. Pathology and Genetics of Head and neck tumours. Londres. IARC Pres.

Bitton, A., Neuman, M., Barnoya, J., Glantz, S. (2005). The p53 tumour suppressor gene and the tobacco industry: research, debate, and conflict of interest. *Lancet*, 365, 531-540.

Boletín Epidemiológico de la Organización Panamericana de la Salud. (1992). 13 (4).

Bouquout, J., Speight, P., Farthing, P. (2006). Epithelial dysplasia of the oral mucosa: Diagnostics problems and prognostic features. *Current Diagnostic Pathology*. 12. 11-21.

Bozkurt, A., Sainöz, S., Özçırplı, B., Özgür, S., Sahinöz, T., Acemoglu, H., Saka, G., Ceylan, A., Palanci, Y., İlçin, E., Akkafa, F. (2006). Patterns of active and passive smoking, and associated factors, in the South-east Anatolian Project (SEAP) region in Turkey. *BMC Public Health*, 6 (15).

Caldeira, E., Fabrega, C., Padovani, C., Camilli, J., García, P., Alves, V. (2007). Morphological alterations in epithelium of the oral mucosa of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to long-term systemic nicotine treatment. *Archives of Oral Biology*, 52, 83-89.

César – Neto, JB., Benatti, BB., Sallum, EA., Casati, MZ., Nociti, FH. (2006). The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *Journal of Periodontal Research*. 41, 118-123.

Chimenos Küstner, E., Font Costa, I., López López, J. (2004). Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 9, 377-84.

Coggins, C., Ayres, P., Mosberg, A., Ogden, M., Sagartz, J., Hayes, W. (1992). Fourteen – Day inhalation study in rats, using aged and diluted sidestream smoke from a reference cigarette. I. Inhalation Toxicology and Histopathology. *Fundamental and Applied Toxicology*. 19. 133- 140.

Collado, M., Serrano, M. (2005). The Senescent Side of Tumor Suppression. *Cell Cycle*, 4 (12), 1722-1724.

Cruz, I., Napier S. S., van der Waal, I., Snijders, P. J., Walboomers, J. M., Lamey, P. J., Cowan, C. J., Greg, T. A., Maxwell, P., Meijer, C. J. (2002). Suprabasal p53 immunexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *Journal of Clinical Pathology*, 55, 98-104.

Dakubo, G., Jakupciak, J., Birch – Machin, M., Parr, R. (2007). Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell International*, 7 (2), 1-12.

Dani, J., Heinemann, S. (1996). Molecular and cellular aspects of Nicotine abuse. *Neuron*. 16. 905-908.

Deng, X., Gao, F., Flagg, T., Stratford, W. (2004). Mono and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *The National Academy of Sciences of the USA*, 101 (1), 153-158.

Depprich, R., Handschel, J., Fritzemeier, C., Engers, R., Kubler, N. (2006). Hybrid verrucous carcinoma of the oral cavity: A challenge for the clinician and the pathologist. *Oral Oncology Extra*. 42. 85-90.

Derka, S., Vairaktaris, E., Papakosta, V., Vassiliou, S., Acil, Y., Vylliotis, A., Spyridonidou, S., Lazaris, A., Mourouzis, C., Kokkori, A., Moulavasili, P., Perrea, D., Donta, I., Yapijakis, C., Patsouris, E. (2006). Cell proliferation and apoptosis culminate in early stages of oral oncogenesis. *Oral Oncology*, 42, 540-550.

Dumble, M., Gatz, C., Tyner, S., Venkatachalam, S., Donehower, L. (2004). Insights into aging obtained from p53 mutant mouse models. *New York Academy of Sciences*. 1019, 171 – 177.

Essers, J., Theil, A., Baldeyron, C., A. van Cappellen, W., Houtsmuller, A., Kanaar, R., Vermeulen, W. (2005). Nuclear Dynamics of PCNA in DNA Replication and Repair. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), 9350-9359.

Estadísticas Sanitarias Mundiales (2007). Diez cuestiones estadísticas de especial interés en Salud Pública.

Gannot, G., Gannot, I., Vered, H., Buchner, A., Keisari, Y. (2002). Increase in immune cell infiltration with progression of oral epithelium from hyperkeratosis to dysplasia and carcinoma. *British Journal of Cancer*, 86, 1444-1448.

Gebel, S., Gerstmayer, B., Bosio, A., Haussmann, H., Van, E., Muller, T. (2004). Gene expression profiling in respiratory tissues from rats exposed to mainstream cigarette smoke. *Carcinogenesis*, 5 (2), 169-178.

Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahmer, I., Kloth, S., Brandt, E., Flad, H. (1991). Immunobiochemical and Molecular biologic characterization of the cell proliferation – associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki- 67. *American Journal of Pathology*, 138 (4). 867- 873.

Grizzi, F., Di Leva, A., Russo, C., Frezza, E., Cobos, E., Muzzio, PC., Chiriva- Internati, M. (2006). Cancer initiation and progression: an unsimplifiable complexity. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 3 (37).

Haas, S., Hormann, K., Bosch, F. (2002). Expression of cell cycle proteins in head and neck cancer correlates with tumor site rather than tobacco use. *Oral Oncology*, 38, 618–623

Hall, PA., Levison, DA., Woods, AL., Yu, CC., Kellogg, DB., Watkins, JA. (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *Journal of Pathology*, 162, 285-294.

Hanahan, D., Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-60.

Henemyre, C., Scales, D., Hokett, S., Cuenin, M., Peacock, M., Parker, M., Brewer, P., Chuang, A. (2003). Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *Journal of Periodontology*, 74, 1440-1446.

Hetch, S. (1997). Tobacco and Cancer: Approaches using carcinogen biomarkers and chemoprevention. *Annals New York Academy of Sciences*. 833, 91-111.

Hoffmann, D., Hetch, S., Wynder, L. (1983). Tumor promoters and cocarcinogens in tobacco carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 50, 247-257.

Husgafvel – Pursiainen, K. (2004). Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutation Research*. 567. 427-445.

Izzotti, A., Bagnasco, M., D'Agostini, F., Cartiglia, C., Lubet, R., Kelloff, G., De Flora, S. (1999). Formation and persistence of nucleotide alterations in rats exposed whole-body to environmental cigarette smoke. *Carcinogenesis*, 20 (8), 1499 – 1505.

Johnstone, S., Logan, R. (2007). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *International Journal Oral & Maxillofacial Surgery*, 36, 263-266.

Kato, H., Yoshikawa, M., Miyazaki, T., Nakajima, M., Fukai, Y., Tajima, K., Masuda, N., Tsukada, K., Fakuda, T., Nakajima, T., Kuwano, H. (2001). Expression of p53 protein related to smoking and alcoholic beverage drinking habits in patients with esophageal cancers. *Cancer Letters*, 167, 65-72

Katono, T., Kawato, T., Tanabe, N., Tanaka, H., Suzuki, N., Kitami, S., Morita, T., Motohashi, M., Maeno, M. (2009). Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators and their inhibitors in human osteoblasts. *Archives of Oral Biology*. 54. 146-155.

Kelman Z. (1997). PCNA: Structure, functions and interactions. Review. *Oncogene*, 14, 629-640.

Kim, J., Shin, DM., El-Naggar, A., Lee JS., Corrales C, Lippman, SM., Hong, WK., Hittelman, WN. (2001). Chromosome polysomy and histological characteristics in oral premalignant lesions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 10, 319-25.

Kitakawa, D., Cabral, L., Marques, M., Salvadori, E., Ribeiro, D. (2006). Medium – term tongue carcinogenesis assays: A comparative study between 4- nitroquinolone-1 oxide (4NQO)-induced rat and dimethylbenzanthracene (DMBA)- induced hamster carcinogenesis. *Journal of Experimental Animal Science*, 43, 219-227.

Kitano, M. (2000). Hosts genes controlling the susceptibility and resistance to squamous cell carcinoma of the tongue in a rat model. *Pathology International*, 50, 353- 362.

Kok, S-H., Hong, C-Y., Lin, S-K., Lee, J-J., Chiang, C-P., Yeng – Ping, M. (2007). Establishment and characterization of a tumorigenic cell line from areca quid and tobacco smoke-associated buccal carcinoma. *Oral Oncology*, 43, 639 – 647.

Kubo, S., Kobayashi, M., Masunaga, Y., Ishii, H., Hirano, Y., Takahashi, K., Shimizu, Y. (2005). Cytokine and chemokine expression in cigarette smoke – induced lung injury in guinea pigs. *European Respiratory Journal*, 26 ( 4), 993-1001.

Kuper, H., Adami, H., Boffetta, P. (2002). Tobacco use, cancer causation and public health impact. *Journal of Internal Medicine*, 251, 455-466.

Lakind, J., Ginevan, M., Naiman, D., James, A., Jenkins, R., Dourson, M., Felter, S., Graves, C., Tardiff, R. (1999). Distribution of exposure concentrations and doses for constituents of environmental tobacco smoke. *Risk Analysis*. 19 (3), 375- 390.

Lee, C., Brown, B., Reed, B., Rahn, C., Coggins, C., Doolittle, D., Hayes, W. (1992). Fourteen – Day inhalation study in rats, using aged and diluted sidestream smoke from a reference cigarette. II. DNA adducts and alveolar macrophage cytogenetics. *Fundamental and Applied Toxicology*. 19. 141- 146.

Liu, S., Chang, L., Pan, L., Hung, Y., Lee, C., Shieh, Y. (2007). Clinicopathologic significance of tumour cell- lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*.

Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. (2005) Apoptosis in normal and diseased oral tissues. *Oral Diseases*, 11, 274–287

Mackay, J. Ericksen, M. (2002). The tobacco atlas. Geneva. World Health Organization.

Messadi, D., Waibel, J., Mirowski, G. (2003). White lesions of the oral cavity. *Dermatologic Clinics*. 21. 63-78.

Mirowski, G., Waibel, J. (2002). Pigmented lesions of the oral cavity. *Dermatologic Therapy*. 15. 218-228.

Morabia, A., Constanza, M., Bernstein, M., Rielle, JC. (2002). Ages at initiation of cigarette smoking and quit attempts among women: A generation effect. *American Journal of Public Health*, 92, 71-74.

Nagai, K., Betsuyaku, T., Ito, Y., Nasuhara, Y., Nishimura, M. (2005). Decrease of vascular endothelial growth factor in macrophages from long- term smokers. *European Respiratory Journal*, 25 (4), 626-633.

National Advisory Committee for Laboratory animal research. (2004). Guidelines on the Care and use of animals for scientific purposes.

Neville, B., Day, T. (2002). Oral cancer and precancerous lesions. *Cancer Journal for clinicians*. 52. 195-215.

Nie, L., Xiang, R., Liu, Y., Zhou, W., Jiang, L., Lu, B., Pang, B., Cheng, D., Gao, J. (2008). Acute pulmonary inflammation is inhibited in CXCR3 knockout mice after short-term cigarette exposure. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29 (12), 1432-1439.

Okazaki, Y., Tanaka, Y., Tonogi, M., Yamane, G. (2002). Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncology*, 38, 562–573

Panno, J. (2005). CANCER: The Role of Genes, Lifestyle, and Environment. United States: Fact on file science library.

Paradiso, K., Steinbach, J. (2003). Nicotine is higher effective at producing desensitization of rat  $\alpha 4\beta 2$  neuronal nicotinic receptors. *Journal of Physiology*. 553 (3). 857-871.

Parke, D. (1994). The Cytocromes P450 and mechanisms of chemical carcinogens. *Environ Health Perspect*. 102. 852-853.

Paunesku, T., Mittal, S., Protic, M., Oryhon, J., Korolev, SV., Joachimiak, A. (2001). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol*, 77, 1007-1021.

Peruga, A., Rincón, A., Selin, H (2002). El Consumo de sustancias adictivas en las Américas. *Adicciones*. 14 (2). 227-238.

Perwez Hussain, S., Hofseth, L., Harris, C. (2001). Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer*, 34, S7-S15

Préfontaine, D., Morin, A., Jumarie, C., Porter, A. (2006). In vitro bioactivity of combustion products from 12 tobacco constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 724-738.

Pressentin, M., Kosinska, W., Guttenplan, J. (1999). Mutagenesis induced by oral carcinogens in lacZ mouse (Muta<sup>TM</sup>Mouse) tongue and other oral tissues. *Carcinogenesis*, 20 (11), 2167-2170.

Rakoff- Nahoum, S. (2006). Cancer mechanisms. Why Cancer and Inflammation?. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 76. 123-130.

Ringdahl, BE., Johnson, GK., Ali, RB., Organ, CC. (1997). Effect of nicotine on arachidonic acid metabolites and epithelial parameters in rat oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 26, 40-45.

Schwartz, J.L., Muscat, J.E., Baker, V., Larios, E., Stephenson, G.D., Guo, W., Xie, T., Gu, X., Chung, F.L. (2003). Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. *Oral Oncology*, 39, 842–854.

Shabana, A., EL-Labban, N., Lee, K. (1987). Morphometric analysis of basal cell layer in oral premalignant white lesions and squamous cell carcinoma. *Journal of Clinic Pathology*. 40, 454-458.

Shin, D., Charuruks, N., Lippman, S., Lee, J., Ro, J., Hong, W., Hittelman, W. (2001). p53 Protein accumulation and genomic instability in Head and Neck multistep tumorigenesis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 10, 603-609.

Slaughter, D.P., Southwick, H.W., Smejkal, W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6, 963-968.

Sridhar, S., Schembrit, F., Zeskind, J., Shah, V., Gustafson, A., Steiling, K., Liu, G., Dumas, Y-M., Zhang, X., Brody, J., Lenburg, M., Spira, A. (2008). Smoking – induced gene expression changes in the bronchial airway re reflected in nasal and buccal epithelium. *BMC Genomics*. 9, 259.

Sugano, N., Minegishi, T., Kawamoto, K., Ito, K. (2001). Nicotine inhibits UV-induced activation of the apoptotic pathway. *Toxicology Letters*, 125, 61–65

Tanaka, H., Tanabe, N., Shoji, M., Suzuki, N., Katono, T., Setsuko, S., Motohashi, M., Maeno, M. (2006). Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast –like cells by increasing macrophage colony- stimulating factor and prostaglandin E2 production by osteoblasts. *Life Sciences*. 78. 1733-1740.

Tanaka, K., Miyake, Y., Sasaki, S., Ohya, Y., Miyamoto, S., Matsunaga, Y., Yoshida, T., Hirota, Y., Hoda, H. (2005). Active and passive smoking and tooth loss in Japanese women: Baseline data from the Osaka maternal and child health study. *Annales of Epidemiologic*. 15 (5). 358 – 364.

Tang, X., Knudsen, B., Bemis, D., Tickoo, S., Gudas, L. (2004). Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clinical Cancer Research*. 10, 301-313.

Taybos, G. (2003). Oral Changes Associated with Tobacco Use. *The American Journal of the Medical Sciences*, 326 (4), 179–182.

Tsantoulis, P., Kastrinakis, N., Tourvas, A., Laskaris, G., Gorgoulis, VG. (2007). Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncology*, 43, 523– 534.

Vaccarino, F., Rotzinger, S., Obot, I., Monteiro, M. (2005). Neurociencia del consumo y dependencia de sustancias psicoactivas. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.

Van der Waal, I. (2008). Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*.

Van Dyke, T., Dave, S. (2005). Risk factors for periodontitis. *Journal International Academy of Periodontology*, 7(1), 3-7.

Voravud, N., Shin, D., Ro, J., Lee, J., Hong, W., Hittelman, W. (1993). Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. *Cancer Research*. 53, 2874-2883.

Whyte DA, Broton CE, Shillitoe EJ. (2002).The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53?. *Journal of Oral Pathology and Medicine*,31,25-33.

Winn, D. (2001). Tobacco Use and Oral Disease. *Journal of Dental Education*, 65(4), 306-312.

Woodward, A., Al- Delaimy, W. (1999). Measures of exposure to environmental tobacco smoke. Validity, Precision and relevance. *Anales New York Academy of Sciences*. 895. 156-172.

Yamada, G., Shijubo, N., Kitada, J., Takahashi, M., Otsuka, M., Fujii, M., Takahashi, H. (2008). Decreased subepithelial microvasculature observed by high magnification bronchovideoscope in the large airways of smokers. *Internal Medicine*, 47, 1579-1583.

Yang, E., Korsmeyer, SJ. (1996). Molecular thanapoptosis: Adiscourse on the Bcl-2 family and cell death (review). *Blood*, 88, 386-401.

Zhang, T., Lu, H., Shang, X., Tian, Y., Zheng, C., Wang, S., Cheng, H., Zhou, R. (2006). Nicotine prevents the apoptosis induced by menadione in human lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 928–934.

## IX. LISTA DE FIGURAS

<b>Fig.</b>		<b>Pág.</b>
1	Consumo de Cigarrillo a nivel mundial.....	17
2	Consumo diario de tabaco según la Organización Panamericana de la Salud.....	19
3	Género: <i>Rattus</i> , Especie: <i>norvegicus</i> ; Cepa: <i>Sprague Dawley</i> .....	71
4	Género: <i>Rattus</i> , Especie: <i>norvegicus</i> ; Cepa: <i>Sprague Dawley</i> .....	72
5	Caja metálica con depósito para alimentos y agua.....	73
6	Succionador de Gleras. Vista Lateral.....	73
7	Succionador de Gleras. Vista Superior.....	74
8	A. Manguera de aspiración en la cual se introducía el cigarrillo. B. Manguera para expulsión del humo en el interior de la jaula.....	75
9	Llave para control de presión de aspirado del cigarrillo: A. Vista lateral. B. Vista Frontal.....	76
10	Caja Plástica con múltiples orificios laterales.....	77
11	Grupo Control no expuesto al humo de cigarrillos.....	79
12	Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos.....	80
13	Grupo expuesto al humo del cigarrillo. Acercamiento....	80

<b>Fig.</b>		<b>Pág.</b>
14	Diseño experimental para administración del humo de cigarrillos.....	81
15	Exposición al humo de cigarrillos. Vista superior.....	82
16	Punción Intraperitoneal del Nembutal Sódico.....	83
17	Dislocación Cervical del animal 10 minutos después de la colocación del anestésico.....	84
18	Colocación del animal en posición cúbito dorsal.....	84
19	Incisión longitudinal sobre la piel: A. Punto de partida porción inferior. B. Extensión hasta labio inferior. C. Separación de la piel y serosa.....	85
20	Incisión longitudinal para acceder a las cavidades abdominal y torácica.....	86
21	A. Disección de músculos mandibulares y liberación de articulaciones temporomandibulares. B. Mandíbula y lengua adosada a piso de boca. C. Sistema cardio – respiratorio.....	87
22	A. Incisión lineal sobre el cráneo. B. Desalojo del Cerebro. C. Cerebro y Cerebelo.....	88
23	Paladar.....	88
24	Riñones, Bazo, Páncreas, Hígado, Pulmones, Corazón, Tráquea, Lengua y Mandíbula.....	89

<b>Fig.</b>		<b>Pág.</b>
25	Fijación por inmersión en formalina tamponada al 10%.	90
26	Muestra de Mucosa Lingual. Epitelio Plano Estratificado Ortoqueratinizado: A. Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos, B. Grupo Control.....	94
27	Muestra de Mucosa Lingual. Acantosis presente en el Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos (A), y ausente en el Grupo Control (B).....	96
28	Muestra de Mucosa Lingual. Hiperplasia Basal presente en el Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos (A), y ausente en el Grupo Control (B).....	98
29	Muestra de Mucosa Lingual. Anisonucleosis en células de la capa presente en el Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos (A), y ausente en el Grupo Control (B).....	100
30	Muestra de Mucosa Lingual. Hiper Cromatismo Nuclear presente en el Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos (A), y ausente en el Grupo Control (B).....	101

<b>Fig.</b>		<b>Pág.</b>
31	Muestra de Mucosa Lingual. Obsérvese Picnosis presente en el Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos: (A) en células de capas basal, parabasal, (B) y en estratos superiores del epitelio.....	103
32	Muestra de Mucosa Lingual. Obsérvese Mitosis presente en el Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos: (A) en células de capa basal (B) y en capa parabasal del epitelio.....	106
33	Muestra de Mucosa Lingual de Grupo Experimental. Obsérvese Patología Epitelial: (A) Hiperplasia epitelial, (B) Displasia epitelial leve, (C) Displasia epitelial moderada.....	109
34	Grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos. Infiltrado inflamatorio Leve.....	112
35	Grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos. Infiltrado inflamatorio Moderado.....	112
36	Muestra de Mucosa Lingual. Obsérvese Vasos sanguíneos en Papilas Dérmicas presente en el Grupo Experimental expuesto al humo de cigarrillos.....	115
37	Muestra de Mandíbula. (A). Grupo expuesto al humo de cigarrillos. (B) Grupo Control.....	117

## X. LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico</b>		<b>Pág.</b>
1	Frecuencia del patrón de queratinización en la Población Animal.....	94
2	Distribución de la presencia de acantosis según el grupo de estudio.....	95
3	Distribución de la Hiperplasia Basal según el grupo de estudio.....	97
4	Distribución de la Anisonucleosis según el grupo de estudio.....	99
5	Distribución del Hiper cromatismo Nuclear según el grupo de estudio.....	101
6	Distribución de la presencia de picnosis según los grupos de estudio.....	103
7	Frecuencia de Mitosis en la población animal.....	105
8	Distribución de la presencia de mitosis según el grupo de estudio.....	105
9	Frecuencia de Patología Epitelial en la población animal de estudio.....	108
10	Distribución de la Patología Epitelial según el grupo de estudio.....	108

<b>Gráfico</b>		<b>Pág.</b>
11	Distribución de la Intensidad del Infiltrado Inflamatorio según el grupo de estudio.....	111
12	Comparación de promedios de vasos sanguíneos entre grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos y grupo control.....	114
13	Comparación de promedios de lagunas óseas entre grupo experimental expuesto al humo de cigarrillos y grupo control.....	116