



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

**Estudio del Efecto de la Apigenina, Ácido Carnósico,
Paclitaxel y 5-fluorouracilo, sobre la Viabilidad, Ciclo
Celular y Apoptosis de las Líneas Celulares PE/CA-
PJ15 y HaCaT**

D. David Mora Montoya

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Línea de investigación: Carcinogénesis: patología experimental

TESIS DOCTORAL

“Estudio del efecto de la apigenina, ácido carnósico, paclitaxel y 5-fluorouracilo, sobre la viabilidad, ciclo celular y apoptosis de las líneas celulares PE/CA-PJ15 y HaCaT”

DAVID MORA MONTOYA

DIRECTORES:

DR. FRANCISCO J. GÓMEZ GARCÍA

DRA. MARÍA PÌA LÓPEZ JORNET

PROGRAMA DE DOCTORADO

EN ENVEJECIMIENTO

2017

Agradecimientos

Durante la realización de esta tesis; he tenido la oportunidad de conocer muchas personas que me han ayudado en este largo camino, y otras tantas personas que de una u otra manera siempre han estado presentes en mi vida, a todos ellos quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

A mi Director Dr. Francisco J. Gómez García por nunca perder la fe en mí, por su paciencia, por su disponibilidad, por recibirme siempre con una sonrisa a pesar de que fuera un día difícil, por motivarme para hacer un buen trabajo y simplemente por ser mi amigo.

A mi Directora Dra. Pía López Jornet por su apoyo, motivación, ayuda y disponibilidad en todo momento.

A Vicente V. Ortega, por su gran pasión por la enseñanza, por abrirme las puertas a su grupo de investigación.

A Alberto Martínez por enseñarme a dar los primeros pasos en el laboratorio y compartir todos sus TIPS para un trabajo perfecto.

A Manolo compañero y amigo de master, por su ayuda en todas las gestiones administrativas en el departamento de Anatomía Patológica.

A todo el personal del Servicio de Apoyo a la Investigación(SAI), en especial a Toñi, Dori, Juana, Pepe y Vero; por sus enseñanzas, buena disponibilidad y por ayudarme a poner a punto los experimentos.

A mis compañeros de la Universidad CES: Dra. Piedad Agudelo, Dra. Lina Yassin y a la Dra. Lina María Salazar; por acogerme, y por la excelente formación académica que me dieron durante mi estancia.

A mi madre Amparo Montoya y a mi padre Edgar Carmona por creer siempre en mí; porque a pesar de la distancia, siempre han estado presentes brindándome su apoyo y ayudándome en los momentos difíciles

A mi novia Martina Giannotti por motivarme siempre a continuar, por la ayuda en los momentos difíciles, por aguantarme y quererme mucho.

A mi hermana Natalia Guzmán por sus consejos y enseñanzas, por apoyarme siempre en todo, por hacer posible lo imposible y por creer siempre en mí.

A mi hermano David Saldarriaga, porque a pesar de la distancia siempre está presente y cuento incondicionalmente con su ayuda.

A mi amigo Trinitario Casanova por su apoyo, consejos, palabras de motivación, por enseñarme que se aprende más de los errores que de los aciertos y trabajar fuerte por lo que se desea.

A mi abuela, tíos y primos por el inmenso cariño que siempre me dan, por estar pendientes de cada paso que doy. Los quiero a todos un montón.

A Mapi por la ayuda y motivación con la tesis, a Fran por sacarme de casa a oxigenar las neuronas y fundirme las piernas en la bici.

A mis amigos, compañeros de laboratorio y grupo afterwork, porque sois amigos de verdad, por la ayuda y las palabras de aliento en los momentos difíciles y por las sonrisas en los momentos buenos.

A Dios que lo hace todo posible y cuida de todos. Gracias a Él esto ha concluido.

INDICE

RESUMEN.....	9
I. INTRODUCCION.....	12
1. Cáncer.....	15
a. Incidencia cáncer oral.....	16
b. Factores de riesgo.....	18
c. Características clínicas y localización.....	24
d. Anatomía Patológica.....	25
e. Diagnostico.....	28
f. Pronostico.....	31
g. Tratamiento cáncer oral.....	32
• 5-fluorouracilo.....	41
• Paclitaxel.....	47
2. Antioxidantes.....	50
3. Polifenoles.....	52
4. Apigenina.....	57
5. Ácido Carnósico.....	59
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....	61
III. MATERIAL Y METODOS.....	65
1. Cultivos celulares.....	67
a. Línea Celular.....	67
b. Método de cultivo.....	69
2. Reactivos Y Agentes.....	70
3. Equipos.....	74
4. Procedimiento experimental.....	78
IV. RESULTADOS.....	87
V. DISCUSIÓN.....	111
VI. CONCLUSIONES.....	131
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	133

Estudio del efecto de la apigenina, ácido carnósico, paclitaxel y 5-fluorouracilo, sobre la viabilidad, ciclo celular y apoptosis de las líneas celulares PE/CA-PJ15 y HaCaT

RESUMEN:

Introducción: El cáncer es una enfermedad con una alta incidencia a nivel mundial; la falta de diagnóstico y la detección temprana constituyen una de las principales complicaciones del tratamiento. Actualmente la investigación de nuevos compuestos resulta de vital importancia para la prevención, control y tratamientos más eficaces.

Objetivos: estudiar in vitro el efecto sobre la viabilidad y la proliferación de los compuestos: apigenina, ácido carnósico, 5 Fluorouracil y paclitaxel. Así mismo estudiar la influencia de estas sustancias sobre el ciclo celular y la apoptosis de las líneas celulares HaCaT y PE/CA-PJ15.

Materiales y métodos: Los compuestos: apigenina, ácido Carnósico, 5-fluorouracilo y paclitaxel fueron ensayados a concentraciones de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M sobre la línea no tumoral HaCaT(queratinocitos) y la línea celular tumoral PE/CA-PJ15; y evaluamos los efectos sobre la proliferación celular, mediante la técnica de MTT.

Resultados: Todos los extractos probados presentan en las pruebas de citotoxicidad una correlación, dosis - tiempo de tratamiento – respuesta. En las primeras 24 horas de tratamiento a concentraciones de 1 μ M y 5 μ M la apigenina, el ácido carnósico y el paclitaxel tienen un efecto proliferativo con respecto al control. A partir de las 48 horas y una concentración de 10 μ M se evidencia disminución de la proliferación celular.

Entre los extractos probados el 5-fluorouracilo a una concentración de 5 μ M presenta los mejores resultados tanto en las pruebas de citotoxicidad como en las pruebas de ciclo celular en el que se aprecia su efecto citostático de fase S. ninguno de los compuestos probados arrojó resultados significativos en la prueba de apoptosis.

Conclusión:

El tratamiento con 5-fluorouracilo sobre la línea celular PE/CA-PJ15 de cáncer oral de células escamosas produce una parada del ciclo celular en la fase S, en cuanto a viabilidad celular se consigue IC50 después de 96 horas a una concentración de 5 μ M

Palabras clave: Cáncer oral, PE/CA-PJ15, 5-fluorouracilo, HaCaT, ácido carnósico, apigenina, paclitaxel.

Study of the effect of apigenin, carnosic acid, paclitaxel and 5-fluorouracil on viability, cellular cycle and apoptosis of PE/CA-PJ15 and HaCaT cellular lines

ABSTRACT:

Introduction: Cancer is a disease with a high incidence worldwide; lack of diagnosis and early detection constitute one of the main complications of the treatment. Research on new compounds is now vitally important for prevention, control and more effective treatments of the disease.

Objectives: to study in vitro the effect on the viability and proliferation of the compounds: apigenin, carnosic acid, 5-fluorouracil and paclitaxel. Likewise to study the influence of these substances on cellular cycle and apoptosis of HaCaT and PE/CA-PJ15 cellular lines.

Materials and methods: The compounds: Apigenin, Carnosic Acid, 5-fluorouracil and paclitaxel were assayed at concentrations of 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M on the non-tumor line HaCaT (keratinocytes) and the tumor cellular line PE/CA-PJ15; then the effects on cellular proliferation were evaluated, using the MTT technique.

Results: All the tested extracts present in the cytotoxicity tests a correlation, dose - treatment time - response. In the first 24 hours of treatment at concentrations of 1 μ M and 5 μ M, apigenin, carnosic acid and paclitaxel have a proliferative effect with respect to the control. From 48 hours and a concentration of 10 μ M, there is a decrease in cellular proliferation.

Among the extracts tested, 5-fluorouracil at a concentration of 5 μ M shows the best results both in cytotoxicity tests and in the cellular cycle tests, in which its cytostatic effect of S phase is appreciated. None of the tested compounds showed significant results in the apoptosis test.

Conclusion:

Treatment with 5-fluorouracil on the COCE PE/CA-PJ15 cellular line causes a cellular cycle arrest in the S phase, as for cellular viability IC₅₀ is achieved after 96 hours at a concentration of 5 μ M

Key words: Oral cancer, PE/CA-PJ15, 5-fluorouracil, HaCaT, Carnosic Acid, Apigenin, Paclitaxel

I. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

La palabra galénica cáncer se utiliza en nuestros días para referirse a las neoplasias cuyo comportamiento biológico es maligno. El concepto de neoplasia maligna no se ha modificado en los últimos años, pues se refiere al comportamiento biológico del proceso y a las consecuencias que la enfermedad tiene sobre la función, el órgano y la vida del paciente. Los estudios de carcinogénesis demuestran que esta transformación es el resultado de diferentes eventos concatenados y sucesivos que se han definido con la expresión “en múltiples pasos”.

El cáncer actualmente es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, se estima que en 2012 se presentaron unos 14 millones de nuevos casos y en 2015 se ocasiono 8,8 millones de muertes (OMS y Torre 2015).

En España no son más alentadoras las cifras, el último dato actualizado por el Instituto Nacional de Estadística (INE) publicados el 31 de enero de 2014, reportó el cáncer como la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares; se estima para el 2020, un total de 246.713 nuevos casos y 117.859 defunciones.

La falta de diagnóstico y la detección del cáncer en una etapa avanzada constituyen una de las principales complicaciones para el tratamiento de esta enfermedad, además de la falta de recursos económicos y políticas públicas (Ruiz.,2017), se estima que el 70% de las muertes se presentan en países de ingresos medios y bajos. En 2010 el costo total que se le atribuye a esta enfermedad es de 1.16 billones de dólares (Stewart BW.,2014).

Por ser una enfermedad mortal, son cada vez mayores los esfuerzos por hacer detección temprana, diagnósticos precisos y tratamientos menos

invasivos, que mejoren la calidad de vida de los pacientes y el mejor de los casos su total recuperación. Por esta razón la investigación de nuevos compuestos de origen natural resulta de vital importancia para la prevención, control y tratamiento más eficaces contra el cáncer.

a. Incidencia cáncer oral

El carcinoma de cabeza y cuello es el sexto cáncer más frecuente a nivel mundial (Jemal A., 2008 y de Matos.,2012) y es el décimo cáncer más frecuente en España; en países del sudeste Asiático como la india llega a ocupar el quinto puesto (Swerdlow A., 1995 y Tanuja T., 2002).

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) representa más del 90% de los cánceres que afectan a la cavidad oral. Cada año se diagnostican en el mundo más de 575.000 casos nuevos de cáncer oral.

La incidencia de este cáncer en el mundo, para el 2012, fue de 4,0 casos nuevos por 100.000 habitantes: 5,5 casos nuevos por 100.000 hombres y de 2,5 por cada 100.000 mujeres. La mortalidad corresponde, en hombres a 2,7 por cada 100.000 hombres y en mujeres a 1,2 por cada 100.000 mujeres (GLOBOCAN.,2012).

En España, la incidencia de este tipo de cáncer es de 12 a 15 casos/100.000 habitantes/año en varones y de 2 a 4 casos/100.000 habitantes/año en mujeres, y representa entre el 2 y el 3% de todas las muertes por cáncer en España. (GLOBOCAN., 2012).

En 2015 se estima que la incidencia de cáncer oral y faríngeo en España fue de 4980 casos en hombres (ASIRw 12.4) y 1690 casos en mujeres (ASIRw 3.3) (Galceran.,2016).



Ten leading incident cancer types by gender in Spain, 2015. Source: Spanish Network of Cancer Registries (REDECAN)

Los tumores intraorales y orofaríngeos son más comunes en hombres que en mujeres con una relación de 2:1 (Silverman.,1998), atribuida al mayor consumo de tabaco y alcohol en hombres; en cuanto al pronóstico de la enfermedad no hay diferencias significativas.

En cuanto a la edad, el 90% de los cánceres orales se diagnostican en mayores de 40 años, en la última década la incidencia de COCE en pacientes jóvenes parece estar aumentando (Schantz.,2002 y Falaki 2011).

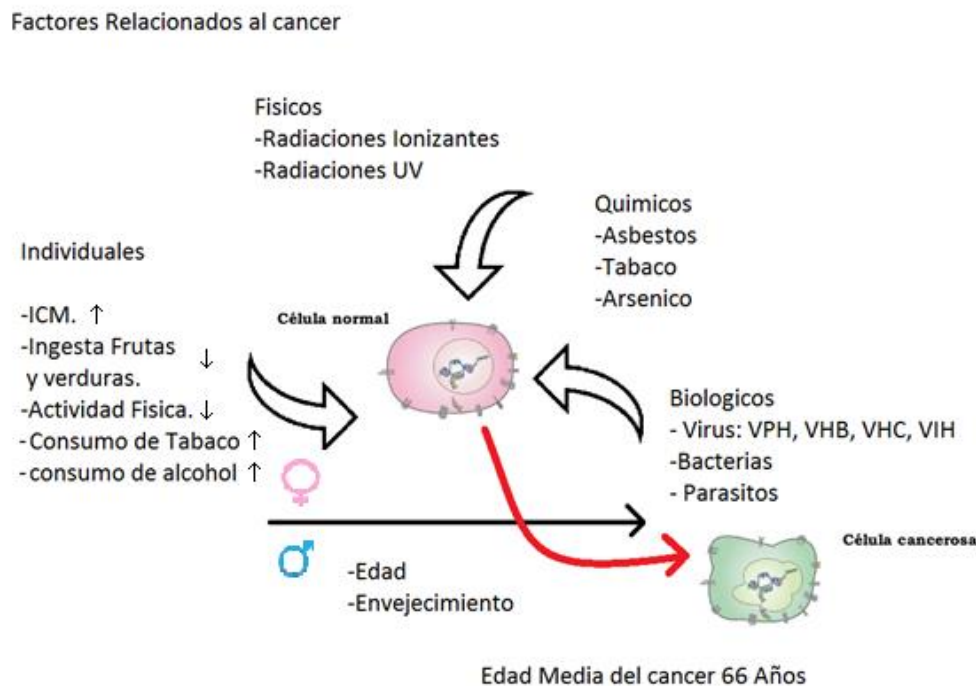
El COCE es una neoplasia epitelial maligna agresiva, es el más frecuente de los tumores de cabeza y cuello, representa alrededor del 3% de los tumores del cuerpo y se le atribuyen más de quinientos mil nuevos casos diagnosticados por año en el mundo (Fan S.,2011).

Tiene un periodo de supervivencia de 5 años, que ha permanecido en menos del 50% en los últimos 30 años. (Neville BW 2002). La baja tasa de supervivencia está asociada a la detección tardía de las lesiones y el alto nivel de recurrencia a nivel local; aunque también puede ocurrir metástasis (Sagheb., 2014).

b. Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo relacionados con la aparición del cáncer encontramos que se da como el resultado de las interacciones genéticas individuales y su relación con tres Agentes externos conocidos como cancerígenos (físicos (Maruccia.,2012), químicos (Rodu.,2004), biológicos (Gillison., 2015)).

Además de estos también se relacionan cinco factores de riesgo directamente relacionados con hábitos personales y nutricionales, también llamados conductuales (índice elevado de masa corporal, baja ingesta de frutas y verduras (Yijian Ding., 2013), falta de actividad física, consumo de tabaco y alcohol (Madani.,2012 y Wyss.,2013). También existen otros dos factores de riesgo que no pueden ser modificados, los cuales son la edad y el sexo (Miller C, 2003)



De estos factores de riesgo hay cuatro que están estrechamente relacionados con la aparición del cáncer oral, estos son: el tabaco, el alcohol, la radiación UV y agentes biológicos (VPH)

- Agentes Químicos

El factor de riesgo más frecuente en la aparición del cáncer bucal es el tabaquismo, ya que el tabaco contiene hasta 50 carcinógenos conocidos, como por ejemplo, hidrocarburos aromáticos, policíclicos y nitrosaminas. Muchas investigaciones han demostrado que más del 95% de los pacientes con carcinoma epidermoide han sido fumadores (Gaurp.,2011).

En un estudio realizado por Nair (Nair.,2016) analizaron 747 pacientes que dividieron en tres grupos, masticadores de tabaco (69,3%), fumadores (19,5%) y los pacientes sin hábitos (11,1%). La mayoría de los fumadores eran hombres (98%). La distribución con respecto al sitio más frecuente de aparición del cáncer reveló que los pacientes con masticación como el único hábito tenían cánceres orales y aquellos que fumaban como el único hábito tenían cáncer laríngeo. En pacientes sin hábitos, se encontró que la lengua era el sitio más común para la aparición de dicha patología.

También se ha demostrado una correlación positiva entre el consumo excesivo de alcohol y el cáncer bucal, de manera que los bebedores frecuentes de bebidas alcohólicas presentan un riesgo 13 veces mayor de adquirir cáncer bucal (Castellsague.,2004 y Hashibe.,2009). El alcohol puede actuar como un disolvente para mejorar la exposición de las mucosas a carcinógenos, pero no es en sí mismo un carcinógeno directo (Mandani.,2012),

Sin embargo, el acetaldehído, un metabolito del alcohol, puede formar aductos de ADN que interfieren con la síntesis y la reparación del ADN (Brooks.,2005). El alcohol se metaboliza en acetaldehído por alcohol deshidrogenasa (ADH) y posteriormente en acetato. Los polimorfismos de la secuencia ADH afectan la actividad enzimática y pueden modular las concentraciones locales de acetaldehído(Visapaa.,2004).

Varios estudios evalúan la relación de las asociaciones entre los genotipos ADH1B / ADH1C / ALDH2 y los niveles de sangre y etanol salivar, en Japón realizaron un estudio con 168 pacientes masculinos en los que se encontró una clara relación del genotipo ADH1B en los alcohólicos(Yokoyama.,2010).

- Agentes físicos

La radiación ultravioleta procedente del sol induce a un aumento de la incidencia del cáncer de piel y es por ello que la exposición periódica al sol es de gran importancia en la aparición del carcinoma epidermoide en los labios (Maruccia.,2012).



Desde los años 50 diferentes investigadores han identificado el total acumulativo de horas de exposición solar como un factor etiológico. Durante el trabajo o actividades al aire con un nivel constante de exposición a lo largo de los años, y es un predictor para el cáncer de labio.

Esto es consistente con los hallazgos sobre la prevalencia de esta patología en personas que realizan tareas agrícolas, forestales y pesqueras. También es coherente con el hecho de que alrededor del 90% de los tumores

aparecen en el labio inferior por ser esta zona más expuesta a la radiación solar directa; luego está el labio superior con un 7% y la comisura labial con un 3%. (de Visser.,1998 y Kerawala.,2017).

- Agentes biológicos

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) también se ha identificado como un factor de riesgo para la COCE, especialmente aquellos que surgen en la orofaringe, que incluye la base de la lengua y la amígdala (Guillison.,2007).

En el carcinoma inducido por VPH, el genoma viral se integra en el genoma de la célula huésped, lo que conduce a una interrupción en las regiones E1 y E2. Esto da lugar a la pérdida de control para la síntesis de proteínas E6 y E7, que a su vez inhibe las funciones de los genes supresores de tumores incluyendo P53 y proteína de retinoblastoma (pRB). La unión de la proteína E7 con pRB causa su inactivación, aumentando consecuentemente la expresión de p16INK4a. La sobreexpresión de p16INK4a impide además la activación de pRB(Agrawal.,2013).

- Genéticos

Cuando existen antecedentes de cáncer en los familiares inmediatos como padres y hermanos, hay un riesgo mayor a padecer neoplasias, se estima que las mutaciones genéticas heredadas desempeñan un papel importante en alrededor de 5 a 10 por ciento de todos los cánceres.

El gen mutado más comúnmente en todos los cánceres es TP53, que produce una proteína que suprime el crecimiento de tumores. Además, las

mutaciones de la línea germinal en este gen pueden causar el síndrome de Li-Fraumeni, un trastorno hereditario raro que conduce a un mayor riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer.

Se han encontrado ramas de algunos cromosomas como el 1 y el 11, donde se repiten alteraciones genéticas cuando hay cáncer bucal (Imai.,2005 y Mallya.,2010).

Los cambios genéticos causantes de cáncer también pueden ser adquiridos durante la vida de una persona, como resultado de errores que ocurren cuando las células se dividen o de la exposición a sustancias, como ciertos químicos en el humo del tabaco o la radiación ultravioleta (Taghavi.,2007).

El desarrollo del carcinoma oral de células escamosas es un proceso de múltiples pasos que requiere la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas, como activación de oncogenes e inactivación de genes supresores tumorales (Williams, 2000). Los oncogenes son una clase de genes promotores del crecimiento, y pueden ser activados por varios mecanismos, incluyendo mutaciones intragénicas, amplificaciones cromosómicas y reordenamientos cromosómicos.

Las mutaciones hereditarias de los genes BRCA1 y BRCA2 están asociadas con el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, que es un trastorno marcado por un mayor riesgo de cáncer de mama y ovario en las mujeres. Varios otros cánceres se han asociado con este síndrome, incluyendo cáncer pancreático y de próstata, así como cáncer de mama masculino (Struewing.,1995).

La frecuencia combinada de las mutaciones en BRCA1 que supone la delección de una adenina y guanina (185delAG) Y la inserción de una

citocina (5382insC) y la mutación en BRCA2 que implica la delección de una timina (6174delT) supera el 2% (Oddoux.,1996).

- Nutricionales

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre el 35 y el 55% de los cánceres, aproximadamente el 15% de los cánceres orofaríngeos son atribuidos a deficiencias o desequilibrios en la dieta.

El efecto de la dieta puede ser directo, a través del efecto acumulativo de la exposición a nutrientes y carcinógenos en los alimentos; En este caso, el equilibrio entre las sustancias protectoras y promotoras del cáncer puede contribuir a definir el riesgo de cáncer (Key.,2004).

También hay maneras indirectas por las cuales la dieta afecta el proceso del cáncer. Estos incluyen los efectos de la dieta sobre el balance energético y el riesgo de obesidad y las respuestas hormonales y metabólicas relacionadas con el balance energético. Algunos autores han revelado que el sobrepeso es un factor de riesgo establecido específicamente para el adenocarcinoma, pero no para el carcinoma de células escamosas (Brown.,1995)

La poca o irregular ingestión de alimentos ricos en vitaminas y minerales (Vitaminas A, C, E, complejo B y minerales como el hierro) favorece a la aparición del cáncer bucal (Bose.,2012). Las frutas y los vegetales frescos son los protectores por excelencia, pues tienen un efecto antioxidante que impide la malignización celular y protegen a los tejidos vitales de las sustancias tóxicas (Pal., 2012).

Otros autores afirman que los papeles relativos de micronutrientes aún no están claros, pero las deficiencias de Riboflavina, folato, vitamina C y zinc pueden ser importantes (IARC.,2002).

También hay pruebas consistentes de que consumir bebidas y alimentos a una temperatura muy alta aumenta el riesgo de estos cánceres (Sharp.,2001).

c. Características clínicas y localización

Características Clínicas Generales	
Síntomas	Frecuentemente asintomáticos o puede presentarse con síntomas vagos y mínimos hallazgos físicos.
Signos	Pequeñas lesiones, con un alto índice de sospecha clínica
Hábitos	Alto consumo de tabaco y alcohol
Hallazgos clínicos	Los pacientes pueden presentar lesiones, rojas, blancas o mixtas, también pueden presentarse placas blancas
características clínicas	Crecimiento mucoso y ulceración, dolor, dolor referido al oído, mal olor de la boca, dificultad para hablar, abrir la boca, masticar, dificultad y dolor al tragar, sangrado, pérdida de peso e hinchazón del cuello.
Ocasionalmente	Agrandamiento de los ganglios del cuello sin síntomas de lesiones orales u orofaríngeas.
cánceres extremadamente avanzados	Crecimiento ulceroproliferativo con áreas de necrosis y extensión a las estructuras, como hueso, músculo y piel.
Etapas terminales	Presenta fístula orocutánea, sangrado intratable, anemia severa y caquexia.

El cáncer puede originarse en cualquier lugar de la cavidad oral; los lugares más comunes para la aparición del COCE son la lengua (25,1%) (Siegel.,2014) y el suelo de la boca (10,2%) (Martinez.,2001), así como el área retromolar (Gerry,. 2002).



Localizacion	Características
Mucosa bucal	Presenta una úlcera con márgenes indurados, crecimiento exofítico o verrugoso Con el lugar de origen dependiendo de la lado preferencial de masticación y colocación del betel. En etapas avanzadas, estas lesiones se infiltran en el área adyacente, hueso y piel.
Lengua	Aparece como una zona roja intercalada con nódulos o como una úlcera profunda infiltrante, produciendo una movilidad reducida de la lengua. Estos tumores son dolorosos.
Suelo de la boca	Aparece como una zona roja, una pequeña úlcera o como una lesión papilar. La mayoría de los pacientes presentan malestar o irritación en el sitio del tumor. En las etapas avanzadas está asociado con babeo.
Labio inferior	Por lo general surgen en el borde bermellón y aparecen como una lesión indurada o ulcerada. Los cánceres del labio superior son raros, a menudo se originan en la piel y se extienden a la mucosa.
Encía	Se presenta generalmente como un crecimiento ulceroproliferativo.

Cresta alveolar	Ocasionalmente puede presentarse como placas asociadas a la prótesis dental o con movilidad de dientes asociados a dolor. También con dientes que presentan sangrado durante el cepillado.
Paladar duro	Frecuentemente se presentan como crecimientos papilares o exofíticos, más bien que una lesión plana o ulcerada.
Paladar blando y úvula	Aparecen como una lesión ulcerosa con Márgenes elevados o como masas con forma de hongo.
Amigdalinos	Generalmente aparece como una lesión exofítica o ulcerosa, a veces pueden presentarse nódulos en el cuello, sin otros signos ni síntomas.
Base de la lengua	Los síntomas se presentan en un estadio avanzado de la enfermedad, en donde se manifiesta como ulcera dolorosa de crecimiento indurado.

d. Anatomía patológica

El epitelio escamoso tiene una progresión normal de maduración celular en capas, se desarrolla desde la membrana basal hacia la superficie, donde eventualmente se desprende.

El cáncer de células escamosas de la mucosa oral puede presentarse como una ulcera con márgenes elevados, indurada, de crecimiento exolítico o verrucoso en algunas ocasiones. En lesiones avanzadas, se aprecia infiltración ósea.

En el tejido afectado por el carcinoma, esta arquitectura se altera y las células muestran características anormales conocidas como atipia, que es visible bajo un microscopio óptico, la comparación entre las células sanas y las células tumorales permite determinar el grado de diferenciación del tumor

El COCE se caracteriza por presentar epitelio con signos de anaplasia dispuesto en cordones o islotes de células pleomórficas, algunas hipercromáticas, mitosis atípicas y abundantes, con aumento de relación núcleo/citoplasma, generalmente nucléolos prominentes, y formación de perlas de queratina.

Estas perlas son más frecuentes en aquellos COCE bien diferenciados, o sea que tienen más parecido con el epitelio de revestimiento, mientras que en aquellos pobremente diferenciados se observan escasas o ausencia de perlas de queratina, epitelio poco parecido al de la mucosa, abundante mitosis, y para poder distinguir de otros tumores indiferenciados es necesario utilizar marcadores de citoqueratina.

Generalmente como la lesión está ulcerada se observa infiltrado linfoplasmocitario entre las células neoplásicas, y en las zonas adyacentes a los tejidos vecinos se puede observar una infiltración con islotes de bordes amplios o dispuestos como en hileras, siendo de peor pronóstico en estos últimos al igual que en los pobremente diferenciados.

En general el patólogo debe informar acerca de si se trata de un COCE bien diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado (también se ha utilizado en grados (I, II, III y IV); informar si existen células neoplásicas en los bordes quirúrgicos, y evaluar el frente de invasión (o sea determinar en el límite de tejido sano y tumor: grado de pleomorfismo, tipo de islotes que infiltran, grado de inflamación en ese borde y grado de diferenciación).

e. Diagnóstico

Aunque la cavidad oral presenta fácil acceso para la exploración clínica y detección temprana de las lesiones cancerosas, el bajo índice de consultas odontológicas preventivas y las características de dicha patología que normalmente suele ser indolora, puede ser una de las causas del diagnóstico tardío.

Existen algunos parámetros establecidos para la identificación de lesiones en estadios iniciales como lo son: úlceras que no cicatrizan después de dos semanas de observación, tras descartar las posibles causas específicas (trauma, infección), induración o masa que persiste después de dos semanas de observación, dolor local o irradiado a estructuras cercanas, masas o nódulos cervicales.

La única forma de determinar con exactitud el tipo de carcinoma de células escamosas es realizando el estudio histológico de los tejidos afectados (Sciuba.,2001).

Algunas ayudas diagnosticas como las radiografías intra-orales, dentales y ortopantomografía, puede ayudar a identificar si hay compromiso de los huesos subyacentes, también es posible hacerlo de forma tridimensional utilizando tomografía computarizada (TC) Y la resonancia magnética (MRI), las cuales permiten determinar más La extensión local de la enfermedad y también Ayudar a identificar las metástasis de los ganglios linfáticos.

La tomografía computarizada es útil para evaluar compromiso del hueso cortical, mientras que la RM es más Información al evaluar el tejido blando y neurovascular consiguiendo así una adecuada caracterización anatómica lo que les convierte en valiosas herramientas.

Una vez confirmado el diagnóstico es importante realizar la clasificación TNM y determinar otros parámetros como los, márgenes de resección positivos o insuficientes, existencia de infiltración perineural del tumor y extensión extracapsular ganglionar. En base a esto se puede realizar un adecuado diagnóstico, pronóstico y por consiguiente plantear la mejor opción de tratamiento.

En el seguimiento clínico y terapéutico de los pacientes se emplea la clasificación TNM: T (Tamaño del tumor primario); N (Presencia de ganglios linfáticos); M (Metástasis a distancia).

Clasificación TNM de carcinomas de la cavidad oral

Tumor Primario (T)	
TX	Tumor Primario no puede ser evaluado
T0	No evidencia de Tumor Primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor de 2cm o menos en su dimensión mayor
T2	Tumor de más de 2cm y menos de 4cm en su dimensión mayor
T3	Tumor de más de 4 cm en su dimensión mayor
T4a (labio)	El tumor invade a través del hueso cortical, nervio alveolar inferior, piso de la boca o la piel (barbilla o nariz)
T4a (Cavidad Oral)	El tumor invade a través del hueso cortical, en el músculo profundo / extrínseco de la lengua (Geniogloso, Hiogloso, Palatogloso y Estilogloso), Seno maxilar o piel de la cara

T4b (Labio y Cavidad Oral)	El tumor invade el espacio masticador, apófisis pterigoides, base del cráneo o recubre la arteria carótida interna.
NOTA	Erosión superficial del hueso / alveolo con periodontitis primaria, no es suficiente para clasificar un tumor como T4.

Ganglios Linfáticos (N)	
NX	No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales
N0	No metástasis ganglios regionales
N1	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral de 3cms o menos en su mayor dimensión
N2	Metástasis según se especifica en N2a, 2b, 2c
N2a	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral, de más de 3 cm No más de 6 cm en su mayor dimensión
N2b	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno más de 6 cm en su mayor dimensión
N2c	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno más De 6 cm en su mayor dimensión
N3	Metástasis en un ganglio linfático de más de 6 cm en su mayor dimensión
Los nódulos de la línea media se consideran nodos ipsilaterales.	

Metástasis (M)	
MX	La metástasis a distancia no puede ser evaluada
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Estadio por etapas			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	NO	M0
Estadio II	T2	NO	M0
Estadio III	T1,T2	N1	M0
	T3	NO,N1	M0
Estadio IVA	T1,T2,T3	N2	M0
	T4a	N0,N1,N2	M0
Estadio IVB	Cualquier T	N3	M0
	T4b	Cualquier N	M0
Estadio IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1

El factor más importante en la supervivencia es la etapa de la enfermedad en que se diagnostica; los estadios I y II engloban el período inicial, donde la tasa de supervivencia suele ser elevada, mientras que los estadios III y IV representan las fases avanzadas de la enfermedad, donde el pronóstico empeora drásticamente (Sobin.,2002 y Greene.,2002).

f. Pronóstico

En general, se puede obtener una tasa de supervivencia a los 5 años del 50%, aunque algunos sitios anatómicos están asociados con un pronóstico menos favorable que otros.

El pronóstico de los pacientes con cáncer escamocelular de cabeza y cuello, se ve afectado negativamente por el desarrollo de segundos tumores primarios (Chuang.,2008). La tasa de incidencia de los segundos tumores primarios es del 10-35%, dependiendo tanto de la localización del primer tumor primario como de la edad del paciente (Cianfrigkia.,1999)

- Metástasis

El mejor pronóstico para determinar el riesgo de metástasis del cáncer oral, puede determinarse de acuerdo al grado de afectación del cuello, debido a la proximidad que presenta de estructuras linfáticas y grandes venas, lo que facilita su diseminación a órganos diana.

La propagación temprana del cáncer oral y orofaríngeo suele darse a nivel local y linfático. Se ha visto que hasta el 20-50% de los carcinomas epidermoides de lengua en estadio inicial presentan metástasis cervicales ocultas (Preda.,2006); además se ha reconocido por mucho tiempo que pacientes con cáncer oral están en riesgo de segundos tumores en el tracto aerodigestivo superior. Se ha informado que esto ha ocurrido en 10-35% de los casos(Van.,2000).

Sin embargo, su diseminación toma importancia a medida que se mejoran las técnicas de detección y control. Algunos estudios relacionan la propagación del cáncer oral por vía hematogena con tumores secundarios de pulmón (Morris.,2011 y Osaki T.,2000).

g. Tratamiento del cáncer oral

La gran mayoría de los cánceres que se encuentran en la cavidad oral son carcinomas de células escamosas. Este tipo de cáncer de la cavidad oral puede ser tratado con radiación, quimioterapia, cirugía (Sayan.,2016), o terapia combinada(Genden., 2010). La detección temprana del cáncer bucal es fundamental para el éxito del tratamiento, en un porcentaje alto de casos, la falta de identificación de los primeros síntomas de la enfermedad, ocasiona la detección tardía empeorando el diagnóstico, tratamiento y pronóstico que

se relaciona con la disminución de la supervivencia a los cinco años en aproximadamente el 50% de los casos.

- Cirugía

El tratamiento del carcinoma oral de células escamosas va encaminado al control de la enfermedad local o tumor primario y de la enfermedad regional a nivel de los ganglios linfáticos cervicales. Así, la cirugía es una de las primeras medidas terapéuticas. El tratamiento del cuello generalmente está condicionado por el estadio clínico.

Los carcinomas orales metastatizan principalmente en niveles I-III ipsilaterales, por lo que, si decidimos tratar de forma quirúrgica el cuello, se realiza una disección supraomohioidea. En estadios I y II con adenopatías positivas se opta por la disección cervical o radioterapia cervical si este ha sido el tratamiento del tumor primario. La disección cervical en estadios III y IV está indicada, aun siendo N0 (Wu-Long.,2008).

Como consecuencias no deseadas de la cirugía, es posible encontrar cicatrices, fibrosis, deformidades con afectación en la estética facial (maxilectomía o mandibulectomía), comunicación entre cavidades como las oronasales u orosinusales y deterioro de las funciones bucales, como la fonación y la masticación.

- Radioterapia

Es una forma de tratamiento basada en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa). Es uno de los tratamientos más comunes contra distintos tipos de cáncer (cabeza y cuello, vejiga, pulmón, entre otros).

La radioterapia puede administrarse como tratamiento primario tras la cirugía, en combinación con la quimioterapia(Langdon.,1995), o como tratamiento paliativo, especialmente si el tumor es inoperable.

Las dosis necesarias variaran en función de la localización y tipo de tumor aunque la dosis total en tumores de cabeza y cuello oscilará entre los 50 y los 70 Gy en un periodo entre 5 a 7 semanas (Vissink.,2003). Las dosis se fraccionan para dar tiempo a la oxigenación de las células tumorales entre las sesiones y hacerlas más radiosensibles, así como por la diferencia de respuesta de reparación subletal entre el tejido tumoral y los tejidos normales (Cox.,1990). Estas dosis totales se fraccionan en dosis de unos 2 Gy al día, 5 días a la semana (Conger.,1973).

Las fuentes de radiación pueden ser externas e internas. La radioterapia externa da por resultado una superficie más amplia de irradiación hística tendiendo a presentar una menor dosis de radiación por unidad de área. La radioterapia interna o braquiterapia es capaz de proporcionar una exposición de irradiación más alta en un área más pequeña.

Los avances en las técnicas de imágenes de diagnóstico han permitido identificar con gran precisión el área tumoral, y de esta forma delimitar más específicamente la zona irradiada, aumentando la dosis entregada a los tejidos tumorales objetivo y reduciendo la dosis en los tejidos adyacentes no objetivo (Argiris.,2008)

Existe un límite importante en el aumento de las dosis, que lo determina la tolerancia de los tejidos adyacentes normales. Los tejidos con un recambio celular rápido presentarán efectos adversos a la radiación más tempranos que aquellos que tengan un recambio celular lento.

Uno de los objetivos del tratamiento radioterápico del cáncer es aumentar la probabilidad de control del tumor y disminuir la probabilidad de complicaciones en los tejidos normales. Para ello se han creado una serie de estrategias como aplicar las dosis con hiperfraccionamiento o fraccionamiento acelerado y el uso de técnicas de planificación computarizada con una intensidad modulada en cada área (Wu., 2000).

La mucosa oral es altamente susceptible al efecto de la radiación sobre ella provocando alteraciones que, aunque no son graves, pueden resultar molestas. Los efectos de la radioterapia sobre la mucosa comienzan a apreciarse tras una o dos semanas de tratamiento.

Los efectos adversos o secundarios a la radioterapia en los tejidos orales pueden ser agudos como las mucositis o la pérdida del sentido del gusto, o crónicos como la hiposialia, las caries dentales, la aparición de trismos o la osteorradionecrosis.

Los cambios inducidos por la radiación pueden dividirse en 2 grupos: efectos secundarios agudos o tempranos que se manifiestan durante o poco después Tratamiento, afectando mucosas, glándulas salivares y alteración del gusto (Otmami.,2007); Y efectos secundarios tardíos que se desarrollan meses o años después del fin de la radioterapia, que afecta las glándulas salivales, dientes, huesos, músculos y piel (Prott.,2002).

En algunos estudios se h observado que se afectaban fundamentalmente los acinos serosos, existía un infiltrado inflamatorio en el tejido intersticial formado por neutrófilos y eosinófilos en el tejido

intersticial al mismo tiempo que los conductos glandulares se dilataban. Los acinos mucosos en cambio presentaban pocos cambios estructurales. El resultado final del daño es la atrofia de las glándulas. Además de la pérdida de acinos serosos, se va a producir una atrofia de las glándulas salivales por fenómenos inflamatorios (Redman.,2017).

Esto ocasiona la disminución de la calidad y cantidad de saliva segregada. Se estima que la sensación de sequedad oral puede ocurrir cuando el flujo normal de una persona no estimulada se reduce en un 45-50% (Ghezzi.,2000).

La disminución de la función de las glándulas salivales, además de la sensación de sequedad bucal, tiene otras consecuencias como la posibilidad de desarrollar infecciones orales, mayor susceptibilidad a la aparición de caries dental, malestar y dolor de la mucosa oral, dificultad para hablar y alteración nutricional.

Una vez finalizado el tratamiento radioterápico, las glándulas serosas aparecen atróficas, con pérdida de acinos serosos, fibrosis y cambios vasculares. En las glándulas mucosas existe menor pérdida de acinos mucosos y menor alteración del sistema ductal ya que parece que las glándulas mucosas presentan una mejor tolerancia a los efectos de la radiación. Al mismo tiempo las glándulas mucosas tienen capacidad de regenerarse unos meses después de finalizar la radioterapia (Jeong.,2012).

Esta alteración puede mejorar tras varios meses de finalizar la radioterapia, aunque lo más frecuente es que sea una secuela crónica del tratamiento y se produzca como resultado una boca seca (xerostomía) (Jensen.,2010).

- **Quimioterapia**

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Actúa evitando que las células cancerosas crezcan y se dividan en más células. Debido a que las células cancerosas en general crecen y se dividen más rápido que las células sanas, la quimioterapia las destruye más rápido que a la mayoría de las células sanas.

Debido a que los fármacos de la quimioterapia son fuertes, estos causan daño a muchas células en crecimiento, incluidas algunas células sanas. Este daño causa los efectos secundarios de la quimioterapia.

El papel de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello presenta los objetivos de disminuir la metástasis a distancia y aumentar el control local. Este último factor es importante pues un elevado porcentaje de estos causan la muerte por mecanismo locorregional (Yogi.,2005 y Nguyen.,2004).

Los fármacos antineoplásicos se clasifican según el tipo de células sobre las que actúan. Así tenemos los cicloindependientes que actúan sobre células en división y reposo. Son específicos de fase, es decir, actúan sobre células en una determinada fase del ciclo celular. Y los ciclodependientes: actúan sobre células en diversas fases del ciclo celular (Borowski.,1986).

Así mismo, los fármacos que actúan sobre las células en división, se pueden clasificar según su mecanismo de acción en (Benedi.,2006):

- ✓ Alquilantes: inhiben la división celular formando enlaces cruzados entre cadenas de DNA impidiendo su replicación.
- ✓ Antimetabolitos: inhiben la división celular actuando sobre los enzimas imprescindibles para la síntesis de bases púricas y pirimidínicas.

- ✓ Inhibidores de la mitosis: inhiben la división celular actuando sobre los microtúbulos del núcleo, impidiendo su división.

Entre los fármacos antineoplásicos usados en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello tenemos el metrotexate, la bleomicina, el cisplatino, el carboplatino, el 5-fluoruracilo, la gencitabina, la ciclofosfamida, la doxorubicina, la vincristina y la vinblastina (Yogi.,2005).

- **Efectos secundarios de la terapia antineoplásica**

Las células de las mucosas se dividen de forma rápida, por lo que éstas son muy sensibles a los efectos de la quimioterapia, pudiendo aparecer alteraciones en la mucosa oral y del tubo digestivo superior en más de la mitad de los pacientes sometidos a quimioterapia.

La alteración más frecuente de la mucosa de la boca durante el tratamiento es la mucositis. Consiste en una inflamación de la mucosa del tracto gastrointestinal; y más común y específicamente de la mucosa oral disminuyendo su capacidad de regeneración, la cual se considera como un efecto secundario asociado al uso de medicamentos y terapias para el tratamiento del cáncer (Stokman.,2003). Esta inflamación generalmente va acompañada de llagas o úlceras dolorosas, que en ocasiones pueden sangrar y sobreinfectarse, suele aparecer de 7 a 10 días después de iniciar la quimioterapia y generalmente, si no existe infección, mejora al cabo de 1 a 2 semanas. La boca es una zona del cuerpo con un nivel elevado de bacterias y hongos. Cuando la mucosa está alterada y se destruye, como ocurre en la mucositis, se infecta con facilidad dificultando su curación y favoreciendo el paso de bacterias a la sangre, pudiendo provocar infecciones, sobre todo si el paciente esta inmunosuprimido.

La mucositis puede ser causada por quimioterapia y/o radioterapia. Se presenta Como eritema y/o ulceración de la mucosa oral y se produce en aproximadamente del 20% al 40% de los pacientes que recibieron quimioterapia convencional, 80% de los pacientes que recibieron dosis de quimioterapia para el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), y casi todos los pacientes que reciben radioterapia de cabeza y cuello (Jones.,2006 y Vera-Llonch.,2007).

Se estima que el 40% de los pacientes tratados con quimioterapéuticos como el 5-fluorouracilo sufren de mucositis oral, con lesiones que aparecen entre los días 5 y 7 de tratamiento. Durante las primeras 24 horas el fármaco presenta una alta citotoxicidad y especificidad hacia células de división rápida, pero no discrimina entre células tumorales y sanas, por lo que afecta a su vez a las células normales de cavidad oral (Wiseman.,2006).

Esta disminución en la capacidad regenerativa del tejido de cavidad oral, hace que las células no se pueden reemplazar a una velocidad suficiente, debido al agotamiento acumulativo de capa basal (Garden.,2003). Esto genera una serie de ulceraciones que tardan mucho en sanar o que no se resuelven mientras perdure la acción del fármaco (Sonis.,2004).

También pueden presentarse alteraciones del gusto durante el tratamiento con quimioterapia; es un efecto secundario bastante frecuente. Se suele producir por daño directo de las papilas gustativas situadas en la lengua y el paladar. Los pacientes perciben una disminución en el sabor de determinadas comidas o un gusto metálico o amargo de las mismas, sobre todo con los alimentos ricos en proteínas como la carne y pescado.

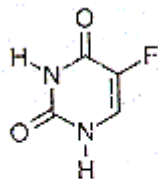
La mucositis grave puede necesitar una reducción en la dosis de quimioterapia o una interrupción del tratamiento en RT, Lo que puede influir negativamente en el pronóstico (Elting.,2003 y Trotti.,2003).

Es típicamente muy doloroso, requiriendo analgésicos opiáceos, además deteriora la ingesta nutricional. La mucositis gastrointestinal se presenta con síntomas debilitantes como dolor, náusea, vómito y diarrea (Keefe.,2007).

Los pacientes con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello, presentan desnutrición con pérdida de peso debido al aumento del gasto energético y reducción de la ingesta. Esta condición dificulta el mantenimiento y mejora del estado nutricional en los mismos; además, contribuyen al agravamiento del cuadro patológico por aumento de la morbimortalidad y costo del tratamiento asociados con el manejo de los síntomas, apoyo, manejo de la infección secundaria y hospitalización(Elting.,2007).

Disminuye la calidad y esperanza de vida (Arribas.,2013). Contrariamente, los enfermos con buen estado nutricional tienen mayor capacidad de sobrellevar los efectos secundarios del cáncer (Filion.,2010). Por lo tanto, la mucositis es muy significativa, y a veces limitante de la dosis, toxicidad de la terapia contra el cáncer.

- **5- Fluorouracilo**



5-fluorouracilo
(5-FU)

El fluorouracilo (5-FU) es una pirimidina fluorada que pertenece a la clase de los antimetabolitos antineoplásicos, con actividad de amplio espectro; actúa sobre células de rápida proliferación.

Difiere del uracilo en un átomo de flúor añadido en la posición 5. Desde hace muchos años, el 5-fluorouracilo se utiliza en combinación con otros fármacos en el tratamiento de muchos tumores sólidos, incluyendo los tumores de mama, cánceres colorectales y cáncer de cabeza y cuello.

La toxicidad y eficacia del fluorouracilo depende de la forma de administración, siendo muy alta la variabilidad entre pacientes y la vía y forma de administración.

Se emplea en infusión continua como el tratamiento de primera línea de neoplasias de cabeza y cuello, y de diversos tumores gastrointestinales. Es también eficaz en el cáncer de páncreas, ovario y endometrio, así como en tumores hepáticos.

Sus efectos secundarios dependen mucho de la pauta de administración. Produce mielosupresión, mucositis, vómitos, síndromeseudogripal y, a dosis altas, neurotoxicidad central.

- **Mecanismo de acción**

El fluoruracilo es un antimetabolito que inhibe la timidilato sintasa y, por lo tanto interfiere con la síntesis del RNA y del DNA:

Efectos sobre el RNA: para incorporarse al RNA, el fluoruracilo se debe transformar en monofosfato de fluoruracilo, lo que se puede producir de dos maneras:

Mediante la transferencia directa de una ribosa desde el fosforibosilpirofosfato al 5-fluorouracilo, transferencia que es catalizada por la acido-orótico-fosforibosiltransferasa.

Adición de una ribosa al 5-fluorouracilo mediante la uridina-fosforilasa para formar la fluorouridina. Esta experimenta seguidamente una fosforilización con uridina kinasa para ocasionar el monofosfato de fluorouracilo. Este último experimenta dos fosforilizaciones secuenciales a través de la pirimidina monofosfato kinasa y pirimidina difosfato kinasa, respectivamente. El trifosfato de fluorouracilo es entonces incorporado al RNA, bloqueando la actividad del ADN y su síntesis.

- **Efectos sobre el ADN**

El fluorouracilo puede ser transformado en fluorodeoxiuridina mediante la acción de la timidina fosforilasa y luego a fluorodeoxiuridina monofosfato a través de la timidina kinasa.

Alternativamente, la fluorodeoxiuridina monofosfato puede formarse indirectamente mediante la conversión de la fluoruridina difosfato a fluorodeoxiuridina difosfato y luego a fluorodeoxiuridina monofosfato. Esta

última es capaz de formar un enlace covalente, firme pero reversible con la timidilato sintasa en presencia de metilentetrahidrofolato.

La ligazón de la fluorodeoxiuridina monofosfato a la timidina sintetasa bloquea la síntesis del timidilato a partir del uracilo. Como el timidilato es el precursor de la timidina trifosfato, uno de los cuatro deoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN, su deficiencia ocasiona la depleción del trifosfato de timidina y, la interrupción de la síntesis de ADN.

Además, tanto la fluorodeoxiuridina monofosfato como la fluorodeoxiuridina difosfato pueden ser convertidas a fluorodeoxiuridina que puede ser incorporada al ADN mediante la ADN-polimerasa en lugar de la timidina trifosfato ocasionando un ADN aberrante. Además, cuando se administra en combinación con la leucovorina, los efectos del 5-fluorouracilo son incrementados al estabilizarse el complejo timidilato sintasa-metilentetrahidrofolato-fluorodeoxiuridina.

- **Citotoxicidad**

Durante las primeras 24 h de exposición al 5-fluorouracilo, se observa una citotoxicidad en la fase S del ciclo celular, probablemente debida a los efectos del fármaco sobre el DNA. A las 24 horas, la citotoxicidad tiene lugar en la fase G-1, probablemente a consecuencia de la incorporación del 5-fluorouracilo en el RNA. La selectividad del 5-fluorouracilo hacia las células en división rápida se debe a que las concentraciones de timidilato sintasa son 20 veces mayores en las células en división que en las células no proliferantes.

La resistencia al 5-fluorouracilo puede ser debida a una variedad de mecanismos. Se han descrito la reducción o desaparición de la actividad de varias enzimas activantes, la reducción de la biodisponibilidad de algunos cofactores, la competición con sustratos naturales y un aumento de la actividad de las enzimas asociadas con el catabolismo del fármaco.

El uracilo no tiene efectos citotóxicos cuando se administra de forma aislada, pero en combinación con el Tegafur inhibe la enzima encargada de catabolizar el 5-fluorouracilo, que también tiene concentraciones más altas en el tejido tumoral que en el sano.

El Tegafur y el Tegafur más uracilo son análogos al 5-fluorouracilo. El Tegafur es un profármaco que se convierte en 5-fluorouracilo mediante la enzima timidita fosforilasa, que se encuentra en concentraciones más altas en el tejido tumoral que en el sano. Una vez metabolizado a 5-fluorouracilo, su acción es similar.

Puede utilizarse junto con ácido folínico para formar un complejo terciario más estable y aumentar así el bloqueo de la enzima, con lo que se incrementa también el efecto citotóxico del 5-fluorouracilo.

Produce mielosupresión y el síndrome palmo-plantar (eritema y descamación dolorosa de manos y pies). Cuando su acción se ve modificada por otros fármacos (como el folinato cálcico), su perfil de toxicidad puede alterarse; la mucositis y la diarrea pueden ser problemas importantes.

También puede producir neurotoxicidad central, sobre todo en forma de síndrome cerebeloso. La toxicidad cardiológica es independiente de la dosis. Se utiliza principalmente para el tratamiento adyuvante del cáncer colorrectal, el cáncer gástrico y el de mama.

La capecitabina es un profármaco oral del 5-fluorouracilo de comercialización más reciente. Causa eritrodisestesia palmo-plantar y mielosupresión con mayor frecuencia que otros compuestos del mismo grupo. Está indicado en el cáncer colorrectal y el cáncer de mama metastáticos

- **Farmacocinética**

El 5-fluorouracilo se puede administrar tópica o parenteralmente. Debido a su absorción digestiva muy baja y variable, este fármaco no se administra por vía oral. Después de la aplicación tópica de 1 g de 5-fluorouracilo sobre la piel, se absorbe aproximadamente el 6% de la dosis.

El fármaco se distribuye ampliamente por todo el organismo, cruzando la barrera hematoencefálica y produciendo concentraciones significativas en el líquido cefalorraquídeo que se mantienen durante varias horas. También se distribuye en el líquido pleural y ascítico.

El 5-fluorouracilo exhibe una farmacocinética no lineal: a medida que aumentan las dosis intravenosas, disminuye la captación hepática, aumenta la biodisponibilidad y la ABC, y se reduce el aclaramiento. Este comportamiento es debido a una saturación de los procesos de metabolización del fármaco. Una pequeña cantidad de 5-fluorouracilo es transformada en metabolitos activos (fluoruridina trifosfato y fluorodeoxiuridina monofosfato) en los diferentes tejidos.

El resto (un 85% aproximadamente) es catabolizado mediante la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) a una dihidropirimidina. Esta enzima (la DPD) está presente en todo el organismo, incluyendo el hígado, la mucosa intestinal y los leucocitos periféricos.

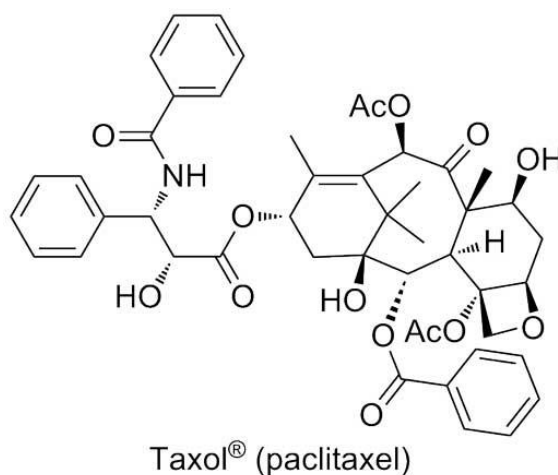
Al exhibir un ritmo circadiano y estar presente de forma muy variable, ocasiona unos niveles plasmáticos de 5-fluorouracilo impredecibles. En algunos individuos, la ausencia o los bajos niveles de la dihidropirimidina deshidrogenasa, hace que el 5-fluorouracilo sea muy tóxico, incluso en dosis bajas.

Después de la administración intravenosa de 5-fluoruracilo, la semi-vida de eliminación es de 16 minutos (entre 8 y 20 minutos) y es dosis-dependiente. A diferencia del fármaco nativo, los nucleótidos intracelulares fluoruridina trifosfato y fluorodeoxiuridina monofosfato tienen semi-vidas muy prolongadas.

El fluorouracilo sin alterar y sus metabolitos son eliminados primariamente a través de la bilis y de la orina.

El 5-fluorouracilo se ha administrado intra-arterialmente mediante infusión en la vena hepática. En estas condiciones, el 19-50% de la dosis experimenta un metabolismo de primer paso y los niveles plasmáticos alcanzados son del 12 al 52% de los que se obtienen con la misma dosis por vía intravenosa.

- **Paclitaxel**



El paclitaxel pertenece a una clase de agentes quimioterapéuticos llamados taxanos. Fue aislado de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, y muestra una actividad antitumoral frente a diversos tipos de tumores. El paclitaxel se utiliza para tratar a muchos tipos de cáncer incluyendo, cáncer de mama (Lesney.,2004), cánceres cervicales, endometriales, ováricos, pulmonares (Weaver.,2014), de vejiga, cabeza y del cuello, sarcoma de Kaposi, y leucemia.

- **Mecanismo de acción**

El paclitaxel es un fármaco antimicrotúbulos que estimula el ensamblaje de microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos impidiendo su despolimerización.

Esta estabilización inhibe la dinámica de reorganización normal de la red de microtúbulos, esencial para las funciones celulares vitales en las fases mitótica e interfase. Además, paclitaxel induce la formación de grupos anormales o haces de microtúbulos a lo largo de todo el ciclo celular y de usos múltiples de microtúbulos durante la mitosis.

Los microtubulos son largos polímeros de proteínas formados por heterodimeros de α -tubulina y β -tubulina. La polimerización de los microtubulos se produce en la mitosis que implica la hidrólisis de GTP para suministrar energía en el momento que la tubulina, con GTP unido, se añade a los extremos de los microtubulos. En la mitosis, los cromosomas duplicados de las células se dividen en dos conjuntos idénticos antes de la división en dos células hijas y la dinámica de la polimerización de los microtubulos desempeña un papel fundamental en este proceso como parte de la replicación celular.

La participación crucial de los microtubulos en la mitosis los convierte en un objetivo para los agentes antitumorales; en general estas sustancias son conocidas como agentes antimitóticos.

El paclitaxel actúa en la metafase de la mitosis celular, uniéndose a las subunidades de β -tubulina impidiendo su despolimerización e inhibiendo el proceso de división celular clave en la formación de lesiones cancerosas y provocando la apoptosis mediada por P53.

Diversos estudios sugieren que la eficacia del paclitaxel puede ser debida no solo a su actividad de estabilización de microtubulos, sino a su capacidad para activar la liberación local de TNF- α de los macrófagos, una citoquina inductora de la apoptosis(Lanni.,1997).

En estudios in vitro con microsomas de hígado y rodajas de tejido humano se observó que el paclitaxel se metaboliza principalmente a 6a-hidroxi paclitaxel por la isoenzima CYP2C8 del citocromo P450 y a 2 metabolitos menores, 3'-p-hidroxi paclitaxel y 6a, 3'-p-dihidroxi paclitaxel por la isoenzima CYP3A4.

In vitro, el metabolismo de paclitaxel a 6a-hidroxi paclitaxel fue inhibido por una serie de agentes (ketoconazol, verapamilo, diazepam,

quinidina, dexametasona, ciclosporina, tenipósido, etopósido y vincristina), pero las concentraciones utilizadas fueron mayores que las que se detectan después de dosis terapéuticas normales.

La testosterona, el estradiol, el ácido retinoico, y la quercetina, inhibidores específicos de la CYP2C8, también inhiben la formación de 6a-hidroxi paclitaxel in vitro. La farmacocinética de paclitaxel también se pueden alterar in vivo como resultado de las interacciones con los compuestos que son sustratos, inductores, o inhibidores de CYP2C8 y / o CYP3A4.

- **Toxicidad**

No se ha estudiado el potencial carcinogénico del paclitaxel. No obstante, debido a su mecanismo de acción farmacodinámico, el paclitaxel es un agente potencialmente carcinogénico y genotóxico a las dosis clínicas. El paclitaxel ha demostrado ser clastogénico in vitro (induce aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos) e in vivo y también genotóxico in vivo (test de micronúcleos en ratones).

Se administra sólo por vía intravenosa y es fundamental la utilización de premedicación para evitar reacciones de hipersensibilidad. Las dosis más comúnmente utilizadas oscilan entre 175-250 mg/m² en infusión de 1 a 3 h, cada 21 días, bien en regímenes de monoterapia o bien en combinación con otros citostáticos.

En el último año se ha extendido la administración en esquemas semanales, a dosis de 75-90 mg/m², con el mismo índice de respuestas y mejor tolerancia. A pesar de que el paclitaxel está autorizado por el

Ministerio de Sanidad para el tratamiento de mujeres afectadas de un cáncer de mama resistente a las antraciclinas, el nivel de actividad detectado en distintos estudios fase II en combinación con antraciclinas como terapia de primera línea en cáncer metastásico hace augurar un futuro posicionamiento como tratamiento de primera línea.

La mielosupresión es la toxicidad limitante de la dosis. El nadir de neutropenia ocurre entre los 7 y los 14 días. Otros efectos secundarios son neurotoxicidad, mialgias, arritmias cardíacas e hipotensión. La alopecia ocurre casi en el 100% de los pacientes y suele ser universal.

2. Antioxidantes

Los antioxidantes son un conjunto heterogéneo de sustancias, formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales y otros compuestos vegetales y enzimas, que bloquean el efecto dañino de los radicales libres. Los antioxidantes se obtienen de la dieta, encontrándose su mayoría en los alimentos vegetales, lo que explica parte de las acciones saludables de frutas, legumbres, hortalizas y cereales integrales (Ruiz.,2012).

Durante los procesos metabólicos de liberar energía, oxidar compuestos endógenos y detoxificar xenobióticos, el oxígeno se comporta como un aceptor terminal de cuatro electrones y pasa por varias etapas hasta transformarse en agua, que es un producto químico estable. Sin embargo, en condiciones normales, la reducción de electrones en el oxígeno es incompleta y se producen productos químicos intermedios, de los cuales los más importantes para la fisiología humana son los radicales hidroxilos y superóxidos (Cuerda.,2011).

Los radicales libres producen efectos negativos para la salud, debido a su capacidad de alterar el ADN(Chiang.,2017), las proteínas y los lípidos. Los radicales libres pueden producir una alteración genética sobre las células que se dividen continuamente contribuyendo a aumentar el riesgo de cáncer por mutaciones genéticas y alteran la funcionalidad de las células que no se dividen tanto, disminuyendo el número de mitocondrias, que es característico del envejecimiento(Ceriello.,2009).

Las situaciones que aumentan la producción de radicales libres son: la contaminación ambiental, el tabaquismo, las dietas ricas en grasas, exposición excesiva a las radiaciones solares, el estrés.

Las consecuencias por los daños generados por oxidación se relacionan con envejecimiento prematuro (Thorin-Trescases.,2010), diabetes (Almogbel.,2017), enfermedad cardiovascular (Matheus.,2017), aterosclerosis y carcinogénesis (Juneja.,2017).

Algunos de estos antioxidantes pueden bloquear los radicales libres que modifican el colesterol malo, reduciendo así el riesgo cardiovascular (Riccioni.,2012), o prevenir el cáncer, en la naturaleza, existen sustancias antioxidantes, que pueden proteger a las células contra el daño causado por los radicales libres (Yoshioka.,2017), sus mecanismos de acción y efectos fisiológicos son objeto de múltiples investigaciones actualmente, se han identificado algunos mecanismos de acción que inducen apoptosis(Lu.,2012), efectos antiproliferativos que ayudan a mantener los procesos de control celular, su efecto antiangiogenico, inhibiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos que son indispensables para la formación y crecimiento tumoral (Kim.,2011).

Debido a estos hallazgos cada vez se buscan más fuentes de antioxidantes y se intenta comprender su función en relación con el estrés oxidativo y las enfermedades asociadas.

3. Polifenoles

Un polifenol, en su definición más simple, es cualquier sustancia que contiene al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (otros sustituyentes pueden estar presentes) (Yoo S., 2011). Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas y están generalmente involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por patógenos. En los alimentos, los polifenoles pueden contribuir al amargor, astringencia, color, sabor, olor y estabilidad a la oxidación (Beckman CH.,2000).

Principalmente se producen en formas conjugadas, con uno o más residuos de azúcar vinculados a grupos hidroxilo, aunque los vínculos directos del azúcar (polisacárido o monosacárido) a un carbono aromático también existen. Asociaciones con otros compuestos, como ácidos carboxílicos y orgánicos, aminas, lípidos y con otros fenoles son también comunes (Kondratyuk TP y Pezzuto JM, 2004).

De acuerdo a la naturaleza de sus estructuras químicas han sido definidos diferentes tipos de polifenoles: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos. De entre estos, los flavonoides son los polifenoles más abundantes en la dieta (Kawai Y, 2011).

- **Polifenoles y cáncer**

En una revisión realizada por Steinmetz y Potter (1996) sobre datos procedentes de 206 estudios epidemiológicos, se ponía de manifiesto que consumos más elevados de frutas y hortalizas estaban relacionados con una menor incidencia de determinados tipos de cáncer, entre los que se incluían los de estómago, esófago, pulmón, cavidad oral y faringe, endometrio, páncreas y colon.

Los polifenoles dietéticos pueden ejercer sus efectos contra el cáncer a través de varios mecanismos posibles, tales como la eliminación de agentes cancerígenos, la modulación de la señalización de las células cancerosas y actividades enzimáticas antioxidantes, inducción de apoptosis, así como la detención del ciclo celular (Hu.,2011).

Los polifenoles también pueden proteger frente al cáncer mediante su inhibición del daño oxidativo del ADN

Otros polifenoles actúan inhibiendo la proliferación celular que se encuentra completamente desregulada en los casos de cáncer.

Otro mecanismo para evitar la carcinogénesis es mediante la activación de los enzimas de detoxificación de carcinógenos, como es el caso de los enzimas de Fase II

- **Flavonoides**

Los flavonoides, nombre que deriva del latín "flavus", cuyo significado es "amarillo", constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. El científico húngaro Albert Szent-Györgyi, premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937, los descubrió en el siglo pasado cuando

aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, y demostró que su consumo regulaba la permeabilidad de los capilares. A la citrina y a los compuestos afines los denominó "vitamina P" (por permeabilidad).

Posteriormente, también observó que estos compuestos poseían propiedades similares a la vitamina C. Mejoraban la absorción de esta vitamina y la protegían de la oxidación, y por ello también se denominaron *vitamina C₂*⁴. Sin embargo, no se pudo confirmar que los flavonoides fueran vitaminas, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Martínez.,2002)

Los flavonoides son pigmentos naturales que protegen al organismo, están presentes en los vegetales y son fundamentales, debido a que el organismo no tiene la capacidad de sintetizar estas sustancias químicas y por tal razón se obtienen enteramente de la ingesta de alimentos.

En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres como los rayos ultravioleta, la polución y sustancias químicas presentes en los alimentos.

Los flavonoides han adquirido notoriedad pública a raíz de su actividad biológica, poseen propiedades muy apreciadas en medicina, Al limitar la acción de los radicales libres los flavonoides reducen el riesgo de cáncer, enfermedades cardíacas, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, bloquean la progresión de las cataratas, la degeneración macular, poseen efectos antimicrobianos entre otros efectos.

Estos compuestos fueron descritos por primera vez por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares.

Estructura

Los flavonoides son moléculas de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos fenólicos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (fig. 1). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química.

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

Se conocen unos 8.000 flavonoides vegetales (Benavente.,2008) y todos comparten la estructura básica venzo-y-pirona a la cual se adiciona uno o más grupos hidroxilo, cetona y/o metilo fundamentalmente lo que permite por si solo adquirir una gran cantidad de configuraciones estructurales. Sin embargo es la glicosilación de la estructura el factor que multiplica la variabilidad estructural de esta familia, que de hecho se observa en la naturaleza.

Se trata pues, de un grupo muy heterogéneo tanto en estructura molecular como en sus características químicas, así como en sus funciones en las plantas que los sintetizan; desde pequeñas moléculas solubles e inestables hasta macromoléculas de elevado peso molecular e insolubles.

Fundamentalmente dos rutas biosintéticas confluyen para generar la estructura C6-C3-C6 característica de los flavonoides. Por un lado a partir del ácido shikimico se genera un fenipropanoide que constituirá el anillo B y el puente tricarboxilico. Por otro lado el anillo A se constituye tras una serie de condensaciones de acetil-CoA. A partir de estos dos puntos de partida se producen todas las subfamilias de flavonoides: flavonoles, flavan-3-oles, catequinas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, antocianidinas y procianidinas.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

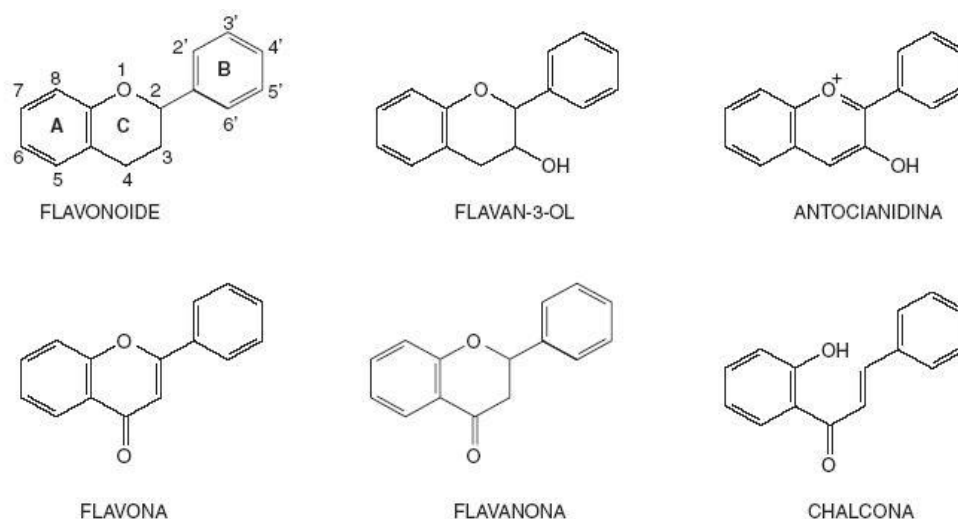
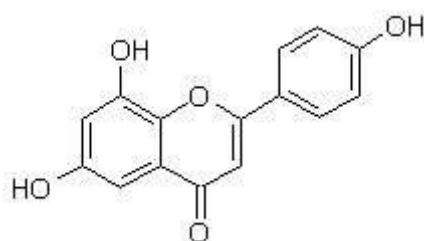


Fig. 1. Estructuras químicas de las subclases de flavonoides más usuales.

Hay tres flavonas importantes: la tricetina, presente en el polen de algunas mirtáceas, y también en las podocarpáceas (*Podocarpus* spp.); apigenina, presente en muchas plantas como la camomila, (*Matricaria recutita*) o el espino blanco (*Crataegus laevigata*), da un color marrón marfileño a las flores si se presenta sola; y luteolina, de color amarillo, que incluso sirve para teñir lana y otros tejidos.

4. Apigenina



La apigenina es un flavonoide natural, del grupo de las flavonas y cuya formulación química es 4',5, 7-trihydroxyflavona. Es un flavonoide de bajo peso molecular, baja toxicidad intrínseca y no mutagénico. Es prácticamente insoluble en agua, moderadamente soluble en alcohol caliente, y soluble en otros disolventes como el KOH y DMSO (Shukla, 2010).

Se halla en cantidades elevadas en vegetales como apio y perejil (Manach, 2004) y en las flores de la manzanilla (*Matricaria recutita*) (McKay, 2006), también está presente en numerosas plantas aromáticas como la menta, el orégano, el tomillo, el romero y la hierbabuena (Bhagwat, 2011). Al igual que la mayoría de los flavonoides, tiene propiedades antioxidantes.

La apigenina ha sido relacionada con efectos ansiolíticos sin provocar relajación muscular ni sedación excesiva, también efectos antiespasmódicos y antiinflamatorios.

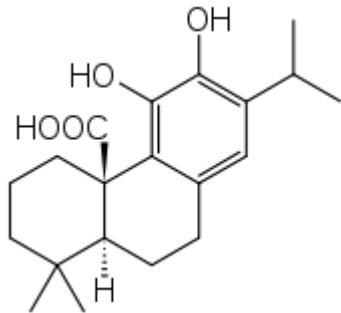
Posee también efectos antitumorales, se han realizado estudios en los que la aplicación tópica de apigenina en la piel del redujo el número y tamaño de tumores inducidos tanto por carcinógenos químicos, como físicos (exposición UV) y otros estudios en los que actúa como fotoprotector (Vescovi.,2016)

Se han investigado los efectos protectores de la apigenina en la piel y se encontró que, restableció la viabilidad de los fibroblastos dérmicos humanos normales (nHDFs), que habían disminuido por exposición a la radiación ultravioleta (UV). Utilizando un ensayo asociado a la senescencia (SA) - β -gal, también se demuestra que la apigenina protege frente a la senescencia inducida por UVA de nHDFs. Además, se encontró que la apigenina disminuyó la expresión de la colagenasa, metaloproteinasa de matriz (MMP) -1, en UHV nHDFs irradiados (Choi.,2016).

La apigenina es un prometedor agente quimiopreventivo, respecto al cáncer oral, existen por su capacidad de inhibición de la angiogénesis (Kim.,2011), la estabilización y mejora de la expresión de p53 (Tong.,2009), la regulación de la expresión de la COX-2 (44).

Varios estudios demuestran la capacidad de la apigenina para reducir el número y la agresividad de tumores provocados por la aplicación tópica de DMBA (7, 12 dimetil -1,2- benzantraceno) en la mucosa yugal del hámster (Gomez.,2012)

5. Ácido carnósico



El ácido carnósico, uno de los componentes del popular arbusto aromático conocido como romero (*Rosmarinus officinalis*), posee propiedades antiinflamatorias (Gonzalez-Trujano.,2007), antioxidantes y antitumorales (Kontogianni.,2013). Dichos efectos son atribuidos a los numerosos compuestos polifenólicos que contiene el romero. Los más importantes son el ácido carnósico, el carnosol (Johnson.,2011), los ácidos rosmarínico y ursólico(Kanjoormana.,2010).

De ellos el que más efecto antioxidante posee es el ácido carnósico. Además esta molécula diterpenica tiene actividad antimicrobiana, es capaz de inhibir la absorción lipídica en humanos y eliminar radicales libres debido a su esqueleto fenólico (Tsai.,2011). In vitro, el ácido carnósico inactiva carcinógenos, protege contra la radiación ionizante y benzopireno, también tiene efectos antiproliferativos (Yesil-Celiktas.,2010). In vivo, se ha demostrado que tienen un efecto protector contra DMBA – que induce carcinogénesis en ratones y piel de ratas, y de la HBP, donde actúa mediante la inhibición de DMBA-ADN (Gómez.,2013).

II. OBJETIVOS

Justificación

La incidencia del cáncer oral de células escamosas (COCE), representa un caso de interés de salud pública con más de 6.000 nuevos casos anuales en España durante el 2015. Además de esto se identifica una variación de la población en riesgo que inicialmente comprendía personas mayores de 45 años y ahora presenta un aumento significativo de casos en personas jóvenes lo que demuestra la necesidad de nuevas estrategias y estudios que permitan un mejor entendimiento de la epidemiología, diagnóstico, tratamiento y pronóstico de esta enfermedad.

Existe evidencia científica de que podemos reducir el riesgo de cáncer, incluyendo el cáncer oral, a través de hábitos alimenticios saludables. Una dieta rica en verduras, frutas, antioxidantes, té y fibra disminuye el riesgo de cáncer bucal y faríngeo, debido a que estos nutrientes pueden prevenir la activación de los carcinógenos y aumentar su desintoxicación.

Hay un grupo de sustancias naturales que presentan numerosas propiedades benéficas como lo son los polifenoles los cuales pueden ejercer sus efectos contra el cáncer a través de varios mecanismos, tales como la eliminación de agentes cancerígenos, la modulación de la señalización de las células cancerígenas y actividades enzimáticas antioxidantes, la inducción de apoptosis, así como la detención del ciclo celular.

Por esta razón es importante desarrollar nuevas investigaciones que permitan mejorar nuestra comprensión del cáncer y el estudio de nuevas sustancias para su detección y tratamiento de forma eficaz.

Como Objetivo General hemos definido el estudio *in-vitro* de los compuestos apigenina, 5-fluorouracilo, ácido carnósico y paclitaxel en las líneas celulares, HaCaT de queratinocitos sanos humanos y PE/CA-PJ15 de cáncer oral de células escamosas.

Objetivos específicos:

- Estudiar los efectos de la apigenina, 5-fluorouracilo, ácido carnósico y paclitaxel *in-vitro*, sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer oral PE/CA-PJ15 y la línea de queratinocitos sanos humanos HaCaT.
- Determinar los efectos de la apigenina, 5-fluorouracilo, ácido carnósico y paclitaxel *in-vitro*, sobre el ciclo celular de dichas líneas mediante citometría de flujo.
- Realizar un estudio comparativo de los efectos sobre la apoptosis en ambas líneas celulares, tras el tratamiento con apigenina, 5-fluorouracilo, ácido carnósico y paclitaxel.

III. MATERIAL Y METODOS

I. MATERIAL Y MÉTODOS

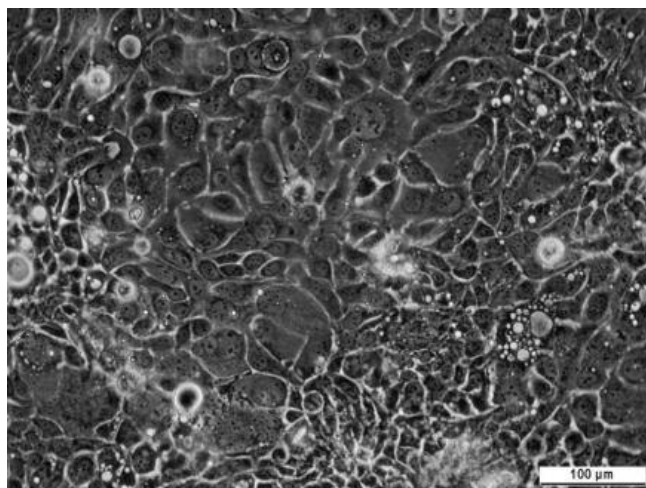
1. Cultivos celulares

a. Líneas celulares

PE/CA-PJ15 (ECACC, Alemania). La línea celular PE/CA-PJ15 se estableció a partir de un tejido con carcinoma oral de células escamosas de la lengua en un paciente masculino de 45 años de edad. Se ha demostrado que estas células tienen características epiteliales diferenciadas que expresan la laminina y citoqueratinas. La involucrina también se ha detectado en algunas células y grupos de células.

Para el cultivo de esta línea celular, hemos utilizado el medio IDMEM, suplementado con $2\mu\text{M}$ glutamina y 10% de suero bovino fetal (SBF). Los cultivos se han mantenido a 37°C , en una atmósfera con el 5% de CO_2 .

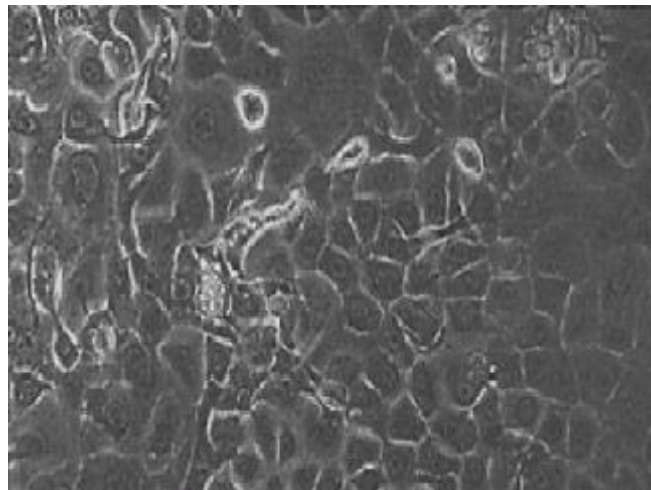
Los medios de cultivo para el mantenimiento celular, se han usado con el marcador colorimétrico de pH (rojo fenol) y se han conservado en frascos de 75 cm_2 , dentro de las estufas, con las condiciones de temperatura, humedad y concentración de CO_2 adecuados.



HaCaT. La línea Celular HaCaT se estableció a partir de queratinocitos humanos sanos, inmortalizados espontáneamente a partir de su incubación a temperaturas altas y concentraciones bajas de calcio (Ca^{2+}) en el medio de cultivo (Boukamp et al., 1988), se ha demostrado que esta línea conserva en gran medida las características de queratinocitos humanos primarios, manteniendo la síntesis de queratinas al igual que un fenotipo epidérmico prácticamente normal (Boukamp et al., 1997).

Para el cultivo de esta línea celular, hemos utilizado el medio DMEM 4,5, suplementado con $2\mu\text{M}$ glutamina y 10% de suero bovino fetal (SBF). Los cultivos se han mantenido a 37°C , en una atmósfera con el 7,5% de CO_2 .

Los medios de cultivo para el mantenimiento celular, se han usado con el marcador colorimétrico de pH (rojo fenol) y se han conservado en frascos de 75 cm^2 , dentro de las estufas, con las condiciones de temperatura, humedad y concentración de CO_2 adecuados.



b. METÓDO DE CULTIVO

Establecimos los cultivos a partir de viales criocongelados en nitrógeno líquido a -196°C . Descongelamos los viales rápidamente en un baño a 37°C , pasando el contenido del vial a un frasco de cultivo de 75cm^2 con 10ml de medio de cultivo fresco. Cuando las células se habían fijado al sustrato, pasadas 24 horas, sustituíamos el medio por medio fresco para eliminar el crioprotector (dimetilsulfoxido al 10% (DMSO)) que contenía el vial.

Para el cultivo masivo usamos frascos de 75cm^2 y el medio adecuado, todo el instrumental utilizado fue esterilizado previamente y realizamos la manipulación de las células en cabinas de flujo laminar vertical Cultair ASB tipo II. Controlamos el crecimiento celular diariamente mediante un microscopio invertido de contraste de fases, cambiando el medio aproximadamente cada dos días, o cuando el indicador de ph señalaba agotamiento.

Los cultivos se dejaban crecer hasta alcanzar el 70 – 80 % de confluencia. En esta fase tratamos los cultivos con 2ml de tripsina (0,1mg/ml) durante 5 minutos en estufa a 37°C y tras despegar las células mediante agitación, añadíamos 3ml de medio fresco, para detener la acción de la enzima, luego centrifugábamos a 200g durante 10 minutos. Pasado este tiempo se eliminaba el medio con la enzima reemplazándolo por 2ml de medio fresco y procedíamos al recuento de células vivas con azul tripan, utilizando el contador automático.

A partir de la densidad así obtenida calculábamos el inocuo necesario para el subcultivo o para los ensayos.

2. Reactivos y agentes

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) de Pm 414,3 (Sigma-Aldrich Quimica S.A.) almacenado a 0,5°C en condiciones de absoluta oscuridad. Preparado con medio IDMEM , o DMEM 4,5 sin RF, de acuerdo a cada la línea celular a una concentración de 5mg/ml de MTT.



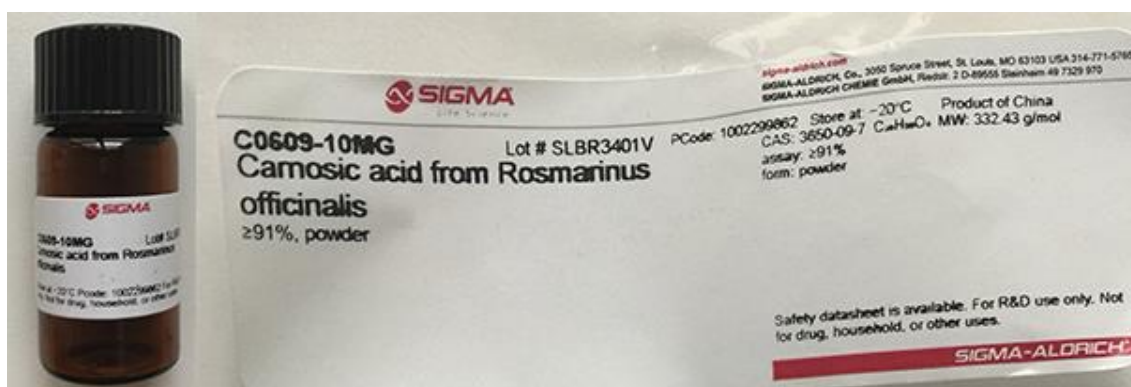
Dimetilsulfóxido (DMSO) Pm 78 (Sigma-Aldrich Quimica S.A.). Se utilizó con una pureza mínima de 99,5% y mantenido a temperatura ambiente (nunca por debajo de 4°C).



Apigenina (A) Pm 270.24 pureza $\geq 99.0\%$ (HPLC) (Sigma-Aldrich Quimica S.A.). Fue administrado tras su dilución en medio fresco de IDMEM y DMEM 4,5 sin RF (respectivamente para cada línea celular) en concentraciones de $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$.



Ácido Carnósico Pm 332.43 pureza $\geq 91\%$ (HPLC) (Sigma-Aldrich Quimica S.A.). Es uno de los principios activos más importantes del romero fue administrado tras su dilución en medio fresco de IDMEM y DMEM 4,5 sin RF (respectivamente para cada línea celular) en concentraciones de $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$.



Paclitaxel Pm 853.91 pureza $\geq 95.0\%$ (HPLC) (Sigma-Aldrich Quimica S.A.). Es uno de los principios activos más importantes del romero fue administrado tras su dilución en medio fresco de IDMEM y DMEM 4,5 sin RF (respectivamente para cada línea celular) en concentraciones de 1nM, 5nM, 10nM, 20nM, 50nM y 100nM.



5-Fluorouracilo (5-FU) Pm 130.08 (Sigma-Aldrich Quimica S.A.). Se utilizó con una pureza $\geq 99.0\%$ (HPLC). Fue administrado tras su dilución en medio fresco de IDMEM y DMEM 4,5 sin RF (respectivamente para cada línea celular) en concentraciones de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M y 100 μ M.



Kit apoptosis Anexina V- FITC (Sigma-Aldrich Quimica S.A.)



Ioduro de Propidio (Sigma-Aldrich Quimica S.A.)



3. Equipos

Espectrofotómetro

Utilizamos el modelo BMG Labtech, CLARIOstar (Servicio de cultivo de tejidos SAI, Universidad de Murcia), que realiza medidas de absorbancia en placas múltiples de 96 pocillos de diferentes modos (absorbancia UV/Vis con barridos espectrales espectro completo o lectura de 8 longitudes de onda, diferentes intervalos de tiempo), que dispone de los siguientes filtros: 220 – 1000nm.



Citometro Fc 500

Se puede utilizar una gran variedad de fluorocromos para analizar cinco colores (FITC, ECD, PC5 o APC y PC7) con uno o dos rayos laser.



Microscopio óptico

Modelo Nikon Eclipse TE 2000-U, Microscopio óptico invertido, Campo claro, Contraste de fases, Epifluorescencia, Objetivos de larga distancia (4, 10, 20 y 40x), platina mecánica graduada y móvil con adaptador para todo tipo de portamuestras, acoplado a un sistema de fotografía digital.

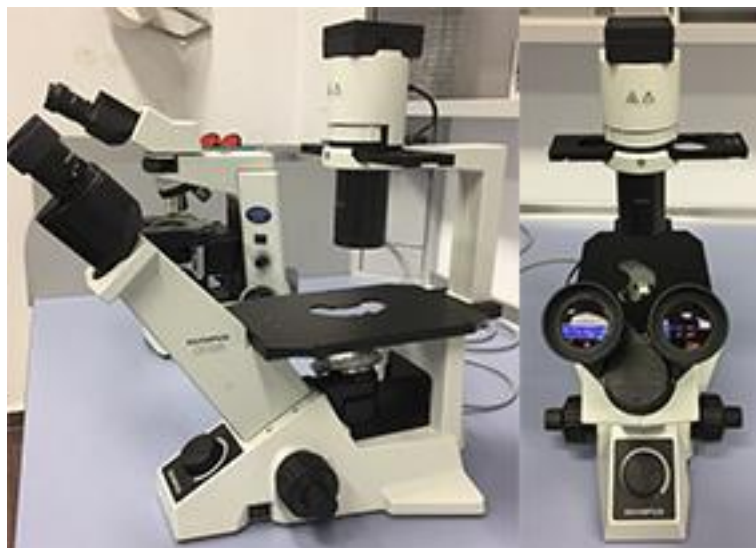
Filtros disponibles para microscopía de fluorescencia (SCT)

Microscopio	Método de excitación	Bloque de filtros				Indicaciones
		Nombre	Filtro de excitación	Espejo dicróico	Filtro de barrera	
NIKON Mod. Eclipse TE2000-U	Ultravioleta	UV-2B	EX 330-380	DM400	BA435	Hoechst
	Ultravioleta	DAPI	EX 340-380	DM400	BA435-485	DAPI
	B (azul)	FITC	EX465-495	DM575	BA515-555	FITC
	G (verde)	G-2A	EX 510-560	DM575	BA590	IP, Rodamina
NIKON Mod. Diaphot-TMD	UV (ultravioleta)	UV-2B	EX330-380	DM400	BA435	Hoechst
	B, B2 (azul)	B-1E	EX470-490	DM510	BA520-560	Inmunofluorescencia/FITC Clorofila Naranja de acridina
	G (verde)	G-2B	EX510-560	DM580	BA610	Rodamina IP



Modelo Olympus CKX31 se usa de forma habitual para evaluar la viabilidad de células en placas de Petri, frascos de cultivo y placas con varios pocillos.

Tiene un anillo de fase común sin centralización para 10x, 20x y 40x; no existe necesidad de ajustarlo.



Contador de Células TC 20

Completamente automatizado, proporciona un recuento total de células de mamíferos, es posible determinar la relación entre células vivas y muertas, con resultados precisos y reproducibles.



Osmómetro

Vapro modelo 5520, osmómetro de presión de vapor, permite la lectura de muestras pequeñas (a partir de 2 microlitros), posee un margen de error inferior al 1%.



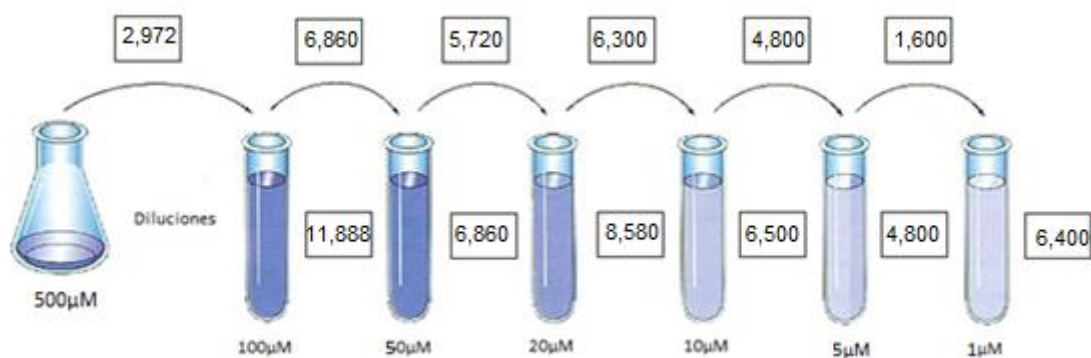
4. Procedimiento experimental

Solubilización y diluciones

Para todos los compuestos utilizados procedimos a preparar disoluciones stock basados en la ficha técnica de cada producto.

Compuesto	Disolución	Cantidad
Apigenina	1M KOH	50mg/ml
Ácido carnósico	MeOH	10g/100ml
5-Fluorouracilo	DMSO	10-50 mg/ml
Paclitaxel	MeOH	50mg/ml

Se definió $500\mu\text{M}$ como la concentración del stock madre más adecuada para realizar las diluciones, lo que permitió estandarizar un protocolo de diluciones seriadas de las diferentes concentraciones a probar.



Control de osmolaridad

Cualquier sustancia que forme parte del medio de cultivo es susceptible de modificar el potencial osmótico modificando la viabilidad, proliferación e incluso la supervivencia de las células en cultivo. Comprobamos que las concentraciones seleccionadas con las que realizamos los ensayos no alteraban significativamente la osmolaridad del medio de cultivo. Para ello preparamos alícuotas de cada uno de los extractos en todas sus concentraciones. Se empleó un osmómetro de vapor de vacío (Wescor, Vapro 5520, USA). Todos los valores obtenidos se comparaban con el valor de una alícuota control de IDMEM y DMEM 4,5 respectivamente a cada línea celular, suplementado y sin suplementos. En ningún caso encontramos variación significativa.

Test de Mycoplasma

La contaminación de sistemas de cultivo celular con Mycoplasma sigue presentando un importante problema para la investigación básica, se ha demostrado que contaminaciones con Mycoplasma producen una variedad de efectos en células cultivadas (por ejemplo, cambios en el metabolismo, propiedades inmunológicas o bioquímicas, crecimiento, viabilidad, etc.); por este motivo hemos realizado controles utilizando el método de tinción de ADN con fluorocromos. De los frascos de cultivo, comprobamos regularmente la ausencia de mycoplasma spp, mediante fluorescencia directa con el colorante específico para el ADN Hoechst H33233. En ninguna de las pruebas realizadas encontramos contaminación por Mycoplasma en los cultivos de las células PE/CA – PJ15 y HaCaT.

Cuantificación de la viabilidad y proliferación

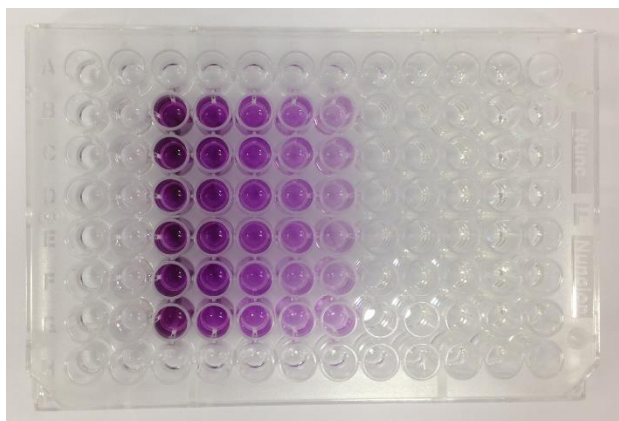
Para evaluar el efecto de los extractos sobre viabilidad y proliferación de células de las líneas celulares PE/CA–PJ15 y HaCaT, utilizamos el test de formación de cristales de formazano tras la aplicación de bromuro de 3-(4-5 dimetiltriazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio (MTT). Usamos placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, USA) con capacidad máxima de 300 μ L por pocillo.

Para la línea celular PE/CA–PJ15 sembramos 4.000 células por pocillo; para la línea celular HaCaT sembramos 3.000 células por pocillo para asegurar un crecimiento exponencial durante todo el ensayo. Pasadas 24 horas tras la siembra, para permitir la adhesión de las células al fondo de los pocillos, procedimos a aplicar los distintos tratamientos con los extractos.

Las concentraciones utilizadas fueron 1, 5, 10, 20, 50 y 100 μ M. Realizamos el ensayo a tres tiempos: 24, 48, 72 y 96 horas desde la aplicación de cada extracto. Mantuvimos todas las placas en estufa de incubación a una temperatura de 37°C, 5% CO₂ para la línea celular PE/CA – PJ15 y de 37°C, 7,5% CO₂ para la línea celular HaCaT.

Pasado el tiempo correspondiente eliminamos el medio de cultivo y agregamos a cada pocillo 50 μ l de una disolución de MTT a 5 mg/mL más 200 μ L del medio de cultivo correspondiente a cada línea celular, de modo que la concentración final de MTT fuese 1 mg/ml. Dejamos incubar durante 4 horas en oscuridad a una temperatura de 37°C, 5% CO₂ para la línea celular PE/CA–PJ15 y de 37°C, 7,5% CO₂ para la línea celular HaCaT.

Pasadas las 4 horas de incubación, vaciamos los pocillos dejando sólo las células, adheridas al fondo de los pocillos y procedimos a disolver el formazano sintetizado en el interior celular mediante la adición de 100 μ L de DMSO a cada pocillo. Tras una agitación de 10 minutos a 80 rpm, procedimos a la lectura de absorbancia en espectrofotómetro a longitudes de onda 570 nm y 690 nm.



Ciclo celular

Para evaluar el efecto de los extractos sobre ciclo celular de las líneas celulares PE/CA–PJ15 y HaCaT Utilizamos placas de 6 pocillos de fondo plano (Nunc, USA) con capacidad máxima de 16 mL por pocillo.

Para la línea celular PE/CA–PJ15 sembramos 118.750 células por pocillo; para la línea celular HaCaT sembramos 89.062 células por pocillo para asegurar un crecimiento exponencial durante todo el ensayo. Pasadas 24 horas tras la siembra, para permitir la adhesión de las células al fondo de los pocillos, procedimos a aplicar los distintos tratamientos con los extractos.

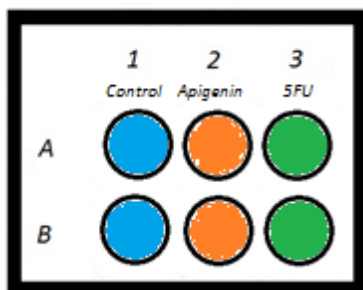
Las concentraciones utilizadas fueron apigenina 20 μ M, ácido carnósico 20 μ M, paclitaxel 20nM, 5-fluorouracilo 5 μ M. Realizamos el ensayo a dos tiempos: 24 y 72 horas desde la aplicación de cada extracto. Mantuvimos todas las placas en estufa de incubación a una temperatura de

37°C, 5% CO₂ para la línea celular PE/CA–PJ15 y de 37°C, 7,5% CO₂ para la línea celular HaCaT.

Diseño experimental

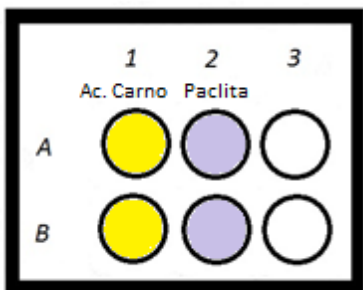
Placa N°1 24 Horas Siembra: 118.750 células x pocillo PE/CA-PJ15

Placa N°1 72 Horas Siembra: 89.062 células x pocillo HaCaT



Placa N°2 24 Horas Siembra: 118.750 células x pocillo PE/CA-PJ15

Placa N°2 72 Horas Siembra: 89.062 células x pocillo HaCaT



Procedimiento

Una vez cumplido el tiempo de ensayo con cada tratamiento, eliminamos el medio de cultivo, lavamos utilizando PBS y procedimos a despegar las células de la placa de 6 pocillos, utilizando Tripsina 0.25% EDTA 0.25%.

Luego centrifugamos 10 min a 200g y resuspendimos en 200µl de PBS.

Añadimos agitando 2 ml de una mezcla de etanol-PBS (70%-30%) frío y dejamos en frío durante 30 min.

Centrifugamos 10 min a 200g y resuspendimos en 800µl de PBS.

Añadimos 100µl de RNasa (1mg/ml) y 100µl de IP(400µg/ml). Incubamos a 37°C durante 30min.

Luego analizamos con un láser de Argón de 488nm.

Analizaremos los datos con el citómetro y su software asociado (CELLQUEST) los datos de FSC (*forward scatter*), SSC (*side scatter*) y PLA-2 (intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio) de una muestra de 30.000 células totales. Para obtener la cuantificación detallada de cada población emplearemos el software de análisis ModFitLT V2.0.

Apoptosis

La fosfatidilserina se encuentra de modo normal en la superficie interna de la membrana plasmática de las células. Por otro lado, la anexina V es una proteína normal del organismo que participa en importantes vías de señalización celular, endocitosis y tráfico intracelular al interaccionar con alta afinidad con la fosfatidilserina de la membrana plasmática, actuando como inhibidor competitivo de otras proteínas señalizadoras que tienen como diana la fosfatidilserina.

El ensayo se fundamenta en una característica común a todas las células que se hallan en apoptosis: la translocación de la fosfatidilserina desde su localización normal en la superficie citoplasmática hacia la superficie externa de la membrana celular, quedando expuesta al medio externo. La anexina V está conjugada con un fluoróforo, Alexa Fluor® 488, que emite luz verde al someterlo al láser argón a 488 nm del citómetro de flujo. Como resultado la anexina V- Alexa Fluor® 488 (AV) emite fluorescencia verde asociada a células en apoptosis. El test se complementa

con yoduro de propidio (IP), que se une al ADN de células necróticas cuya membrana plasmática se encuentra completamente alterada. El efecto de esta tinción fluorescente combinada permite distinguir poblaciones de células en apoptosis temprana (AV^{+++} - PI $^{-}$), en apoptosis tardía (AV^{+++} - PI $^{+++}$), en necrosis (AV^{+} - PI $^{+++}$) y viables (AV^{+} - PI $^{-}$).

Para la determinación del porcentaje de células apoptóticas se analizarán las células según la presencia e intensidad de fluorescencia de AV e IP, y se visualizarán en diferentes cuadrantes de un diagrama que relaciona frecuencia de conteo con intensidad de fluorescencia de cada fluorocromo.

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la apoptosis de las líneas celulares PE/CA – PJ15 y HaCaT Utilizamos placas de 6 pocillos de fondo plano (Nunc, USA) con capacidad máxima de 16 mL por pocillo.

Para la línea celular PE/CA – PJ15 sembramos 118.750 células por pocillo; para la línea celular HaCaT sembramos 89.062 células por pocillo para asegurar un crecimiento exponencial durante todo el ensayo. Pasadas 24 horas tras la siembra, para permitir la adhesión de las células al fondo de los pocillos, procedimos a aplicar los distintos tratamientos con los extractos.

Las concentraciones utilizadas fueron apigenina 20 μ M, ácido carnósico 20 μ M, paclitaxel 20nM, 5-fluorouracilo 5 μ M y como control positivo utilizamos camptotecina 6 μ M. Realizamos el ensayo a las 24 horas desde la aplicación de cada extracto. Mantuvimos todas las placas en estufa de incubación a una temperatura de 37°C, 5% CO₂ para la línea celular PE/CA – PJ15 y de 37°C, 7,5% CO₂ para la línea celular HaCaT.

Diseño experimental

Placa Nº1

24 Horas

Siembra: 118.750 células x pocillo PE/CA-PJ15

Siembra: 89.062 células x pocillo HaCaT

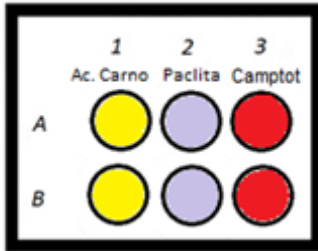


Placa Nº2

24 Horas

Siembra: 118.750 células x pocillo PE/CA-PJ15

Siembra: 89.062 células x pocillo HaCaT



Procedimiento

Una vez cumplido el tiempo de ensayo con cada tratamiento, eliminamos el medio de cultivo, lavamos utilizando PBS y procedimos a despegar las células de la placa de 6 pocillos, utilizando Tripsina 0.25% EDTA 0.25%.

Luego centrifugamos 10 min a 200g y resuspendimos en 500µl de Buffer de unión (Binding Buffer).

Añadimos agitando 5µl de Anexina V FITC conjugada y 10µl de yoduro de propidio en cada tubo de las células tratadas con los diferentes compuestos.

Incubamos los tubos a temperatura ambiente y protegidos de la luz por 10 minutos.

Pasado este tiempo determinamos la fluorescencia de las células, utilizando el citometro de flujo.

Método estadístico

Se realizó una estadística descriptiva de cada una de las variables obteniendo los parámetros característicos: media, desviación típica, máximo y mínimo.

Para determinar el grado de asociación estadística entre las variables en estudio, se aplicó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA, programa SPSS Versión 8.0), complementado con el contraste de igualdad de pares de medias, con el método de la mínima diferencia significativa (DMS) y con la corrección de Bonferroni.

Se consideraron significativos valores iguales o menores a 0,005 ($p \leq 0,005$). Realizamos la relación entre variables cuantitativas mediante un análisis de regresión y correlación lineal.

IV. RESULTADOS

II. Resultados

1. Viabilidad celular

Los siguientes resultados se fundamentan en la aplicación del test de proliferación-citotoxicidad sobre la línea celular HaCaT de cada uno de los compuestos objeto de estudio. Los ensayos se han realizado por duplicado durante cuatro periodos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas) siendo, los resultados gráficos presentados a continuación, la media ponderada de ambos ensayos.

Apigenina

Tiempo	Concentración	1	5	10	20	50	100
24 horas	Media	0,343	0,375	0,4	0,34	0,214	0,156
	Desv. est.	27,136	0,92	29,666	4,64	3,303	9,619
	% respecto control	114,379	123,66	133,386	112,127	70,466	51,838
48 horas	Media	0,667	0,727	0,758	0,622	0,306	0,099
	Desv. est.	8,846	6,544	0,306	10,199	9,207	1,318
	% respecto control	91,633	99,426	102,666	85,749	40,182	13,594
72 horas	Media	1,483	1,382	1,164	1,098	0,433	0,018
	Desv. est.	6,078	0,766	10,367	2,538	4,656	0,218
	% respecto control	111,28	104,217	86,863	82,935	32,272	1,417
96 horas	Media	2,552	2,519	1,996	1,452	0,358	0
	Desv. est.	11,175	16,493	4,099	21,297	8,375	0,653
	% respecto control	101,347	99,821	79,448	57,116	13,984	0

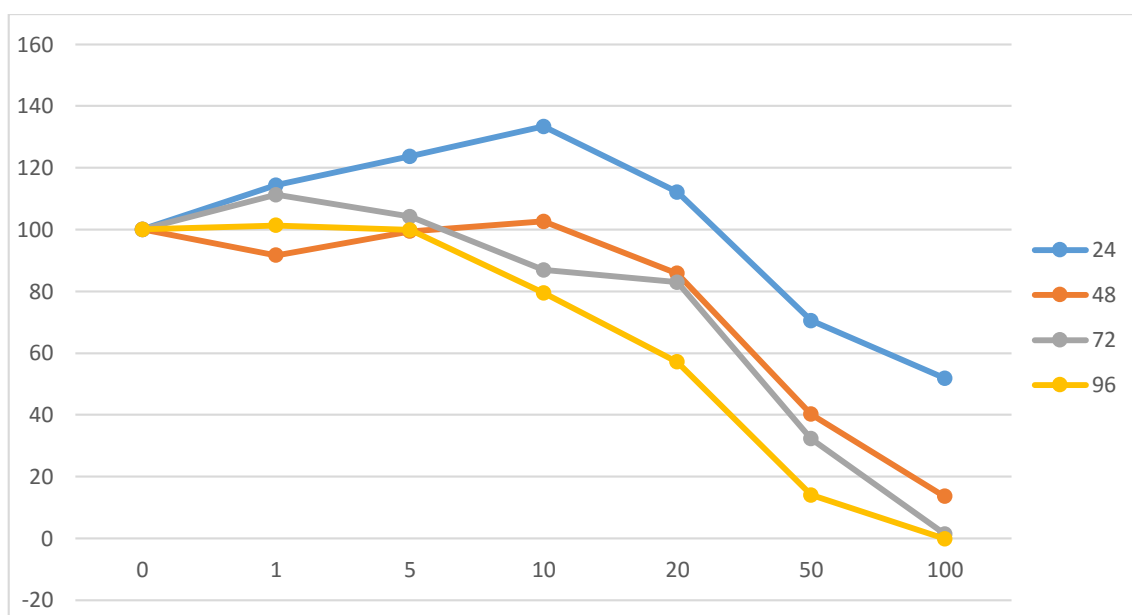


Fig.1. Efecto sobre la proliferación in vitro de células HaCaT utilizando apigenina a distintas concentraciones tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

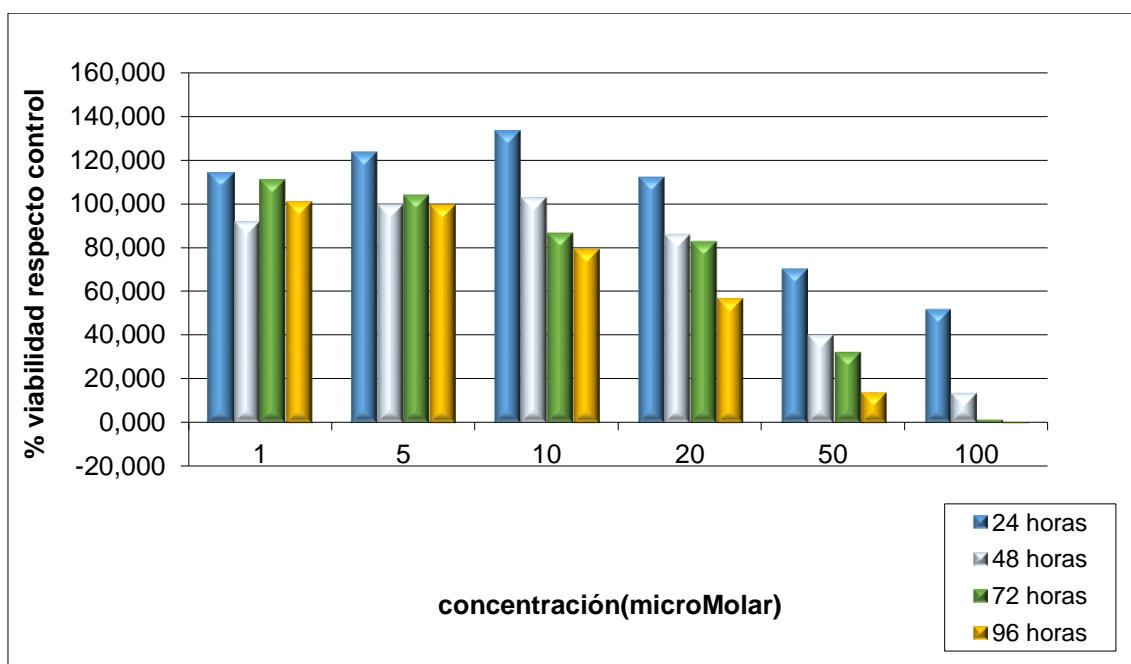


Fig.2. Efecto sobre la proliferación in vitro de células HaCaT utilizando apigenina tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

En la prueba con apigenina observamos que a las 24 horas de tratamiento las concentraciones entre 1 µM y 20 µM estimulan la proliferación celular de la línea HaCat.

En cuanto a las concentraciones más altas encontramos inhibición de la proliferación celular, las dosis utilizadas fueron 50 µM y 100 µM, el IC 50 se ha establecido tras 24 horas de tratamiento a una concentración de 100 µM

A partir de las 48 horas el efecto antiproliferativo se presenta a partir de una concentración de 20 µM y a las 72 horas este efecto se evidencia a partir de una concentración de 10 µM; esto nos permite establecer una relación directa entre el tiempo de exposición al compuesto y la concentración utilizada con respecto a la viabilidad celular.

Tras 72 horas de tratamiento utilizando una concentración de 100 µM, se disminuye la viabilidad celular casi a un 98,5%.

Ac. Carnósico

Tiempo	Concentración	1 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M	50 μ M	100 μ M
24 horas	Media	0,292	0,294	0,256	0,119	0,007	0,008
	Desv. est.	4,646	30,825	46	31,787	2,065	4,253
	% respecto control	114,974	119,112	105,905	50,72	2,51	3,967
48 horas	Media	0,63	0,527	0,384	0,22	0,004	0,003
	Desv. est.	21,762	7,83	27,712	12,054	0,697	0,406
	% respecto control	101,222	83,799	63,071	35,783	0,601	0,509
72 horas	Media	0,887	0,712	0,493	0,178	0,003	0
	Desv. est.	7,46	0,691	32,005	14,473	0,912	0,607
	% respecto control	95,459	76,649	53,0811	19,154	0,322	0
96 horas	Media	1,466	0,966	0,784	0,23	0	0
	Desv. est.	18,269	4,92	22,239	11,069	0,117	0,016
	% respecto control	94,203	61,319	46,952	13,307	0,008	0

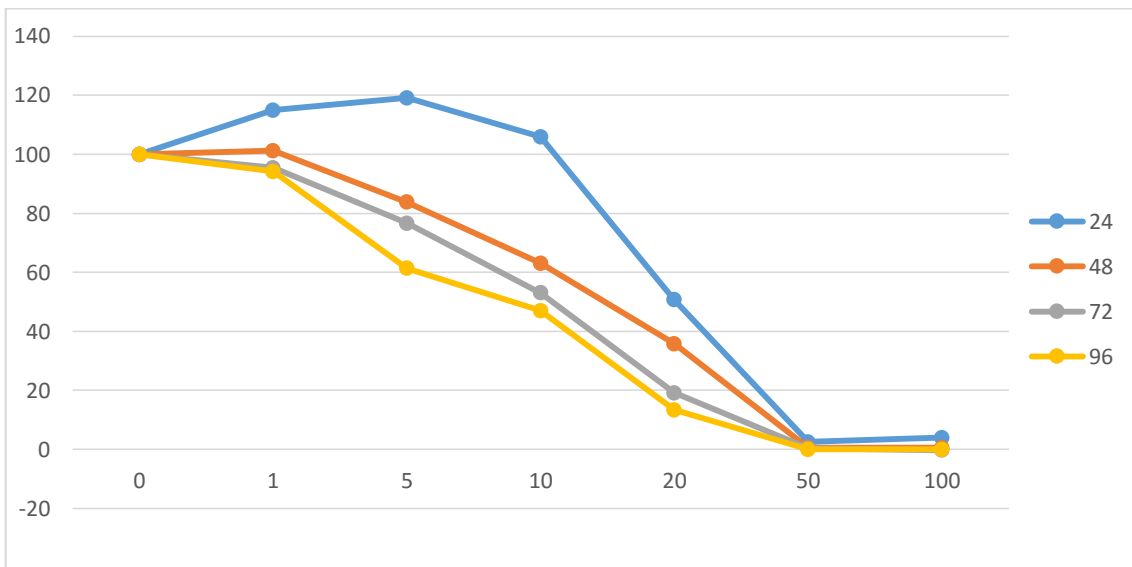


Fig.3. Efecto sobre la proliferación in vitro de células HaCaT utilizando ácido carnósico tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

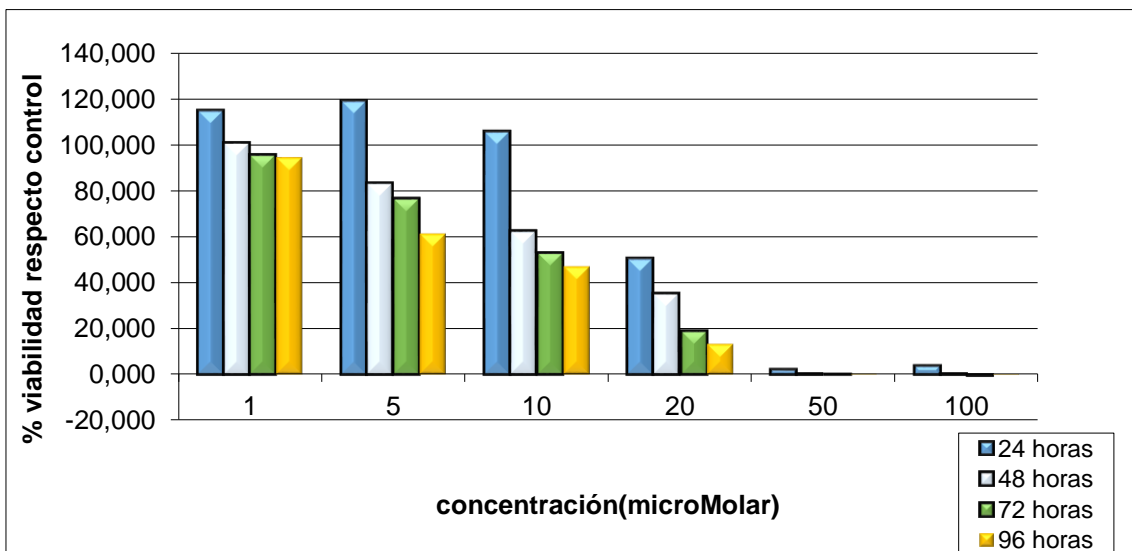


Fig.4. Efecto sobre la proliferación in vitro de células HaCaT utilizando ácido carnósico tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

En cuanto a los efectos del ácido carnósico sobre la línea celular HaCaT podemos observar que las concentraciones de 1µM a 10µM se presenta un aumento de la proliferación celular, alcanzando el pico máximo a una concentración de 5µM y un porcentaje de 119% con respecto al control.

Para las concentraciones más altas 20µM - 100µM observamos una considerable disminución de la proliferación celular. El IC50 se ha establecido tras 24 de tratamiento a una concentración de 20µM.

En cuanto a las concentraciones de 50µM y 100µM se evidencia la no viabilidad para esta línea celular.

Se observa una relación directa entre la concentración y el tiempo de tratamiento.

5-Fluorouracilo

Tiempo	Concentracion	1µM	5µM	10µM	20µM	50µM	100µM
24 horas	Media	0,236	0,273	0,23	0,226	0,236	0,208
	Desv. est.	6,295	19,285	2,779	10,618	2,147	7,943
	% respecto control	79,065	92,787	76,267	73,958	78,883	68,562
48 horas	Media	0,394	0,375	0,352	0,289	0,26	0,239
	Desv. est.	11,009	0,801	15,051	9,316	17,549	11,177
	% respecto control	71,397	68,36	63,398	52,202	46,579	43,019
72 horas	Media	0,671	0,415	0,356	0,277	0,222	0,17
	Desv. est.	8,7	14,878	10,822	3,806	1,249	0,139
	% respecto control	75,896	49,171	41,741	31,449	24,804	18,766
96 horas	Media	0,824	0,465	0,367	0,272	0,1885	0,176
	Desv. est.	7,678	16,317	10,931	4,535	2,043	3,457
	% respecto control	41,392	27,216	20,872	14,307	9,555	9,433

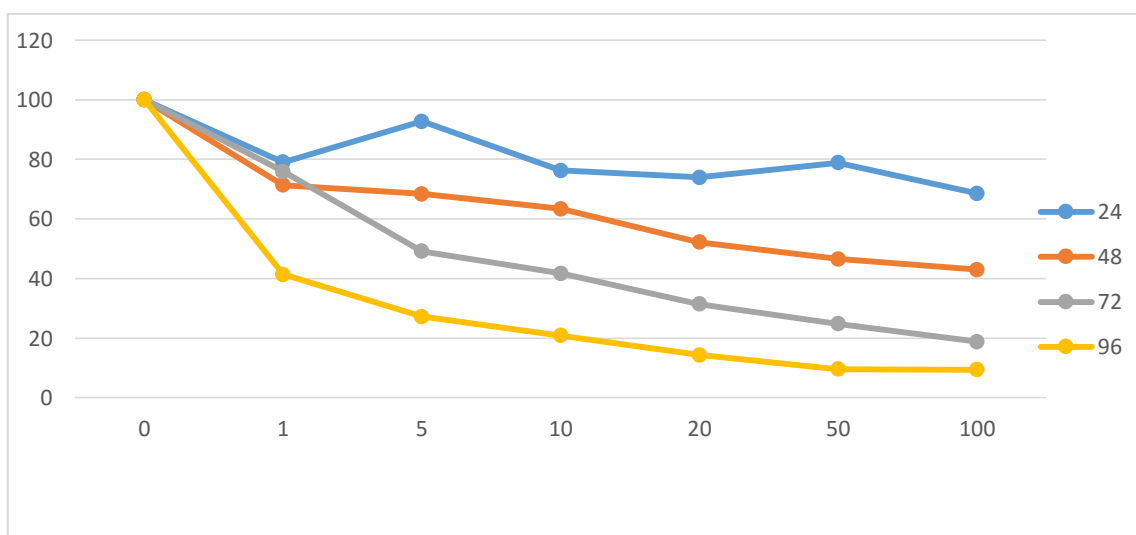


Fig.5. Efecto sobre la proliferación in vitro de células HaCaT utilizando 5-fluorouracilo tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

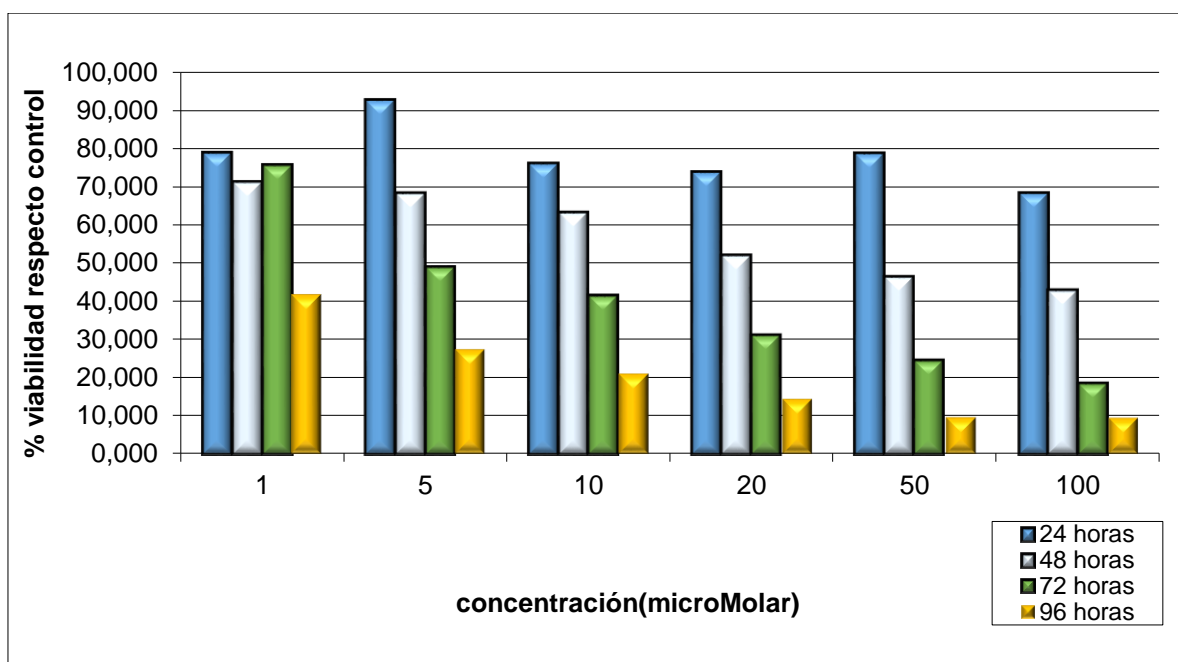


Fig.6. Efecto sobre la proliferación in vitro de células HaCaT utilizando 5-fluorouracilo tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

En la prueba con el compuesto 5-fluorouracilo observamos la acción del compuesto a partir de las 24 horas de tratamiento ocasionando una disminución de la viabilidad celular con respecto al control de un 21% para la concentración de 1µM y de un 32.5% para la concentración más alta 100µM.

A partir de las 48 hasta las 96 horas es posible observar una disminución de la viabilidad celular con respecto a la concentración (dosis-respuesta)

El IC50 podemos observarlo tras 48horas de tratamiento a una concentración de 20µM o a las 72 horas a una concentración de 5µM

Paclitaxel

Tiempo	Concentracion	1nM	5nM	10nM	20nM	50nM	100nM
24 horas	Media	0,537	0,582	0,516	0,486	0,34	0,241
	Desv. est.	16,568	10,88	15,648	15,118	23,036	18,503
	% respecto control	104,626	114,571	100,643	94,656	64,516	45,32
48 horas	Media	1,221	1,251	1,018	0,785	0,212	0,115
	Desv. est.	11,844	29,585	14,233	29,155	5,081	6,068
	% respecto control	98,739	98,82	81,766	60,632	16,802	8,643
72 horas	Media	2,253	2,327	1,804	0,981	0,129	0,048
	Desv. est.	1,409	1,067	8,942	25,618	3,181	1,001
	% respecto control	96,85	100,137	79,368	37,677	4,997	1,913
96 horas	Media	2,934	2,676	2,246	1,05	0,072	0,02
	Desv. est.	3,385	19,517	19,481	16,469	1,379	0,461
	% respecto control	96,105	86,708	72,629	33,646	2,302	0,651

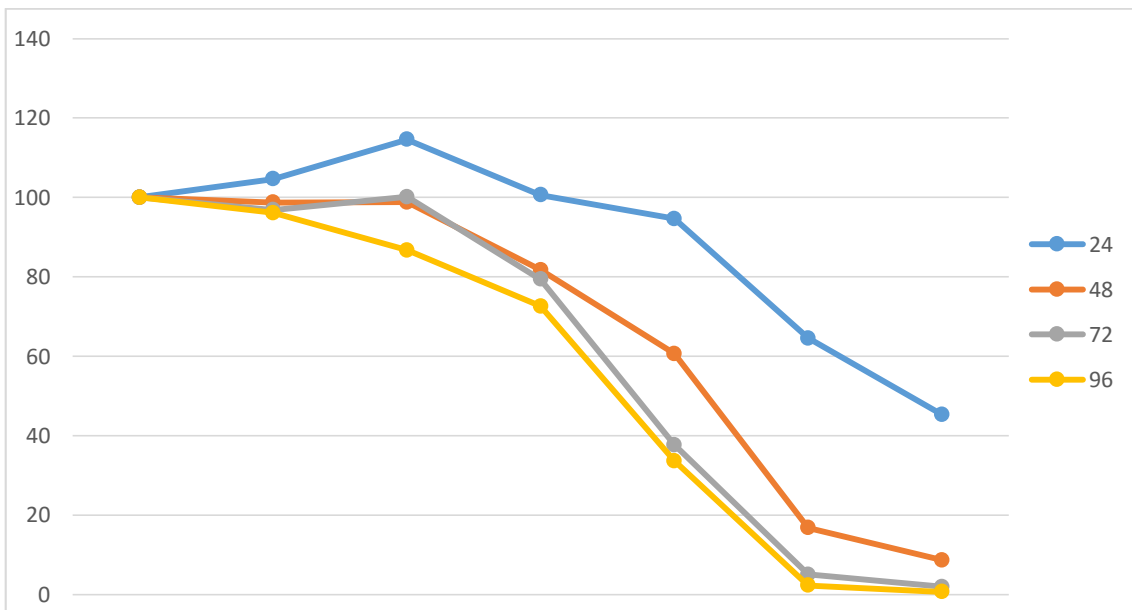


Fig.7. Efecto sobre la proliferación in vitro de células HaCaT utilizando paclitaxel tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

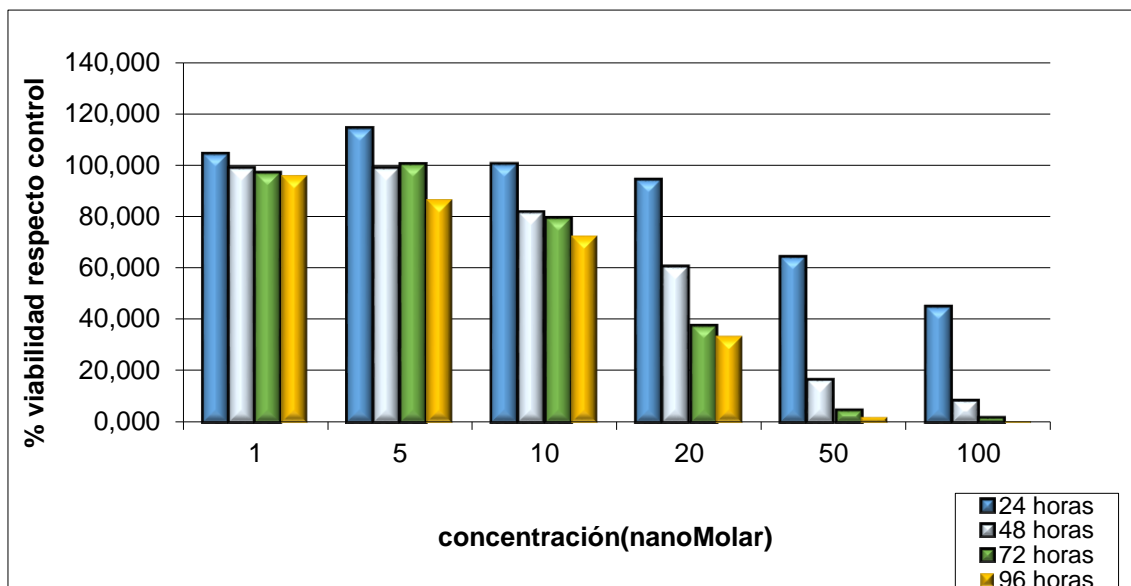


Fig.8. Efecto sobre la proliferación in vitro de células HaCaT utilizando paclitaxel tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

En la prueba realizada con el compuesto paclitaxel después de 24 horas observamos un aumento en la viabilidad celular en las concentraciones más bajas 1nM y 10nM

A partir de las 48horas se observa una disminución de la viabilidad celular directamente relacionada con la dosis respuesta. Para este tiempo de tratamiento y una concentración de 20nM encontramos una disminución del 40% de la viabilidad celular con respecto al control.

Observamos que después de 72 horas de tratamiento utilizando las concentraciones más altas del compuesto en este caso 50 nM y 100 nM la viabilidad celular está por debajo del 5%.

Los siguientes resultados se fundamentan en la aplicación del test de proliferación-citotoxicidad sobre la línea celular PE/CA-PJ15 de cada uno de los compuestos objeto de estudio. Los ensayos se han realizado por duplicado durante cuatro periodos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas) siendo, los resultados gráficos presentados a continuación, la media ponderada de ambos ensayos.

Apigenina

Tiempo	Concentración	1µM	5µM	10µM	20µM	50µM	100µM
24 horas	Media	0,422	0,469	0,437	0,398	0,362	0,346
	Desv. est.	1,73	2,429	4,843	1,659	7,14	3,274
	% respecto c	107,778	119,742	111,853	101,705	92,25	88,232
48 horas	Media	1,011	0,97	0,904	0,813	0,591	0,27
	Desv. est.	0,92	10,256	2,238	7,67	1,394	1,629
	% respecto c	106,61	101,966	95,369	85,923	62,357	28,553
72 horas	Media	1,677	1,561	1,517	1,211	0,58	0,233
	Desv. est.	12,828	15,269	14,15	24,34	12,391	2,117
	% respecto c	98,537	91,928	89,283	72,132	34,591	13,724
96 horas	Media	2,593	2,596	2,737	1,961	0,527	0,144
	Desv. est.	3,728	2,152	21,188	5,633	0,037	0,257
	% respecto c	90,941	91,006	96,795	68,422	18,461	5,032

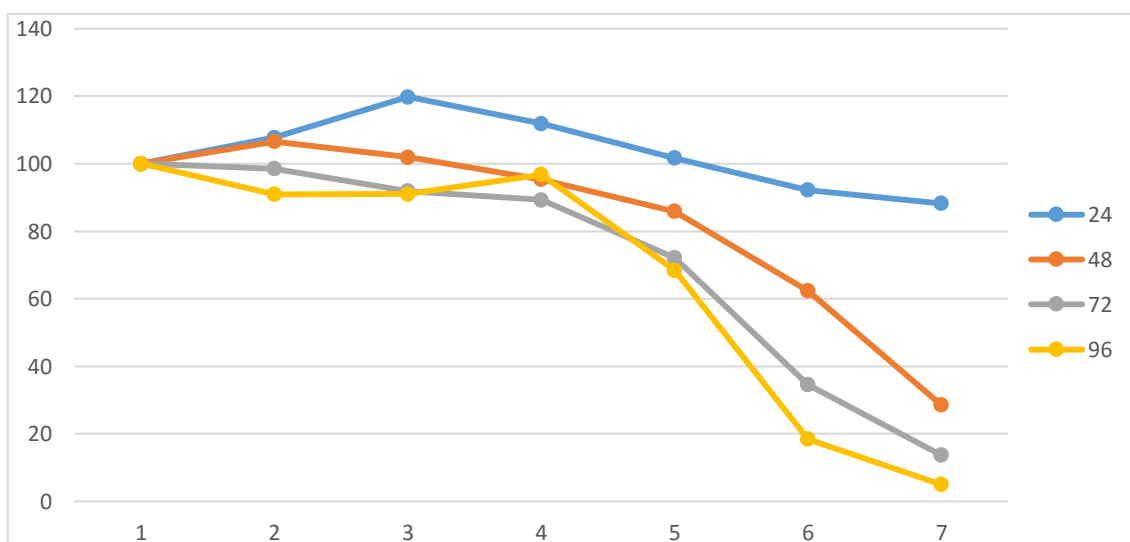


Fig.9. Efecto sobre la proliferación in vitro de células PE/CA-PJ15 utilizando apigenina, tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

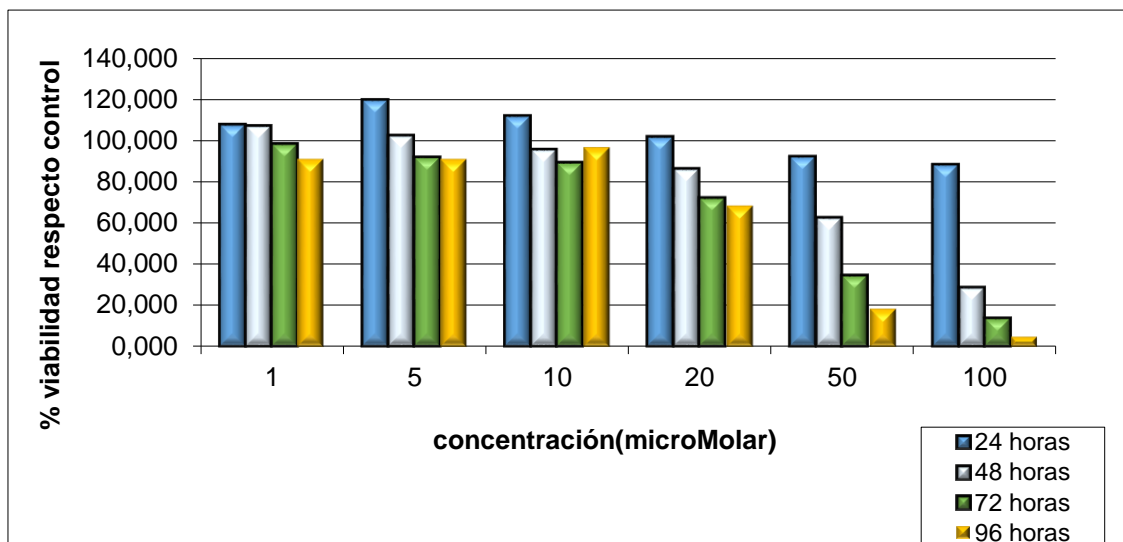


Fig.10. Efecto sobre la proliferación in vitro de células PE/CA-PJ15 utilizando apigenina, tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

En la prueba realizada con el compuesto apigenina después de 24 horas de tratamiento observamos un aumento en la viabilidad celular en las concentraciones más bajas 1µM - 10µM

Observamos que después de 72 horas de tratamiento utilizando las concentraciones más altas del compuesto en este caso 50µM y 100µM la viabilidad celular está por debajo del 40%.

A 96 horas de tratamiento se consigue una disminución de la viabilidad celular en todas las concentraciones probadas con una relación directa dosis-respuesta.

Ácido Carnósico

Tiempo	Concentracion	1µM	5µM	10µM	20µM	50µM	100µM
24 horas	Media	0,298	0,305	0,299	0,27	0,239	0,175
	Desv. est.	18,305	21,124	11,742	17,02	21,24	27,938
	% respecto control	96,536	99,595	94,257	87,757	80,205	41,209
48 horas	Media	0,552	0,548	0,549	0,462	0,337	0,124
	Desv. est.	4,248	10,868	1,703	3,93	0,76	19,515
	% respecto control	95,5	96,287	93,558	78,216	57,521	16,747
72 horas	Media	1,082	1,207	1,141	0,824	0,354	0,071
	Desv. est.	8,621	14,221	17,035	18,903	13,34	6,679
	% respecto control	101,525	106,625	99,763	70,214	28,777	4,723
96 horas	Media	1,841	1,614	1,386	1,016	0,345	0,005
	Desv. est.	5,652	23,606	26,992	40,66	10,218	1,98
	% respecto control	95,93	88,255	81,38	60,002	10,318	1,509

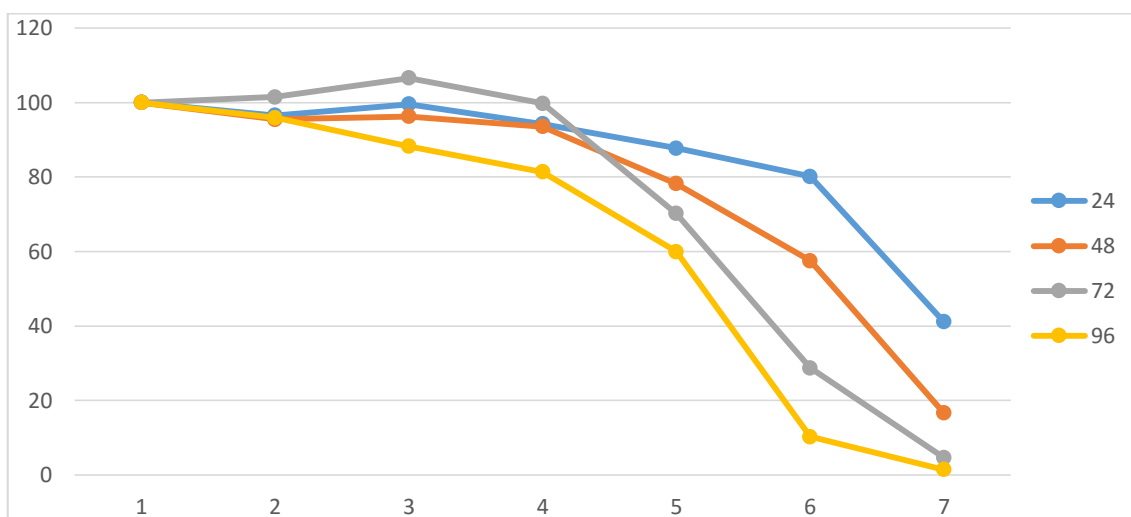


Fig.11. Efecto sobre la proliferación in vitro de células PE/CA-PJ15 utilizando ácido carnósico, tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

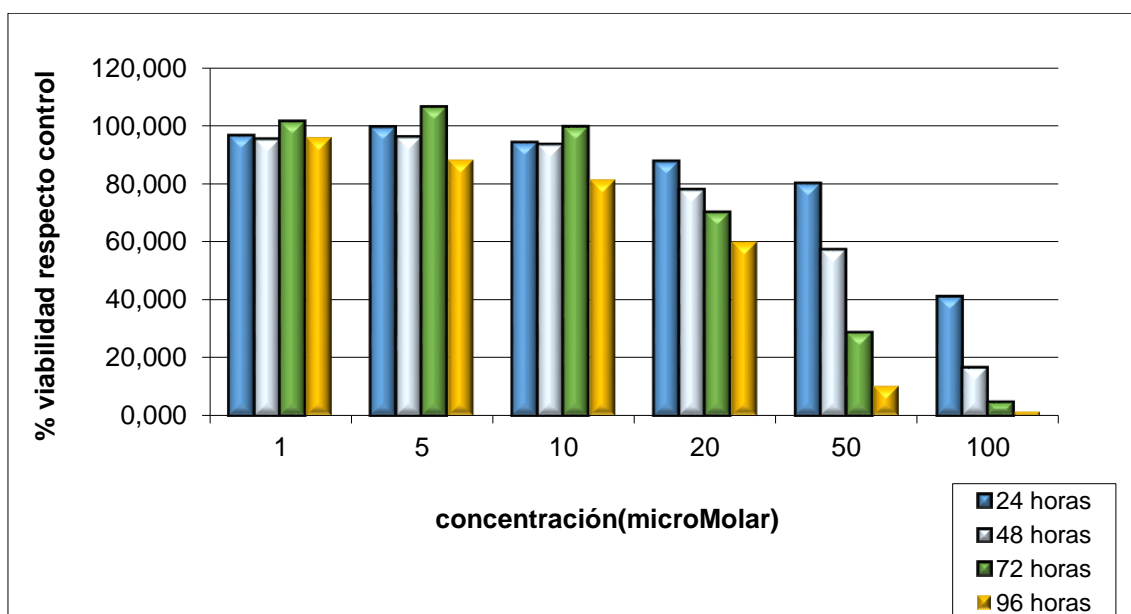


Fig.12. Efecto sobre la proliferación in vitro de células PE/CA-PJ15 utilizando ácido carnósico, tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

En la prueba realizada con el compuesto a después de 24 horas de tratamiento observamos un aumento en la viabilidad celular en las concentraciones más bajas 1µM - 10µM

Observamos que después de 72 horas de tratamiento utilizando las concentraciones más altas del compuesto en este caso 50µM y 100µM la viabilidad celular está por debajo del 40%.

A 96 horas de tratamiento se consigue una disminución de la viabilidad celular en todas las concentraciones probadas con una relación directa dosis-respuesta.

5-Fluorouracilo

Tiempo	Concentracion	1µM	5µM	10µM	20µM	50µM	100µM
24 horas	Media	0,271	0,226	0,235	0,213	0,206	0,198
	Desv. est.	15,781	27,352	33,375	9,426	11,788	8,894
	% respecto control	112,607	97,174	102,381	87,594	85,42	81,626
48 horas	Media	0,451	0,43847	0,352	0,307	0,259	0,207
	Desv. est.	15,809	18,183	13,62	1,697	13,184	5,219
	% respecto control	104,208	100,742	81,169	72,161	59,274	48,162
72 horas	Media	0,665	0,562	0,551	0,358	0,362	0,33
	Desv. est.	12,213	12,154	36,599	30,463	28,866	37,572
	% respecto control	97,543	82,314	78,743	50,697	51,448	45,959
96 horas	Media	1,07	0,773	0,67	0,37	0,268	0,26
	Desv. est.	5,842	3,908	1,166	2,466	1,106	3,4
	% respecto control	73,204	52,819	45,622	25,391	18,153	17,411

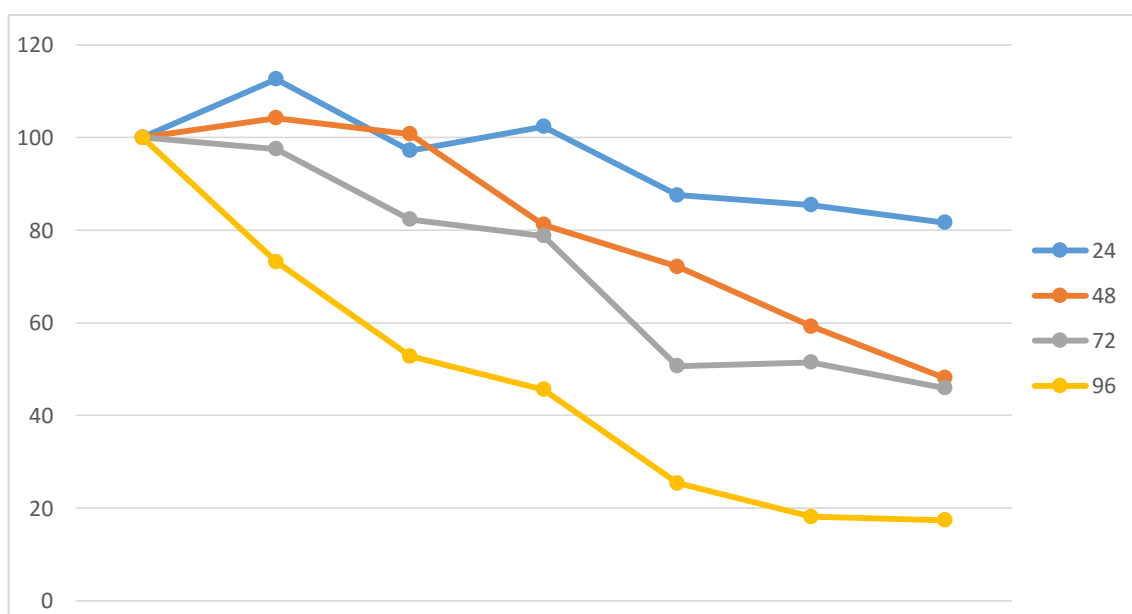


Fig.13. Efecto sobre la proliferación in vitro de células PE/CA-PJ15 utilizando 5-fluorouracilo, tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

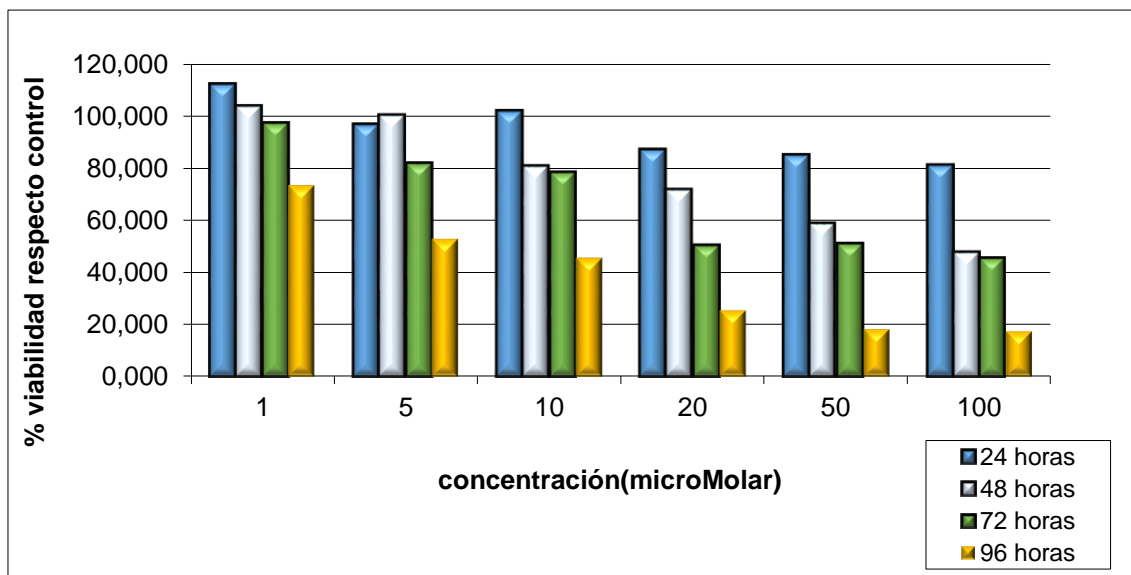


Fig.14. Efecto sobre la proliferación in vitro de células PE/CA-PJ15 utilizando 5-fluorouracilo, tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

En la prueba realizada con el compuesto 5-fluorouracilo después de 24 horas de tratamiento observamos un aumento en la viabilidad celular en la concentración más baja 1µM.

Observamos que después de 72 horas de tratamiento se consigue una disminución de la viabilidad celular en todas las concentraciones probadas con una relación directa dosis- respuesta; a una concentración de 20µM obtenemos el IC50.

A 96 horas de tratamiento continua la tendencia de disminución de la viabilidad celular en todas las concentraciones probadas. En la concentración más baja de 1µM se consigue una reducción del 27%, mientras que las concentraciones de 50µM y 100µM consiguen un resultado similar con una reducción de más del 80%

Paclitaxel

Tiempo	Concentracio	1nM	5nM	10nM	20nM	50nM	100nM
24 horas	Media	0,423	0,404	0,345	0,361	0,329	0,297
	Desv. est.	9,93	3,623	6,467	7,67	16,667	24,037
	% respecto c	109,159	103,037	88,596	93,008	86,31	79,643
48 horas	Media	0,813	0,799	0,753	0,713	0,611	0,521
	Desv. est.	20,315	13,698	6,264	2,068	15,486	1,107
	% respecto c	113,447	111,642	105,443	99,892	85,298	73,105
72 horas	Media	1,329	1,277	1,128	0,764	0,503	0,415
	Desv. est.	24,601	29,242	14,943	11,616	3,688	3,882
	% respecto c	117,163	112,584	99,365	67,345	44,319	36,582
96 horas	Media	2,117	1,966	1,853	1,443	0,761	0,581
	Desv. est.	0,066	3,909	14,463	4,476	2,411	2,54
	% respecto c	97,3	90,969	87,369	65,635	35,348	27,122

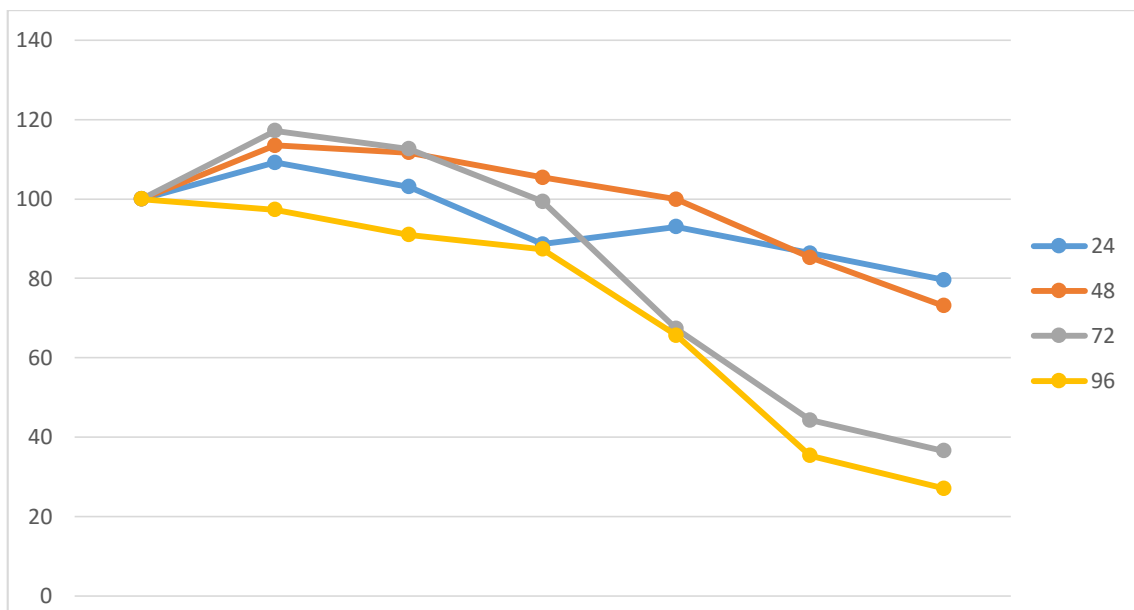


Fig.15. Efecto sobre la proliferación in vitro de células PE/CA-PJ15 utilizando paclitaxel, tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

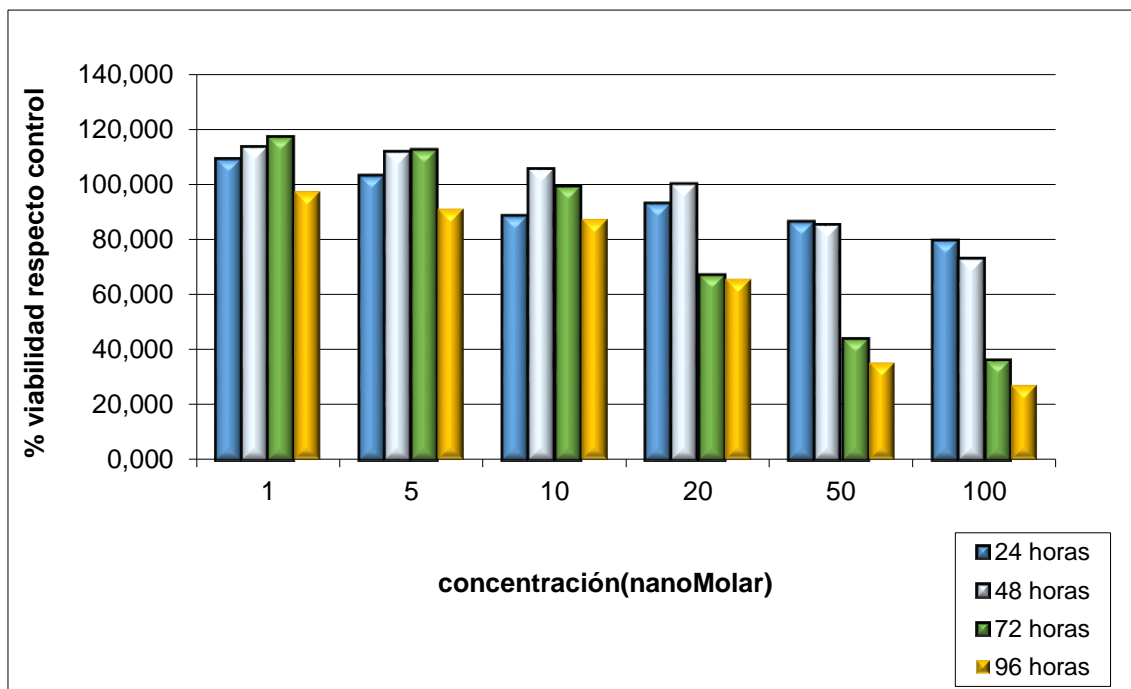


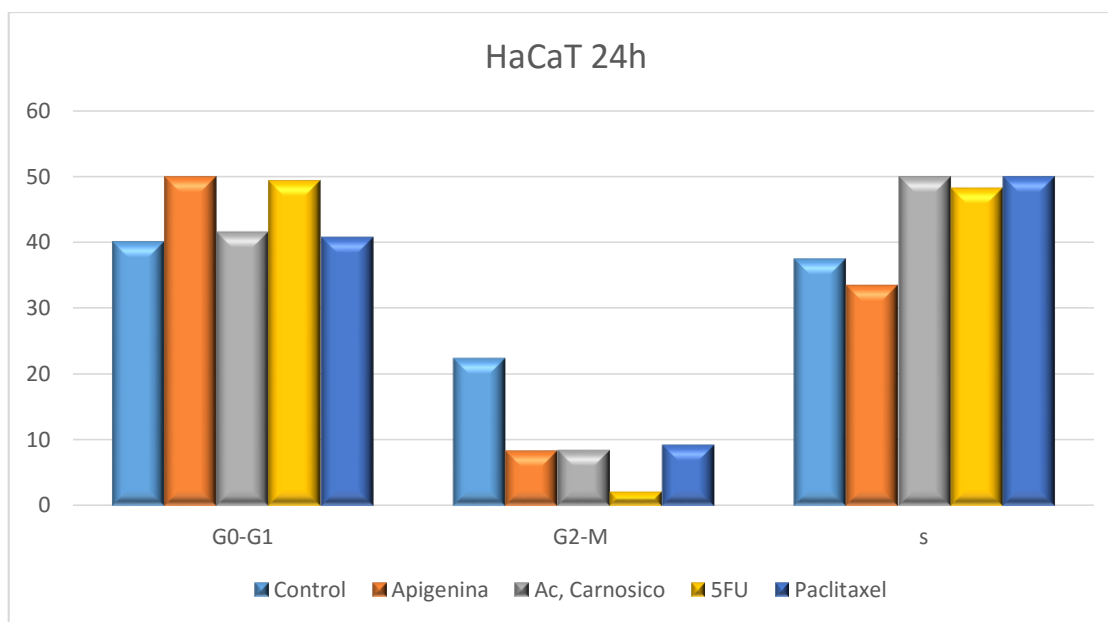
Fig.16. Efecto sobre la proliferación in vitro de células PE/CA-PJ15 utilizando paclitaxel, tras un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

En la prueba realizada con el compuesto a después de 24 horas de tratamiento observamos un aumento en la viabilidad celular en las concentraciones más bajas 1µM 5nM, que fue constante hasta las 72 horas. En las concentraciones más altas 50nM y100nM se consigue una disminución de la viabilidad celular.

Observamos que después de 72 horas de tratamiento se consigue una disminución de la viabilidad celular a partir 20nM.

A 96 horas de tratamiento se consigue una disminución de la viabilidad celular en todas las concentraciones probadas.

Ciclo celular HaCaT 24h



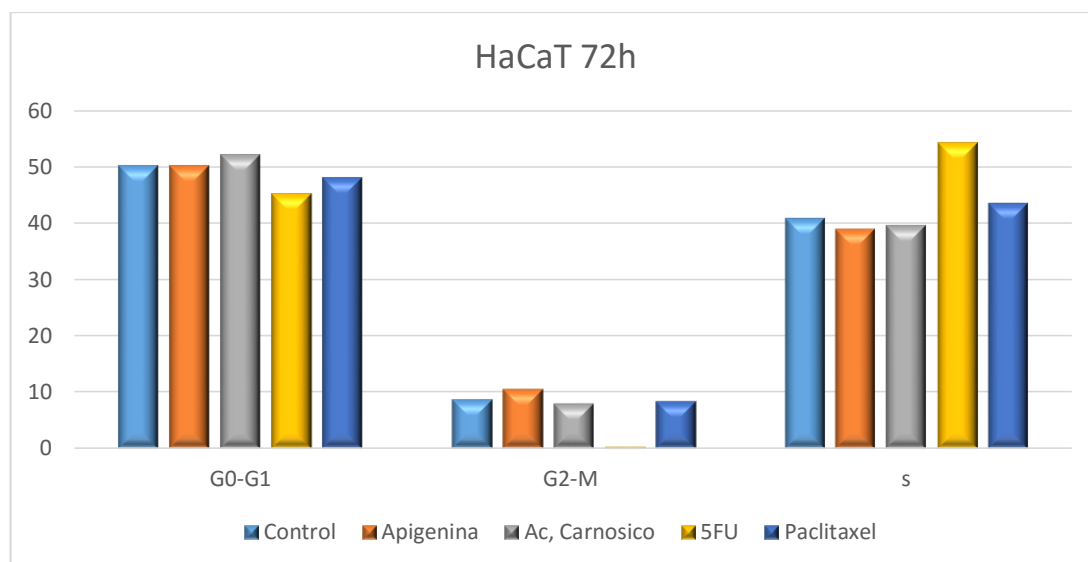
	G0-G1	G2-M	S
Control	40,08%	22,48%	37,44%
Apigenina	58,01%	8,44%	33,56%
Ac, Carnósico	41,57%	8,48%	49,95%
5-fluorouracilo	49,50%	2,19%	48,31%
Paclitaxel	40,78%	9,30%	49,93%

Para el ciclo celular de la línea celular HaCaT encontramos que a las 24 horas los compuestos ácido carnósico 49,95%, 5-fluorouracilo 48,31 y paclitaxel 49,93% presentaron un aumento en la fase S con respecto al control 37,44%

Para la fase G0-G1 la apigenina 58,01% y % 5-fluorouracilo 49,50% presentaron un aumento con respecto al control 40,08%

Para la fase G2-M todos los compuestos probados presentaron una disminución en esta fase con respecto al control, siendo el más representativo el 5-fluorouracilo 2,19%.

Ciclo celular HaCaT 72h



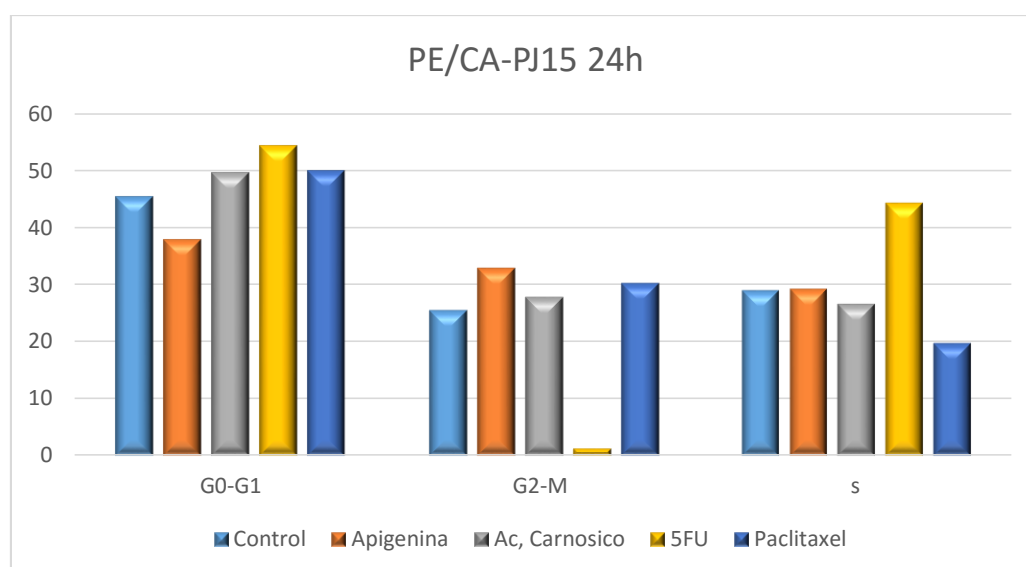
	G0-G1	G2-M	S
Control	50,21	8,84	40,94
Apigenina	50,36	10,62	39,02
Ac, Carnósico	52,28	8,06	39,66
5-fluorouracilo	45,31	0,36	54,33
Paclitaxel	48,04	8,47	43,50

Para el ciclo celular de la línea celular HaCaT encontramos que a las 72 horas de tratamiento la apigenina presenta un pequeño aumento de la fase G2-M con respecto al control mientras que el ácido carnósico presenta un ligero aumento en la fase G0-G1; ambos compuestos presentan una disminución en la fase S con respecto al control.

El compuesto paclitaxel presenta una ligera disminución 48,04% en la fase G0-G1 con respecto al control 50.21% y un ligero aumento en la fase S 43,50 con respecto al control 40,94%

El 5-fluorouracilo presenta los efectos más significativos de los compuestos probados, encontramos un aumento de la fase S 54,33% con respecto al control 40,94% la fase G0-G1 presenta una disminución de un 5% con respecto al control y la fase G2 prácticamente ha desaparecido 0,36% con respecto al control 8,84%

Ciclo celular PE/CA-PJ15 24h



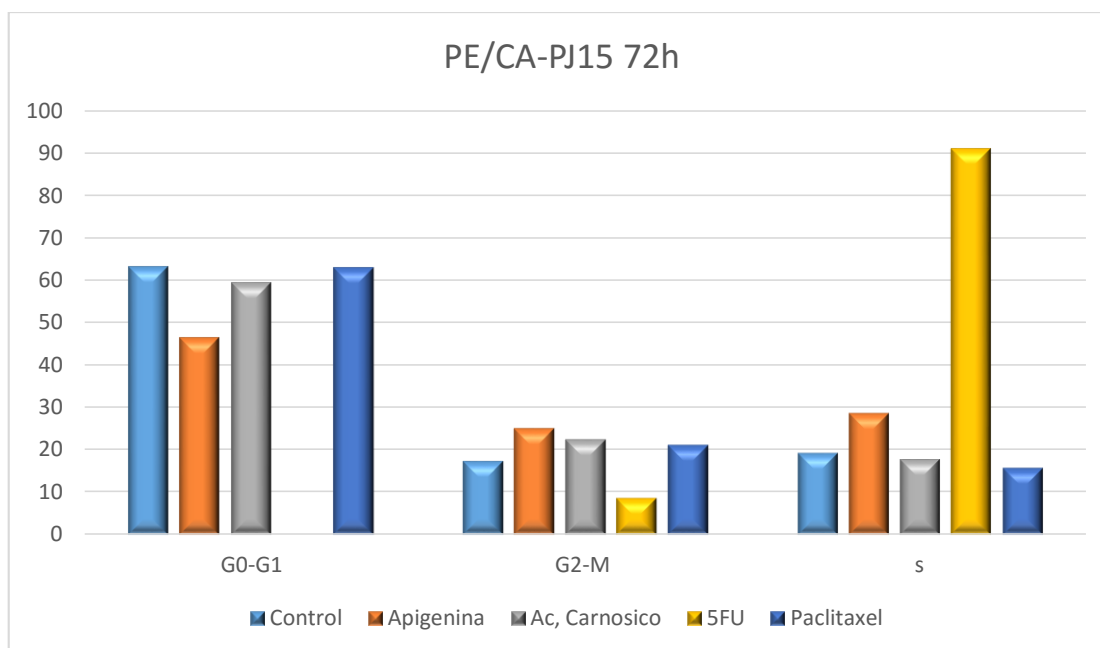
	G0-G1	G2-M	S
Control	45,44	25,54	29,01
Apigenina	37,90	32,88	29,22
Ac, Carnósico	49,59	27,82	26,59
5-fluorouracilo	54,40	1,27	44,32
Paclitaxel	50,02	30,25	19,73

Para el ciclo celular de la línea celular PECA PJ 15 encontramos que a las 24 horas de tratamiento la apigenina presenta una disminución en la fase G0-G1 con un porcentaje 37,90% los otros compuestos probados presentan aumento del porcentaje de células en esta fase: ácido carnósico, 49,59% paclitaxel 50,02%, 5-fluorouracilo 54,40% con respecto al control que es 45,44%.

Para la fase G2-M todos los compuestos probados presentaron un aumento en esta fase con respecto al control excepto el 5-fluorouracilo que presenta una disminución 1,27% con respecto al control 25,54%.

Con respecto a la fase S encontramos que el 5-fluorouracilo tiene un aumento considerable 44,32% con respecto al control 29,01% mientras que el paclitaxel tiene el porcentaje más bajo en esta fase del ciclo con 19,73% seguido del ácido carnósico con 26,59%

Ciclo celular PE/CA-PJ15 72h



	G0-G1	G2-M	S
Control	63,23	17,41	19,35
Apigenina	46,31	25,09	28,60
Ac, Carnósico	59,46	22,63	17,91
5-fluorouracilo	0,00	8,76	91,24
Paclitaxel	63,01	21,24	15,75

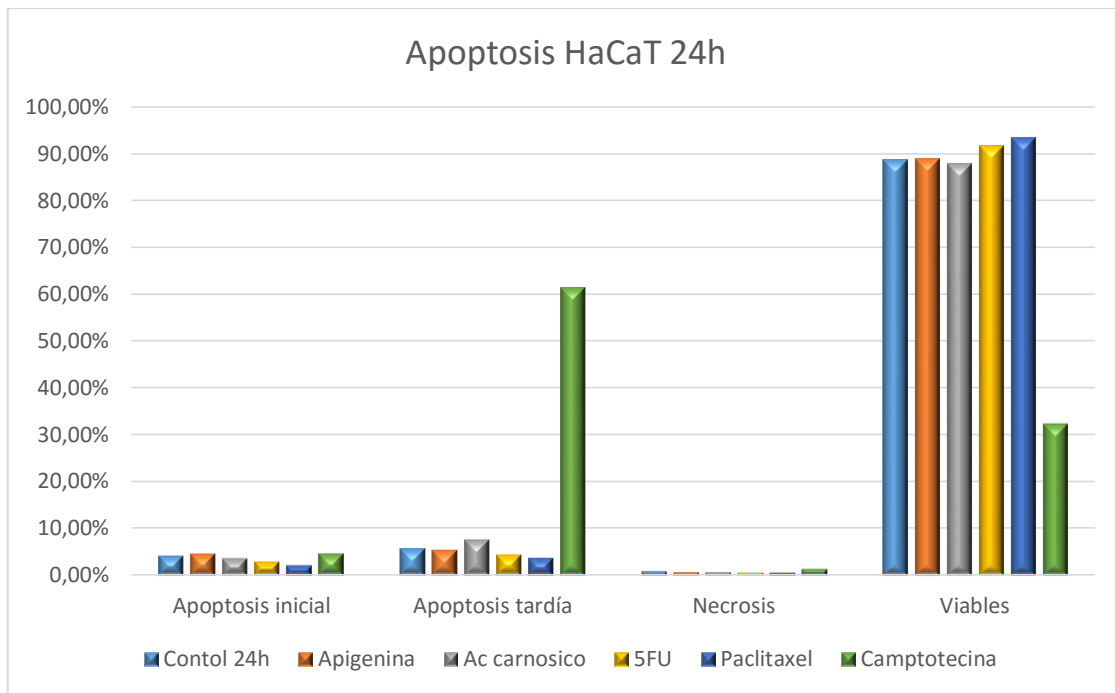
Para el ciclo celular de la línea celular PECA PJ 15 encontramos que a las 72 horas de tratamiento el compuesto 5-fluorouracilo ha disminuido totalmente (0,0) la fase G0-G1 con respecto al control 63,23% y ha hecho una parada del ciclo en la fase S 91,24% con respecto al control 19,35%.

La apigenina presenta una disminución en la fase G0-G1 46,31% y aumento en las fases G2-M 25,09% Y S 28,60%.

El ácido carnósico presentaba una pequeña disminución en las fases G0-G1 59,46% y S 17,91% y un aumento en la fase G2-M 22,63%.

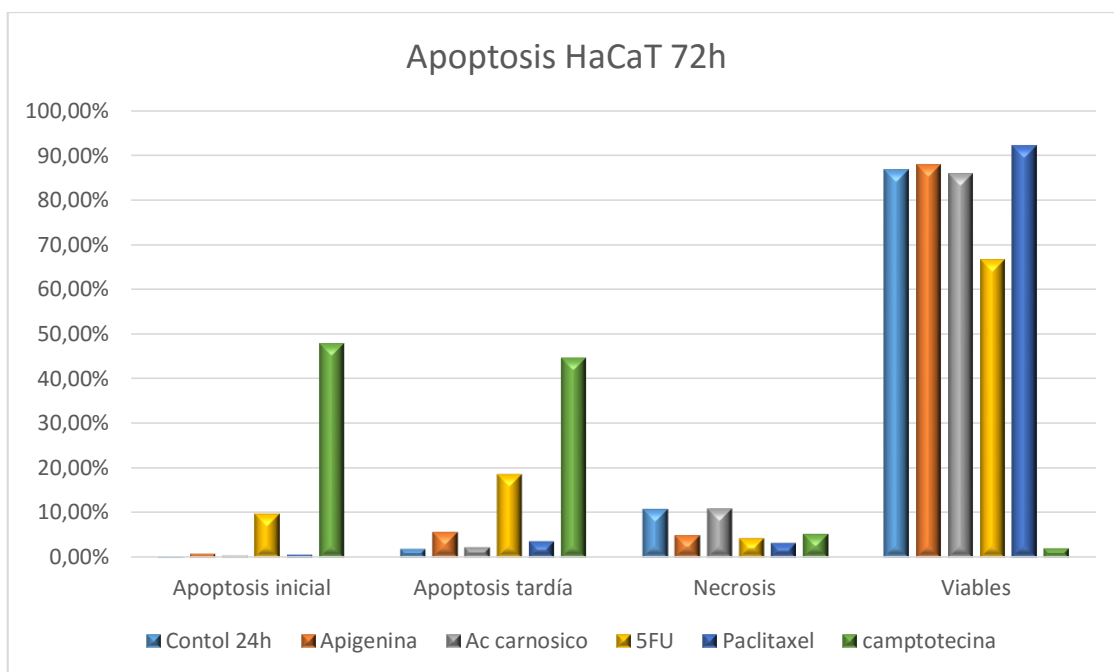
El paclitaxel presenta una leve disminución en la fase S 15,75% y un aumento en la fase G2-M.

Efectos sobre la apoptosis en la línea HaCaT 24h



	Apoptosis inicial	Apoptosis tardía	Necrosis	Viables
Control 24h	4,3%	5,9%	1,0%	88,8%
Apigenina	4,7%	5,6%	0,8%	88,9%
Ac carnósico	3,7%	7,7%	0,8%	87,8%
5-fluorouracilo	3,1%	4,5%	0,6%	91,7%
Paclitaxel	2,2%	3,8%	0,6%	93,4%
Camptotecina	4,8%	61,4%	1,5%	32,3%

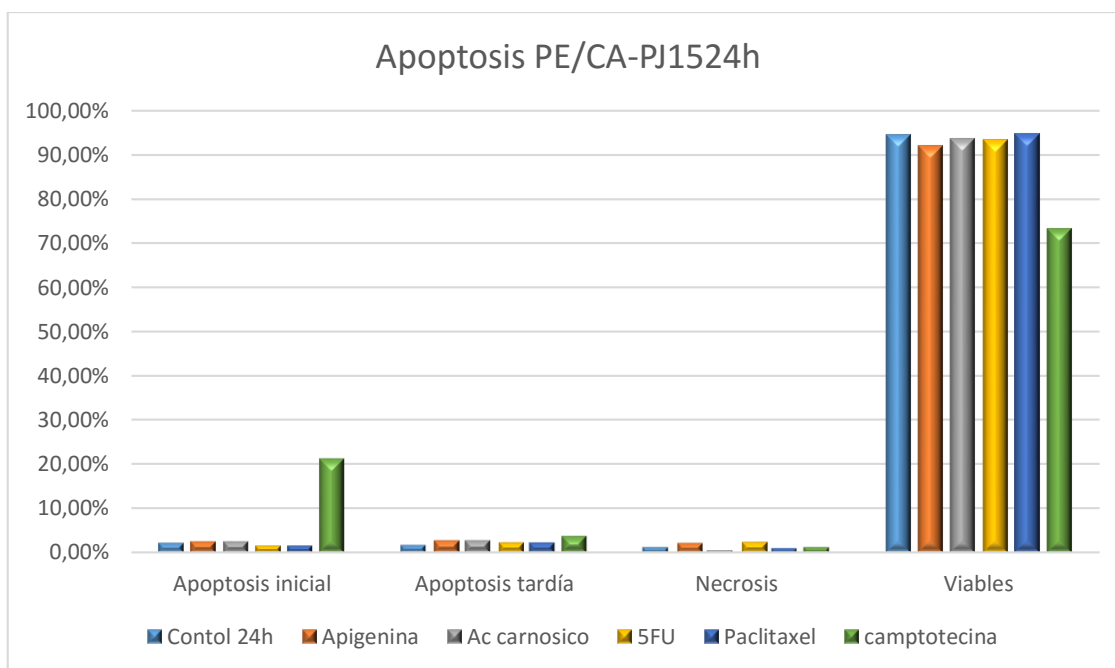
Efectos sobre la apoptosis en la línea HaCaT 72h



	Apoptosis inicial	Apoptosis tardía	Necrosis	Viables
Control 72h	0,3%	2%	11%	86,8%
Apigenina	1%	5,9%	5,2%	87,9%
Ac carnósico	0,5%	2,4%	11,1%	86%
5-fluorouracilo	10%	18,8%	4,5%	66,7%
Paclitaxel	0,7%	3,7%	3,4%	92%
Camptotecina	47,9%	44,6%	5,4%	2,2%

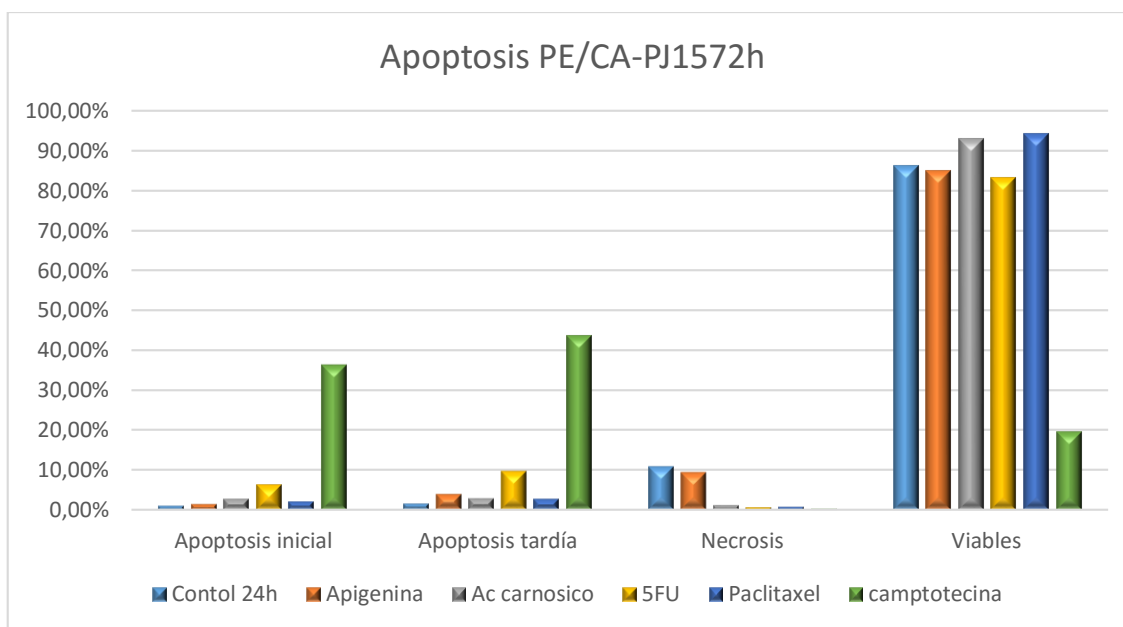
En el análisis del porcentaje de población celular HaCaT que se encontraba en lo que denominamos apoptosis inicial, apoptosis tardía y necrosis mostro valores más bajos que el control para los compuestos apigenina y paclitaxel, el ácido carnósico mantiene valores similares al control mientras que el 5-fluorouracilo presenta unos resultados destacables con un 20% más con respecto al control.

Efectos sobre la apoptosis en la línea PE/CA-PJ15 24h



	Apoptosis inicial	Apoptosis tardía	Necrosis	Viables
Control 24h	2,2%	1,8%	1,3%	94,7%
Apigenina	2,6%	2,9%	2,3%	92,2%
Ac carnosico	2,6%	2,9%	0,6%	93,8%
5-fluorouracilo	1,6%	2,4%	2,5%	93,5%
Paclitaxel	1,7%	2,4%	1,1%	94,8%
camptotecina	21,4%	3,8%	1,3%	73,5%

Efectos sobre la apoptosis en la línea PE/CA-PJ15 72h



	Apoptosis inicial	Apoptosis tardía	Necrosis	Viables
Control 72h	2%	3,3%	1,5%	93,2%
Apigenina	1,5%	4,0%	9,5%	85%
Ac carnósico	2,8%	3,0%	1,2%	93,0%
5-fluorouracilo	6,4%	9,7%	0,6%	83,2%
Paclitaxel	2,2%	2,8%	0,8%	94,3%
camptotecina	36,4%	43,7%	0,2%	19,7%

En el análisis del porcentaje de población celular PE/CA-PJ15 que se encontraba en lo que denominamos apoptosis inicial, apoptosis tardía y necrosis mostro valores más bajos que el control para el compuesto paclitaxel, el ácido carnósico mantiene valores similares al control mientras que el 5 fluorouracilo y la apigenina presenta unos resultados destacables entre un 8-10 % más con respecto al control.

V. DISCUSIÓN

El carcinoma oral de células escamosas es el sexto tumor maligno más frecuente a nivel mundial (Jemal A., 2008 y de Matos.,2012) y la séptima causa más común de muerte por cánceres en el mundo. La incidencia anual en todo el mundo de carcinoma de células escamosas se estimó en 500.000 casos, lo que representa el 3% de todos los tumores malignos en el año 2012; el 90% de las lesiones que se presentan en cavidad oral son de este tipo.

En 2015 la incidencia estimada de cáncer oral y faríngeo en España fue de 4.980 casos en hombres y 1.690 casos en mujeres, lo que daría una relación de 3 a 1 (Galceran.,2016).

A pesar de que la cavidad oral es un área de fácil acceso, la mayoría de consultas y diagnósticos asociados a esta patología se dan en estadios avanzados lo que dificulta el pronóstico y tratamiento. Se estima que el tratamiento de la enfermedad en estadios tempranos (estadios I o II) tiene éxito con frecuencia (80%). Para pacientes con enfermedad avanzada (estadios III y IV), la terapia estándar es mucho menos exitosa (menos del 30%). La recurrencia de la enfermedad ocurre aproximadamente entre el 20% y el 30% de los pacientes, en particular las locales o linfáticas.

A pesar de los avances recientes en cirugía, radioterapia y quimioterapia, la tasa de supervivencia global a los 5 años para los pacientes en fases avanzadas de la enfermedad es de las más bajas de los principales tipos de cáncer y no ha cambiado durante las últimas dos décadas. La localización más frecuente de este tipo de tumores es borde lateral y superficie ventral de la lengua, seguido de suelo de boca.

Por ahora, una de las principales medidas contra el cáncer oral es la prevención, es importante educar a las personas para que se realicen autoexamen de boca y aprendan a detectar los signos y síntomas de esta

patología, dado su fácil acceso y detección, además de concienciar sobre los factores de riesgo conductuales como lo son el consumo de tabaco y alcohol.

También es responsabilidad del odontólogo o el médico de Atención Primaria identificar cualquier lesión sospechosa que le pueda aparecer en boca o labio y realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad; una correcta Historia Clínica junto con una exploración exhaustiva extraoral e intraoral, teniendo especial cuidado en las zonas más frecuentes de aparición de lesiones cancerosas o lesiones premalignas, y el uso de pruebas complementarias como screening o biopsia para descartar la posibilidad que sea un cáncer de toda aquella lesión que persista más de dos o tres semanas en boca que no tenga una causa aparente.

Las opciones de tratamiento para los carcinomas orales, son variables y dependen de varios factores como del tamaño y localización del tumor primario, del estado de los ganglios linfáticos, presencia o ausencia de metástasis a distancia, o incluso, de los deseos del propio paciente y de la capacidad que tenga para tolerar el tratamiento.

Tanto la cirugía como la radioterapia, siguen siendo la primera opción para el tratamiento de los tumores de labio y cavidad oral, ya sea usados por separado, o en combinación con quimioterapia en estadios avanzados.

Cuando se utiliza la cirugía para el tratamiento de este tipo de cáncer se debe intentar preservar la máxima estructura sana posible, todo dependerá de la afectación de los nódulos cervicales. Si no lo están, bastará con extirpar toda la lesión con márgenes de seguridad, además de los ganglios cervicales. Si por el contrario, éstos están afectados será necesario realizar una cirugía radical estándar, extirpando el músculo ECM, milohioideo, nervio IX, glándula submaxilar, venas yugulares, sistema linfático cervical y polo inferior de parótida e incluso estructuras óseas vecinas si el tumor es muy

grande. El tratamiento quirúrgico para el cáncer oral compromete en gran medida el habla y la estética facial; además del compromiso a nivel psicológico que genera en el paciente (Vissink.,2003 y Schuster.,2012).

Al igual que en otros tipos de cáncer, la radioterapia juega un papel muy importante en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello. Está limitada debido a su toxicidad grave hacia las células normales cuando se aplica a dosis altas, mientras que tiene un mínimo efecto sobre las células cancerosas a dosis bajas. Por lo tanto, la búsqueda de agentes y modalidades que podrían aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la radiación es muy importante (radiosensibilizantes) (Reagan.,2008).

La dosis de la radioterapia va a depender de la localización y tipo de tumor, y la dosis utilizada y esquema de tratamiento utilizado. Normalmente, las dosis de radiación en un paciente con cáncer de cabeza y cuello alcanzan los 50-70 Gy, en un periodo de 5 a 7 semanas, una vez al día, 5 días a la semana.

Una de las nuevas técnicas es añadir cisplatino en el tratamiento de la radioterapia para ver si puede mejorar los resultados en el tratamiento. En el estudio presentado por S. Cooper, y tras analizar a 459 pacientes de los cuales 231 fueron asignados al azar para recibir radioterapia y 228 pacientes radioterapia además de cisplatino, llegó a la conclusión de que la radioterapia y la quimioterapia mejoran significativamente el control locorregional, además de aumentar la supervivencia.

Pero la radioterapia tiene también complicaciones graves que afectan a estructuras orales como glándulas salivales, hueso, dentición y mucosa oral, entre otros, provocando en el paciente consecuencias clínicas como mucositis, xerostomía, osteorradionecrosis y caries por radiación (Gevorgyan.,2013).

Todas estas consecuencias tienen un gran impacto en la calidad de vida del paciente, por ello se desarrolló la braquiterapia, tipo de radiación interna local, que se encuentra en contacto con la masa tumoral a través de unos adaptadores, como agujas o tubos, que son cómodos y no producen daño. Es una técnica poco lesiva ya que ofrece una radiación menor que la radioterapia externa, además de evitar que la radiación no llegue a los tejidos vecinos sanos gracias a un protector de acrílico de 2 mm de plomo.

Pero no en todos los casos se puede usar esta terapia, y es que cuando el hueso está afectado, o haya pérdida importante de tejido o necesite una gran escisión quirúrgica, está totalmente contraindicado utilizarla. Con el uso de esta técnica hay que considerar que en algunos casos puede producir mucositis en la zona donde aplicamos la radiación, pero este inconveniente suele ser leve y desaparece entre 1-1,5 meses (Casino.,2006).

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Actúa evitando que las células cancerosas crezcan y se dividan en más células. Debido a que las células cancerosas en general suelen tener un índice mitótico alto, la quimioterapia las destruye más rápido que a la mayoría de las células sanas. Pero las células de las mucosas también se dividen de forma rápida, por lo que éstas al igual que las células cancerígenas pueden ser sensibles a acción de la quimioterapia, ocasionando la aparición alteraciones en la mucosa oral y del tubo digestivo superior en más de la mitad de los pacientes sometidos a quimioterapia.

Un quimioterápico se puede usar solo o combinado con otros medicamentos. Entre los quimioterápicos más empleados en los cánceres de cabeza y cuello son la bleomicina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluoruracilo, la vinblastina y la ciclofosfamida (Infante.,2000 y Jacob.,2016). Con frecuencia, la combinación de medicamentos puede reducir el tamaño de los tumores con más eficacia, aunque probablemente causará más efectos

secundarios. Una combinación usada comúnmente es cisplatino y 5-fluorouracilo. Esta combinación es más eficaz que cualquier medicamento por sí solo en la reducción del cáncer de cavidad oral y de orofaringe. Otra combinación usada a menudo consiste en cisplatino, 5-fluorouracilo, mas docetaxel.

El 5-fluorouracilo es uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento del cáncer, este penetra en la célula utilizando el transportador natural de uracilo por un sistema de transporte facilitado. Una vez dentro de la célula, es transformado por distintas vías enzimáticas en varios metabolitos activos, responsables del efecto antineoplásico (Longley., 2003).

El efecto citotóxico se ejerce durante todas las fases del ciclo celular siendo máximo durante la fase de síntesis (S). La principal ruta metabólica es la conversión directa de 5-fluorouracilo en 5- fluorodeoxiuridina (5-FUdR) por la acción de la timidina fosforilasa. El 5-FUdR es a su vez fosforilado por la timidina quinasa (TK) transformándose en un metabolito activo, el 5'-fluoro-2' deoxiuridina monofosfato (5-FdUMP).

Posteriormente, el 5-FdUMP en presencia de folato reducido (5,10-metilentetrahidrofolato) forma un complejo estable unido covalentemente a la timidilato sintetasa (TS). Este complejo inhibe el funcionamiento de TS dando lugar a la depleción de deoxitimidina trifosfato (dTTP) e interfiriendo con la síntesis y reparación del ADN (Longley., 2003)

Existen numerosos estudios relacionados con el tratamiento del cáncer utilizando 5-fluorouracilo autores como Focaccetti et all. (2015) evaluaron los efectos de 5-fluorouracilo en HCM y HUVE sobre la proliferación celular utilizando un ensayo estándar MTT. La inhibición del crecimiento de células endoteliales se hizo estadísticamente significativa a concentraciones de 10µM o superiores después de 24 h, y se mantuvo a lo largo de todo el curso

del tiempo; compararon los efectos sobre las células vasculares con los resultados terapéuticos ejercidos sobre las células de cáncer de colon.

La comparación de la eficacia de 5-fluorouracilo en las líneas celulares de cáncer de colon confirmó una respuesta, con la mitad de la concentración máxima eficaz (EC50) de 13,72 μM para HCT116 y 106,8 μM para HT29 células. Los efectos secundarios sobre las células vasculares se produjeron a EC50 de 3.832 μM para HUVECs y 4.866 μM para HCMs. Las tasas de replicación celular variaron ampliamente entre cardiomiocitos, células endoteliales y tumorales.

En este mismo estudio se evaluó el ciclo celular el cual indicó una tendencia hacia un aumento en las células apoptóticas y una disminución en las células endoteliales de replicación (fase S) en los tratamientos con 5-fluorouracilo mayores de 1 μM . Además, investigaron los efectos citostáticos / citotóxicos de 5-fluorouracilo usando el ensayo de liberación de deshidrogenasa láctica (LDH), que mide la pérdida de integridad de la membrana mediante la detección de la actividad de la enzima LDH en el medio de cultivo. Concentraciones de 5-fluorouracilo mayores que 1 μM comprometieron significativamente la integridad de la membrana celular tanto para los cardiomiocitos como para las células endoteliales. Hemos examinado en profundidad la capacidad de 5-fluorouracilo para inducir la apoptosis utilizando Annexina V y 7AAD. Después de un tratamiento prolongado (96 horas) con 5-fluorouracilo, ambos tipos de células mostraron una muerte celular inducida por 5-fluorouracilo (Annexina V + / 7AD \pm). Con un porcentaje de apoptosis inducido en cardiomiocitos y células endoteliales estadísticamente significativo ($P < 0,05$) para concentraciones de 10 μM , 10 μM y 1mM.

En otro estudio realizado por Milczarek et al. (2014) se realizó el análisis del ciclo celular de tumores cosechados en ratones tratados tanto con 5-fluorouracilo solo y combinados con compuestos análogos de la vitamina D. Se observó que, en los tumores tratados con 5-fluorouracilo, el porcentaje de células en la etapa G0 / G1 disminuyó significativamente. Además, estas células fueron detenidas en la fase S ($P < 0,05$) y el porcentaje de muertes celulares aumentó. El PRI-2191 usado solo no afectó significativamente al ciclo celular de los tumores HT-29. Sin embargo, se utilizó en el tratamiento combinado con 5-fluorouracilo, aumentó el número de células en G0 / G1 y en paralelo disminuyó las células tanto en las etapas G2 / M y S, así como las células de muerte en comparación con 5-fluorouracilo solo. Los tumores de ratones tratados con PRI-2205 combinados con 5-fluorouracilo mostraron una distribución del ciclo celular similar a la de los ratones tratados con 5-fluorouracilo solo.

En nuestro estudio el 5-fluorouracilo afectaba significativamente la viabilidad celular de ambas líneas en la prueba de MTT; a partir de las 24 horas observamos una considerable disminución de la proliferación celular para todas las concentraciones probadas (1, 5, 10, 20, 50 y 100 μM) con una relación directa dosis respuesta, el IC50 se ha obtenido en la línea HaCaT a las 48 horas de tratamiento a una concentración de 20 μM mientras que en la línea tumoral PE/CA-PJ15 se consigue a las 72 horas de tratamiento.

En cuanto a la apoptosis, se observa un incremento en ambas líneas celulares a las 72h a una concentración de 5 μM , en la línea celular HaCaT se observaba un aumento del 20% mientras que en la línea tumoral PE/CA-PJ15 solo del 10.

En cuanto al ciclo celular observamos que la línea celular HaCaT y la línea tumoral PE/CA-PJ15 tras 24 horas presentaban un aumento en las

fases G0-G1 y la fase S y disminución en la fase G2-M. A las 72 se observa disminución en las fases G0-G1 y G2-M y aumento en la fase S.

Otro fármaco que también se usa como quimioterapéutico y que ha sido evaluado en nuestro estudio es el paclitaxel; los resultados que hemos obtenido en cuanto a la viabilidad celular utilizando paclitaxel, encontramos que en ambas líneas celulares HaCaT y PE/CA-PJ15 las concentraciones más bajas utilizadas (1, 5 y 10 nM) en las primeras 24 horas de tratamiento aumentan la viabilidad celular. A partir de las 72 horas observamos una considerable disminución de la proliferación celular para todas las concentraciones probadas (1, 5, 10, 20, 50 y 100 nM)

En cuanto a la prueba de apoptosis en la línea HaCaT observamos una disminución de la apoptosis, mientras que la línea tumoral PE/CA-PJ15 no existía ningún cambio con respecto a las células no tratadas. En las pruebas de ciclo celular la línea celular HaCaT se observaba un aumento en la fase S, mientras que la línea tumoral presentaba un aumento en la fase G2-M lo que concuerda con otros autores.

Maushagen R et al. (2016) han realizado pruebas in vitro donde la línea celular HNSCC fue tratada con 10 μ M paclitaxel por 24, 48 y 72 h. Los datos demuestran que paclitaxel induce un arresto en la fase G2 / M dependiente del tiempo, incrementa en la fracción SubG1 que representa las células apoptóticas con hipodiploides ADN. Estos resultados confirman que el paclitaxel induce la muerte celular programada en la línea celular HNSCC después de prolongar un bloqueo mitótico. En todas las líneas celulares HNSCC, la Fracción SubG1 aumentó notablemente entre las horas de tratamiento farmacológico 48 y 72 h, en comparación con los controles no tratados. El aumento dependiente del tiempo en la fracción SubG1 fue estadísticamente significativa en todas las líneas de células HNSCC analizadas.

Estos resultados fueron confirmados por la prueba de anexina V-APC / PI doble tinción, se tiñeron y se analizaron mediante citometría de flujo. Se mostró la inducción de apoptosis inducida por paclitaxel con una reducción en células viables bajo tratamiento.

A pesar de los avances recientes en cirugía, radioterapia y quimioterapia, la tasa de supervivencia global a los 5 años para los pacientes en fases avanzadas de la enfermedad es de las más bajas de los principales tipos de cáncer y no ha cambiado durante las últimas dos décadas (Funk GF y cols., 2002; Neville BW y Day TA, 2002).

Debido a que los tratamientos que se emplean en la actualidad no consiguen resolver totalmente esta enfermedad en todos los casos, y que presentan muchos efectos secundarios que en ocasiones obligan a la suspensión del tratamiento e incluso llegan a comprometer la vida de los pacientes, es necesaria la búsqueda de nuevas sustancias y realización nuevas investigaciones que permitan determinar su eficiencia.

Durante los últimos años, ha generado gran interés un grupo de sustancias de origen natural presentes en muchos casos en alimentos y bebidas a las cuales se han atribuido propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales. Por esta razón en este estudio hemos decidido poner a prueba un polifenol extracto del romero llamado ácido carnósico y un flavonoide extraído de la manzanilla y el perejil llamado apigenina.

Para determinar el efecto del ácido carnósico sobre el crecimiento celular, las células HaCaT y PE/CA-PJ15 se incubaron con diferentes concentraciones (1, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) durante 24, 48, 72 y 96 h y los resultados demuestran en la línea HaCaT en las concentraciones más altas

20 μ M - 100 μ M observamos una considerable disminución de la proliferación celular. El IC50 se ha establecido tras 24 de tratamiento a una concentración de 20 μ M. En la línea tumoral se observa una mayor resistencia a este compuesto, observamos que después de 72 horas de tratamiento utilizando las concentraciones más altas del compuesto en este caso 50 μ M y 100 μ M la viabilidad celular está por debajo del 40%, en ambas líneas pudimos observar que este compuesto inhibe el crecimiento celular de una manera dependiente de la concentración y el tiempo.

Otros autores han realizado pruebas en otras líneas celulares HL-60 y U937 sobre la proliferación celular: se incubaron con concentraciones crecientes de este agente durante un máximo de 96 h y luego directamente contado los resultados demuestran que el ácido carnósico inhibe el crecimiento celular de una manera dependiente de la concentración, lo cual concuerda con nuestros resultados. Valores de concentración inhibitoria semimáxima similares (6-7 μ M) se obtuvieron 24 - 96 h después del tratamiento.

Para evaluar el mecanismo de la inhibición del crecimiento, primero se examinó si la reducción del número de células era debida a un posible efecto citotóxico del ácido carnósico. Para este propósito, las células se teñieron con azul de tripán y la liberación de LDH a medio de cultivo se midió a lo largo de 96 h de incubación con ácido carnósico. No hubo reducción significativa en HL-60 y U937 (no se muestra) viabilidad celular, en comparación con células de control, se detectó a <7,5 μ M de ácido carnósico, aunque una dosis más alta (10 μ M) provocó un aumento en el número de las células teñidas con azul de tripano en un 10-15% por encima del control nivel. Se obtuvieron resultados similares usando el ensayo LDH. Por lo tanto, en todos los experimentos posteriores, se utilizó ácido carnósico 2,5 - 7,5 μ M.

A $<7,5 \ \mu\text{M}$, el ácido carnósico no afectó significativamente la viabilidad de las células ni indujo a la muerte celular apoptótica, tal como lo reveló el uso de diferentes marcadores de citotoxicidad.

En nuestro estudio el ácido carnósico afectaba significativamente la viabilidad celular en la prueba de MTT. En cuanto a la apoptosis, en ambas líneas celulares HaCaT y PE/CA-PJ15, a una concentración de 20 se observaba un aumento del 1%. En cuanto al ciclo celular observamos que la línea celular HaCaT experimentaba un ligero aumento en la fase G0-G1 a las 72h, mientras que en la línea tumoral PE/CA-PJ15 aumentaba ligeramente la fase G2-M.

Otros autores como Cattaneo, Lucia et al. (2015) plantearon que la inhibición de la viabilidad celular podría resultar de la inducción de la apoptosis y / o la detención del crecimiento celular, por lo que, para obtener información sobre los procesos celulares posiblemente afectados por el extracto de romero, el efecto sobre el ciclo celular fue investigado por citometría de flujo. Para ello se incubaron células de melanoma A375 con diferentes diluciones de extracto ácido carnósico, durante 24, 48 y 72 h, luego se marcaron con yoduro de propidio y se sometieron a análisis FACS. Los resultados, mostraron que los tratamientos a las diluciones 1: 120 y 1: 240 afectaron profundamente el ciclo celular, mientras que las diluciones más altas fueron ineficaces. En particular, la dilución 1: 120 promovió un aumento de hasta 30% de las células en fase sub-G0, presumiblemente muerte por apoptosis, de una manera dependiente del tiempo, con una fuerte reducción de la población en fase G0 / G1, mientras que la dilución 1: 240 indujo una fuerte reducción de la fase G0 / G1, contrabalanceada por una detención en la fase G2 / M, seguida de la aparición de células hiperploides. Los informes de la literatura muestran que muchas moléculas con efectos antiproliferativos sobre las células cancerosas, bloquean el ciclo celular en

la fase G2 / M, así como que diferentes mecanismos podrían ser implicados, incluyendo daño al ADN, o la interferencia con la formación de la mitótica huso. Independientemente del mecanismo específico involucrado, algunas de estas células pueden progresar a través de una mitosis retardada y morir en la mitosis o finalmente salir de la mitosis, produciendo una sola célula 4N G1, que se detiene en G1 o continúa ciclando, formando células hiperploides. En resumen, comparando estos últimos datos con los obtenidos con el recuento directo de células, parece que el extracto de romero podría inhibir la proliferación celular a través de mecanismos citotóxicos y citostáticos, de una manera dosis-dependiente del tiempo, como se observa para otras sustancias con propiedades anticancerígenas.

En resumen, este estudio permitió determinar que un extracto era capaz de reducir eficientemente, de una manera dependiente de la dosis y del tiempo, la proliferación de la línea celular de melanoma A375 humano, resistente a agentes citotóxicos. La investigación del ciclo celular indicó que el extracto de romero inhibía la proliferación celular a través de efectos tanto citotóxicos como citostáticos. La evaluación de la producción de ROS celular y de la carbonilación de proteínas indicó que el efecto antiproliferativo no se debía a una actividad prooxidante del extracto.

También se han realizado experimentos in-vivo. Manoharan et al (2010) utilizaron un total de 40 hámsters, que fueron distribuidos al azar en cuatro grupos de diez animales en cada uno. Grupo I los animales sirvieron como control y fueron pintados con parafina líquida solo tres veces a la semana durante 14 semanas en su vestibular izquierdo bolsas Los animales de los Grupos II y III fueron pintados con DMBA al 0,5% en parafina líquida tres veces a la semana durante 14 semanas en sus bolsas bucales izquierdas. Los animales del Grupo III recibieron por vía oral ácido carnósico a una

dosis de 10 mg / kg de peso corporal / día, comenzando una semana antes de la exposición al carcinógeno y continuando en los días alternando a la pintura DMBA, hasta el final del experimento. Los animales del grupo IV recibieron una administración oral de ácido carnósico 10 mg / kg de peso corporal / día.

La administración oral de ácido carnósico a una dosis de 10 mg / kg de peso evitó la aparición del tumor y redujo las severidades de la hiperplasia, displasia e hiperqueratosis en los hámsters tratados con DMBA (Grupo III). No se observó tumor en los animales de control pintados con parafina líquida sola (Grupo I) Así como los animales administrados solo con ácido carnósico (Grupo IV).

En cuanto a la Apigenina Maggioni et al. (2013) estudiaron su efecto sobre la línea de cáncer oral SCC-25 y queratinocitos sanos (HaCaT). En los ensayos de viabilidad celular (MTT), la apigenina redujo la supervivencia del cultivo en ambas líneas celulares, pero sobre todo en las SCC-25, que fue significativamente menor al control en las tres concentraciones de estudio (25, 50 y 100 μ M). En concordancia con este estudio los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular para las líneas HaCaT y PE/CA-PJ15 los resultados son significativamente menores al control para las concentraciones utilizadas (1, 5, 10, 20, 50 y 100 μ M). También ha sido reportado un efecto inhibitorio de la proliferación en células de cáncer de próstata respecto a células prostáticas no transformadas, ambas tratadas con apigenina (Gupta.,2001). A las 24 h, obtuvieron d.e.s con las tres concentraciones en las SCC-25, destacando los valores de viabilidad por debajo del 50% con la concentración de 100 μ M, sin embargo, con las HaCaT estos valores no eran tan bajos, y solo eran significativos a 100 μ M.

Estos autores también realizaron el test de apoptosis con Anexina V en ambas líneas a las 24h y con la concentración de 100 μ M. En la SCC-25, tanto la apoptosis inicial (20 vs 1,5%) como la tardía (14,5 vs 4,8%) se vieron

aumentadas respecto al control, mientras que con las HaCaT se apreció un ligero aumento, pero no significativo.

En el estudio del ciclo celular, que realizaron a las 24 y 48 horas, también con la concentración de apigenina de 100 μ M, observando un bloqueo en G₂/M en ambas líneas, con d.e.s a las 48 h.

En nuestro estudio en las pruebas realizadas a una concentración de 20 μ M en las líneas celulares HaCaT y PE/CA-PJ15 un aumento de la fase G₂/M en ambas líneas, con datos significativos a las 72 h.

En cuanto a la apoptosis en las pruebas realizadas a una concentración de 20 μ M en la línea celular HaCaT no observamos ninguna variación significativa con respecto al control mientras que en la línea tumoral PE/CA-PJ15 a las 72h se evidencia un aumento significativo de la apoptosis.

Al estudiar la ciclina B1 en las SCC-25, una de las proteínas que regula el ciclo celular (transición G₀/G₁ y G₂/M), no encontraron modulaciones destacables en su expresión, por lo que estudiaron los niveles de otra proteína asociada, llamada CDK1, no encontrando tampoco ninguna variación respecto al control. Sin embargo, sí encontraron que el tratamiento con apigenina favorece la modulación del ciclo celular mediante la ciclina D₁ (transición G₀/G₁) en la línea SCC-25 (en HaCaT también se observó diferencia pero no e.s) y en la ciclina E (transición G₁/S) en este caso solamente en HaCaT.

Sin embargo, la dificultad en la correlación de los estudios in vitro con aquellos realizados in vivo, quedó patente en el trabajo realizado por Swanson et al. (2014). Estos autores observaron una actividad antiproliferativa dosis-respuesta en la línea celular FaDu (carcinoma de células escamosas faríngeo) tratada con apigenina y con kaempferol, siendo la primera más efectiva, con una IC₅₀ de 20 μ M frente a la de 46 μ M del

kaempferol. Para testar el efecto in vivo de la apigenina, administraron 50 µg diarios de esta flavona mediante gavage a ratones atímicos nu/nu durante todo el experimento. Después de una semana de tratamiento, inocularon en el flanco izquierdo de cada animal por vía subcutánea una suspensión con 1×10^5 células FaDu. Fueron midiendo con calibre el volumen de los tumores que se iban desarrollando, y al final del experimento, eran mayores los tumores de los animales tratados con apigenina que los de los controles con d.e.s (3.024 vs 1858 mm³).

Según nuestra experiencia, en estudios previos realizados in vivo por nuestro grupo de investigación, la apigenina se ha comportado como agente quimiopreventivo, disminuyendo tanto la incidencia como el volumen de los tumores desarrollados. En un trabajo publicado por Gómez-García et al. (2013), se aplicó tópicamente a los animales (hámster sirio) en la mucosa yugal, el carcinógeno químico 7,12-dimetil-benzantraceno (DMBA). Un grupo de animales, además, fue tratado con apigenina potásica administrada por vía oral, obteniendo una reducción de la incidencia de tumores del 50% respecto al grupo control. Además, estos tumores tenían un comportamiento biológico menos agresivo y un volumen mucho menor (140 vs 9 mm³). En otro trabajo del grupo publicado en 2014 (Baldasquín-Cáceres et al.), utilizamos 50 hámster sirios divididos en 5 grupos, que fueron tratados con DMBA de forma tópica y diferentes polifenoles por vía oral: apigenina potásica, catequinas del cacao, eriocitrina y ácido rosmarínico. Los animales se sacrificaron después de 12 semanas, tras las que se procedió al estudio macro y microscópico, que incluía el marcaje inmunohistoquímico con PCNA (marcador de proliferación celular) y p53 (antioncogen que se ve alterado en múltiples tumores, incluyendo el COCE). Todos los grupos tratados con polifenoles mostraron menor incidencia de tumores, mayor diferenciación celular y menores puntuaciones en el grado de invasión

tumoral que los animales control, destacando la apigenina y el ácido rosmarínico. Probablemente, la diferencia con el estudio de Swanson et al. (2014) venga dada por el tipo de tumor. En nuestro caso, se trataba de tumores inducidos por un carcinógeno aplicado a los animales, es decir, tumores provocados y desarrollados por los propios animales, mientras que en el trabajo de Swanson, se inoculaban células humanas muy poco diferenciadas de CCE faríngeo. Está descrito que la apigenina puede bloquear el receptor AHR, con la consiguiente inducción de las enzimas de metabolización de fase I como las CYP1A1, pudiendo intervenir así en la inhibición de la activación metabólica del carcinógeno DMBA. Este mecanismo, obviamente, no estaría activo en los tumores inducidos por explantes celulares, como los del trabajo de Swanson. El hecho de que no sólo no sea favorable el tratamiento con apigenina, sino que favorezca la proliferación tumoral, Swanson et al. Lo atribuyen a una posible activación de los receptores estrogénicos α y β que ya ha sido reportada en células de cáncer de mama en las que la apigenina favorece su proliferación por encima del control debido a este mecanismo (Hye.,2006).

Los cultivos celulares presentan una serie de ventajas y desventajas. Entre las ventajas más importantes que cabe resaltar es que resulta más económico que realizar experimentación en un modelo “in-vivo”, no es necesario el sacrificio de animales (una vez está establecida la línea celular), el control de las condiciones físico-químicas (pH, temperatura, presión osmótica, presión parcial de O₂ y CO₂), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.).

Para algunas líneas celulares se han establecido medios definidos, lo que permite un mantenimiento en óptimas condiciones y obtener réplicas idénticas en cada subcultivo, así las características de la línea celular se conservan durante varias generaciones, permitiendo una mayor estabilidad

en los ensayos y facilitando mucho el tratamiento estadístico de los resultados.

Como aspecto negativo sería la validez del modelo 'in vitro'. En realidad, un cultivo celular es un disgregado celular de un tejido y se diferencia de éste en que se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido ya que éstas se propagan en dos dimensiones, y también se han perdido las interacciones entre los distintos tipos celulares y entre las células y la matriz extracelular. Pero quizá, la mayor diferencia se encuentra en la carencia de los componentes sistémicos implicados en la regulación de la homeostasis "in vivo", especialmente los sistemas nervioso y endocrino. Por estas razones el cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo 'in vivo' pero es una alternativa válida en muchas situaciones.

Como línea de investigación futura, nos planteamos continuar con el estudio de estos compuestos y otros más que nos generen interés, dados los buenos resultados en las pruebas de citotoxicidad. Sería interesante realizar más estudios a mayores concentraciones de las sustancias probadas para análisis de ciclo celular y apoptosis. Además de esto consideramos que resultaría de gran interés realizar pruebas adicionales realizando la combinación de citotóxicos, ya que hoy en día es un concepto que parece incuestionable y necesario en el tratamiento del cáncer si queremos obtener una mayor capacidad antitumoral evitando en la medida de lo posible la formación de resistencias y potenciar el efecto del fármaco. Los efectos sinérgicos entre fármacos provocan una menor toxicidad sistémica y por consiguiente la disminución de los posibles efectos secundarios del tratamiento. Una vez establecidas todas las pruebas "in-vitro" y tener resultados satisfactorios, nos plantearemos la realización de pruebas en un modelo "in-vivo".

VI. CONCLUSIONES

- Todos los extractos estudiados (ácido carnósico, apigenina, 5-fluorouracilo y paclitaxel) mostraron efecto antiproliferativo y/o citotóxico con relación directa tiempo–dosis respuesta, tanto en la línea de queratinocitos normales HaCaT como en la línea tumoral PE/CA-PJ15
- En el estudio del ciclo celular sobre la línea HaCaT, todos los compuestos provocaron un bloqueo en la fase G2-M a las 24h, mientras que a las 72h, solamente se mantenía en el 5-fluorouracilo.
- En la línea celular transformada PE/CA-PJ15, el agente que mejor se comportó fue el 5-fluorouracilo, con un gran bloqueo de la fase G2-M a las 24h, 72h y un aumento de la fase de síntesis.
- En el estudio de apoptosis sobre la línea HaCaT, el ácido carnósico fue el agente que provocó un mayor porcentaje de células en apoptosis tardía a las 24h, mientras que a las 72h fue en 5-fluorouracilo el tratamiento que indujo más apoptosis en esta línea celular.
- En la línea celular PE/CA-PJ15 también fue el 5-fluorouracilo el agente que indujo mayor porcentaje de células apoptóticas en ambos tiempos de estudio.
- All extracts examined (carnosic acid, apigenin, 5-fluorouracil and paclitaxel) showed antiproliferative and / or cytotoxic effects with a direct time-dose response relationship, both in the normal HaCaT keratinocyte line and in the PE/CA-PJ15 tumor line.
- In the study of the cell cycle on the HaCaT line, all compounds caused blockade in the G2-M phase at 24h, while at 72h, it was only maintained at 5-fluorouracil.
- In the transformed cell line PE/CA-PJ15, 5-fluorouracil was the best agent, with a large blockade of the G2-M phase at 24h, 72h and an increase in the synthesis phase.
- In the study of apoptosis on the HaCaT line, carnosic acid was the agent that caused a higher percentage of cells in late apoptosis at 24h, whereas at 72h it was in 5-fluorouracil treatment that induced more apoptosis in this cell line.
- In the PE/CA-PJ15 cell line 5-fluorouracil was also the agent that induced a higher percentage of apoptotic cells at both study times.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrawal GP, Joshi PS, Agrawal A. Role of HPV-16 in pathogenesis of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma and correlation of p16INK4a expression in HPV-16 positive cases: An immunohistochemical study. *ISRN Pathol.* 2013;1–7.
2. Almogbel, Ebtehal, and Naila Rasheed. “Protein Mediated Oxidative Stress in Patients with Diabetes and Its Associated Neuropathy: Correlation with Protein Carbonylation and Disease Activity Markers.” *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR.* 2017; 2: 21–25.
3. Angiero F, Gatta LB, Seramondi R, Berenzi A, Benetti A, Magistro S, Ordesi P, Grigolato P, Dessy E. Frequency and role of HPV in the progression of epithelial dysplasia to oral cancer. *Anticancer Res.* 2010; 30: 3435-3440.
4. Argiris, A., Karamouzis, M.V., Raben, D., and Ferris, R.L. Head and neck cancer. *The Lancet.* 2008; 371: 1695–1709
5. Arribas L, Hurtós L, Fort E, Peiró I. Factores pronóstico de desnutrición a partir de la valoración global subjetiva generada por el paciente (VGS-GP) en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. *NutrHosp.* 2013; 28: 155-163.
6. Baldasquín Cáceres B, Gómez García FJ, López Jornet P, Castillo Sánchez J, Vicente Ortega O. Chemopreventive potential of phenolic compounds in oral carcinogénesis. *Arch Oral Biol* 2014; 59: 1101-1107.

7. Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuño A, Del Rio JA. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 1997; 45:4505–4515.
8. Benedi J, Gomez Del Rio M, Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional* Vol. 20. Núm. 2. 2006.
9. Bhagwat S., Haytowitz D.B., Holden J.M., USDA Database for the Flavonoid Content for Selected Foods. Release 3. Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 2011, Web site: [<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>].
10. Bose KS, Vyas P, Singh M. Plasma non-enzymatic antioxidants- vitamin C, E, beta-carotenes, reduced glutathione levels and total antioxidant activity in oral sub mucous fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012; 16: 530-532.
11. Borowski B. Les soins bucco-dentaires du malade cancéreux. Paris: Masson 1986; 60-65.
12. Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* 2005; 35: 187–193.
13. Brown LM, Swanson CA, Gridley G, et al. Adenocarcinoma of the esophagus: role of obesity and diet. *Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87: 104–109.

14. Butt FM, Chindia ML, Rana F. Oral squamous cell carcinoma in human immunodeficiency virus positive patients: clinicopathological audit. *J Laryngol Otol.* 2012; 126: 276-278.
15. Byers LA, Rudin CM. Small cell lung cancer: where do we go from here? *Cancer* 2015; 121: 664–672.
16. Casino AR, Toledan IP, Jorge JF, Díez JMO, Llobet CC, Prat MA. Brachytherapy in lip cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11: 223-229.
17. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004; 108: 741–749.
18. Cattaneo, Lucia et al. Anti-Proliferative Effect of *Rosmarinus Officinalis* L. Extract on Human Melanoma A375 Cells. Ed. Miguel Angel Medina. *PLoS ONE* 2015; 10(7):e0132439.
19. Ceriello A, Testa R. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:32-36.
20. Chiang, Shih-Chieh et al. “Mitochondrial Protein-Linked DNA Breaks Perturb Mitochondrial Gene Transcription and Trigger Free Radical–induced DNA Damage.” *Science Advances* 2017; e1602506.

21. Chen X, Sturgis EM, Lei D, Dahlstrom K, Wei Q, Li G. Human papillomavirus seropositivity synergizes with MDM2 variants to increase the risk of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2010; 70(18):7199-7208.
22. Choi, S., Youn, J., Kim, K., Joo, D. H., Shin, S., Lee, J., Lee, H. K., An, I., Kwon, S., Youn, H. J., Ahn, K. J., An, S., Cha, H. J. "Apigenin inhibits UVA-induced cytotoxicity in vitro and prevents signs of skin aging in vivo". *International Journal of Molecular Medicine* 2016; 38: 627-634.
23. Chuang, S.-C., Scelo, G., Tonita, J.M., Tamaro, S., Jonasson, J.G., Kliewer, E.V. et al. Risk of second primary cancer among patients with head and neck cancers: a pooled analysis of 13 cancer registries. *Int J Cancer.* 2008; 123: 2390–2396
24. Cianfriglia F., Di Gregorio D. A., Manieri A. Multiple primary tumours in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, 1999; 35: 157-163.
25. Conger AD. Loss and recovery of taste acuity in patients irradiated in the oral cavity. *Radiat Res* 1973; 53: 338-347.
26. Cox JD. Dose response for local control with hyperfractionated radiation therapy in advanced carcinoma of the upper aerodigestive tracts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18: 515-521.
27. Cuerda C, Luengo L.M, Valero M.A, Vidal A, Burgos R, Calvo F, y cols. Antioxidants and diabetes mellitus: review of the evidence. *Nutr Hosp.* 2011; 26: 68-78.

28. de Cássia Braga Ribeiro K, Kowalski LP, Latorre Mdo R. Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129: 219-228.
29. de Matos FR, Lima ED, Queiroz LM, da Silveira EJ. Analysis of inflammatory infiltrate, perineural invasion, and risk score can indicate concurrent metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 70: 1703–1710
30. Elting LS, Cooksley C, Chambers M, Cantor SB, Manzullo E, Rubenstein EB. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. *Cancer*. 2003; 98: 1531-1539.
31. Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS. Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;68: 1110-1120.
32. Falaki F, Dalirsani Z, Pakfetrat A, Falaki A, Saghravarian N, Nosratzahi T, y cols. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: a retrospective study and review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16: 473-477.

33. Fillion E, McClure L, Huang D, Seng K, Kaplan M, Dimitrios A et al. Higher incidence of head and neck cancers among vietnamese American men in California. *Head Neck*. 2010; 32(10): 1336-1344.
34. Focaccetti, Chiara et al. Effects of 5-Fluorouracilo on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. Ed. Ying-Jan Wang. *PLoS ONE* 10.2 2015; e0115686.
35. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós J, Alemán A, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19: 799-825
36. Garden. Mucositis: current Management and investigations. *Seminars in radiation oncology*. 2003;13(3):276-273.
37. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th Ed. New York, NY: Springer; 2002.
38. Gaur P, Mittal M, Mohanti BK, Das SN Functional genetic variants of TGF- β 1 and risk of tobacco-related oral carcinoma in high-risk Asian Indians. *Oral Oncol*. 2011; 47(12): 1117-1121.

39. Gerry F et al. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: A National Cancer Data Base Report. *Head Neck* 2002; 24: 165-180.
40. Gevorgyan A, Wong K, Poon I, Blanas N, J Enepekides D, M Higgins K. Osteoradionecrosis of the mandible: a case series at a single institution. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2013; 42: 1-7.
41. Ghezzi EM, Lange LA, Ship JA (2000) Determination of variation of stimulated salivary flow rates. *J Dent Res* 79:1874–1878
42. Gillison, M.L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck*. 2007; 29: 779–792
43. Gillison, M.L., Chaturvedi, A.K., Anderson, W.F. et al, Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 3235–3242.
44. GLOBOCAN 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence in Worldwide in 2012. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
45. Gómez García FJ, López Jornet P, Álvarez Sánchez N, Castillo Sánchez J, Benavente García O, Vicente Ortega V. Effect of the phenolic compounds apigenin and carnosic acid on oral

- carcinogénesis in hámster induced by DMBA. *Oral Dis* 2013; 19: 279-286.
46. Gonzalez-Trujano ME, Pena EI, Martinez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Dèciga-Campos M, et al. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodent. *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 476–482.
47. Gupta S, Afaq R, Mukhtar H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 914-920.
48. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353: 229–237.
49. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2009; 18(2): 541–50.
50. Hu ML. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med J* 2011; 34: 449-60.
51. Hye-Sook S, DeNardo DG, Jacquot Y. Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha *Breast Cancer Res* 2006; 99: 121-134

52. Infante-Cossío P, Gutiérrez-Pérez JL, Bullón-Fernández P. Complicaciones de la radioterapia y la quimioterapia en pacientes con cáncer en la cavidad bucal. In: Ceballos-Salobreña A, Bullón-Fernández P, Gándara-Rey JM, Chimenos-Küstner E, Blanco-Carrión A, Martínez-Sahuquillo Márquez A, et al. *Medicina bucal práctica*. Santiago de Compostela: Danú; 2000; 646-657
53. International Agency for Research on Cancer. Diet and the risk of cancers of the lung, oral cavity and pharynx, and larynx: a populationbased case-control. IARC Scientific Publications No. 156. Lyon: IARC, 2002.
54. Imai FL, Uzawa K, Nimura Y, Moriya T, Imai MA, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. Chromosome 1 open reading frame 10 (C1orf10) gene is frequently down-regulated and inhibits cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(8): 1641-55.
55. Jacob LA, Chaudhuri T, Lakshmaiah KC, Babu KG, Dasappa L, Babu M, Rudresha AH, Lokesh KN, Rajeev LK. Current status of systemic therapy for recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Indian J Cancer*. 2016; 53(4): 471-477.
56. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008; 58: 71-96.
57. Jensen SB, Pedersen AM, Vissink A, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer

- therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. *Support Care Cancer*. 2010;18(8): 1039–1060.
58. Jeong SY, Kim HW, Lee S-W, Ahn B-C, Lee J. Salivary gland function 5 years after radioactive iodine ablation in patients with differentiated thyroid cancer: direct comparison of pre- and postablation scintigraphies and their relation to xerostomia symptoms. *Thyroid* 2013; 23: 609–616.
59. Jones JA, Avritscher EB, Cooksley CD, Michelet M, Bekele BN, Elting LS. Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. *Support Care Cancer*. 2006; 14: 505-515.
60. Johnson J. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Lett*. 2011, 305, 1–7.
61. Juneja, Saurabh et al. “Antioxidant-Oxidant Index as a Biomarker in Oral Potentially Malignant Disorders and Oral Squamous Cell Carcinoma: A Biochemical Study.” *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR* 2017; 11(3): ZC05–ZC08.
62. Kanjoormana, M.; Kuttan, G. Antiangiogenic activity of ursolic acid. *Integr. Cancer Ther*. 2010, 9, 224–235
63. Kerawala, C et al. Oral Cavity and Lip Cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *The Journal of Laryngology and Otology*. 2016; 130(2): S83–S89.

64. Keefe DM. Intestinal mucositis: mechanisms and management. *Curr Opin Oncol.* 2007; 19: 323-327.
65. Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr.* 2004; 7: 187-200.
66. Kim BR1, Jeon YK, Nam MJ. A mechanism of apigenin-induced apoptosis is potentially related to anti-angiogenesis and anti-migration in human hepatocellular carcinoma cells. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49(7): 1626-1632.
67. Kim KK, Singh AP, Singh RK, Demartino A, Brard L, Vorsa N, Lange TS, Moore RG. Anti-angiogenic activity of cranberry proanthocyanidins and cytotoxic properties in ovarian cancer cells. *Int J Oncol.* 2012; 40(1): 227-235.
68. Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki AA, Sayyad N, Stosic-Grujicic S, et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem* 2013; 136:120–129
69. Langdon JD, Henk JM. Malignant tumours of the mouth, jaws and salivary glands. Second ed. London: Edward Arnold; 1995; 61-3.
70. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(5):330-338

71. Lu DY, Chang CS, Yeh WL, Tang CH, Cheung CW, Leung YM, Liu JF, Wong KL. The novel phloroglucinol derivative BFP induces apoptosis of glioma cancer through reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress pathways. *Phytomedicine*. 2012.
72. Madani AH, Dikshit M, Bhaduri D. Risk for oral cancer associated to smoking, smokeless and oral dip products. *Indian J Public Health* 2012; 56: 57-60.
73. Maggioni D, Garavello W, Rigolio R, Pignataro L, Gaini R, Nicolini G. Apigenin impairs oral squamous cell carcinoma growth in vitro inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Oncol* 2013; 43: 1675-1682.
74. Mallya SM, Wu HI, Saria EA, Corrado KR, Arnold A. Tissue-specific regulatory regions of the PTH gene localized by novel chromosome 11 rearrangement breakpoints in a parathyroid adenoma. *J Bone Miner Res*. 2010; 25(12): 2606-2612
75. Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; 81: 230S–242S.

76. Martinez-Conde R. y cols. Factores clínico-patológicos en el carcinoma de células escamosas inicial de lengua y suelo de la boca, en Vizcaya. *Medicina Oral* 2001; 6: 87-94.
77. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutr Hosp* 2002; 17: 271-278.
78. Maruccia M, Onesti MG, Parisi P, Cigna E, Troccola A, Scuderi N. Lip cancer: a 10-year retrospective epidemiological study. *Anticancer Res.* 2012;32(4): 1543-1546
79. Matheus D, Baldisseraa, Carine F. Souzaa, Thirssa H. Grandoa, Lenita M. Stefanib, Silvia G. Monteiroa. β -caryophyllene reduces atherogenic index and coronary risk index in hypercholesterolemic rats: The involvement of cardiac oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions.* 2017; 270: 9–14.
80. Maushagen R, Reers S, Pfannerstill AC, Hahlbrock A, Stauber R, Rahmanzadeh R, Rades D, Pries R, Wollenberg B. Effects of paclitaxel on permanent head and neck squamous cell carcinoma cell lines and identification of anti-apoptotic caspase 9b. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016; 142(6): 1261-1271
81. McKay, D. L. and Blumberg, J. B. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother. Res.* 2006; 20: 519–530

82. Milczarek, Magdalena et al. Vitamin D Analogs Combined with 5-Fluorouracilo in Human HT-29 Colon Cancer Treatment. *Oncology Reports* 2014; 32(2): 491–504.
83. Miller C, Henry R, Kay M, Disparities in risk of and survival from oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 570-575.
84. Morris, L.G.T., Sikora, A.G., Hayes, R.B., Patel, S.G., and Ganly, I. Anatomic sites at elevated risk of second primary cancer after an index head and neck cancer. *Cancer Causes Control*. 2011; 22: 671–679
85. Nair S, Datta S, Thiagarajan S, Chakrabarti S, Nair D, Chaturvedi P. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in exclusive smokers, chewers, and those with no habits. *Indian J Cancer*. 2016; 53(4): 538-541.
86. Nguyen NP, Moltz CC, Frank C, Vos P, Smith HJ, Karlsson U, Dutta S, Midyett FA, Barloon J, Sallah S. Dysphagia following chemoradiation for locally advanced head and neck cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 383-388.
87. Oddoux C, Struewing JP, Clayton CM, et al. The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nat Genet* 1996; 14: 188-190

- 88.Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T, Kimura T, Matuoka H, Sakai H, Ryoke K. Clinical investigation on pulmonary metastasis of head and neck carcinomas. *Oncology* 2000; 59: 196-203.
- 89.Otmani N. Oral and maxillofacial side effects of radiation therapy on children. *J Can Dent Assoc.* 2007; 73(3): 257–261
- 90.Pal D, Banerjee S, Ghosh AK. Dietary-induced cancer prevention: An expanding research arena of emerging diet related to healthcare system. *J Adv Pharm Technol Res.* 2012; 3(1): 16-24.
- 91.Pillai RN, Owonikoko TK. Small cell lung cancer: therapies and targets. *Semin Oncol* 2014; 41: 133–142.
- 92.Preda L, Chiesa F, Calabrese L, Latronico A, Bruschini R, Leon ME, et al. Relationship between histologic thickness of tongue carcinoma and thickness estimated from preoperative MRI. *Eur Radiol.* 2006; 16: 2242–2248.
- 93.Prott FJ, Handschel J, Micke O, Sunderkotter C, Meyer U, Piffko J. Longterm alterations of oral mucosa in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54(1): 203–210.
- 94.Reagan-Shaw S, Mukhtar H, Ahmad N. Resveratrol imparts photoprotection of normal cells and enhances the efficacy of radiation therapy in cancer cells. *Photochem Photobiol* 2008; 84: 415-421.

- 95.Redman, R. S. Histologic Changes in the Salivary Glands Following Radiation Therapy. In Salivary Gland Development and Regeneration Springer International Publishing. 2017; 75-91.
- 96.Riccioni G, D Orazio N, Salvatore C, Franceschelli S, Pesce M, Speranza L. Carotenoids and vitamins C and e in the prevention of cardiovascular disease. *Int J Vitam Nutr Res.* 2012; 82(1): 15-26.
97. Rodu B, Jansson C. Smokeless tobacco and oral cancer: a review of the risks and determinants. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 252-263.
- 98.Ruiz R, Strasser-Weippl K, Touya D, et al. Improving access to high-cost cancer drugs in Latin America: Much to be done. *Cancer.* 2017; 123(8) :1313-1323.
- 99.Sagheb, K., Sagheb, K., Taylor, K.J., Al-Nawas, B., Walter, C. Cervical metastases of squamous cell carcinoma of the maxilla: A retrospective study of 25 years. *Clinical Oral Investigations.* 2014; 18 (4): 1221-1227.
100. Sayan M, Cassidy RJ, Switchenko JM, et al. Development of Late Toxicities in Patients with Oral Tongue Cancer Treated with Surgical Resection and Adjuvant Radiation Therapy. *Frontiers in Oncology.* 2016; 6: 272.

- 101.Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973–1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128: 268–274.
- 102.Schuster M, Stelzle F. Outcome measurements after oral cancer treatment: Speech and speech related aspects- an overview. *Oral Maxillofac Surg* 2012; 16: 291-298.
- 103.Sciubba JJ: Oral leukoplakia. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6(2): 147–160.
- 104.Sciuba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase management. *JADA* 2001;132:12s-18s.
- 105.Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology*45. 2009;301-308
106. Sharp L, Chilvers CE, Cheng KK, et al. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus in women: a case-control study. *British Journal of Cancer* 2001; 85:1667–1670.
- 107.Shukla S, Gupta S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharmaceutical research.* 2010; 27(6): 962-978.
- 108.Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014; 64(1): 9–29.

109. Silverman S Jr. Epidemiology. In: Silverman S Jr ed. Oral Cancer. 4th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc; 1998; 1–6.
110. Sobin LH, Wittekind C. TNM: Classification of Malignant Tumours. 6th ed. John Wiley & Sons: New York 2002.
111. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 2004; 100:1995–2025.
112. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. *J Am Diet Assoc* 1996; 96: 1027-1039.
113. Stewart BW, Wild CP, editors. World cancer report 2014 Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014
114. Stokman MA, Spijkervet FKL, Burlage FR, et al. Oral mucositis and selective elimination of oral flora in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: a double-blind randomised clinical trial. *British Journal of Cancer*. 2003; 88: 1012 – 1016.
115. Struwing JP, Abeliovich D, Peretz T, et al. The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet* 1995;11:198-200
116. Swanson HI, Choi EY, Helton WB, Gairola CG, Valentino J. Impact of apigenin and kaempferol on human head and neck squamous cell

- carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014; 117: 214-220
117. Swerdlow A, Marmot M, Grulich A, Head J. Cancer mortality in Indian and British ethnic immigrants from the Indian subcontinent to England and Wales. *Br J Cancer*. 1995; 72: 1312.
118. Taghavi N, Yazdi I. Type of food and risk of oral cancer. *Arch Iran Med* 2007; 10:227-232.
119. Tanuja T. y cols. Expresión of Bcl-2 and Bax In Chewing Tobacco-Induced Oral Cancers and Oral Lesions from India. *Pathology Oncology Research*. 2002; 8(2): 109-114.
120. Thorin-Trescases N, Voghel G, Farhat N, Drouin A, Gendron MÈ, Thorin E. Age-dependent oxidative stress: toward an irreversible failure in endothelial maintenance. *Med Sci (Paris)*. 2010; 26(10): 875-880.
121. Tong X, Pelling JC. Enhancement of p53 expression in keratinocytes by the bioflavonoid apigenin is associated with RNA-binding protein HuR. *Mol Carcinog* 2009; 48: 118–129.
122. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65, 87–108.

123. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol.* 2003; 66: 253-262.
124. Tsai C, Lin C, Lin H, Chen J. Carnosic acid, a rosemary phenolic compound, induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated p38 activation in human neuroblastoma IMR-32 cells. *Neurochem. Res.* 2011, 36, 2442–2451
125. Van Oijen MG, Slootweg PJ. Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9: 249-256.
126. Vera-Llonch M, Oster G, Ford CM, Lu J, Sonis S. Oral mucositis and outcomes of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in patients with hematologic malignancies. *Support Care Cancer.* 2007;15:491-496
127. Vescovi Freitas J, Rigo Gaspar L. In vitro photosafety and efficacy screening of apigenin, chrysin and beta-carotene for UVA and VIS protection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016; 89(30), 146–153
128. Visapaa JP, Gotte K, Benesova M, et al. Increased cancer risk in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase 1C*1 allele, possibly due to salivary acetaldehyde. *Gut* 2004; 53: 871–876.

129. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:199-212.
130. Weaver, Beth A. "How Taxol/paclitaxel Kills Cancer Cells." Ed. William Bement. *Molecular Biology of the Cell*. 2014; 25(18): 2677–2681.
131. Wiseman M. The Treatment of Oral Problems in the Palliative Patient, *JCDA*. 2006: 72(5): 453-458
132. Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol* 2000; 53: 165–72.
133. Wu Q, Manning M, Schmidt-Ullrich R, Mohan R. The potential for sparing of parotids and escalation of biologically effective dose with intensity-modulated radiation treatments of head and neck cancers: a treatment design study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 195-205.
134. Wu-Long J, Wei-min Y, Jia-wei Z, Liang Z, Han-guang Z, Zhi-yuan Z, et al. Occult cervical Lymph node metastases in 100 consecutive patients with cN0 tongue cancer. *Chin Med J (Engl)nal*. 2008; 121: 1871–1874.
135. Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, et al. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in

- the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.
Am J Epidemiol 2013; 178: 679–690.
136. Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, Vardar-Sukan F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2010, 65, 158–163
137. Yijian Ding. Protection of Dietary Polyphenols against Oral Cancer
Nutrients 2013; 5: 2173–2191.
138. Yogi V, Singh OP. Induction followed with concurrent chemo radiotherapy in advanced head & neck cancer. *J Cancer Res Ther* 2005; 1: 198- 203.
139. Yoshioka, Yasukiyo et al. Black Soybean Seed Coat Polyphenols Prevent AAPH-Induced Oxidative DNA-Damage in HepG2 Cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 60. 2017; 2: 108–114.
140. Yokoyama, A., Tsutsumi, E., Imazeki, H., Suwa, Y., Nakamura, C. and Yokoyama, T. Polymorphisms of Alcohol Dehydrogenase-1B and Aldehyde Dehydrogenase-2 and the Blood and Salivary Ethanol and Acetaldehyde Concentrations of Japanese Alcoholic Men. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2010; 34: 1246–1256.