

BIOMARCADORES PROTEICOS SALIVALES EN UNA POBLACIÓN RURAL EXPUESTA AL ARSÉNICO EN EL AGUA DE CONSUMO EN LA PROVINCIA DE TUCUMÁN (ARGENTINA).



Palabras Claves:

Saliva, Arsénico, Proteínas, Electroforesis.

Key Words:

Salivary, Arsenic, Proteins, Electrophoresis.

Autores:

Analía Graciela Soria *

Rosa Silvina Guber **

Ana Ansonnaud***

Alicia Wierna****

Mauricio Gonzalez Mac Donald *****

*Doctora de la UBA. Profesora Titular. Cátedra de Patología Molecular, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.

**Jefe de Trabajos Prácticos. Cátedra de Patología Molecular, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.

***Magister en Docencia. Profesora Titular Cátedra de Semiología y Clínica Estomatológica. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Tucumán.

****Magister en Docencia. Profesora Adjunta Cátedra de Semiología y Clínica Estomatológica. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Tucumán.

*****Especialista en Periodoncia. Jefe de Trabajos Prácticos. Cátedra de Semiología y Clínica Estomatológica. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Tucumán.

Resumen

El arsénico contamina el agua de consumo en el este de Tucumán. El fluido salival es una secreción de fácil obtención. El objetivo fue analizar biomarcadores proteicos salivales en una población rural expuesta al arsénico en agua de consumo en Tucumán. Estudio de casos y controles, incluyeron voluntarios de departamentos Cruz Alta y Graneros. Se recolectaron 51 muestras de salivas. Se dividieron en: G1, 18 individuos (48+9,4 años), expuesto a As > 0,05 mg/L, y G2, 33 controles no expuestos (49,3+15,2 años). Se determinaron proteínas totales y se identificaron bandas de proteínas. El análisis de datos se realizó con SPSS 23.0. La concentración de proteínas totales fue 6,6+1,9 y 8,7+4,1 mg/L para G1 y G2 respectivamente ($p < 0,022$). Las bandas de proteínas de 6KDa, 20KDa, 27KDa, 42KDa, 56KDa y 103KDa se expresaron en 100% y 84,8%, 16,7% y 15,1%, 27,5% y 21,2%, 33,4% y 30,3% 100% y 100% y 27,5% y 27% para G1 y G2 respectivamente. El área para la banda de 20 KDa fue 0,09+0,03 y 0,15+0,07 ($p < 0,01$) y la de 42 KDa fue 0,08+0,02 y 0,16+0,05 cm² ($p < 0,012$) para G1 y G2 respectivamente. Las patologías orales en tejido blando y duro del G1 fueron expresadas en % (IC95%): periodontitis 55,5% (32,6-78,4), queilitis actínica 50% (27,0-73,0) y dientes veteados 55,5% (32,6-78,4). En el G2 gingivitis 63,6% (47,2-80,0), periodontitis 9,1% (0-18,9) y queratosis friccionales 10% (0-20,0). Se sugiere que la concentración de inmunoglobulina A y amilasa se encuentran disminuida en individuos expuestos, además presentan alto porcentaje de lesiones potencialmente malignas.

Summary

Arsenic contaminates drinking water in eastern Tucumán. Salivary fluid is a secretion easily obtained. The objective was to analyze salivary protein biomarkers in a rural population exposed to arsenic in drinking water in Tucumán. Study of cases and controls, included volunteers from departments Cruz Alta and Graneros. 51 saliva samples were collected. They were divided into: G1, 18 individuals (48+9.4 years), exposed to As >0.05 mg/L, and G2, 33 controls not exposed (49.3+15.2 years). Total proteins were determined and protein bands were identified. The data analysis was performed with SPSS 23.0. The concentration of total proteins was 6.6+1.9 and 8.7+4.1 mg/L for G1 and G2 respectively ($p < 0.022$). The protein bands of 6KDa, 20KDa, 27KDa, 42KDa, 56KDa and 103KDa were expressed in 100% and 84.8%, 16.7% and 15.1%, 27.5% and 21.2%, 33.4% and 30.3% 100% and 100% and 27.5% and 27% for G1 and G2 respectively. The area for the 20 KDa band was 0.09+0.03 and 0.15+0.07 ($p < 0.01$) and the 42 KDa was 0.08+0.02 and 0.16+0.05 cm² ($p < 0.012$) for G1 and G2 respectively. Oral pathologies in soft and hard tissues of the G1 were expressed in % (95%CI): periodontitis 55.5% (32.6-78.4), actinic cheilitis 50% (27.0-73.0) and veined teeth 55.5% (32.6-78.4). In G2, 63.6% gingivitis (47.2-80.0), periodontitis 9.1% (0-18.9) and frictional keratosis 10% (0-20.0). It is suggested that the concentration of immunoglobulin A and amylase decrease in exposed individuals. In addition, they present a high percentage of potentially malignant lesions.

Introducción

En el Este de la provincia de Tucumán el arsenicismo crónico configura un grave problema de salud pública y de alta importancia social que incide en comunidades pobres y con un nivel de instrucción limitado. El Arsénico llega al organismo a través de agua contaminada, lo que implica que grandes grupos poblacionales pueden ser afectados por sus efectos nocivos, a medida que se acumula en el organismo (1).

En relación a su letalidad potencial, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, clasifica al As como carcinógeno del grupo A (2) y el Centro de Investigaciones sobre Cáncer lo incluye en el grupo I indicando en ambos casos que el agente es carcinógeno para los seres humanos (3). El consumo del metaloide en agua de bebida durante largos períodos de tiempo se ha asociado a una enfermedad denominada Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE), que se caracteriza por presentar lesiones en piel (leucomelanodermia y/o queratosis), cáncer de piel, pulmón, vejiga, riñón, entre otros, alteraciones en el desarrollo, afecciones cardiovasculares, neurotoxicidad y diabetes (4). Algunos autores la han definido como una enfermedad social, que afecta a la población más deprimida de las áreas rurales que no tiene acceso al agua potable de red (5).

Se denomina cáncer bucal (CB) a todo crecimiento de tejido, autónomo e irreversible que tiende a realizar metástasis a distancia y compromete la vida del individuo, librado a su evolución natural. Afecta con mayor frecuencia, bordes laterales de lengua, encía y labio inferior. Con menor frecuencia, piso de boca, paladar, mucosas yugales y labio superior. El CB es un serio problema de salud pública, que causa gran morbilidad y mortalidad no habiendo mejorado en las últimas décadas (6). La boca es un órgano accesible para ser examinado, el odontólogo entrenado puede detectar los factores de riesgo, lesiones potencialmente malignas y el cáncer en sus primeros estadios, con maniobras sencillas y poco invasivas. Los cánceres diagnosticados a tiempo tienen alrededor del 90% de supervivencia a los 5 años. Los factores de riesgo más importantes son el hábito de fumar, el alcoholismo, la presencia de elementos dentarios o protésicos en mal estado que provocan traumatismos o heridas crónicas en las mucosas, la presencia de focos infecciosos, infecciones por ciertos tipos de virus, como el Virus del Papiloma Humano y la exposición al sol, sin la protección adecuada (semimucosa labial inferior) (7).

La búsqueda de nuevos biomarcadores en fluidos se refiere a identificar especies moleculares presentes en estados patológicos y que no se encuentran en controles normales. La saliva constituye una buena alternativa

de muestra por la accesibilidad, su obtención no es cruenta, por el bajo costo de la recolección, pudiendo ser una herramienta valiosa para el diagnóstico, y para monitorizar la evolución y el tratamiento de enfermedades orales y sistémicas. La contribución única de líquido gingival permite que en la saliva se encuentren marcadores que derivan de la circulación (8). Las proteínas desempeñan un papel central en la función de las células y la estructura celular. Algunos cambios en el perfil de las proteínas que se producen durante la condición patológica podrían conducir al descubrimiento de nuevos biomarcadores y nuevas estrategias para la mejora de la detección y el diagnóstico de cáncer bucal. El análisis de saliva en el diagnóstico del riesgo de padecer caries es bien conocida, las candidiasis pueden diagnosticarse por la presencia de *Cándida spp* en la saliva y otras bacterias periodontopatógenas (9). En algunas enfermedades malignas, existen marcadores que pueden ser detectados en la saliva como la presencia de anticuerpos contra la proteína p53 en pacientes con carcinoma oral de células escamosas (10). Es por ello que se propone realizar un estudio de la composición proteica de la saliva en individuos expuestos y no expuestos, correlacionar los resultados con el diagnóstico clínico. El objetivo de este estudio fue analizar la utilidad de la concentración de proteínas totales y el perfil electroforético en saliva humana como biomarcadores en una población rural expuesta a niveles elevados de Arsénico en el agua de consumo y determinar su asociación con patologías bucales.

Materiales y Métodos

Estudio observacional, analítico de corte transversal, de casos y controles con admisión desde Mayo 2015 a Diciembre de 2017, que incluyeron a voluntarios de los departamentos de Graneros y Cruz Alta (Tucumán). En la Figura 1 se muestran las localidades donde se trabajó. En las zonas de trabajo hay unidades docentes asistenciales permanentes. Se citan a los voluntarios y se les garantiza la confiabilidad de los datos solicitados y de los resultados analizados, debiendo firmar el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética en Investigación. Criterios de inclusión: pacientes de ambos sexos mayores de edad. Criterios de Exclusión: incapacidad física o mental que impide que realicen de manera confiable la entrevista, pacientes con patologías sistémicas al momento de la entrevista, hepáticas, pancreáticas, renales, anemias, distrofias musculares, estados inflamatorios agudos o crónicos, lupus, diabetes, consumo de narcóticos o aspirinas, que estén recibiendo quimioterapia o radioterapia sistémica, enfermedades virósicas recientes y depresión. Se incluyeron a 51 personas de ambos sexos. Los participantes concurren con una muestra de agua del pozo domiciliario. Las muestras de agua fueron remitidas para la determinación de la concentración de Arsénico

por el método colorimétrico de Gutzei cuantitativo considerándose grupo expuesto (G1) cuando los niveles fueron superiores a 0,05 mg/L. El nivel promedio medido de As en el agua fue de 0,180+0,36 mg/L (0,05-3,16 mg/L). El G1 estuvo conformado por 18 individuos (9 mujeres y 9 varones, 48+9,4 años) y G2, 33 controles sanos no expuestos a niveles elevados de arsénico (17 mujeres y 16 varones, 49,3+15,2 años) (Figura 2). En las entrevistas se consignaron datos demográficos, socio económicos y personales, historia de permanencia en el lugar, consumo de tabaco y alcohol, historia familiar de cáncer, enfermedades previas, el tiempo de exposición al arsénico y el tipo de provisión de agua para consumo.



FIGURA 1: Departamentos de Cruz Alta y Graneros donde se trabajó.

Figura 2: Población estudiada en los departamentos de Granero y Cruz Alta de la Provincia de Tucumán (n° 51)

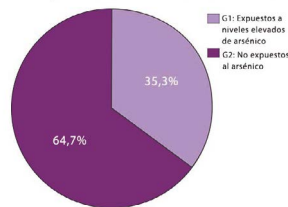


FIGURA 2: Población estudiada de Cruz Alta y Graneros (n=51)

Se realizó la exploración clínica gingivoperiodontal. En los casos que así lo requirieron, y con el consentimiento informado del paciente se realizaron biopsias con punch y bisturí cruento. Se obtuvieron las muestras de saliva total de los participantes en ayuno. Los pacientes salivaron durante cinco minutos en recipientes estériles de plástico. Las muestras se guardaron a -20°C hasta el momento de su procesamiento. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford. La electroforesis fue realizada con Mini-Protean II (Bio-Rad) (Figura 3). El peso molecular de cada fracción de proteína se determinó mediante el uso de marcadores de peso molecular premarcado estándar (Bio-Rad).



FIGURA 3 Mini-Protean II e insumos utilizados para realización de la electroforesis en gel (Bio-Rad).

Los gels de electroforesis fueron digitalizados y sus bandas medidas mediante perfiles densitométricos a través del software de procesamiento digital de imágenes ImageTool. Análisis estadístico: Se utilizó el programa SPSS versión 23.0 para el análisis estadístico. El nivel de significancia considerado para todos los test es $p < 0.05$.

Resultados

Las características demográficas de la población rural atendida fueron: Alfabetización: Educación básica incompleta 49,8% (IC95% 36,1-63,5). Características sociales: casados: 47,3% (IC95% 33,6-61,0), Solos: 43,8% (IC95% 30,2-57,4). En pareja: 8,9% (IC95% 1,1-16,7). Percepción económica: Regular 40% (IC95% 26,6-53,4). Mala: 40% (IC95% 26,6-53,4). Desarrollo de actividad laboral: Jornaleros: 42,3% (IC95% 28,8-55,8). Jubilados 27,7% (IC95% 15,5-39,9). De lo expuesto podemos inferir que la población en riesgo es vulnerable y además no tienen acceso al sistema de salud por lo que la atención y vigilancia de las patologías buco-dentales para determinar las condiciones bucales no son frecuentes. Se determinaron en pacientes de ambos grupos la concentración de Proteínas Totales, siendo 6,6+1,9 y 8,7+4,1 mg/L para el G1 y G2 respectivamente. Las diferencias en la concentración de las proteínas fueron estadísticamente significativas ($p < 0,022$). Se realizaron las corridas en gels de poliacrilamida. La Figura 4 muestra un ejemplo de las diferentes bandas de proteínas obtenidas con la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

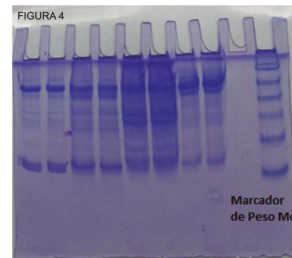


FIGURA 4 Gel de poliacrilamida donde se observa la corrida electroforética de pacientes.

En la Tabla I se puede observar la expresión de las bandas de proteínas en el G1 y G2. Se pueden observar diferencias en la expresión de las bandas 6KDa pero no hubo asociación estadísticamente significativa. Estas bandas corresponderían a la Estaterina quien tiene como función la remineralización que presenta la saliva y la colonización bacteriana, en la superficie del diente, durante la formación de la placa dental. La Tabla II muestra los promedios (+DS) de las áreas de las bandas expresadas en ambos grupos.

GRUPOS/BANDAS	G1 % (IC95)	G2 % (IC95)
6 KDa	100	84,8 (72,6-97,0)
20 KDa	16,7 (0-33,9)	15,1 (2,9-27,3)
27 KDa	27,5 (6,9-48,1)	21,2 (7,3-35,1)
42 KDa	33,4 (11,6-55,2)	30,3 (14,6-46,0)
56 KDa	100	100
103 KDa	27,5 (6,9-48,1)	27 (12-42)

TABLA I: Porcentajes de las bandas de proteínas expresadas en G1 y G2.

GRUPOS/BANDAS	G1 (x±DS cm²)	G2 (x±DS cm²)
6 KDa	0,18±0,12	0,20±0,09
20 KDa	0,09±0,03	0,15±0,07
27 KDa	0,13±0,05	0,14±0,09
42 KDa	0,08±0,02	0,16±0,05
56 KDa	0,22±0,09	0,19±0,10
103 KDa	0,09±0,01	0,095±0,02

TABLA II: Promedios de áreas de las bandas en los grupos G1 y G2.

El área de la banda 20KDa fue 0,09+0,03 y 0,15+0,07 cm² para el G1 y G2 respectivamente, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Esta banda corresponde a la Inmunoglobulina A con funciones antimicrobianas.

El área de la banda 42 KDa fue 0,08+0,02 y 0,16+0,05 cm² para el G1 y G2 respectivamente, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,012$). Esta banda corresponde a la amilasa, enzima cuya función consiste en la digestión bucal del almidón proveniente de la dieta. Asimismo, puede restringir el crecimiento de algunas especies de bacterias.

Las patologías orales encontradas del grupo expuesto fueron periodontitis crónica 55,5%(32,6-78,4) es una causa muy frecuente de pérdida de dientes, queilitis tipo actínica 50% (27,0-73,0) considerada como un trastorno potencialmente maligno (22) y dientes veteados 55,5% (32,6-78,4). En el grupo no expuesto las patologías encontradas fueron gingivitis asociada a placa bacteriana 63,6% (47,2-80,0); periodontitis crónica 9,1% (0-18,9) y queratosis friccionales en rebordes edéntulos 10% (0-20,0) principalmente (Figura 5). En la Figura 6, 7 y 8 se pueden observar las lesiones detalladas.

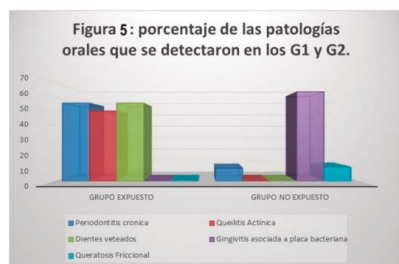


FIGURA 5: Porcentajes de las patologías orales que se detectaron en el G1 y G2.



FIGURA 6: Paciente expuesto al Arsénico con dientes veteados.



FIGURA 7: Paciente expuesto al Arsénico con Periodontitis crónica.



FIGURA 8: Paciente expuesto al Arsénico con Queilitis Actínica.

Discusión

Este estudio analiza la utilidad de la concentración de proteínas totales y el perfil electroforético en saliva humana como biomarcadores en una población

rural expuesta a niveles elevados de arsénico en el agua de consumo y determina su asociación con patologías bucales. Los indicadores socio-demográficos encontrados son similares a los de otros países pobres del mundo (11). Según el censo nacional de población, hogares y viviendas 2010, Graneros es el departamento con mayor necesidades básicas insatisfechas (28%), Cruz Alta ocupa el séptimo lugar (20,6%).

Aproximadamente el 50% de los hogares rurales incluidos en este trabajo son pobres, siendo la principal actividad económica la agricultura, pero las tecnologías agrícolas no son adecuadas y la producción depende del clima.

A esta situación debemos agregar otra problemática que es la contaminación del agua de consumo con arsénico. En este trabajo se recolectaron muestras de agua de consumo de los departamentos de Graneros y Cruz Alta de la provincia de Tucumán considerados de riesgo por estar localizados en la zona este. El 35,3% de las muestras de agua tenían niveles mayores a los permitidos por el Código Alimentario Argentino, siendo hasta 63 veces superiores, lo que está de acuerdo con lo encontrado por otros autores (1,12).

Debemos considerar que el arsénico y sus compuestos han sido clasificados como cancerígenos para los seres humanos. Los efectos en la salud resultantes a la exposición con el metaloide varían dependiendo de la ruta de exposición, dosis, duración de la exposición, el tiempo de vida y la genética (13).

El arsénico es un agente genotóxico y clastogénico; esto es, que puede provocar daños de distintas clases y magnitudes en los cromosomas; en pocas palabras, afecta multifactorialmente el ADN. El consumo crónico de arsénico en el agua de bebida puede afectar las glándulas salivales modificando la concentración y la expresión de las proteínas que componen la saliva. En este estudio se encontró una disminución de la concentración de proteínas totales en la saliva del grupo expuesto, las cuales son imprescindibles para mantener el estado de salud de los tejidos bucales.

No existen antecedentes en la literatura acerca de una disminución en la concentración de proteínas salivales como consecuencia de la ingesta crónica de arsénico en el agua de consumo. Si se estudió en otros grupos de pacientes, como en jóvenes consumidores sociales de alcohol donde se encontró que la concentración de proteínas totales en saliva estaba significativamente disminuida (14).

En la saliva de pacientes con carcinoma bucal de células escamosas se encontraron niveles significativamente

mayores que en pacientes con lesiones potencialmente malignas y controles sanos (15). Estos hallazgos son consistentes con otros estudios (16,17) y se contraponen con lo encontrado por otros autores (18). La concentración de proteínas totales también fueron estudiadas en pacientes con caries habiéndose encontrado niveles significativamente mayores (19).

Estas diferencias pueden atribuirse a las diferentes metodologías utilizadas por lo que los resultados no son fácilmente comparables. El perfil de proteínas salivales mostró menor concentración de la inmunoglobulina A (proteína de 20 KDa) en el grupo expuesto. Las inmunoglobulinas son esenciales para combatir las enfermedades infecciosas, aunque niveles muy altos pueden indicar una patología subyacente.

Las mayores tasas de secreción de Inmunoglobulina A fueron asociadas con un menor riesgo de muerte por cáncer (20). Estudios recientes demostraron que la concentración de inmunoglobulina A disminuyó marcadamente en la saliva de pacientes con cáncer oral pero no mostró asociación con el estadio clínico, grado y tipo histológico y metástasis ganglionar (21).

La concentración de la amilasa (proteína de 42 KDa) es significativamente menor. Esta enzima es uno de los componentes más abundantes en la saliva, representa el 10-20% del contenido total de proteína, es importante en la digestión de los carbohidratos que ingerimos con la dieta. La enzima amilasa salival se considera como confiable para determinar la funcionalidad de la célula serosa. Se demostró que no había diferencia entre los niveles de amilasa salival en personas sanas y pacientes con cáncer oral (22).

Estos hallazgos no están de acuerdo con otro trabajo en el que encontraron una reducción en los niveles de amilasa salival que puede ser causada por la disfunción de las células serosas en la glándula parótida (15).

Las lesiones potencialmente malignas fueron descritas por la OMS como aquel tejido de morfología alterada con mayor predisposición a la cancerización (superior al 5%) que el tejido equivalente de apariencia normal, independientemente de sus características clínicas o histológicas. Es un estado reversible y no implica necesariamente el desarrollo de un cáncer. Las lesiones potencialmente malignas de la cavidad bucal son leucoplasia, eritroplasia, liquen plano, fibrosis submucosa, queilitis actínica, úlcera traumática (23).

Los estados potencialmente malignos son aquellos en que el paciente tiene un riesgo mayor de desarrollar un cáncer por cigarrillo, alcohol, sífilis, Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE). Es así que en

Bangladesh que tiene aguas subterráneas contaminadas con arsénico y otros factores de riesgo se predice que el cáncer será en las próximas décadas una de las principales causas de morbi-mortalidad. El cáncer de cavidad bucal ocupa el segundo lugar más prevalente en los hombres y el tercer lugar en las mujeres.

Es así que se ha desarrollado una Estrategia Nacional de Control del Cáncer y un Plan de Acción con el objetivo de ofrecer un servicio universal basado en la calidad y atención oportuna intentando que esta problemática se trate eficaz y eficientemente con toma de decisiones basada en la evidencia (24).

En Taiwán, además de los factores de riesgo establecidos, fumar cigarrillos y masticar betel, el arsénico y el níquel son considerados nuevos factores de riesgo para el cáncer oral (25). En la provincia de Córdoba (Argentina) se documentó un paciente residente de una zona rural arsenical que presentó lesiones carcinomatosas múltiples de localización bucal (26).

En la población aquí estudiada, al 50% de los pacientes expuestos a niveles elevados de arsénico en el agua de consumo se les diagnosticó queilitis actínica. El arsénico y la exposición en forma prolongada a los rayos solares podría modificar esta lesión potencialmente maligna.

Los pacientes incluidos en este trabajo se encontrarían bajo riesgo de desarrollar cáncer bucal por lo que deberían recibir tratamiento y realizar el seguimiento correspondiente. Finalmente se debe concientizar a la población local sobre la importancia de su participación en el mantenimiento de su propia salud bucal y controlar los factores de riesgo a los que están expuestos.

Conclusión:

Si bien los resultados de este estudio son preliminares, sugiere que la concentración de las proteínas totales, la inmunoglobulina A y la amilasa se encuentran disminuida en los individuos expuestos quienes además presentan un alto porcentaje de lesiones potencialmente malignas. La electroforesis en geles de poliacrilamida es una técnica relativamente simple, que requiere muy poca muestra de saliva, siendo esta de fácil obtención y de bajo costo.

Agradecimiento:

Este trabajo fue financiado por la Secretaria de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional de Tucumán. Proyecto D 633. Agradecemos la colaboración de las siguientes instituciones: Facultad de Medicina, Unidad de Practica Final Obligatoria. Centro de Atención Primaria de la Salud de Graneros y Los Pereyra.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guber, R.S., Tefaha, L., Arias, N.N., Sandoval, N.G., Toledo, R., Fernández, M.,... Soria de González, A. Contenido de arsénico en el agua de consumo en Leales y Graneros (Provincia de Tucumán-Argentina). *Acta BioquímClinLatinoam*, (2009). 43,201-7.
2. United States Environmental Protection Agency (US EPA). *Arsenic, Inorganic*. Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System; Washington, DC, USA: CASRN (1993). 7440-38-2.
3. International Agency for Research on Cancer, 2012.
4. Villaamil Lepori, E. C. Hidroarsenicismo crónico regional endémico en Argentina. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, (2015) 49(1), 83-104.
5. García, S. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones-PRECOTOX. Módulo de Capacitación para Atención Primaria. HACRE. (2011).
6. Montero, P. y Patel, S. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am*, (2015) 24(3), 491-508.
7. Sankeshwari, R., Ankola, A., Hebbal, M., Muttagi, S. y Rawal, N. Awareness regarding oral cancer and oral precancerous lesions among rural population of Belgaum district, India. *Glob Health Promot*, (2015) 23(3), 27-35.
8. Wang, A., Wang, C., Tu, M., y Wong, D. Oral Biofluid Biomarker Research: Current Status and Emerging Frontiers. *Diagnostics*, (2016)6(4), 45-60.
9. Podzimek, S., Vondrackova, L., Duskova, J., Janatova, T. y Broukal, Z. Salivary Markers for Periodontal and General Diseases. *Dis Markers*, (2016)2016:1-8.
10. Mewara, A., Gadbail, A.R., Patil, S., Chaudhary, M. y Chavhan, S, D. C-deletion mutation of the p53 gene at exon 4 of codon 63 in the saliva of oral squamous cell carcinoma in central India: a preliminary study. *J Investig Clin Dent*,(2010) 1,108-13.
11. Sacoar, C., Payne, B., Augusto, O., Vilanculo, F., Nhacolo, A., Vidler, M the CLIP Working Group. Health and socio-demographic profile of women of reproductive age in rural communities of southern Mozambique. *PLoS ONE*, (2018)13(2), e0184249.
12. Gerstenfeld, S., Jordán, A., Calli, R., Fariás, P., Malica, J., Gómez Peña, M. L. y Flores Ivaldi, E. Determinación de zonas de riesgo al agua arsenical y prevalencia de HACRE en Villa Belgrano, Tucumán, Argentina. *Rev. Argent. Salud Pública*, (2012)3(10), 24-29.
13. WHO (World Health Organization) Exposure to arsenic: A major public health concern. *Public Health and Environment*, Geneva, (2010)1-5.
14. Actis, A. B., Simbrón, A., Brunotto, M., y Gómez de Ferraris, M. E. Concentración de proteínas totales en saliva de jóvenes consumidores sociales de alcohol. *Acta Odontológica Venezolana*,(2006)44(2), 171-175.
15. Awasthi N. Role of salivary biomarkers in early detection of oral squamous cell carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*,(2017) 60,464-8.
16. Shetty, S.R., Chadha, R., Babu, S., Kumari, S., Bhat, S., y Achalli, S. Salivary lactate dehydrogenase levels in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: A biochemical and clinicopathological study. *J Cancer Res Ther*; (2012) 8(1):S123-5.
17. Dhakar, N., Astekar, M., Jain, M., Saawarn, S., y Saawarn, N. Total sialic acid, total protein and total sugar levels in serum and saliva of oral squamous cell carcinoma patients: A case control study. *Dental Research Journal*, (2013) 10(3), 343-347.
18. Fuchs, P. N., Rogić, D., Vidović-Juras, D., Susić, M., Milenović, A., Brailo, V., y Boras, V. V. Salivary analytes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Coll Antropol*, (2011) 35(2), 359-62.
19. Pandey, P., Reddy, N. V., Rao, V. A. P., Saxena, A., y Chaudhary, C. P. Estimation of salivary flow rate, pH, buffer capacity, calcium, total protein content and total antioxidant capacity in relation to dental caries severity, age and gender. *Contemporary Clinical Dentistry*. (2015) 6, S65-S71.
20. Phillips, A. C., Carroll, D., Drayson, M. T., y Der, G. Salivary Immunoglobulin A Secretion Rate Is Negatively Associated with Cancer Mortality: The West of Scotland Twenty-07 Study. *PLoS ONE*, (2015)10(12), e0145083.
21. Zhang, S., Zhang, X., Yin, K., Li, T., Bao, Y. y Chen, Z. Variation and significance of secretory immunoglobulin A, interleukin 6 and dendritic cells in oral cancer. *Oncology Letters*, (2017)13(4), 2297-2303.
22. Ramya, A. S., Uppala, D., Majumdar, S., Surekha, C., y Deepak, K. G. K. Are salivary amylase and pH-Prognostic indicators of cancers? *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, (2015) 5(2),81-85.
23. Yang, E.C., Tan, M.T., Schwarz, R.A., Richards-Kortum, R.R., Gillenwater, A.M., y Vigneswaran N. Noninvasive diagnostic adjuncts for the evaluation of potentially premalignant oral epithelial lesions: current limitations and future directions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, (2018)125(6),670-681.
24. Hussain, S.A. y Sullivan, R. Cancer control in Bangladesh. *Jpn J Clin Oncol*, (2013)43, 1159-69.
25. Su, Ch., Lin, Y.Y., Chang, T-K., Chiang, C-T., Chung, J-A., Hsu, Y-Y. y Lian, B. Incidence of oral cancer in relation to nickel and arsenic concentrations in farm soils of patient's residential areas in Taiwan. *BMC Public Health*,(2010),10,67-77.
26. Carrica, V. Carcinomatosis múltiple de localización bucal en un paciente de zona de Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE). *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba*, (2006)63(2), 20-24.