



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Oftalmología, Optometría,
Otorrinolaringología y Anatomía Patológica

**“Efecto de los Compuestos Fenólicos Apigenina,
Catequinas Del Cacao, Ácido Rosmarínico y
Eriocitrina sobre la Carcinogénesis Oral Inducida
por DMBA en Hámsters”**

D^a. BEATRIZ BALDASQUÍN CÁCERES

2012

AGRADECIMIENTOS

La elaboración y finalización de la presente tesis no habría sido posible sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación se citan.

Primero y antes que nada, mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Vicente Vicente Ortega, al cual agradezco que me brindara la oportunidad de participar de este proyecto, el Dr. Francisco Martínez Díaz, por su inestimable ayuda en el estudio inmunohistoquímico de las preparaciones, y el Dr. Francisco Gómez García, compañero y amigo, al que agradezco sus consejos, apoyo y su atenta lectura de este trabajo.

Agradezco a la empresa Nutrafur S.A., por proporcionarnos los compuestos fenólicos utilizados para este estudio y por compartir conmigo sus conocimientos en el campo de los polifenoles.

Al Dr. Manuel Canteras, por su valiosa colaboración en el análisis estadístico y la interpretación de los datos obtenidos en este estudio.

Gracias también a los compañeros del laboratorio, por su ayuda en la elaboración de todas las preparaciones y, en especial, a Alberto y Jaqueline por su gran ayuda y sobre todo por los buenos momentos que hemos pasado y seguro pasaremos juntos.

A mi familia por ser un gran apoyo, por su cariño, por confiar siempre en mis posibilidades e inculcarme los valores del sacrificio, el esfuerzo y la honestidad.

Gracias a todos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	7
ETIOLOGÍA DEL CÁNCER: AGENTES CARCINÓGENOS.....	10
<i>CARCINÓGENOS QUÍMICOS.....</i>	<i>10</i>
<i>CARCINÓGENOS FÍSICOS</i>	<i>13</i>
<i>CARCINÓGENOS VIVOS</i>	<i>15</i>
ETAPAS DE LA CARCINOGENÉISIS:.....	17
INICIACIÓN	17
PROMOCIÓN	18
PROGRESIÓN	19
FENOTIPO NEOPLÁSICO:.....	19
ADQUISICIÓN DE PROLIFERACIÓN AUTÓNOMA	20
INSENSIBILIDAD A LAS SEÑALES INHIBITORIAS DE CRECIMIENTO.....	23
EVASIÓN DE LA APOPTOSIS.....	26
DESARROLLO DE ANGIOGÉNESIS	27
POTENCIAL REPLICATIVO ILIMITADO	27
CAPACIDAD DE INVADIR Y METASTATIZAR	27
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS:.....	28
EPIDEMIOLOGÍA	28
ETIOPATOGENIA	31
<i>TABACO</i>	<i>31</i>
<i>ALCOHOL</i>	<i>33</i>
<i>BETEL</i>	<i>34</i>
<i>VIRUS</i>	<i>35</i>
<i>HERENCIA FAMILIAR.....</i>	<i>35</i>
<i>ALTERACIONES GENÉTICAS DURANTE EL DESARROLLO DEL COCE.....</i>	<i>36</i>
DIAGNÓSTICO.....	37
PREVENCIÓN.....	39
COMPUESTOS FENÓLICOS	40
FLAVONOIDES:.....	41
APIGENINA	44
CATEQUINAS DEL CACAO	47
ERIOCITRINA	50
ÁCIDO ROSMARÍNICO	52

MODELOS EXPERIMENTALES DE CARCINOGENESIS ORAL	53
ESTUDIOS EXPERIMENTALES SOBRE EL EFECTO QUIMIOPREVENTIVO DE LOS POLIFENOLES EN LA CARCINOGENESIS ORAL	57
OBJETIVOS	61
MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
MATERIAL.....	67
ANIMALES	67
AGENTES.....	69
MÉTODOS	71
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	71
MÉTODO ANATOMO-PATOLÓGICO	71
2.1. Método histopatológico	71
2.2. Método inmunohistoquímico.....	73
MÉTODO ESTADÍSTICO.....	74
RESULTADOS	75
OBSERVACIONES GENERALES DE TODOS LOS GRUPOS	77
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS GENERALES	79
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS GENERALES.....	84
GRUPO CONTROL.....	88
GRUPO II: DMBA+ APIGENINA POTÁSICA	91
GRUPO III: DMBA+ CATEQUINAS DEL CACAO	93
GRUPO IV: DMBA+ ERIOCITRINA	97
GRUPO V: DMBA+ ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	99
COMPARACIÓN INTERGRUPO	103
RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	108
DISCUSIÓN	109
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXO I. CERTIFICADO DE LA COMISIÓN BIOÉTICA	167
ANEXO II. ABREVIATURAS	169

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal es el cáncer más frecuente de cabeza y cuello y se caracteriza por una baja tasa de supervivencia y mal pronóstico (Petersen, 2009). A pesar de la amplia documentación sobre biología molecular y celular, y los avances en oncología y cirugía, los índices de morbilidad y mortalidad en pacientes con carcinoma de células escamosas no se han reducido en las últimas décadas.

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).

La etiología de estas alteraciones es multifactorial. Los principales factores de riesgo implicados en el cáncer oral son el tabaco y el alcohol (Scully, 2007). Los virus, más notablemente el virus del papiloma humano, también están relacionados con el cáncer oral (Masano, 2006). También se sabe que existe una predisposición genética al cáncer, debido a que la mayoría de la población expuesta a factores de riesgo no desarrolla cáncer oral y al hecho de casos esporádicos de cáncer oral en jóvenes no fumadores ni bebedores. El consumo de frutas y hortalizas se encuentra asociado a un menor riesgo de padecer cáncer oral, esto sugiere que una dieta pobre en antioxidantes predispone al desarrollo de esta patología (Warnakulasuriya, 2009).

El rápido progreso en relación con la comprensión de las alteraciones moleculares que contribuyen al desarrollo del carcinoma oral de células escamosas, está dando lugar a mejoras en el diagnóstico precoz de los tumores y al perfeccionamiento de los tratamientos biológicos individualizados a las características específicas del tumor de un paciente (Vairaktaris, 2008).

Los recientes esfuerzos para controlar la incidencia del carcinoma oral de células escamosas, se centran en el desarrollo de estrategias quimiopreventivas eficaces (Meier 2007), que deben ser demostradas en modelos animales experimentales que desarrollen carcinomas de células escamosas y lesiones premalignas muy similares a las humanas.

Desde que los agentes químicos se describieron como los principales factores etiológicos del cáncer oral, se han desarrollado diversos modelos animales con el objetivo de estudiar los mecanismos de la carcinogénesis, incluyendo modelos en hámster, ratas y ratones.

El hámster sirio o hámster dorado es el modelo animal más utilizado en la investigación de la carcinogénesis oral y que se correlaciona estrechamente con los procesos involucrados en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cáncer oral humano (Gimenez-Conti, 1993; Shklar, 1999). El primer intento con éxito de inducción de tumores en hámsters lo realizó Salley en 1954. Salley demostró que las aplicaciones de uno o varios hidrocarburos policíclicos podrían inducir carcinomas de células escamosas en la mucosa yugal del hámster. Encontró que el 9,10 dimetil-1,2-benzatraceno (DMBA) disuelto en éter era el carcinógeno más eficaz en la inducción de tumores mediante la pincelación de la mucosa oral del hámster con esta sustancia (Salley, 1954).

La mucosa yugal del hámster constituye, por tanto, un excelente órgano para evaluar la intervención de agentes preventivos en el cáncer oral debido a su accesibilidad para el examen y su similitud con las lesiones humanas (Shklar, 1972).

La **quimioprevención** en el cáncer se refiere a la prevención o inhibición de la carcinogénesis mediante la intervención con productos químicos de origen natural o sustancias derivadas de la dieta. Para lograrlo, dichas sustancias han de ejercer un efecto antioxidante, que bloquee parcialmente los efectos perniciosos de los radicales libres implicados en el deterioro celular. El organismo humano ya dispone de una serie de mecanismos antioxidantes, denominados endógenos. Sin embargo, muchas de las sustancias antioxidantes han de incorporarse mediante la dieta, son las denominadas exógenas. Las frutas y verduras son ricas en micronutrientes y tienen un efecto antioxidante y protector frente al cáncer oral (Pavia, 2006).

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes de la dieta y están ampliamente distribuidos por el reino vegetal. Como antioxidantes, los polifenoles podrían proteger a los constituyentes de la célula contra el estrés oxidativo causante de varias enfermedades degenerativas como enfermedad cardiovascular, diabetes y cáncer (Scalbert, 2005). Se han desarrollado numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, para establecer los efectos anticarcinógenos de estos compuestos vegetales sobre distintos tipos de cáncer (Yang, 2001). Muchos de estos compuestos han sido ensayados en la carcinogénesis oral obteniendo grandes resultados (Hong, 1986; Shklar, 1989; Hong, 1990; Tanaka, 1994; Papadimitrakopoulou, 1997; Armstrong, 2000; Masuda, 2001; Yang, 2002; Li, 2002; Chandra Mohan, 2005; Lim, 2006; Manoharan, 2010; Chen, 2011; Chang, 2012).

ANTECEDENTES

El término neoplasia procede del griego “neo”, nuevo, y “platis”, modelado, crecimiento. Según la definición de Willis, corresponde a una masa anormal de tejido cuyo crecimiento es excesivo e incoordinado respecto al de los tejidos normales, y continúa aún después de interrumpir el estímulo que indujo al cambio (Willis, 1952).

Las causas de la aparición del cáncer han preocupado a la Medicina desde la antigüedad. Así, es posible que Galeno (131-203 a.C) fuera el primer autor en proponer una teoría sobre la carcinogénesis. Galeno consideraba que el cáncer aparecía como consecuencia de un desequilibrio entre los humores, lo que provocaba una acumulación de bilis negra. Esta acumulación de bilis daba lugar al tumor y a un peculiar estado general: *la melancolía* (síndrome constitucional neoplásico). Esta teoría perduró hasta el Renacimiento, momento en que Paracelso (1493-1541) afirmó que los tumores se producían por una acumulación de agentes en el organismo.

En la actualidad se acepta que la génesis del cáncer es un proceso evolutivo, que sigue múltiples etapas, en el que intervienen múltiples lesiones genéticas y epigenéticas no letales, principalmente, sobre los proto-oncogenes (genes promotores del crecimiento y la división celular), los genes supresores tumorales (inhibición del crecimiento tumoral), los genes que regulan la muerte celular programada (apoptosis), y los genes implicados en la reparación del ADN (Kumar, 2005).

Tales lesiones se producen por la exposición a agentes carcinógenos, que pueden ser: químicos (como los hidrocarburos policíclicos), físicos (como las radiaciones ionizantes) o biológicos (como los virus oncogénicos); o bien tienen un origen hereditario. Estos factores desencadenantes alteran la estructura heredable de la célula, dando como resultado una célula transformada con el potencial de desarrollarse en un clon de células malignas (Weinstein, 1988).

ETIOLOGÍA DEL CÁNCER: AGENTES CARCINÓGENOS

Agentes carcinógenos químicos

A pesar de que la radiación ionizante, las infecciones virales y los determinantes genéticos juegan un papel importante en la etiología del cáncer, actualmente conocemos que la mayor incidencia de cáncer es provocada por sustancias químicas del ambiente (Marquardt, 1999).

La correlación entre el cáncer y los carcinógenos químicos es conocida desde largo tiempo. La primera referencia histórica de la carcinogénesis química la constituyen las observaciones clínicas de Percival Pott en 1775, quien atribuyó correctamente el cáncer de piel escrotal de los deshollinadores, a la exposición crónica al hollín. Hubo que esperar 140 años para obtener la primera prueba experimental de la carcinogénesis química. En 1915, Yamagiwa e Ichikawa comunicaron la aparición de tumores cutáneos en la oreja del ratón mediante aplicaciones reiteradas de alquitrán. Desde entonces, se han identificado una gran variedad de compuestos químicos carcinógenos. Actualmente la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) tiene catalogadas 107 sustancias químicas como carcinógenos humanos.

Basándonos en la actividad química y biológica, los carcinógenos químicos son clasificados en diferentes grupos:

- Carcinógenos completos: Sustancias que inducen el proceso completo de la carcinogénesis cuando son dados a las dosis suficientes (inductores y promotores).
- Carcinógenos incompletos: Sustancias que sólo producen una de las etapas de la carcinogénesis química (inductores).
- Carcinógenos de acción directa: Sustancias que no requieren conversión metabólica para desarrollar su acción. Los carcinógenos de acción directa son lo suficientemente reactivos inherentemente como para unirse de forma covalente a macromoléculas celulares. Algunos de ellos son fármacos quimioterápicos (ciclofosfamida, cisplatino,

busulfano), que son agentes alquilantes que transfieren grupos alquilo (metilo, etilo, etc.) a macromoléculas, como las guaninas del ADN.

- Carcinógenos de acción indirecta: Sustancias que requieren la conversión metabólica a un compuesto final, más activo.

- Hidrocarburos aromáticos policíclicos: Algunos de los carcinógenos químicos indirectos más potentes, los hidrocarburos policíclicos, se encuentran principalmente en combustibles fósiles. Entre ellos se encuentran compuestos como el benzo[a]pireno, el 3-metilocolantreno y el dimetilbenzantraceno. Estos compuestos tienen un amplio espectro de órganos diana y pueden causar cáncer en el lugar de su aplicación. Los hidrocarburos policíclicos son metabolizados, por oxidasas de acción mixta dependientes del citocromo P450, a epóxidos electrófilos que, a su vez, reaccionan con proteínas y ácidos nucleicos (Marquardt, 1999).

- Aminas aromáticas y colorantes azoicos: Las aminas aromáticas y los colorantes azoicos son otra clase de carcinógenos de acción indirecta. A diferencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas aromáticas y los colorantes azoicos no suelen ser carcinógenos en el punto de aplicación. No obstante, suelen producir tumores vesicales y hepáticos respectivamente, cuando los ingieren animales de experimentación. Un agente implicado en los cánceres humanos fue la β -naftilamina, que tras su ingesta se detoxifica por conjugación con el ácido glucurónico. Cuando se excreta por la orina, el conjugado no tóxico se escinde por la enzima urinaria glucoronidasa para liberar otra vez el reactivo electrófilo, induciendo así el cáncer de vejiga. Antes de identificar su carcinogenicidad, la β -naftilamina fue responsable de una incidencia 50 veces aumentada de cáncer de vejiga en los trabajadores expuestos a los colorantes de anilina e industrias del caucho (Talaska, 2003). Los colorantes aminoazoicos también son carcinógenos. En un tiempo se utilizó el dimetilaminoazobenceno para dar color a la margarina, para que se pareciera a la mantequilla.

- Nitrosaminas/nitrosamidas: Las nitrosaminas han demostrado ser carcinógenos poderosos en animales. La dimetilnitrosamina produce tumores renales y hepáticos en los roedores (Magee, 1956). Son también potentes carcinógenos en los primates, aunque no existen datos fehacientes de inducción de cáncer en seres humanos. No obstante, la enormemente elevada incidencia de cáncer en la provincia china de Hunan (100 veces superior a la de otras zonas) se ha relacionado con el elevado contenido en nitrosaminas de la dieta. También preocupa que las nitrosamidas estén implicadas en la génesis de otros cánceres gastrointestinales, ya que los nitritos añadidos habitualmente para conservar carnes elaboradas y otros alimentos, son metabolizados por la flora endógena formando nitrosaminas y nitrosamidas. La preocupación sobre estos agentes ha dado lugar al rechazo de los alimentos procesados que contengan nitratos (Antón, 2001).
- Carcinógenos naturales: Existen varios carcinógenos químicos conocidos producidos por plantas y microorganismos, es particularmente importante el potente carcinógeno hepático aflatoxina B₁. Esta micotoxina está producida por algunas cepas del hongo *Aspergillus flavus* que crece en el maíz, el arroz y los cacahuetes, almacenados en condiciones inadecuadas (humedad, etc.). Al igual que los hidrocarburos aromáticos policíclicos, se metaboliza a un epóxido, que se detoxifica o se une de forma covalente al ADN. Se ha encontrado una fuerte correlación entre la concentración dietética de este carcinógeno y la incidencia de carcinoma hepatocelular en algunas partes de África y China (McGlynn, 2003).
- Agentes misceláneos: La introducción en el organismo de un cuerpo extraño no biodegradable provoca una reacción fibroblástica o mesotelial que puede evolucionar a una neoplasia maligna, tal y como ocurre en algunos sarcomas provocados en roedores tras la implantación de materiales inertes, como películas de plástico y metálicas, diversas fibras, etc. Los seres humanos son muy resistentes

a la carcinogénesis por cuerpos extraños, como lo demuestra la ausencia de cánceres tras el implante de prótesis de plástico o metal.

Existen diversos tipos de materiales fibrosos como las fibras de vidrio sintéticas, las fibras cristalinas sintéticas y las fibras minerales naturales. Al menos un componente de cada uno de estos tres grupos ha demostrado poseer propiedades carcinogénicas. De ellos, el asbesto ha sido la fibra más estudiada por su importancia ambiental e industrial. El asbesto se ha visto implicado en la génesis de al menos dos tipos distintos de neoplasia, mesotelioma maligno y el cáncer broncopulmonar (Bello, 2001).

El cromo, níquel y otros metales, cuando se volatilizan e inhalan en atmósferas industriales, provocan cáncer de pulmón (Kumar, 2005).

Mecanismo de acción de los carcinógenos químicos

La mayoría de los carcinógenos químicos son mutagénicos. Contienen grupos electrófilos muy reactivos que forman aductos químicos con el ADN o, también, con proteínas y ARN. Los oncogenes y genes supresores tumorales, como RAS y p53, son unos de sus principales dianas (Kumar, 2005).

Agentes carcinógenos físicos

La carcinogénesis no sólo está mediada por agentes químicos, sino también por agentes físicos que son capaces de inducir el desarrollo de neoplasias malignas. La radiación de cualquier origen (rayos UV de la luz solar, rayos X, fisión nuclear, radionúclidos) es un carcinógeno establecido.

- Radiación ultravioleta

Existe una amplia evidencia a partir de estudios epidemiológicos, de que los rayos UV del sol producen una incidencia aumentada de carcinoma escamoso, carcinoma basocelular y melanoma cutáneo (Cleaver, 2002).

La radiación ultravioleta (UV) es la porción de longitud de onda corta del espectro electromagnético, adyacente a la región violeta de la luz visible. Parece que sólo determinadas porciones del espectro UV se asocian a la lesión tisular, y se produce un efecto carcinógeno con longitudes de onda situadas entre 290 y 320 nm. Los efectos de la radiación UV sobre las células son la activación enzimática, la inhibición de la división celular, la mutagénesis, la muerte celular y el cáncer.

Los cánceres cutáneos no melanoma se asocian a la exposición acumulada total a la radiación UV, mientras que los melanomas se asocian a una exposición intensa intermitente, como sucede al tomar el sol. La capacidad carcinógena de la luz UV se atribuye a la formación de dímeros de pirimidina en el ADN. Salvo que se elimine eficazmente por la ruta de la reparación de escisión de nucleótidos, la lesión genómica producida por la radiación UV es mutágena y carcinógena (Kumar, 2004).

- Radiaciones ionizantes

La relación causal entre radiaciones ionizantes, tanto la electromagnética como la de partículas, y cáncer está bien establecida. Tal evidencia se puede ilustrar en numerosos ejemplos. Los mineros no protegidos de elementos radiactivos tienen una incidencia 10 veces mayor de sufrir cáncer de pulmón. El seguimiento de los supervivientes de las bombas atómicas lanzadas en Hiroshima y Nagasaki reveló una incidencia notablemente aumentada de leucemia, además de una mayor tasa de mortalidad por carcinoma de tiroides, mama, colon y pulmón.

Las propiedades oncogénicas de la radiación ionizante están relacionadas con sus efectos mutágenos, causa rotura cromosómica, translocaciones y, con menor frecuencia, mutaciones puntuales. Biológicamente, las roturas de dobles cadenas de ADN parece ser la forma más importante de daño del ADN causado por este tipo de radiación (Kumar, 2004). Existen también algunas pruebas de que dosis no mortales de radiación pueden inducir inestabilidad genómica, que favorece la carcinogénesis.

Agentes carcinógenos vivos

Se ha demostrado que muchos virus ADN y ARN son oncogénicos en animales (Zur Hausen, 2001). Sin embargo, sólo unos pocos virus se han relacionado con el cáncer humano.

El estudio de los retrovirus oncogénicos en animales ha dado espectaculares conocimientos sobre la base genética del cáncer. Sin embargo, el virus tipo 1 de la leucemia humana de células T (HTLV-1) es el único retrovirus que se ha demostrado que causa cáncer en humanos (Kumar, 2005).

Con respecto a los virus ADN oncogénicos tienen interés especial el virus del papiloma humano (VPH), virus de Epstein-Barr (VEB), herpesvirus del sarcoma de Kaposi (HVSK) y virus de la hepatitis B (VHB), porque están claramente relacionados con el cáncer.

- Papilomavirus humanos (VPH): Son virus epiteliotrópicos de doble cadena de ADN que producen lesiones verrugosas en piel y mucosas. Actualmente se conocen 120 tipos genéticamente distintos de VPH (Campisi, 2009). Algunos genotipos (VPH 6 y 11) causan claramente papilomas escamosos benignos en humanos. Por el contrario, los VPH de alto riesgo (VPH 16 y 18) se han implicado en la génesis de varios cánceres, especialmente el carcinoma escamoso de cuello uterino y región anogenital (Scully, 2005). El VPH, está también implicado en el carcinoma escamoso oral y de cabeza y cuello. Al menos el 50% de los cánceres orofaríngeos, en particular los que se afectan a las amígdalas y base de la lengua, se asocian al VPH (Gillison, 2000).

El potencial oncogénico del VPH está relacionado con la expresión de dos oncoproteínas, E6 y E7, que se unen a la proteína del retinoblastoma y a p53, respectivamente, neutralizando así su función; también activan a las ciclinas (Jabbar, 2010).

Sin embargo, la infección por VPH por sí misma no es suficiente para la carcinogénesis, posiblemente actúe junto con otros factores ambientales. Sin embargo, la primacía de la infección por VPH en la etiología del cáncer de

cuello de útero está avalada por la protección casi completa de éste cáncer con vacunas anti-VPH.

- Virus de Epstein-Barr: El VEB se ha implicado en la patogenia de varios tumores humanos: linfomas de Burkitt, linfomas en pacientes inmunodeprimidos con infección por VIH o trasplantados de órganos, en algunas formas de linfoma de Hodgkin, y en el carcinoma de nasofaringe (Dolcetti, 2003). A excepción de este último, todos son tumores de células B.
- Virus de la hepatitis B y C: A nivel mundial, el 85% de los carcinomas hepatocelulares son debidos a la infección por VHB (54%) o VHC (31%) (Parkin, 2002). Aunque los efectos oncogénicos de VHB y VHC son multifactoriales, al parecer el efecto dominante es la inflamación crónica mediada inmunológicamente, así como lesión hepatocelular, estimulación de la proliferación de hepatocitos y producción de oxígeno reactivo capaz de lesionar el ADN.
- *Helicobacter pylori*: Existen evidencias que relacionan la infección gástrica por la bacteria *H. pylori* y la producción de carcinomas y linfomas gástricos (Covacci, 2003). El mecanismo de aparición de cánceres gástricos debidos a la infección por *H. pylori* es multifactorial, con inflamación crónica mediada inmunológicamente, estimulación de la proliferación de células gástricas, y producción de especies de oxígeno reactivo que lesionan el ADN. Los genes de patogenicidad de *H. pylori* pueden también contribuir estimulando factores de crecimiento.

ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS

Los estudios de la carcinogénesis química en animales de experimentación aclararon las etapas individuales de la progresión de las células normales hasta el cáncer. En 1947, Berenblum y Shabik demostraron que una sola aplicación de un carcinógeno sobre la piel de un ratón no era, por sí misma, suficiente para producir cáncer. Sin embargo, cuando se aplicó localmente un estímulo proliferativo no carcinógeno, en forma de segunda sustancia química irritante, aparecieron tumores (Berenblum, 1941). El primer efecto se denominó **iniciación**. La acción de la segunda sustancia química, no carcinógena, se denominó **promoción**.

La **iniciación** resulta de la expresión anormal de los proto-oncogenes y/o los genes supresores tumorales, que activan los sistemas celulares que conducen a la transformación maligna de las células (Walaszek, 2004). Esta expresión anormal puede producirse por mutación esporádica, delección, pérdida de heterocigosidad, sobreexpresión o modificaciones epigenéticas como hipermetilación (Stadler, 2008).

La iniciación implica la mutación del ADN celular y, por tanto, se caracteriza por ser un hecho irreversible y con memoria, y parece depender de la dosis, aunque no existe un umbral fácilmente medible ni un nivel de dosis no efectivo (Walaszek, 2004). Además, se ha señalado la importancia de la existencia de una o varias divisiones celulares en presencia del iniciador, para que el ADN dañado pueda ser replicado.

Dicha mutación se produce por la exposición a carcinógenos o por alteraciones estructurales del material genético de la célula, que dan como resultado una célula con el potencial de desarrollarse en un clon de células malignas (Weinstein, 1988).

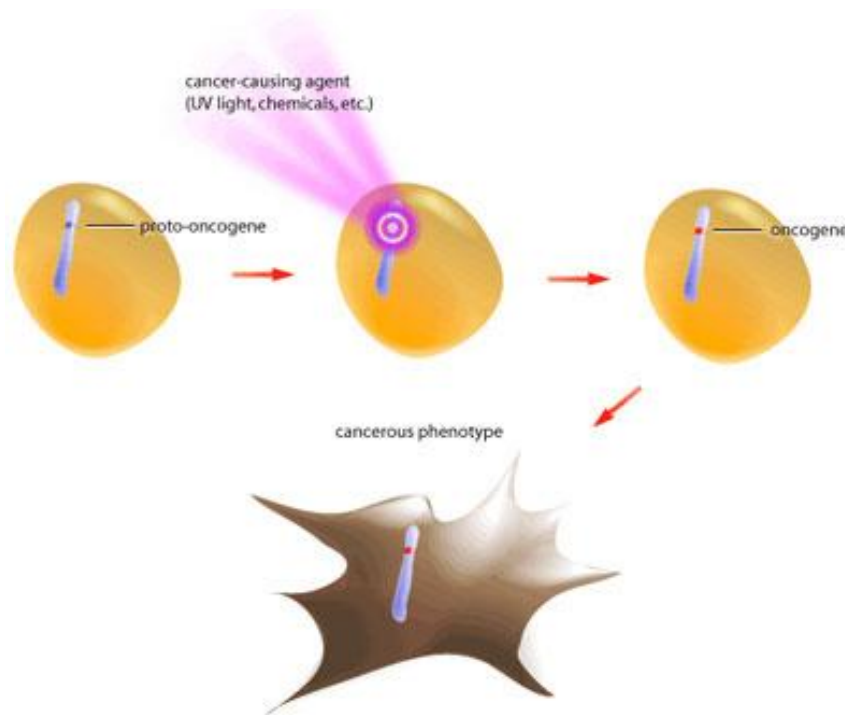


Figura 1. Un agente mutágeno induce el cambio del proto-oncogén en oncogén (tomado de Stott B, 2003)

La **promoción** sigue a la iniciación y se caracteriza por la expansión clonal reversible de la célula iniciada y la alteración reversible de la expresión genética. La promoción, por tanto, se diferencia de la iniciación en el hecho de la reversibilidad (en las primeras etapas) y en la existencia de una dosis umbral y una respuesta máxima (Boutwell, 1964).

El mecanismo de acción de los agentes promotores es desconocido. Boutnell fue uno de los primeros en proponer que los agentes promotores ejercen su acción alterando la expresión de la información genética celular. También se han demostrado otras acciones de los promotores; así, unos son mitógenos, otros incrementan la síntesis de ADN, y otros podrían actuar inhibiendo la comunicación intercelular (Kumar, 2005).

Los agentes promotores no se pueden considerar carcinógenos, puesto que sólo inducen neoplasias en las células ya iniciadas pero, por sí solos, no inducen tumores ya que no producen lesión permanente en el ADN.

El último paso que conduce al cáncer se denomina **progresión tumoral**. En esta etapa el crecimiento se vuelve autónomo, independiente del carcinógeno o del promotor. En esta etapa se produce un daño genético, que implica la conversión gradual de las células premalignas a las neoplásicas, con un aumento de la agresividad y metástasis potencial, y la formación de nuevos vasos (Walaszek, 2004).

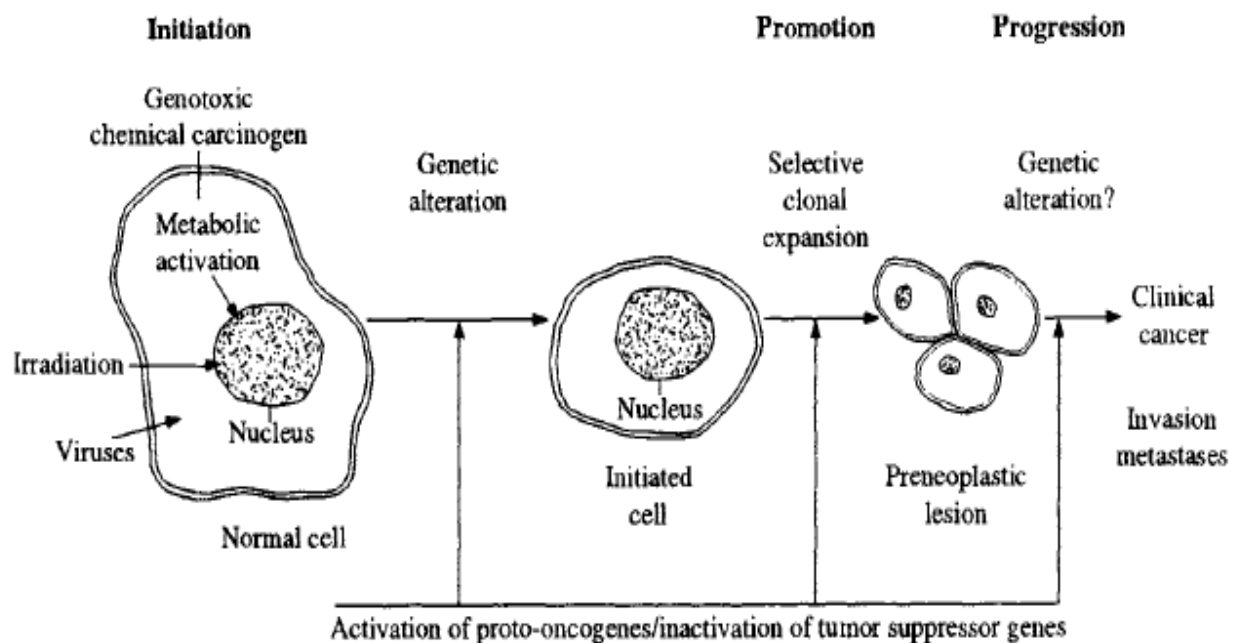


Fig. 2. Fases de la carcinogénesis química tomado de Harris, 1991.

FENOTIPO NEOPLÁSICO

Estas alteraciones genéticas dan lugar al llamado fenotipo neoplásico, es decir, al comportamiento neoplásico que comparten las células transformadas, caracterizado por: adquisición de proliferación autónoma, insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial proliferativo ilimitado, desarrollo de angiogénesis sostenida y capacidad de invadir y metastatizar (Hanahan, 2000).

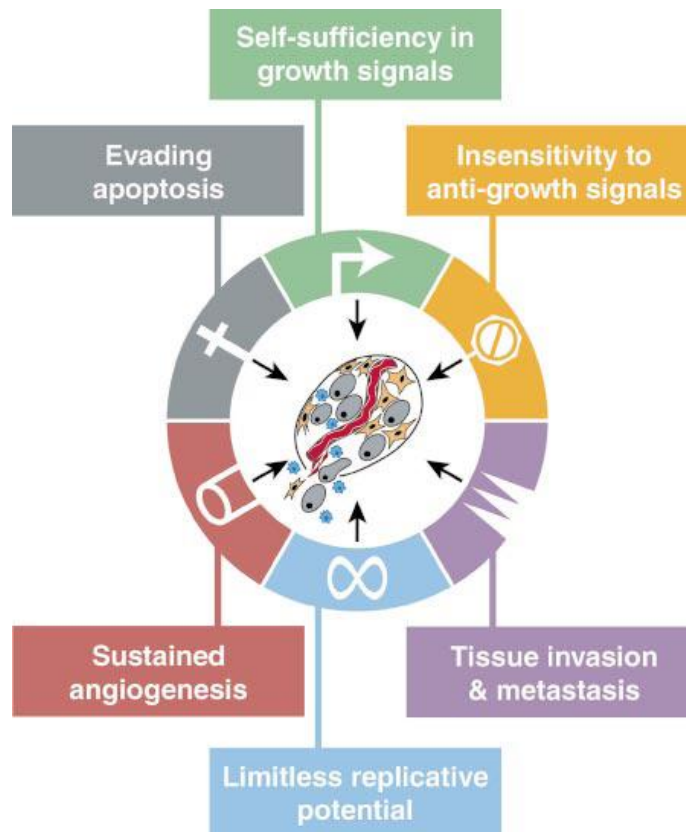


Fig. 3. Características biológicas de las células cancerígenas tomado de Hanahan (2000).

❖ **Adquisición de proliferación autónoma**

Las células normales necesitan la estimulación por factores de crecimiento para iniciar la proliferación. Los genes que potencian el crecimiento celular autónomo en las células cancerosas se denominan oncogenes. Derivan de mutaciones en los proto-oncogenes y se caracterizan por la capacidad de promover el crecimiento celular, en ausencia de las señales normales que promueven el crecimiento. Sus productos, las oncoproteínas, dotan a la célula de autosuficiencia en el crecimiento (Kern, 2001), mediante varios mecanismos:

- Factores de crecimiento: Muchas células cancerosas desarrollan autosuficiencia en el crecimiento adquiriendo la capacidad de sintetizar los mismos factores de crecimiento a los que responden (Ejemplo: el factor de crecimiento PDGF está producido en exceso en los astrocitomas y osteosarcomas).

- Receptores del factor de crecimiento: Muchas oncoproteínas desarrollan autosuficiencia mediante la hiperexpresión o mutación de los receptores de factores de crecimiento, por lo que éstos liberan continuamente señales mitógenas a la célula aun en ausencia de estímulo. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), está sobreexpresado en el 80-100% de los tumores de cabeza y cuello (Ritter, 2003). Además, un aumento de la expresión de EGFR se ha demostrado que está presente en los tejidos sanos de alrededor de las lesiones tumorales en pacientes con cáncer en comparación con la población normal (Zimmmermann, 2006), así como en el carcinoma de células escamosas asociado al consumo de nuez de betel (Chiang, 2008). El aumento de expresión del receptor EGF se asocia con un pobre pronóstico (Kalyankrishna, 2006) y con la promoción de metástasis (Rubin, 1996).
- Mutaciones en los genes que codifican moléculas encargadas de la transmisión de señales de los receptores de los factores de crecimiento: Estas moléculas de señalización transmiten señales promotoras de crecimiento al núcleo cuando son activadas mediante los factores de crecimiento. Un ejemplo está constituido por los genes de la familia ras, integrada por los oncogenes H-, K- y N-ras. Los oncogenes de la familia ras, se han identificado en los carcinomas de células escamosas en humanos. La proteína ras mutante está activada de forma permanente produciendo la estimulación continua de las células, sin ningún desencadenante externo. En modelos animales experimentales, la activación exclusiva de K-ras es suficiente para inducir la aparición de un cáncer oral (Caulin, 2004). Sin embargo, existe una enorme variación en la mutación de los genes ras en el cáncer oral humano. Aunque algunos estudios han encontrado mutaciones en el 20% de los pacientes occidentales (Nunez, 1992), el consenso es que las mutaciones en genes ras ocurren en el 5% de los casos (William, 2000). Sin embargo, estas mutaciones se encuentran en el 50% de los pacientes de poblaciones del sur de Asia (Saranath, 1991), dónde el cáncer oral tiene una prevalencia del 50% y está asociado al hábito de mascar tabaco. Aunque la diferencia en las cifras de mutación se puede relacionar con la exposición a diversos

agentes carcinógenos, estos datos sugieren que la adquisición de las mutaciones de los genes ras pueda predisponer al cáncer oral.

- Hiperproducción o actividad no regulada de los factores de transcripción: Un ejemplo es la oncoproteína myc, que puede activar a los genes promotores del crecimiento (quinasas dependientes de ciclina) y reprimir a los genes que retrasan o impiden la progresión a través del ciclo celular.
- Mutaciones en los genes que codifican la síntesis de las proteínas ciclinas y quinasas dependientes de ciclina: Los miembros de esta familia activan el ciclo celular. Las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), una familia de serina/treonina proteínquinasas, se activan en puntos específicos del ciclo celular mediante fosforilación y asociación a las ciclinas. Los niveles de ciclinas activas van cambiando en las diferentes fases del ciclo celular, mientras los niveles de CDKs permanecen estables (Collins, 2005). La progresión a través de la fase G1 está mediada por las diferentes isoformas de la ciclina D que, unidas a CDK4 y CDK6 y en respuesta a estímulos mitogénicos, promueven la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb), que inicia la transición de la fase G a la fase S del ciclo celular (Wilkey, 2009). El oncogen que las codifica, denominado CCND1 (localizado en el cromosoma 11q13), se encuentra frecuentemente amplificado en el cáncer oral, e induce una sobreexpresión de la proteína ciclina D. Dicha ciclina está sobreexpresada en un 30-50% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Rousseau, 2001) y se ha asociado con un estado avanzado, recurrencia temprana, y baja supervivencia (Sidransky, 1995; Jayasurya, 2005).

❖ **Insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento**

En el crecimiento de las células durante el ciclo celular debe existir una homeostasis entre la proliferación e inhibición del crecimiento. El fallo en la inhibición del crecimiento es una de las alteraciones fundamentales en el proceso de la carcinogénesis (Igney, 2002). Los genes supresores tumorales codifican proteínas que inhiben la proliferación celular. La alteración de estos genes hace que estas células sean refractarias a la inhibición del crecimiento. Entre estos genes se encuentran el gen del retinoblastoma, los genes codificantes de las proteínas inhibidoras de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) y el gen TP₅₃ (Evan, 2001).

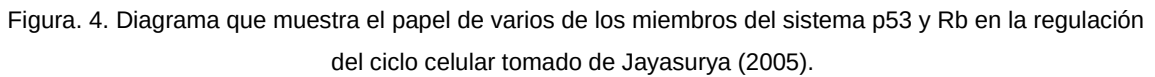
La proteína del retinoblastoma (pRb) y su sistema molecular asociado, se encuentran frecuentemente y precozmente alterados en el cáncer oral. La proteína Rb ejerce efectos antiproliferativos mediante el control de la transición de la fase G₁ a la fase S en el ciclo celular. En su forma activada, la proteína Rb se halla hipofosforilada y se une al factor de transcripción E2F. Esta interacción impide la transcripción de genes como la ciclina E, que son necesarios para la replicación del ADN, por lo que las células se detienen en la fase G₁. La pRb puede ser inactivada a su forma fosforilada por la expresión aumentada de ciclina D1, que se une a las ciclinas dependientes de quinasa CDK4 o CDK6, lo que conduce a la liberación del factor de transcripción E2F necesario para entrar en la fase S y continuar el ciclo celular (Jayasurya, 2005) (Fig. 4). Un alto porcentaje de lesiones orales premalignas (83%) y de carcinomas orales (90%) presentan una expresión alterada de al menos uno de los miembros del sistema pRb, por lo que no ejerce su efecto regulador del ciclo celular (Soni, 2005).

Los genes que codifican las moléculas inhibidoras de CDKs se comportan como importantes genes supresores tumorales, ya que impiden la actividad de las CDKs uniéndose a ellas, y frenan la progresión del ciclo celular. Estas moléculas inhibidoras se pueden dividir en dos familias, la familia del inhibidor de la CDK4 (INK4), como p15, p16, p18 y p19 que inhiben específicamente CDK4 y CDK6 (Carnero, 1998), y la familia inhibidora de CDK (CIP/KIP) como p21, p27 y p57 que son capaces de inhibir a todas las CDKs (Pavletich, 1999). La inactivación del gen CDKN2A, que codifica la proteína p16, es el cambio

genético más común que ocurre de forma temprana en los tumores de cabeza y cuello (Reed, 1996), al menos el 80% de los cánceres orales tienen una falta de función de p16 (Sartor, 1999), lo que resalta la importancia de esta proteína.

Uno de los genes supresores tumorales más importantes en el ser humano es el p53. El gen p53 es un supresor tumoral que está alterado en la mayoría de los tumores humanos. Sus funciones son la detención del ciclo celular y la iniciación de la apoptosis en respuesta al daño de ADN (González, 2008). El p53 se activa ante el daño celular del ADN, esta proteína favorece la reparación del ADN, detiene el ciclo promoviendo la transcripción de la proteína p21/waf, inhibidor de CDKs. Este mecanismo permite reparar los daños en el ADN antes de su replicación en la fase S (Shukla, 2006). En el caso de no producirse la reparación la célula, el p53 induce su muerte por apoptosis mediante la inhibición de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-2 y Bcl-XL) y la activación de las proteínas proapoptóticas Bcl-2, como Bax y Bak (Jayasurya, 2005) (Fig. 4). La alteración de este gen provoca que las lesiones del ADN no se reparen y las mutaciones se perpetúen en las células en división. El gen p53 se encuentra mutado en el 40-60% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, y esta mutación se asocia con la progresión de las lesiones premalignas a enfermedades invasoras (Forastiere, 2001).

Los tumores con mutaciones de p53, tienen probabilidad de recidivas tempranas. Un estudio realizado por Brennan demostró que pacientes con mutaciones de p53 en su tumor primario, posteriormente desarrollaban recurrencias en los márgenes quirúrgicos en comparación con pacientes con todos los márgenes del tumor libres de esta mutación (Brennan, 1996). Otro estudio de este autor demostró que las mutaciones p53 fueron significativamente mayores en los pacientes que consumían tabaco y alcohol, que en los pacientes que no consumían estas sustancias (Brennan, 1995). Es interesante observar que los pacientes con tumores positivos al VPH eran menos propensos a tener mutaciones p53. Un estudio reciente sobre 560 pacientes que fueron sometidos a resección primaria de su carcinoma oral de células escamosas (COCE), muestra una asociación (independiente de la etapa) entre el estado mutacional de p53 y la supervivencia (Poeta, 2007).



❖ **Evasión de la apoptosis**

La apoptosis es un mecanismo de defensa que impide la perpetuación de células con lesiones en el ADN. Los estímulos que conducen a la apoptosis de la célula pueden ser intracelulares (vía intrínseca) o extracelulares (vía extrínseca). La vía intrínseca se activa por estrés celular o daño del ADN, y provoca la liberación de citocromo c al citosol, lo que se acompaña de pérdida del potencial de membrana y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. Una vez en el citosol, el citocromo c se une a Apaf-1 y una vez unido recluta y procesa a la procaspasa 9 a su forma activa (caspasa 9), la cual puede a su vez activar otras caspasas (Kroemer, 1998). La salida del citocromo c desde la mitocondria está regulado por miembros de la familia Bcl-2, alguno de estos miembros son pro-apoptóticos como Bax y Bak mientras que otros son antiapoptóticos (Bcl-2 y Bcl-XL). La vía extrínseca se activa tras la unión de ligandos a los receptores de la membrana plasmática, como el receptor-1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1). Este tipo de unión activa a las caspasas iniciadoras (2, 8, 10). Una vez activadas, estas caspasas activan otras caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7) que en última instancia son las responsables de la fragmentación de proteínas del cito-esqueleto y proteínas nucleares, lo que conduce a la apoptosis de las células (Wolf, 1999) (Fig. 5).

La supervivencia de las células está condicionada por genes que facilitan e inhiben la apoptosis. La mutación de los genes que regulan la apoptosis hace que los tumores sean resistentes a la muerte celular programada. Un ejemplo de estas mutaciones es la del gen p53, detectada en más del 50% de los carcinomas epidermoides de la cavidad bucal (Poeta 2007; Molinolo, 2009). Esta proteína, denominada “el guardián del genoma”, induce muerte celular ante un daño en el ADN que no puede ser reparado modulando la expresión de las proteínas reguladoras de la apoptosis de la familia de bcl-2, aumentando la expresión de la proteína Bax (proapoptótica), que a su vez estimula a las mitocondrias para la liberación del citocromo C (Fig. 5) (Hanahan, 2000).

❖ **Desarrollo de angiogénesis**

Un hecho determinante en la progresión tumoral es la angiogénesis. La producción de nuevos vasos sanguíneos, a partir de los preexistentes, dota al tumor de la capacidad de nutrirse y proliferar. Entre los mecanismos que regulan este proceso destacan los mediados por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y sus receptores (Argiris, 2008). El gen que lo codifica puede comportarse como un oncogén en el carcinoma oral de células escamosas (COCE). El aumento de expresión de VEGF acontece en todas las etapas de progresión del COCE (Johnstone, 2007). Otros factores que promueven la formación de vasos sanguíneos y la migración de células endoteliales son la prostaglandina E2 y TGF- β , que están a menudo sobreexpresados en los tumores celulares. La inhibición de la COX-2 es efectiva en el control de la proliferación celular del COCE mediante la inhibición de la PGE2 (Sumitani, 2001).

❖ **Potencial replicativo ilimitado**

Las células normales pueden replicarse un número finito de veces. Los telómeros, estructuras localizadas en los extremos de los cromosomas, se acortan con cada división celular. Una longitud crítica de los telómeros activa mecanismos de control y las células entran en un periodo senescente. Las células tumorales, en cambio, eluden este proceso lo que les permite replicarse indefinidamente. Diversos estudios han confirmado la actividad incrementada de la enzima telomerasa, encargada de la replicación de los telómeros, en diversos tipos de cánceres. En el COCE se ha demostrado que esta enzima está reactivada en aproximadamente el 90% de los casos (Stadler, 2008).

❖ **Capacidad de invadir y metastatizar**

La capacidad para invadir tejidos es una característica fundamental del fenotipo maligno. Se trata de un complejo mecanismo que produce alteraciones en las moléculas implicadas en la adhesión de las células entre sí y a la matriz extracelular (E-cadherinas, integrinas) y la activación de proteasas extracelulares (Hanahan, 2000).

CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

❖ EPIDEMIOLOGÍA

Los carcinomas de cabeza y cuello representan la sexta neoplasia en el mundo en términos de frecuencia para ambos sexos, por detrás del cáncer de colon y recto, pulmón, mama, cervix y estómago (Petersen, 2005). El tipo histológico más frecuente (más del 90%) es el carcinoma epidermoide, conocido también como carcinoma de células escamosas o epitelioma espinocelular. Está comúnmente localizado en la cavidad oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe y laringe. La cavidad oral incluye la mucosa alveolar, mucosa masticatoria, triángulo retromolar, suelo de la boca, paladar duro y los dos tercios anteriores de la lengua. En numerosos artículos se hace una distinción entre el cáncer intraoral y el de labio debido a las diferencias etiológicas. La lengua y el suelo de la boca son los lugares más comunes del carcinoma epidermoide de la cavidad bucal, así como el área retromolar (Gerry, 2002). Del resto de tumores malignos, los linfomas se establecen en localizaciones como la amígdala, el paladar y la encía; los sarcomas se localizan en los tejidos blandos próximos al maxilar al igual que los carcinomas y adenocarcinomas de glándulas salivares accesorias, que se asientan predominantemente en la mucosa y fibromucosa palatina. El melanoma se localiza con mayor frecuencia en la mucosa del maxilar (Santamaría, 2008).

El carcinoma epidermoide es una neoplasia maligna epitelial agresiva, caracterizado por una baja tasa de supervivencia y mal pronóstico. A pesar de los numerosos avances en su tratamiento, con la utilización de los protocolos más recientes para cirugía, radioterapia y quimioterapia, la supervivencia a largo plazo ha permanecido por debajo del 50% durante los últimos 50 años (Forastiere, 2001). El pronóstico desfavorable se debe a numerosos factores. Por ejemplo, el cáncer oral se diagnostica con frecuencia cuando la enfermedad ya ha alcanzado una fase avanzada. La tasa de supervivencia a los 5 años del cáncer oral en fase precoz es aproximadamente del 80%, mientras que la cifra cae al 19% para la enfermedad en fase avanzada (Murphy, 1995). Además, el desarrollo frecuente de múltiples tumores primarios disminuye de forma marcada la supervivencia.

En estos pacientes se ha comunicado una tasa de segundos tumores primarios del 3 al 7% por año, más alta que para cualquier otra enfermedad maligna (Anderson, 2001). Tal hecho ha conducido al concepto de “cancerización de campo” (field cancerization).

El concepto de cancerización de campo fue inicialmente propuesto por Slaughter en 1953, en un intento de explicar la frecuente aparición de nuevos tumores en el tracto aereodigestivo superior en pacientes que habían desarrollado un primer tumor de cavidad oral u orofaringe (Slaughter, 1953). El conocimiento actual de los mecanismos moleculares implicados en la regulación del ciclo celular, ha posibilitado dar una interpretación molecular más precisa a la formación de segundos tumores que aparece en algunos pacientes. Los eventos oncogénicos moleculares más precoces en el desarrollo del cáncer oral son las mutaciones del gen p53 y la pérdida de heterocigosidad (LOH) en los loci cromosómicos 3p, 9p y 17p (Chung, 1993). Estas regiones cromosómicas albergan importantes genes reguladores del ciclo celular. Estas alteraciones genéticas precoces forman un campo expansivo precanceroso, que va progresivamente reemplazando al epitelio normal. Estos campos expansivos, no han desarrollado aún la capacidad de atravesar la membrana basal del epitelio e invadir el corion, lo que marca la diferencia entre estado precanceroso y cáncer. Esta teoría explicaría el por qué un individuo que sigue vivo 5 años después de diagnosticarse el tumor primario inicial, tiene una probabilidad del 35% de desarrollar al menos un nuevo tumor primario dentro de este periodo de tiempo. (Lippman, 1989).

La incidencia del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello ha aumentado gradualmente en las últimas tres décadas. Con las tasas actuales, cabe esperar que cada año se diagnostiquen alrededor de 35.000 casos en estados Unidos y más de 500.000 en el mundo (Jemal, 2009).

La distribución de la incidencia del carcinoma oral de células escamosas es muy variable según la zona geográfica. El área del mundo con mayor incidencia es Melanesia, una subregión de Oceanía (31,5 /100.000 en hombres y 20,2/100.000 en mujeres). Las tasas en los hombres son elevadas en Europa occidental (11,3 por 100.000), el sur de Europa (9,2 por 100.000), el sur de Asia

(12,7 por 100.000), África meridional (11,1 por 100.000) y Australia/Nueva Zelanda (10,2 por 100.000). En las mujeres, la incidencia es relativamente alta en el sur de Asia (8,3 por 100.000) y en algunos países africanos (Parkin, 2002).

Estos patrones reflejan la prevalencia de factores de riesgo específicos, tales como el consumo de tabaco/alcohol. Las altas cifras de incidencia para hombres en las poblaciones de los países industrializados, es en parte debido a la larga tradición de fumar y al consumo excesivo de alcohol. En el Sudeste Asiático y algunos países africanos tienen una alta tasa de incidencia para ambos sexos, las tasas en estos países se relacionan directamente con el riesgo de comportamientos tales como el consumo de tabaco de mascar (por ejemplo, nuez de betel o Miang de mascar, o el uso de khat), además del tabaco y del consumo de alcohol. La alta tasa de cáncer oral en Australia se debe al cáncer de labio, en relación con la irradiación solar (Petersen, 2009).

Con respecto al sexo, este tumor es más frecuente en varones, a pesar que ha habido un aumento de la incidencia en mujeres. Se ha estimado una incidencia de cáncer oral y faríngeo en hombres de 25,240 nuevos casos en el año 2009 en EEUU, y de 10,480 para las mujeres (Davies, 2006). En cuanto a la edad, el 90% de los cánceres orales se diagnostican en mayores de 40 años, y más del 50% en individuos de más de 65 años (Ries, 2006). Recientemente se ha observado un aumento en la incidencia de esta enfermedad en menores de 40 años, lo que podría estar asociado a una infección por el virus del papiloma humano (Myers, 2000).

La tasa de mortalidad del cáncer de la cavidad oral es, generalmente, más alta para los varones que para las mujeres. Por otra parte, esta tasa es relativamente baja en muchos países industrializados de Occidente debido a que los servicios de salud están a disposición de la población general, sin embargo, es bastante elevada en los países de bajos y medianos ingresos, así como en países con economías en transición y con acceso limitado a servicios de salud (Petersen, 2009). En España en el año 2008 se produjeron 1628 defunciones en varones y 432 en mujeres (Centro Nacional de Epidemiología).

❖ ETIOPATOGENIA

La etiología del carcinoma escamoso es multifactorial. De entre los factores de riesgo que influyen en el desarrollo del cáncer oral, el tabaco y el alcohol son los más importantes. En la India y otras partes del Sudeste Asiático se consume tradicionalmente nuez de betel, un potente irritante de la mucosa oral. Las infecciones virales como las del virus del papiloma humano afectan al menos al 50% de los cánceres orofaríngeos, en particular los que afectan a las amígdalas y a la base de la lengua (Gillison, 2000). Otro factor de riesgo puede ser la susceptibilidad genética que predisponga a algunos individuos al desarrollo del cáncer oral (Jefferies, 2001). La irritación crónica de la mucosa por aristas de dientes, prótesis mal ajustadas o infecciones crónicas pueden actuar también como promotor del cáncer. Los factores dietéticos y nutricionales pueden tener también alguna participación en el desarrollo del cáncer oral.

Tabaco

El tabaco es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de lesiones premalignas y del cáncer oral, en especial del COCE (Hirota, 2008).

La exposición crónica a los carcinógenos del tabaco produce cambios genéticos en las células epiteliales de la mucosa oral del tracto digestivo superior. La acumulación de cambios genéticos conduce a una inestabilidad genómica, al desarrollo de lesiones premalignas y, finalmente, al carcinoma invasivo. Paralelamente al efecto directo de los componentes del tabaco sobre el genoma, el tabaco puede inducir la actividad proliferativa a través de la activación de los receptores EGFR y sus mecanismos intermedios, que incluyen MAPK y ERK1 y PKC alpha. Esto activa la ciclina D1, que conduce a una mayor actividad proliferativa y el aumento de frecuencia de las mutaciones, por lo que las células son más vulnerables a los cambios genéticos permanentes que a su vez pueden dar lugar a la inestabilidad genómica y al cáncer invasor (Fig. 6).

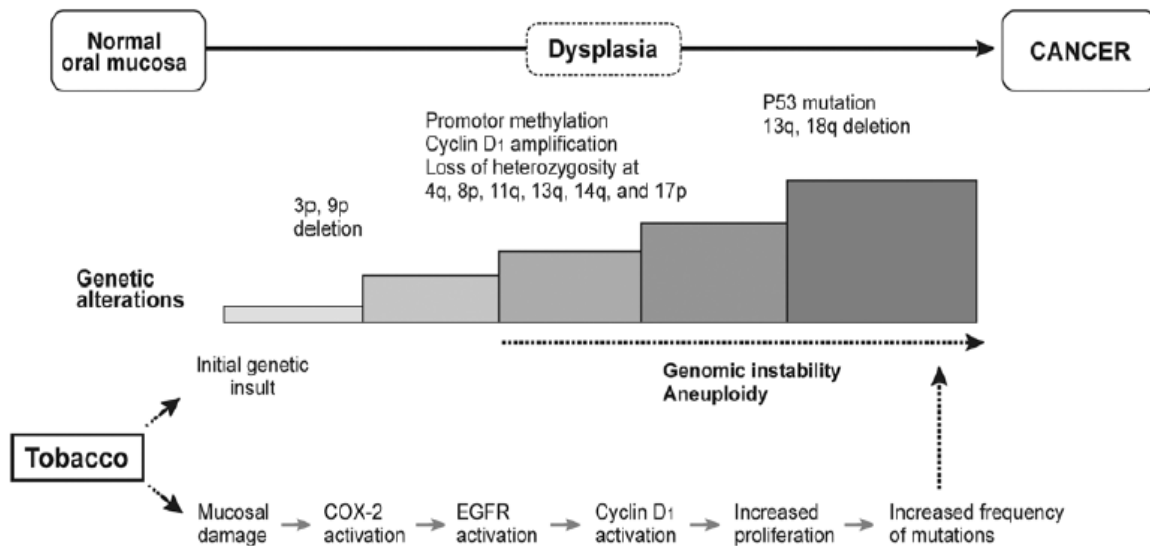


Figura 6. Progresión genética en la carcinogénesis oral. Transformación del epitelio normal a displasia y carcinoma invasor por la acción de carcinógenos como el tabaco, tomado de Choi 2008.

Los componentes más carcinogénicos del tabaco son la N-nitroso-nor-nicotina, hidrocarburos aromáticos como el benzopireno y el polonium, siendo perjudiciales localmente y favoreciendo la absorción de sustancias carcinógenas (Rodu, 2004).

Se estima que entre 85 y 90% de los casos con cáncer de las vías aerodigestivas superiores son explicados por la exposición al tabaco y el riesgo es proporcional a la intensidad de la exposición (Blot, 1998). Además, se ha observado un efecto sinérgico entre el tabaco y el alcohol en la patogénesis del cáncer de la cavidad oral (Znaor, 2003; Hashibe, 2009). Fumar aumenta la carga de acetaldehído siguiente al consumo de alcohol que, a su vez, aumenta la activación de pro-carcinógenos presentes en el tabaco (Seitz, 2009). Resulta difícil distinguir el efecto por separado de estos dos agentes, ya que los consumidores de bebidas alcohólicas suelen fumar y viceversa.

El hábito de fumar de forma invertida (con la lumbre hacia el paladar), habitual en partes de la India, América del sur y Filipinas, está fuertemente asociado a lesiones en el paladar que pueden llevar a un alto riesgo de desarrollar cáncer oral. Existe un efecto sinérgico entre la hiperemia y la acción directa de los carcinógenos del tabaco (Stich, 1992).

Fumar otras sustancias, como la marihuana, también se ha considerado como un factor potencial de riesgo de cáncer oral, particularmente en adultos jóvenes. El cannabis tiene una mayor concentración de carcinógenos aromáticos policarbonados que el tabaco y, además, se suele fumar sin filtro. Sin embargo hasta ahora, sólo un estudio (Zhang, 1999) ha demostrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al riesgo de padecer cáncer oral, por lo que se precisan estudios epidemiológicos más amplios para poder ratificar su importancia en la génesis de este proceso maligno.

Alcohol

El consumo de alcohol se ha señalado como uno de los factores de mayor riesgo en cáncer oral y todo el tracto aerodigestivo superior. El alcohol produce un riesgo cinco veces mayor de padecer cáncer para los grandes bebedores, y hay una fuerte relación dosis-respuesta (Pelucchi, 2008).

Aunque los mecanismos exactos por los cuales ingestión crónica de alcohol estimula la carcinogénesis no están del todo esclarecidos, los estudios experimentales en animales apoyan el concepto de que el etanol no es un carcinógeno, pero bajo ciertas condiciones experimentales actúa como co-carcinógeno y/o promotor tumoral. El metabolismo del etanol por la enzima alcohol-deshidrogenasa, conduce a la generación de acetaldehído y radicales libres (Boccia, 2009). Estos compuestos altamente reactivos se unen rápidamente a los componentes celulares y, posiblemente, al ADN. El acetaldehído disminuye los mecanismos de reparación del ADN y la metilación de la citosina en el ADN. También daña la función del glutatión, un péptido importante en la desintoxicación de carcinógenos.

Otro mecanismo por el que el alcohol estimula la carcinogénesis es mediante la inducción de la enzima CYP2E1 del citocromo P450, que conduce a la activación de varios procarcinógenos presentes en las bebidas alcohólicas, que potencian el efecto carcinogénico del humo del tabaco y de los carcinógenos presentes en la dieta (Poschl, 2004). El alcohol además actúa como solvente, permitiendo la absorción de otros carcinógenos.

También parece estar asociado con el daño tisular y con una hiperregeneración compensatoria secundaria. Por eso, se ha cuestionado la asociación entre el cáncer oral y el uso de enjuagues orales con alto contenido en alcohol (McCullough, 2008; La Vecchia, 2009), basándose en la hipótesis de que la permanencia del alcohol en contacto con la mucosa oral durante un mayor tiempo que al ingerir una bebida alcohólica podría hacer pensar en un posible efecto nocivo a partir de un mecanismo local. Sin embargo, no se ha podido confirmar una relación causal entre el uso de colutorios y el desarrollo del cáncer oral, pero, por otro lado, algunos autores opinan que no está justificado el empleo de alcohol en los colutorios orales (Carretero, 2004).

Betel

Existe también una relación de COCE con el consumo de nuez de betel (areca), que es una costumbre en la India y otras partes de Sudeste Asiático (Cogliano, 2004). La IARC hace mucho tiempo declaró que la nuez de betel era un carcinógeno para los seres humanos, y ha sido confirmado posteriormente (Thomas, 1993; Merchant, 2000; Reichart, 2007; Zhang, 2007)

Los constituyentes del betel varían en las diferentes culturas, pero normalmente consta de nuez de areca, que se obtiene de la planta *Piper betel* (inflorescencia, hoja o raíz) y cal apagada (ya sea en forma de polvo o en pasta). En muchos países también contiene tabaco y especias, por lo que masticar betel a menudo se asocia con el consumo de tabaco. Similares hábitos de mascar, tales como el consumo de khat, también pueden estar implicados en el COCE en algunas comunidades (Fasanmade, 2007; Sawair, 2007).

La arecolina, principal alcaloide de la nuez de betel, podría bloquear los genes supresores tumorales por hipermetilación, inhibiendo la reparación del ADN (Tsai, 2008).

Virus

La participación del Virus del Papiloma Humano en el cáncer oral y de faringe fue propuesto por primera vez por Syrjänen et al. en 1983, y apoyado posteriormente por varios autores (Zur Hausen, 2002; Erdmann J, 2003; Ha PK, 2004; Nair, 2005) sobre la base de las siguientes pruebas: 1) el bien establecido epiteliotrofismo del VPH, 2) las similitudes morfológicas entre la orofaringe y el epitelio genital, 3) la capacidad de immortalizar queratinocitos orales humanos *in vitro*, y 4) el papel etiológico firmemente establecido del VPH en el cáncer de cuello del útero en humanos.

Esta asociación se establece para los VPH de alto riesgo, entre ellos se incluyen el 16 y 18. Algunos autores asocian el VPH-16 con aproximadamente el 50% de los carcinomas de la orofaringe (Masano, 2006). Estos tumores relacionados con el VPH tienen menor tasa de mutaciones en el gen p53, escasa relación con el hábito tabáquico, el consumo de alcohol y un mejor pronóstico. Este hecho también justifica el aumento de la incidencia del COCE y su aparición en personas jóvenes, estando los factores de riesgo más comunes presentes o no. Las oncoproteínas del VPH 16, codificadas por los genes E6 y E7, provocan inestabilidad genómica en las células infectadas e inactivan los genes supresores.

Historia familiar

Otro aspecto a considerar es la susceptibilidad genética a contraer cáncer de la cavidad oral. La aparición de tumores de la cavidad oral en pacientes jóvenes y en pacientes no fumadores sugiere el papel del componente genético. Algunos pacientes que presentan cáncer oral tienen disminuida la capacidad de reparar los daños ocasionados en el ADN por los agentes carcinógenos. Villaret et al. (2000) usaron la técnica de microrrays de ADN e identificaron que ciertos genes como keratin 17 y 19, laminin-5, connexin-26 y VEGF, estaban sobreexpresados en las zonas biopsiadas de carcinomas orales de células escamosas.

Alteraciones genéticas durante el desarrollo del COCE

El desarrollo del cáncer oral de células escamosas es un proceso de múltiples pasos que requiere la acumulación de múltiples alteraciones genéticas, influenciadas por la predisposición genética del individuo y la exposición a carcinógenos ambientales. Son muchas las alteraciones genéticas que se pueden encontrar en el cáncer oral. Pueden aparecer ganancias o amplificaciones, o pérdidas de heterocigosidad (LDH) o deleciones en determinados cromosomas.

Algunas alteraciones aparecen precozmente y conllevan un valor pronóstico para los pacientes con lesiones premalignas o con carcinomas en estadios precoces. El cromosoma 9 parece ser una de las dianas más precoces y sensibles en el desarrollo del cáncer, habiéndose documentado pérdidas alélicas en la región 9p21 en la mayoría de las lesiones orales premalignas (Jiang, 2001) y de los carcinomas incipientes (Bockmühl, 1998). La región 9p21 alberga genes que codifican los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas p16 y 14, que actúan como importantes reguladores de la proliferación celular. Esta alteración se asocia con la transición desde la normalidad hasta la hiperplasia/hiperqueratosis, y ocurre antes del desarrollo de atipia histológica (Mao, 1996). Así mismo, algunas regiones del cromosoma 3 son frecuentes portadoras de aberraciones cromosómicas en el cáncer oral. Otra alteración genética que ocurre en un estadio más avanzado de la progresión del carcinoma de células escamosas es la LDH en 17p. Esta aberración provoca la mutación del gen supresor tumoral p53 y se asocia con progresión hasta displasia (Boyle, 1993).

Otras aberraciones se asocian comúnmente a la progresión hasta la malignidad. Ejemplos de ellos son las deleciones en 4q, 6p, 8p, 11q, 13q y 14q (Rosin, 2000) (Fig. 6).

❖ DIAGNÓSTICO

La detección precoz en estadios asintomáticos, garantiza no sólo un aumento en las tasas de supervivencia sino también una mejora en la calidad de vida en consecuencia a tratamientos menos agresivos y mutilantes (Sciuba, 2001). Sin embargo, en el momento del diagnóstico del cáncer oral, el 36% de los pacientes presentan enfermedad localizada, un 43% presentan enfermedad con afectación regional, un 9% presentan metástasis a distancia, y para el 12% restante el estadio de la enfermedad no se puede identificar (Silverman, 1998; García, 2005). Aunque la cavidad oral es un área accesible y examinada con frecuencia, el hecho de que este tipo de cáncer sea normalmente indoloro, puede ser una de las causas del diagnóstico tardío.

Tras el diagnóstico clínico se debe realizar una biopsia de las lesiones intrabucales, para hacer un estudio anatomopatológico y establecer un diagnóstico definitivo (Sciuba, 2001). Otras técnicas no invasivas como la citología oral por raspado (Sciuba, 1999; Acha, 2005) o la tinción de las lesiones con azul de toluidina (Silverman, 1984), deben considerarse complementarias a la biopsia pero nunca deben sustituirla (Neville, 2002).

Las técnicas por imagen (TAC, RM y PET), están actualmente muy estandarizadas y son un elemento fundamental para la determinación de la extensión del tumor, la afectación de los ganglios regionales y la presencia de metástasis a distancia.

Recientemente, el estudio genético de marcadores moleculares se ha hecho más común, ya que permiten detectar alteraciones antes de que sean visibles clínicamente (García, 2005). El carcinoma oral de células escamosas se ha relacionado con diferentes tipos de marcadores celulares y tisulares, como pueden ser PCNA y p53, que pueden proporcionar información adicional a la aportada por el examen clínico y el estudio histopatológico.

El antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA), Clon PC10, está indicado para la identificación de células proliferativas en tejidos normales y en algunas formas de neoplasia (Hall, 1990). El PCNA es una proteína esencial para la progresión del ciclo celular, que se expresa en la fase G1 (último 5%) y el primer 35% de la fase S del ciclo celular. Es un componente de la maquinaria de replicación del ADN, actuando como proteína auxiliar de la ADN polimerasa requerida para la síntesis del ADN. La ausencia o los niveles bajos de PCNA funcional pueden inducir a las células a la apoptosis (Kelman, 1997).

La p53 proteína (clon DO-7) es una fosfoproteína nuclear con una masa molecular de 53 kDa. La proteína p53 de tipo natural está presente en células normales, pero tiene vida media muy corta y, por consiguiente, sólo está presente en cantidades muy pequeñas (Vojtěšek, 1992), generalmente por debajo del nivel de detección de los métodos inmunocitoquímicos (Cooper, 1997). La mutación somática del gen p53, es un evento muy frecuente en el desarrollo de la neoplasia humana y, puesto que las proteínas p53 de tipo mutante suelen ser mucho más estables que las de tipo natural, la proteína p53 mutante se acumula en grandes cantidades (Vojtěšek, 1992).

❖ PREVENCIÓN

Una de las formas evidentes para prevenir esta enfermedad, es disminuir en lo posible la exposición a factores de riesgo que se han encontrado asociados a la misma. En cuanto a la prevención secundaria, uno de los problemas más grandes asociados al cáncer oral es el diagnóstico tardío de la enfermedad (Silverman, 1988).

La **quimioprevención** es un área de rápido crecimiento de la oncología. Este término fue introducido inicialmente por Sporn et al. (1976), e implica el uso de compuestos sintéticos o de origen natural para prevenir, inhibir o revertir el desarrollo de cáncer (Sporn, 2002; Patel, 2007; Lee, 2011). Este enfoque farmacológico se basa en la identificación de los individuos sanos que se consideran en alto riesgo de desarrollar cáncer, y para los cuales un agente farmacológico puede inhibir eficazmente la aparición de cáncer. Además de la inhibición o el retraso de la aparición de la neoplasia mediante el bloqueo de inicio neoplásico, la quimioprevención juega un papel en la prevención del desarrollo de la capacidad invasora y metastásica de los tumores establecidos. La quimioprevención del cáncer difiere del tratamiento en que el objetivo de ésta es reducir la tasa de incidencia de cáncer (Patel, 2007).

Un agente quimiopreventivo ideal debe: tener poca o ninguna toxicidad, tener eficacia en múltiples localizaciones, poder ser administrado oralmente, poseer un mecanismo de acción conocido y tener bajo coste y aceptación (Lee, 2011).

Actualmente los polifenoles, micronutrientes presentes en frutas y verduras, han captado una gran atención debido a su baja toxicidad intrínseca y sus beneficios para la salud, especialmente su capacidad para inhibir el desarrollo de diferentes tipos de cánceres (Manach, 2004, Chen, 2007).

COMPUESTOS FENÓLICOS

Son muchos los estudios epidemiológicos que han demostrado una asociación inversa entre el consumo de verduras y frutas, y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Nakachi, 1996; Bazzano, 2001). Aunque los efectos de protección se atribuían en un principio a los antioxidantes conocidos, como la vitamina C, vitamina E y β -caroteno, en los últimos años ha cobrado especial relevancia el papel de los compuestos fenólicos de los vegetales.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, siendo parte importante de la dieta tanto humana como animal (Martínez-Valverde, 2000). Conforman un conjunto heterogéneo de más de 8000 compuestos bien identificados, que comparten la característica de poseer en su estructura un anillo aromático de benceno, con uno o más grupos hidroxilos. Se pueden clasificar por el número y disposición de sus átomos de carbono y comúnmente se encuentran conjugados con azúcares y ácidos orgánicos (Crozier, 2009).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a los grupos hidroxilos unidos a sus anillos aromáticos, que les brindan una estructura especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante al poder actuar como donadores de hidrógeno o electrones, así como atrapadores de radicales libres (Nakatani, 2000).

Además de sus propiedades biológicas, relacionadas con la fisiología vegetal, se les han atribuido actividades farmacológicas y médicas relacionadas con la prevención y/o mejora del estado de salud. Entre éstas destacan sus efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos e inhibidores de la fosfolipasa A2, de la cicloxigenasa, lipoxigenasa, glutatión reductasa y xantina oxidasa (Middleton, 2000).

Los polifenoles pueden interferir en las distintas etapas que conducen al desarrollo de tumores malignos al proteger el ADN del daño oxidativo,

inactivando de este modo los carcinógenos, inhibiendo la expresión de los genes mutágenos y de la actividad de las enzimas encargadas de la activación de procarcinógenos, y activando los sistemas enzimáticos responsables de la detoxificación de xenobióticos (Benavente-García, 2008). Diferentes estudios epidemiológicos han puesto en evidencia el efecto preventivo de los polifenoles frente al cáncer de vejiga (Stavric, 1984), mama (Whitsett, 2006), próstata (Adhami, 2004), pulmón (Ju, 2007), colon (Ji, 1997), estómago (Myung, 2009), o cáncer oral (Chandra Mohan, 2005).

FLAVONOIDES

Entre los polifenoles, los flavonoides constituyen el grupo más importante representando el 60% de éstos. Se han identificado más de 5000 variedades de flavonoides (Patel, 2007) y están clasificadas de acuerdo a su estructura molecular, que consiste en dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado central (anillo C) (Fig. 7) (Ross, 2002; Manach, 2004).

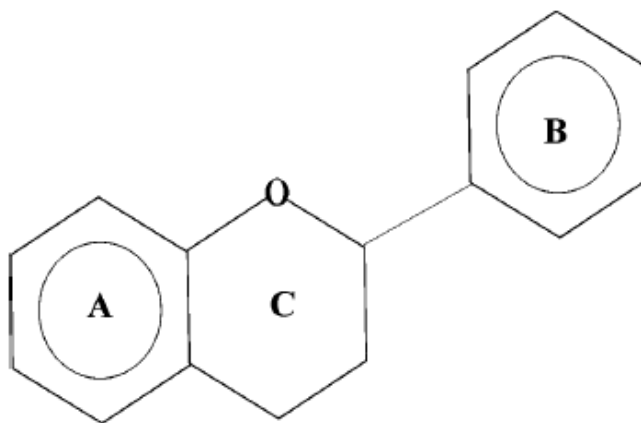


Fig. 7. Estructura general de los flavonoides.

Los flavonoides se clasifican en subgrupos, según la conexión entre los anillos B y C, el estado de oxidación y los grupos funcionales del anillo C (Beecher, 2003). Los seis subgrupos principales son: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas y flavanoles (Fig. 8) (Manach, 2004). Otros subgrupos que están presentes de forma minoritaria en la dieta son: dihidroflavonoles, flavan-3,4-dioles, cumarinas, chanconas, dihidrochanconas y auronas.

El esqueleto básico de los flavonoides puede tener ciertos sustituyentes. Los grupos hidroxilos suelen estar en las posiciones 4',-5' y 7'. Los azúcares son muy comunes, encontrándose la mayoría de flavonoides en forma de glicósidos. Tanto los azúcares como los grupos hidróxilos, aumentan las solubilidad en agua de los flavonoides, otros sustituyentes como los grupos metilo o unidades isopentil hacen a los flavonoides más lipófilos (Crozier, 2009).

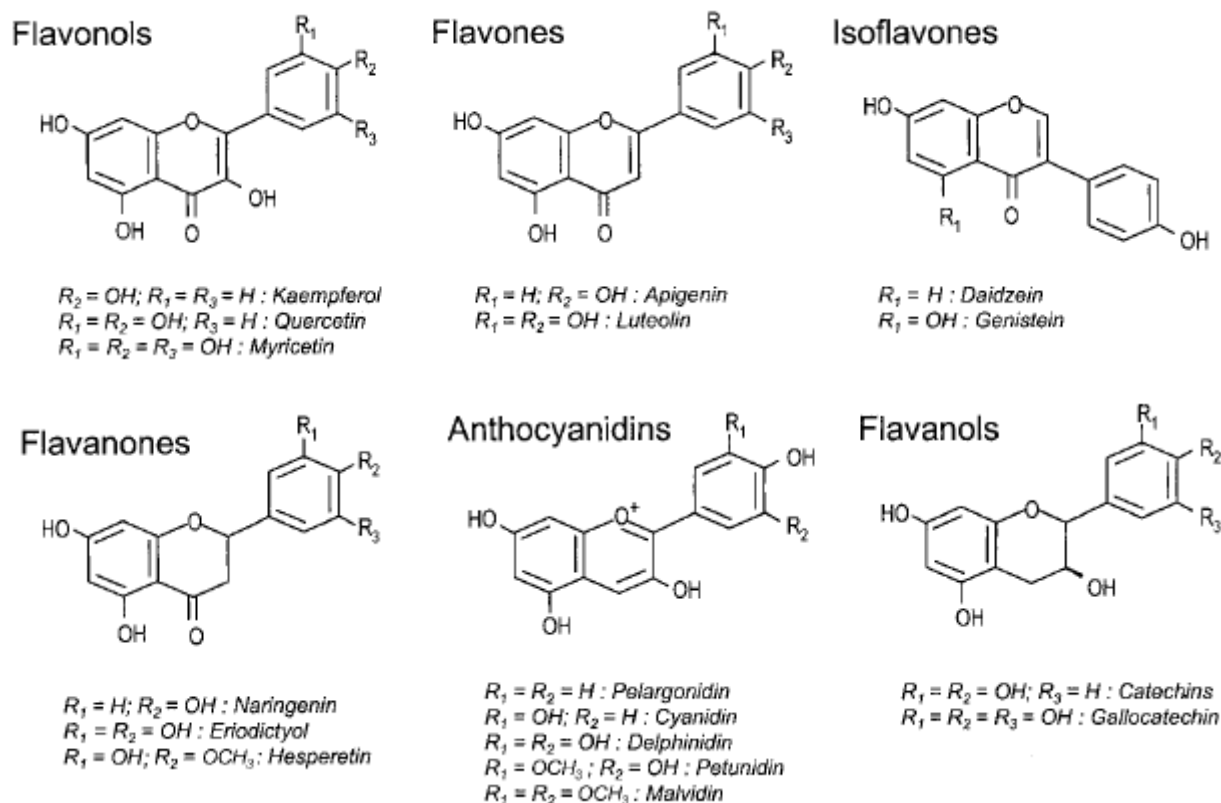


Fig. 8. Estructura química de los 6 subtipos de flavonoides (tomado de Manach, 2004)

Se han descrito una serie de alimentos y bebidas con alto contenido en flavonoides. Las frutas y verduras (manzanas, uvas, cebollas, legumbres), el chocolate negro y las bebidas como el té (verde o negro) y el vino tinto, son las principales fuentes de flavonoides de la dieta. El consumo total de flavonoides oscila entre aproximadamente 20 mg/d (Estados Unidos, Dinamarca, Finlandia) a 70 mg/d (Holanda). Aunque estos valores no representan el total de flavonoides ingeridos en la dieta, ya que sólo se tienen en cuenta tres flavonoles y dos flavonas (Aherne, 2002; Beecher, 2003; Manach, 2004; Crozier, 2009). La ingesta de flavonoides excede a la de otros antioxidantes en la dieta, como el

beta-caroteno (2-3 mg/día) y la vitamina E (7-10 mg/día), mientras que representa aproximadamente un tercio del consumo de vitamina C (70- 100 mg/día). Así pues, los flavonoides representan una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana.

Los flavonoides cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas. Sus principales acciones son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, predadores y a los daños provocados por la luz ultravioleta. Casi todos los flavonoides son pigmentos, lo que se asocia con su capacidad electrónica para captar y transferir energía, así como para atraer insectos, animales y aves polinizadoras. Además desempeñan un importante papel en el metabolismo del nitrógeno (Havsteen, 2002; Taylor, 2005).

Estos compuestos polifenólicos muestran un gran espectro de propiedades biológicas en los seres humanos, como: antioxidantes, antiinflamatorios, analgésicos, antivíricos, antibacterianos y antifúngicos. El consumo regular de flavonoides también se ha asociado con un menor riesgo de padecer varias enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos y cáncer. Con respecto a la salud cardiovascular, los flavonoides pueden alterar el metabolismo de los lípidos (Zern, 2005), inhibir la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Jeong, 2005), reducir la formación de lesiones ateroscleróticas (Fuhrman, 2005), inhibir la agregación plaquetaria (Hubbard, 2006), disminuir la expresión de la molécula de adhesión celular vascular (Ludwig, 2004), mejorar la función endotelial (Hallund, 2006) y reducir la presión arterial (Hodgson, 2006). Los flavonoides también han demostrado mejorar la función cognitiva y revertir la neurodegeneración relacionada con la edad (Joseph, 1999). Así mismo, se les atribuyen propiedades anticancerígenas ya que son capaces de actuar sobre múltiples etapas de la carcinogénesis: inhiben el daño oxidativo del ADN e inactivan a carcinógenos y a las enzimas responsables de la activación de los procarcinógenos (Patel, 2007), inducen la apoptosis de las células (Mantena, 2006), inhiben proliferación de células cancerosas (Wang, 2000) y previenen la angiogénesis, la invasión tumoral y metástasis (Yang, 2008).

APIGENINA

La apigenina es un flavonoide natural, del grupo de las flavonas y cuya formulación química es 4',5, 7-trihydroxyflavona (Fig. 9). 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).

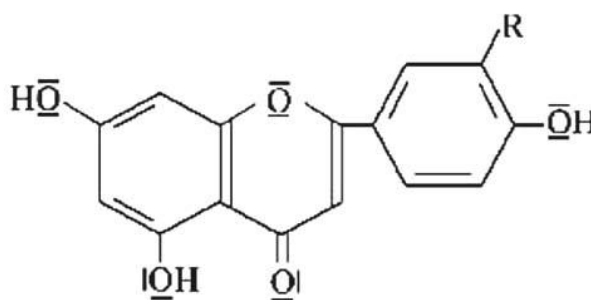


Fig. 9. Estructura química de la apigenina

A la apigenina se le atribuyen en la medicina popular propiedades sedantes, anticonvulsivantes, antiespasmódicas, analgésicas, antiinflamatorias y antisépticas (Heidari, 2009). Así, la flor de la pasión se ha empleado para tratar el asma, el insomnio, la enfermedad del Parkinson, la neuralgia, el herpes zóster. La manzanilla, en sus distintas formulaciones, se ha empleado como antiinflamatorio y antiespasmódico intestinal, o para reducir la inflamación cutánea y otros problemas dermatológicos (Avallone, 2000; Patel, 2007).

Esta flavona tiene, además, efectos antitumorales, ya que inhibe la proliferación celular de varias líneas celulares neoplásicas humanas, incluyendo cáncer de mama (Yin, 2001), colon (Wang, 2000), próstata (Shukla, 2006), piel (Caltagirone, 2000), tiroides (Yin, 1999) y leucemia (Takahashi, 1998). Estos

efectos inhibitorios son producidos debido a que la apigenina regula la carcinogénesis en todas sus etapas.

En la fase de **iniciación**, es capaz de proteger el ADN de distintas células del daño causado por compuestos genotóxicos, evitando mutaciones que podrían fomentar el desarrollo de tumores. Así, es capaz de promover la quelación metálica, regular la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo de carcinógenos como el citocromo P450, eliminar radicales libres o estimular a las enzimas detoxificadoras de la fase II (Patel, 2007).

En la fase de **promoción**, inhibe o ralentiza la división celular mediante la regulación del ciclo celular y su capacidad de inducir apoptosis (Gupta, 2001; Shukla, 2006; Shukla, 2008). Actúa como reguladora del ciclo celular en numerosas líneas celulares, entre ellas en células de cáncer mama (Yin, 2001; Choi, 2009), cuello de útero (Zheng, 2005), colon (Wang, 2000), próstata (Gupta, 2002; Shukla, 2006) y de piel (Lepley, 1997). Disminuye los niveles de varias ciclinas (A, D1, 2 y B1), inactiva a las CDKs y regula positivamente a los inhibidores de las CDKs. A esto se suma su capacidad para estabilizar la proteína p53, responsable de la activación de la proteína p21/waf, y de inducir la desfosforilación de Rb, evitando así la expresión de las ciclinas D y E relacionadas con la progresión del ciclo celular (Fig. 10). Su actividad proapoptótica se debe a que aumenta la expresión de la proteína supresora p53, que aparece alterada con frecuencia en el cáncer, disminución de la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bid (antiapoptóticas) y aumento de la expresión de Bax y Bak (proapoptóticas), aumenta el flujo de salida del citocromo c al citoplasma con la consiguiente activación de caspasa-9 y caspasa-3, activa la cascada de las caspasas e inhibe la ADN topoisomerasa II (Shukla, 2008).

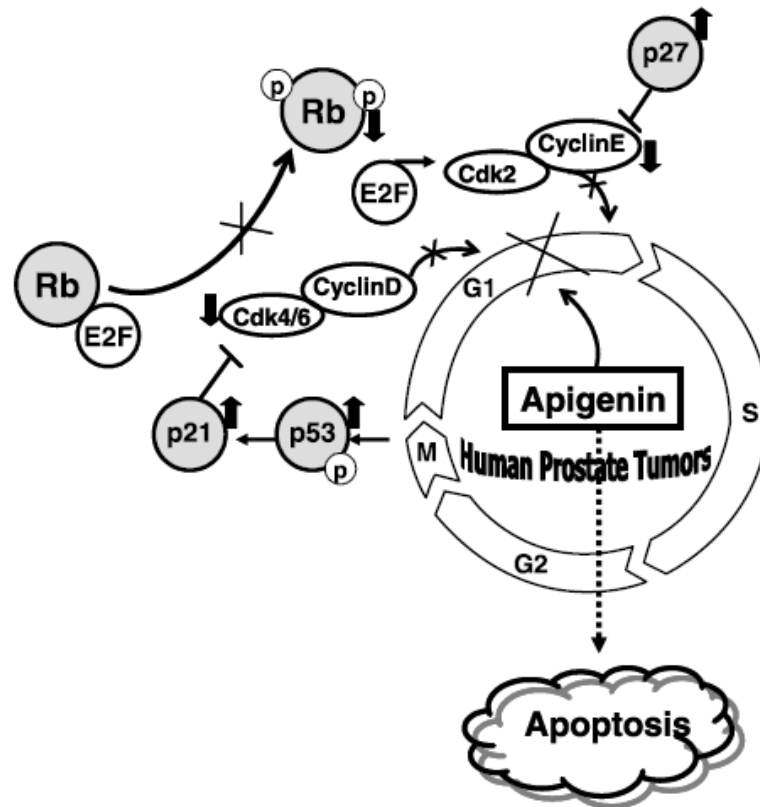


Fig. 10. Actividad reguladora del ciclo celular de la apigenina, tomado de Shukla (2006).

En la última fase de la carcinogénesis, la **progresión**, la apigenina inhibe la angiogénesis y el proceso de metástasis (Fang, 2005; Hu, 2008; Lee, 2008). Se ha demostrado que la apigenina inhibe la angiogénesis en el melanoma y en el carcinoma de mama, piel, pulmón y colon (Wei, 1990; Caltagirone, 2000; Wang, 2000; Yin, 2001; Liu, 2005). Sus efectos parecen estar mediados principalmente a través de la supresión de la expresión del factor inducible por hipoxia 1- α , la ciclooxigenasa-2, la síntesis de óxido nítrico-2, la disminución del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la lipoxigenasa (Liang, 1999; Ramos, 2008). Al mismo tiempo la apigenina ha demostrado tener capacidad anti-metastásica al disminuir los niveles de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) en la línea celular SCC-4 (Yang, 2008) y en la línea celular MDA-MB231 del adenocarcinoma de mama humano (Lindenmeyer, 2001).

CATEQUINAS DEL CACAO

El cacao que se obtiene de las semillas de *Theobroma Cacao*, es una importante fuente dietética de antioxidantes dado su elevado contenido en flavonoides, principalmente flavanoles (Adamson, 1999). Los flavanoles del cacao se presentan en dos formas estructurales, como entidades únicas o monómeros, o como estructuras oligoméricas (polímeros).

Dentro de los flavanoles, los monómeros más importantes que se encuentran en el cacao y en sus subproductos son las catequinas o flavan-3-oles, y entre los productos poliméricos, las procianidinas (58%). La principal catequina es la (-)-epicatequina, que supone aproximadamente el 35% del total de los polifenoles presentes en el cacao (Wollgast, 2000).

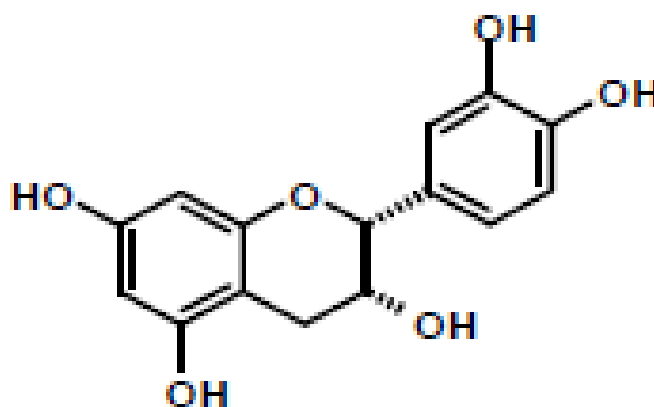


Fig. 11. Estructura química de la (-)-epicatequina.

Las catequinas y procianidinas aisladas en el cacao, tienen fuertes propiedades antioxidantes *in vitro*, como se demuestra al comparar las catequinas del chocolate con las del té, con respecto a las cuales muestran un efecto antioxidante 4 veces mayor (Art, 1999), siendo las catequinas y sus oligómeros unidos por enlace C4→C8 las de mayor efecto (Osakabe, 2002).

Los productos de cacao tienen efectos beneficiosos para la salud, ya que protegen contra el estrés oxidativo y la inflamación crónica, que son factores de riesgo para ciertas enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

Los polifenoles del cacao previenen del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, ya que: inhiben la oxidación de las LDL (Wan, 2001; Mathur, 2002); incrementan la producción del óxido nítrico en el tejido endotelial, efecto que se traduce en una acción vasodilatadora (Hermann, 2006), y de relajación vascular (Karim, 2000); inhiben tanto la activación como la agregación de las plaquetas en los vasos sanguíneos, efecto fisiológico que se complementa con la acción inhibidora de la oxidación de las LDL (Rein, 2000; Hermann, 2006).

El cáncer es un ejemplo de las patologías que se relacionan con un aumento en la concentración de radicales libres (RL) en el organismo. La vulnerabilidad de las proteínas y del ADN al potencial oxidativo de organismo humano, se ha considerado un factor carcinogénico de gran importancia. Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, que se forman continuamente en el organismo como resultado de diferentes reacciones bioquímicas, pueden causar un daño oxidativo significativo, además de los carcinogénicos ambientales. Diferentes estudios experimentales han revelado las propiedades de los polifenoles del cacao para inhibir el daño oxidativo sobre el ADN de la célula de algunos carcinógenos externos (acción antígenotóxica), mostrando así su rol protector en la prevención del cáncer (Ohno, 2009). Se ha observado un efecto protector de los polifenoles del cacao contra la aflotoxina B1, que es un potente mutágeno y carcinógeno; la acción se produce al evitar la unión de ésta y el benzo[a]pireno con el ADN. La epicatequina tiene un efecto antimutagénico sobre uno de los componentes del tabaco, ya que previene su oxidación a la forma activa que daña el ADN. (Jardine, 1999).

También se ha investigado las propiedades de las flavonas del cacao en las diferentes etapas de la carcinogénesis. La procianidina obtenida de extractos de semilla de cacao, causa detención del ciclo celular en la fase G2/M y una inhibición del crecimiento del 70% en las células Caco-2, una línea celular del cáncer de colon (Carnesecchi, 2002). Otro estudio ha demostrado los efectos de las procianidinas para inhibir selectivamente la proliferación del cáncer de mama humano, mediante la desfosforilación o desregulación de varias proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular (Ramljak, 2005). Amin et al., indicaron que el extracto de licor de cacao puede reducir la actividad de las

enzimas de los marcadores tumorales en la hepato-carcinogénesis (Amin, 2004). Bisson et al., demostraron que los polifenoles del cacao disminuían la hiperplasia de próstata, a través de la reducción de los niveles de dihidrotestosterona (Bisson, 2007). Posteriores estudios realizados por este autor, demostraron que también reducía la incidencia de tumores de próstata si se administraba previamente a la inducción del proceso de carcinogénesis (Bisson, 2008). Los polifenoles del cacao, a la concentración más alta ensayada (0,2%), inducen la inhibición completa del crecimiento en las líneas celulares metastásicas DU 145 y no metastásicas 22Rv1 del cáncer de próstata (Jourdain, 2006). Las procianidas del cacao inhiben, además, la expresión del gen de la tirosina quinasa ErbB2, lo que puede resultar en una disminución de la proliferación de células endoteliales, disminuyendo de este modo la angiogénesis asociada a la patología tumoral (Kenny, 2004).

De igual forma, la inflamación crónica, incrementa la posibilidad de aparición del cáncer debido a que origina un recambio celular continuo, estableciendo un ambiente propicio para la carcinogénesis (Willett, 2002). Respecto a la respuesta inflamatoria, las procianidinas del cacao han mostrado la capacidad de modular las citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria aguda (Steinberg, 2002). Tienen, además, un efecto inhibitorio sobre la fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, disminuyendo de esta forma los niveles de prostaglandinas, sustancias que incrementan la respuesta inflamatoria (Wollgast, 2000).

ERIOCITRINA

La eriocitrina (Fig 12), es una flavanona que se encuentra en forma glicosilada en el hidroxilo situado en el C-7, esta glicosilación es de la estructura β -rutinósido (eriodictyol 7-O-rutinoside). Es muy abundante en el limón y en la lima, obteniéndose de la piel de estos frutos cítricos. Las hojas de menta (*Mentha piperita* L.), constituyen también una fuente importante de polifenoles, siendo la eriocitrina (383,3 $\pm$ 2,2 mg/g de extracto) y el ácido rosmarínico (381,2 $\pm$ 1,9 mg/g extracto) los componentes más abundantes identificados dentro de estas hojas (Dorman, 2009). La menta es un remedio ampliamente conocido en la medicina tradicional que sirve para aliviar los trastornos digestivos. Sus hojas son, así mismo, útiles en el tratamiento de la bronquitis, diabetes, diarrea, fiebre, hipertensión, ictericia, náuseas, dolor, afecciones respiratorias e infecciones del tracto urinario (Baliga, 2010).

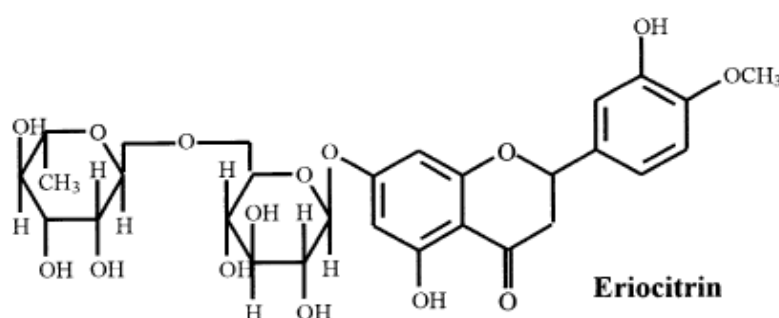


Fig. 12. Estructura química de la eriocitrina.

La eriocitrina posee la actividad más antioxidante de todos los flavonoides glicósidos presentes en frutos de limón (Tripoli, 2007). Así se ha observado que, la eriocitrina suprime de forma significativa el estrés oxidativo inducido con estreptozotocina en el hígado de ratas diabéticas (Miyake, 1998) o causados por el ejercicio físico en ratas (Minato, 2003).

Varios estudios realizados sobre los flavonoides presentes en los cítricos, han demostrado su capacidad para inhibir la proliferación de muchos tipos de líneas celulares cancerosas en ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se observó que la eriocitrina y sus metabolitos secundarios producidos por la hidrólisis de una bacteria intestinal (eriodictiol, ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico y floroglucinol)

(Miyake, 1997), inducen la apoptosis en las líneas celulares leucémicas HL-60 (Ogata, 2000). En otro trabajo, se estudió la actividad antiproliferativa de 27 flavonoides de Citrus contra varias líneas celulares normales y tumorales. En todos los casos se comprobó una actividad contra las células tumorales incluyendo las del carcinoma A549 y TGBC11TKB de cáncer gástrico, sin afectar las células normales (Kawaii, 1999). Otro estudio demostró que los flavonoides del limón y sus metabolitos inducen la apoptosis en la línea de células leucémicas HL-60, en dosis y tiempo dependientes (Ogata, 2000). Otros flavonoides presentes también en los cítricos, como la naringina, naringenina, herperidina, neoshesperidina, tangeretina y nobiletina, han sido utilizados en el modelo de carcinogénesis oral en hámster, inhibiendo la transformación neoplásica (Miller, 2008).

Estudios experimentales han demostrado que la menta también posee propiedades preventivas contra carcinogenicidad del shamma (mezcla de tabaco, aceites y especies), en el modelo de carcinogénesis oral sobre la mucosa yugal de hámster (Samman, 1998); y frente al cáncer de pulmón inducido por benzo[a]pireno en ratones (Kumar, 2004).

ÁCIDO ROSMARÍNICO

El ácido rosmarínico, denominado también ácido labiático, es un éster del ácido cafeico y del ácido 3, 4-dihidroxifeniláctico (Fig. 13). Se encuentra en hierbas de la familia de las lamiáceas, como el romero (*Rosmarinus officinalis* L.), la melisa (*Melissa officinalis*), la menta (*Mentha piperita* L.), el orégano (*Origanum vulgare* L.) y la perilla (*Perilla frutescens*).

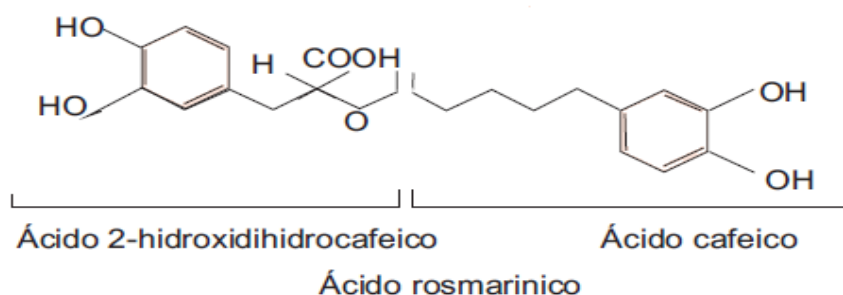


Fig 13. Estructura química del ácido rosmarínico.

El ácido rosmarínico posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Petersen, 2003). Varios estudios han demostrado que ejerce su efecto antiinflamatorio inhibiendo la activación del complemento (Sahu, 1999) y la actividad de la COX-2 (Cheung, 2007), que es considerada como un factor de riesgo en el desarrollo del tumor. También actúa inhibiendo las enzimas inflamatorias 5-lipooxigenasa y 12-lipooxigenasa (Yamamoto, 1998).

También ha sido demostrado su efecto anticancerígeno en un estudio realizado por Sancheti y Goyal (2006), en el que el extracto acuoso de las hojas de *Rosmarinus officinalis* inhibía de forma significativa la inducción de los papilomas de la piel en ratones albinos suizos. Otro estudio llevado a cabo por Osakabe et al. (2004) mostró que el ácido rosmarínico presente en el extracto de perilla, reduce la carcinogénesis cutánea en ratones a través de dos mecanismos independientes: la inhibición de la respuesta de varios mediadores inflamatorios (ICAM-1, VCAM-1, KC, MIP-2 y COX-2) y la captura de radicales de oxígeno reactivo (peróxidos lipídicos y ácido tiobarbitúrico). Anteriores estudios documentaron que el extracto de romero inhibe la carcinogénesis inducida por 7,12-dimetil-benzo[a]antraceno en tumores mamarios en ratas Sprague-Dawley (Singletary, 1991) y la genotoxicidad del benzo[a]pireno en células bronquiales (Offord, 1995).

MODELOS EXPERIMENTALES DE CARCINOGENESIS ORAL

El objetivo principal de cualquier modelo de experimentación para el estudio de la carcinogénesis, es obtener y entender los mecanismos involucrados en dicho proceso y recopilar datos que ayuden al clínico a proporcionar tratamientos más efectivos a los pacientes. Los parámetros observados en los modelos de experimentación se deben correlacionar estrechamente con los parámetros de las lesiones en humanos.

El uso de modelos animales para el estudio de la carcinogénesis está justificado desde que los agentes químicos se identificaron como los principales factores desencadenantes del cáncer de cabeza y cuello (Vairaktaris, 2008). Son numerosos los modelos animales utilizados para el desarrollo de carcinomas de células escamosas en la cavidad oral de forma experimental, entre ellos se incluye el hámster, la rata y el ratón (Tang, 2004).

La mucosa oral del hámster, es el modelo experimental mejor caracterizado y más ampliamente utilizado para el desarrollo de carcinomas orales de células escamosas. Entre las mayores ventajas de este modelo destacan las similitudes entre la mucosa yugal del hámster y la mucosa oral queratinizada humana, la ausencia de tumores espontáneos y la susceptibilidad a influencias sistémicas como hormonas, micronutrientes y otros (Vairaktaris, 2008). Además, la mucosa yugal del hámster se asemeja a un bolsillo, por lo que es fácilmente accesible para la inducción local del tumor y puede ser evertida fácilmente para el seguimiento macroscópico y el tratamiento local (Fig.14). Los rasgos anatómicos y fisiológicos de la bolsa de la mejilla del hámster fueron descritos por primera vez por Keyes y Dale (Keyes, 1944).

Los primeros intentos para inducir tumores malignos orales fueron en gran medida ineficaces, ya que la mucosa oral se mostraba considerablemente más resistente a las acciones de los carcinógenos químicos que la piel.



Fig. 14. Muestra de la mucosa yugal del hámster que asemeja a un bolsillo.

El primer intento exitoso de producción de tumores en la bolsa fue realizado por Salley en 1954. Demostró que las aplicaciones de uno o varios hidrocarburos policíclicos podrían inducir carcinomas de células escamosas en el delgado revestimiento de la mucosa del hámster. Encontró que el 7,12 dimetil-1,2-benzo[a]antraceno (DMBA) disuelto en acetona era el carcinógeno más eficaz en la inducción de tumores mediante la pincelación de la mucosa del hámster con esta sustancia tres veces por semana durante 16 semanas. Describió histológicamente cuatro etapas reconocibles que ocurrían en la mucosa: hiperplasia, papilomas, carcinoma *in situ*, y carcinoma de células escamosas.

Posteriormente en 1961, Morris optimizó y estandarizó la técnica, estableciendo que la concentración óptima para producir la máxima respuesta tumoral con el mínimo periodo de latencia era de 0,5% de una solución de 7,12-dimetil-1,2-benzo[a]antraceno (DMBA) aplicada tres veces a la semana. Además añadió que el epitelio de la bolsa de hámster de más edad era más resistente a la acción del DMBA que la de los animales jóvenes y determinó que 5 semanas parece ser la edad óptima para comenzar los estudios experimentales de carcinogénesis (Morris, 1961).

El mecanismo de acción del hidrocarburo policíclico aromático DMBA es a través de un proceso de oxidación, que empieza tras la unión del DMBA con el receptor Ah localizado en la membrana de los queratinocitos orales (Slaga, 1979). Se requiere el contacto directo del carcinógeno con el queratinocito para que se produzca el desarrollo del carcinoma. La oxidación del complejo DMBA-Ah ocurre a través de la activación del sistema del citocromo P450. Las enzimas citocromo P450, son esenciales para la activación metabólica de dichos hidrocarburos policíclicos aromáticos a intermedios epóxido, que se convierten con la ayuda de la enzima hidrolasa epóxido a diol-epóxidos. Estos metabolitos carcinógenos últimos, se unen covalentemente a los grupos amino exocíclicos de purinas en el ADN para formar aductos estables (Sindhu, 2010). Uno de estos aductos de ADN es la *8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG)*, que aparece en las etapas iniciales del proceso de carcinogénesis oral, antes de la displasia (semana primera). Los aductos formados están asociados con la mutaciones como las transversiones G-T en los genes supresores tumorales (Teicher, 2002).

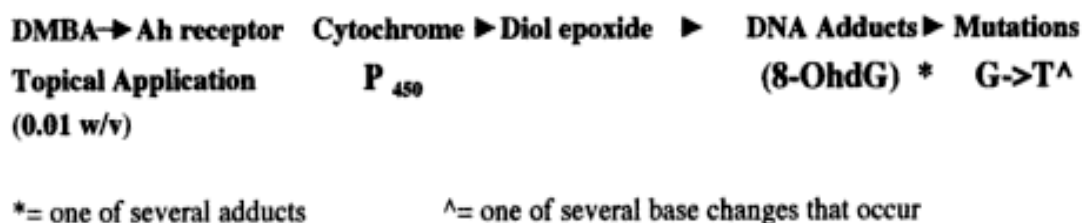


Fig.15. Mecanismo de acción del DMBA, tomado de Teicher, 2002.

El desarrollo de las lesiones inducidas químicamente en este modelo, se correlaciona estrechamente con la secuencia de procesos involucrados en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cáncer oral humano. (Giménez-Conti, 1993; Shklar, 1999). Estos eventos comunes incluyen mutaciones, así como cambios en la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores, tales como p53, el H-ras y p16 (Gimenez-Conti, 1996; Schwartz, 1997; Husain, 1989; Muscarella, 2001), expresión de marcadores de proliferación celular (Schwartz, 1989, 1995), respuesta a las citokinas relacionadas con la inmunidad (tales como las interleukinas y el factor de necrosis tumoral) (Schwartz, 1990) y la estimulación del crecimiento en respuesta a diversos factores, tales como el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante (Wong, 1993).

Desde el trabajo de Salley, muchos investigadores han utilizado el dimetilbenzantraceno (DMBA) sobre la mucosa de la mejilla del hámster en diversos estudios sobre el cáncer (Silberman, 1963; Santis, 1964; Shklar, 1972; Dipple, 1984; Vairaktaris, 2008).

A pesar de que el modelo de carcinogénesis oral en hámsters tiene muchas similitudes con los cambios observados en el cáncer oral humano, los hámsters poseen varias singularidades que deben ser consideradas. La mucosa yugal del hámster proporciona un área superficial relativamente grande para el desarrollo de carcinoma invasivo, mientras que el humano no posee este tipo estructura de mucosa. En contraste con los humanos, ratones o ratas, la mucosa del hámster carece de drenaje linfático, lo que permite que diversos fármacos o moléculas se acumulen en la mucosa (Takuji, 2011). Además, se ha cuestionado la similitud de las neoplasias inducidas por DMBA en este modelo de carcinogénesis con las lesiones observadas en humanos (Kanojia, 2006). Otros autores están en desacuerdo con este modelo, ya que no permite examinar las lesiones tempranas de la mucosa, debido a la irritación local causada por el DMBA y sus solventes (acetona o benceno), que provocan una respuesta inflamatoria severa, necrosis y desprendimiento (Nauta, 1996).

Existe otro carcinógeno químico que se emplea frecuentemente para la inducción de la carcinogénesis oral, el 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO). Fue presentado por primera vez por Wallenius y Lekholm en 1973, y se ha demostrado que produce COCE tanto en ratas como en ratones, siendo útil para analizar los efectos de agentes antitumorales (Suzuki, 2006). El 4NQO es un químico sintético (derivado de una quinolina), que puede provocar la formación de aductos de ADN, que resultan de la sustitución de la adenosina por guanosina. El 4-NQO también puede producir especies reactivas de oxígeno que producen mutaciones y fracturas en la cadena de ADN. Es soluble en agua y, por tanto, de fácil aplicación pudiendo administrarse oralmente en el agua de bebida (Tang, 2004). Se usa para estudiar las diversas etapas de carcinogénesis oral, ya que es capaz de inducir secuencialmente las fases de la carcinogénesis (hiperplasia, displasia, displasia severa, carcinoma *in situ* y COCE) (Wilkey, 2009).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES SOBRE EL EFECTO QUIMIOPREVENTIVO DE LOS POLIFENOLES EN LA CARCINOGENESIS ORAL

Existe un creciente interés por los polifenoles presentes en la dieta y plantas medicinales, debido a su papel en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer. Los recientes esfuerzos en el control de la incidencia del carcinoma oral se centran en desarrollar estrategias efectivas sobre la quimioprevención. Como ya hemos comentado, la quimioprevención es el uso de sustancias naturales o sintéticas para detener, retrasar o revertir la progresión maligna en tejidos en situación de riesgo para el desarrollo de cáncer invasivo (Tanaka, 1995). Los polifenoles son los agentes más estudiados para la quimioprevención del cáncer oral. Las frutas y brebajes como el té y el vino tinto constituyen una importante fuente de polifenoles. La cavidad oral y el tracto digestivo pueden representar una posible diana para el efecto quimiopreventivo de estos agentes, debido su contacto directo en la administración oral. Por esta razón y por la facilidad de acceso exploratorio, el modelo de carcinogénesis oral descrito por Salley, ha sido ampliamente utilizado para investigar el efecto quimiopreventivo de los polifenoles presentes en la dieta y plantas medicinales.

Ning Li y sus colaboradores sugieren en su estudio que el té y la curcumina podrían inhibir la carcinogénesis oral al ser administrados tras el periodo de post-iniciación. En este estudio, el proceso de carcinogénesis era iniciado mediante la aplicación de DMBA durante 6 semanas. Tras la iniciación, los animales recibían un tratamiento durante 18 semanas con curcumina de forma tópica, té verde en agua de bebida y una combinación de ambos tratamientos. Los resultados de este estudio sugieren que el té, la curcumina y, en especial, la combinación de ambos, inhiben la carcinogénesis mediante la supresión de la proliferación celular, la inducción a la apoptosis y la inhibición de la carcinogénesis (Li, 2002).

Chandra Mohan et al. (2005), demostraron la eficacia de los polifenoles del té verde y té negro en la inhibición de la carcinogénesis inducida por DMBA en la mucosa oral de hámster. Los animales fueron divididos en 6 grupos, de tal manera que el grupo 1 servía de control, a los grupos 2 y 3 se le administraron 0,005% de E y B-Polifenon, respectivamente. A los animales de los grupos 4-6

se le aplicó DMBA al 0.5% en la mucosa yugal tres veces por semana durante 14 semanas. Mientras que el grupo 4, no recibió ningún tratamiento, a los hámster de los grupos 5 y 6 se les administró E y B-Polifenon, respectivamente. La reducción de carcinomas en la mucosa yugal por los polifenoles del té, se asoció a una disminución de las enzimas de la fase I, a la modulación de la peroxidación lipídica y a la estimulación de la actividad de las enzimas detoxificadoras de la fase II.

Otro estudio investigó el efecto quimiopreventivo de la genisteína administrada en el periodo de post-iniciación, tras seis semanas de la aplicación del DMBA, sin observar efectos inhibitorios significativos en la transformación maligna de lesiones precancerosas orales (Yang, 2006).

Un estudio realizado por Manoharan et al. (2009) demostró el potencial quimiopreventivo de la curcumina y piperina en la carcinogénesis oral inducida por DMBA en hamsters. Se sugirió que la capacidad antioxidante sobre la peroxidación lipídica era la responsable de su posible efecto protector. Un posterior estudio realizado por este mismo autor, investigó la actividad quimiopreventiva del ácido carnósico administrado de forma oral (10 mg/ kg de peso corporal/día) advirtiendo que éste inhibía totalmente la incidencia tumoral de carcinomas orales inducidos mediante la aplicación de DMBA durante 14 semanas. Este efecto quimiopreventivo parece estar mediado por la modulación de la actividad de las enzimas de la fase I, encargadas de la transformación de los pro-carcinógenos a carcinógenos últimos, y de las enzimas de la fase II, encargadas de excretar el metabolito último del DMBA, dihidrotiol epóxido.

Silvan et al. (2011), demostraron en su estudio que la administración oral de apigenina (2,5 mg/kg de peso corporal/día) evitaba por completo la formación de tumores en la carcinogénesis oral inducida por DMBA. Atribuía este fenómeno a la inhibición de la activación metabólica del DMBA por la modulación de las enzimas de la fase I y II. Esta cascada de enzimas está alterada en la carcinogénesis inducida por DMBA (Priyadarsini, 2009). La administración oral de apigenina devuelve la actividad de estas enzimas a los valores previos a la administración del DMBA, con lo cual inhibe la activación metabólica del DMBA y mejora la excreción de sus metabolitos activos.

También se han realizado estudios quimiopreventivos utilizando el carcinógeno 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) como inductor de tumores orales. Así, Tanaka (1994) utilizó este compuesto para examinar el efecto del β -caroteno, la hesperidina y la curcumina, en las fases de iniciación y postinitiation de la carcinogénesis oral inducida por 4-NQO en ratas. Sus resultados indicaron que la administración de estos compuestos mediante la dieta, reducía la incidencia de neoplasias y preneoplasias en la lengua. El orden de potencias inhibitorias era la curcumina > β -caroteno > hesperidina. Otro estudio más reciente realizado por Srinivasan (2008), evidenció una reducción significativa del número de tumores y del volumen tumoral, en los carcinomas orales de células escamosas desarrollados en ratas inducidos por 4-NQO al ser tratadas con los polifenoles del té verde (GTP). Este autor propuso que GTP juega un papel como agente detoxificante ya que inhibe las enzimas de la Fase I y aumenta la expresión de las enzimas de la Fase II que desintoxican el 4-NQO.

También se han realizado numerosos estudios in-vitro para evaluar la actividad quimiopreventiva de distintos compuestos fenólicos sobre líneas celulares del carcinoma oral. Un estudio realizado por Masuda y colaboradores (2001), demostró que el tratamiento con epigallocatequina-3-galato (EGCG) aumentó la proporción de células en la fase G1 del ciclo celular y la inducción a la apoptosis en un estudio *in vitro* realizado sobre dos líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas. Además, en las células tratadas con EGCG, se observó una reducción de la ciclina D1 y de la forma hiperfosforilada de pRB. Liu et al. (2011) mostraron que el extracto de té verde y epigallocatequina 3-galato inhibía el crecimiento de 3 líneas celulares del carcinoma oral de células escamosas (CAL-27, SCC-25, y KB), a través de la detención de la fase S y G2/M. También se ha demostrado que el EGCG interfiere en la actividad de la uroquinasa-activador del plasminógeno (u-PA), una de las enzimas más frecuentemente expresadas en los cánceres humanos, y reduce la expresión de las metaloproteinasas de matriz extracelular tipo II, mostrando una inhibición casi completa de la invasión de la línea celular de carcinoma oral de células escamosas SCC-9 (Chen, 2011).

OBJETIVOS

En nuestra investigación hemos pretendido alcanzar los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Valorar la eficacia quimiopreventiva de los compuestos fenólicos: apigenina potásica, catequinas del cacao, eriocitrina y ácido rosmarínico; sobre el proceso de la carcinogénesis oral inducida por DMBA en hámster.

Objetivos específicos:

Reproducir el modelo experimental de la carcinogénesis oral inducida en hámster, mediante la aplicación tópica de DMBA sobre la mucosa oral.

Analizar las características clínicas e histopatológicas de las lesiones desarrolladas.

Analizar el grado de expresión de marcadores tumorales de proliferación celular y apoptosis en las lesiones desarrolladas.

Estudiar el efecto de los compuestos fenólicos: apigenina potásica, catequinas del cacao, eriocitrina y ácido rosmarínico, administrados por vía oral, sobre el proceso de carcinogénesis oral inducida por DMBA.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Material

1. Animales

Hemos empleado 64 hámster sirios (*Mesocricetus auratus*) (41 machos y 23 hembras), que pesaban aproximadamente 100g (al inicio del experimento) y de una media de edad de 5 meses. Los animales procedían del Servicio de Animales de Experimentación del SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación), licencia nº REGAES 300305440012 de la Universidad de Murcia, donde fueron criados y mantenidos en habitaciones con control de temperatura ambiente (23-24°C) y con ciclos alternos de 12 horas de luz-oscuridad. Durante el estudio los animales fueron alojados en cajas de 22x22 cm (484 cm²), en grupos de 5 ó 6 hámster y recibieron comida y bebida “ad libitum”.

Los animales fueron tratados según lo dispuesto en la legislación española y, en concreto, en el RD 1201/2005 de 10 de octubre, sobre la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, en la Ley 32/2007 de 7 de noviembre para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, así como lo establecido en la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos (Diario Oficial de la Unión Europea). Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia (Anexo 1).



Fig. 16. Hámsters en cajas de acrílico de 22x22 cm.

2. Agentes

- Hidrocarburo aromático policíclico 7,12-dimetil-1,2-bezantraceno (DMBA), obtenido de Sigma Aldrich Co. (Madrid). El polvo de DMBA se disolvía al 0,5% en acetona de tal manera que por cada 0,1 gramo de carcinógeno añadíamos 20ml de acetona. La mezcla era distribuida en eppendorffs de 1,5 ml y conservada a -4°C.
- Apigenina potásica, obtenida de Nutrafur, S.A. (Alcantarilla, Murcia). Extracto concentrado de apigenina (90% de pureza) que se disolvía en agua destilada (1,1mg/15ml) y se agitaba para su disolución.
- Catequinas del cacao, obtenida de Nutrafur, S.A. (Alcantarilla, Murcia). Extracto concentrado de catequinas del cacao (40% de pureza) que se disolvía en agua destilada (2,5 mg/15 ml) y se agitaba para su disolución.
- Eriocitrina, obtenida de Nutrafur, S. A. (Alcantarilla, Murcia). Extracto concentrado de eriocitrina (20% de pureza) que se disolvía en suero fisiológico (6 mg/15ml) y se agitaba para su disolución.
- Ácido Rosmarínico, obtenido de Nutrafur, S. A. (Alcantarilla, Murcia). Extracto concentrado de ácido rosmarínico (15% de pureza), que se disolvía en suero fisiológico (1,3 mg/15ml) y se agitaba para su disolución.



Fig. 17. Frascos de los productos antioxidantes.

II. Métodos

1. Procedimiento experimental

Pasado un tiempo para su aclimatación, los animales fueron divididos en cinco grupos: Grupo I (control) tratado con DMBA al 0,5% en acetona (n=12), Grupo II tratado con DMBA + extracto concentrado de apigenina potásica (n=10), Grupo III tratado con DMBA + extracto concentrado de catequinas del cacao (n=10), Grupo IV tratado con DMBA + extracto concentrado de eriocitrina (n=16), Grupo V tratado con DMBA + extracto concentrado de ácido rosmarínico (n=16).

Dos semanas antes del inicio de la aplicación del DMBA, comenzamos a administrar los tratamientos con el objetivo de que los animales tuvieran una concentración plasmática y tisular adecuada de cada uno de los compuestos. Todos los compuestos fenólicos se administraban en el agua de bebida, que los animales consumían “ad libitum”. Calculamos el volumen de agua diario consumido por animal en 15 ml. La disolución era cambiada cada dos días para evitar su oxidación. Estimamos la dosis requerida de polifenol “puro” por animal en 10 mg/kg/día de apigenina potásica y catequinas del cacao, en 10-12 mg/kg/día de eriocitrina y en 0,2 mg/hámster/día de ácido rosmarínico.

Pasado el pretratamiento inicial, se procedió a la aplicación del agente carcinógeno DMBA para lo cual los animales eran sedados tres veces por semana mediante una mezcla de ketamina [Imalgene 1000 (100 mg/ml)] y xilacina [(Xilagesic 2% (20mg/ml)], a una dosis de 200/10 ml/kg con una aguja de 25g x 5/8”, administrada por vía intramuscular (patas traseras). Los animales continuaron recibiendo el tratamiento con antioxidantes simultáneamente a la aplicación del agente carcinógeno. El DMBA se aplicaba de forma tópica con micropipeta en la mucosa yugal izquierda de los animales. Para ello, se aislaba la zona con dos hisopos de algodón y se depositaba sobre la mucosa una solución de DMBA al 0,5% (20 µl) disuelto en acetona, durante 12 semanas. Las dosis fueron tomadas de la literatura (Morris, 1961; Gimenez-Conti, 1990), y en base a estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (Gómez, 2012).



Fig 18. Fotografía durante la aplicación del agente carcinógeno.

2. Método anatómo-patológico

2.1. Estudio morfológico

Todos los animales se pesaban semanalmente y se observaba con detenimiento la mucosa yugal y tejidos adyacentes a la pincelación, en busca de cambios tisulares macroscópicos como eritema, ulceraciones o tumefacciones. Siguiendo el procedimiento utilizado por Feng, registramos el tiempo en semanas en el que el 50% de los animales de cada grupo había desarrollado tumores (T_{50}) (Feng, 2006). Transcurridas 12 semanas del tratamiento, se procedió a la eutanasia de los animales mediante una cámara de CO_2 . Se contó el número de tumores visibles y se midió con un calibre digital (Proinsa, España) el diámetro de cada tumor. Los tumores y las mucosas fueron extirpados, así como las vísceras (pulmones, riñones, hígado, etc.). El tamaño de dichos tumores se medía en milímetros en 3 direcciones ortogonales (A, B y C). Para calcular su volumen se consideró a los tumores como si fueran cuerpos esféricos, por lo que se aplicó la siguiente fórmula: $\text{volumen} = 4/3\pi r^3$ (donde r es la media de los radios de los tres diámetros medidos en mm^3). La carga tumoral total de cada animal se obtuvo por la suma de todos los volúmenes tumorales presentes en la mucosa yugal. La media del número de lesiones orales por animal (multiplicidad) se expresó dividiendo el número de tumores entre el número de animales portadores de tumor (Yang, 2006).

2.2. Estudio histopatológico

Las muestras tisulares fueron fijadas en formol neutro taponado al 10%, al menos durante 48 horas, para ser incluidas en parafina, seccionadas a 4µm de espesor y teñidas con Hematoxilina y Eosina, según el método habitual empleado por la Cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia. Se utilizaron los cortes principales que incluían el espesor completo del tejido tumoral (incluyendo márgenes de invasión).

El estudio morfológico de todas las muestras tisulares se realizó con microscopía óptica, bajo un microscopio Laborlux 12 Leitz (Germany) y utilizando los aumentos de 4x, 10x, 20x y 40x por dos observadores con conocimientos de análisis histopatológico, identificando el frente tumoral en cada una de ellas.

Se evaluaron los siguientes parámetros histológicos en base a los criterios establecidos por la OMS: hiperplasia, papiloma, displasia, carcinoma *in situ* y carcinoma invasor. La hiperplasia del epitelio oral fue diagnosticada por el aumento del número de células del estrato espinoso y estrato basal. Las lesiones constituidas por un epitelio escamoso estratificado que presentaba una disposición ramificada con ejes fibrovasculares fueron diagnosticadas como papilomas (Yang, 2006). La displasia epitelial está definida por unas características histopatológicas arquitecturales y citológicas. Datos arquitecturales: estratificación irregular del epitelio, pérdida de polaridad de las células basales, crestas epiteliales anómalas (en gota, bulbosas,...), aumento del número de mitosis, mitosis anormales superficiales, queratinización prematura de células aisladas, perlas de queratina dentro de las crestas. Datos citológicos: variación anormal en el tamaño nuclear, variación anormal en la forma nuclear, variación anormal en el tamaño celular, variación anormal en la forma celular, aumento en la proporción núcleo/citoplasma, aumento del tamaño nuclear, mitosis atípicas, aumento del número/tamaño nnucléolos. El carcinoma se diagnostica por una displasia que afecta al 100% del espesor del epitelio (*in situ*), y que puede invadir el estroma y tejidos subyacentes (carcinoma invasor) (Barnes, 2005).

Se analizó la gradación histológica de los carcinomas desarrollados siguiendo los siguientes sistemas de clasificación:

- **Clasificación de Broders:** Según esta clasificación propuesta por Broders, y modificada posteriormente por la OMS (Barnes, 2005), podemos clasificar los carcinomas orales atendiendo a la semejanza o ausencia de similitud con el epitelio malpighiano del que deriva en tres grados:

- Bien diferenciados: Histológicamente son muy similares al epitelio pavimentoso malpighiano del que derivan. Las células tumorales conservan la capacidad de formar queratina, formando perlas o globos córneos dentro de unos límites bien definidos. Las mitosis son moderadas y hay escasas atipias celulares. Frecuentemente aparece un infiltrado peritumoral.
- Moderadamente diferenciado: El número de mitosis aumenta y la queratinización celular va disminuyendo, dejando de formar globos córneos y queratinizándose células de forma aislada.
- Mal diferenciados o indiferenciados: Desaparece la actividad queratoblástica. Los clones celulares pierden su semejanza con las células de las que derivan y se rompe la adhesión intercelular facilitando las metástasis (García, 2009).

- **Sistema de graduación del Frente de Invasión Tumoral de Bryne (FIT):**

Este sistema de graduación del FIT evalúa cinco parámetros morfológicos, otorgándole a cada uno un score de 1 a 4, determinando el grado de malignidad para cada tumor (Fig. 17). Los parámetros contemplan el grado de queratinización, polimorfismo nuclear, patrón de invasión, estadio de invasión y respuesta inflamatoria. De los parámetros analizados en este sistema de graduación, los valores patrón de invasión y respuesta inmune local han demostrado entregar información pronóstica para diversos tipos de cánceres (Bànkfalvi, 2000; Tumuluri, 2004; Kane, 2006). El patrón de invasión muestra la forma en que la neoplasia infiltra y se desarrolla hacia los tejidos adyacentes, y la respuesta inflamatoria refleja la reacción inmunológica contra la neoplasia. Este sistema de graduación de malignidad solamente evalúa las partes más invasivas del tumor. El score para cada parámetro es sumado y permite tener una puntuación o score de malignidad total (Kristensen, 1999).

Parámetros morfológicos	Puntos			
	1	2	3	4
Grado de queratinización	Alta (>50% de las células)	Moderada (20-50 % de cels.)	Mínima (5-20% de cels.)	Sin queratin (0-5% de cels.)
Polimorfismo nuclear	Escaso (>75% céls maduras)	Moderado (50-75% cl. mad.)	Abundante (25-50% cl. mad.)	Extremo (0-25% cl. mad.)
Patrón de invasión	Expansivo, bordes infiltrativos bien delimitados	Infiltrante, cordones sólidos, bandas y/o nidos	Pequeños grupos de cordones de células infiltrando (n>15)	Marcada diseminación celular en pequeños grupos (n>15)
Estadio de invasión (profundidad)	Carcinoma <i>in situ</i>	Invasión exclusivamente de la lámina propia	Invasión musculatura subyacente	Invasión profunda afectando estroma o hueso subyacente.
Infiltración linfoplasmocitaria	Marcada	Moderada	Leve	Nula

La puntuación del sistema se obtiene sumando los puntos considerados para cada uno de los parámetros morfológicos.

Fig.19. Sistema de graduación histológica del Frente de Invasión Tumoral de Bryne.

2.2. Estudio Inmunohistoquímico

Se realizó un estudio inmunohistoquímico de los carcinomas desarrollados, según la metodología del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Reina Sofía de Murcia, utilizando la técnica “*Estreptavidina-biotina-peroxidasa*” (Hsu, 1981), aplicándola a los dos anticuerpos de nuestro estudio:

- PCNA (clón PC10) (Dako Corporation, Glostrup, Denmark).
- P-53 (clón DO-7) (Dako Corporation, Glostrup, Denmark).

Los pasos de esta técnica son los siguientes:

- Desparafinar las secciones en estufa de 37 °C durante 24 horas y deshidratar con lavados con xilol y alcohol a concentraciones decrecientes (100%, 95% y 70% durante 5 minutos cada uno).
- Lavar con agua destilada.
- Inhibir la peroxidasa endógena mediante incubación en agua oxigenada al 3% en metanol durante 15 min.
- Recuperación antigénica. Incubación con proteasa al 1% durante 5min.
- Incubación con suero de caballo al 20% en suero fisiológico 20min.
- Incubación con el anticuerpo primario diluido en suero de caballo al 10%

a la dilución de trabajo, durante 30 min.

- Lavar con buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,2 tres veces.
- Incubación con el anticuerpo secundario diluido 1:200 en suero de caballo al 10%, durante 30 min.
- Lavar con PBS pH 7,2 tres veces.
- Incubación en el complejo Estreptavidina-biotina-peroxidasa (SBC) diluido 1:200 en suero de caballo al 10% durante 45 min.
- Lavar con PBS pH 7,2 tres veces.
- Revelado con 0,02% 3,3'-diamino-benzidina (DAB) tetracloruro con peróxido de hidrógeno 0,002 en buffer Tris pH 7,4.
- Lavar con agua destilada.
- Contrastar con Hematoxilina de Harris.
- Hidratar en orden inverso a la deshidratación.
- Montar con Entellan® y cubrir con portaobjetos.

La intensidad de expresión de cada anticuerpo ha sido determinada mediante la observación de las muestras al microscopio óptico por dos observadores. Se homogenizaron criterios antes de la observación y se procedió a graduar según la intensidad de la expresión en un rango de positividad de 0 a 3 cruces (negativo, intensidad leve, moderada y severa respectivamente).

3. Método estadístico.

Hemos realizado un análisis estadístico descriptivo de las variables observadas para medir la distribución de las frecuencias entre los grupos. En los casos de variables cuantitativas, se calcularon 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 y con la corrección de Bonferroni. Se consideraron significativos valores iguales o menores a 0,005 ($p \leq 0,005$). Para la comparación de grupos con datos cualitativos se hizo tabla de contingencia complementado con análisis de residuos.

RESULTADOS

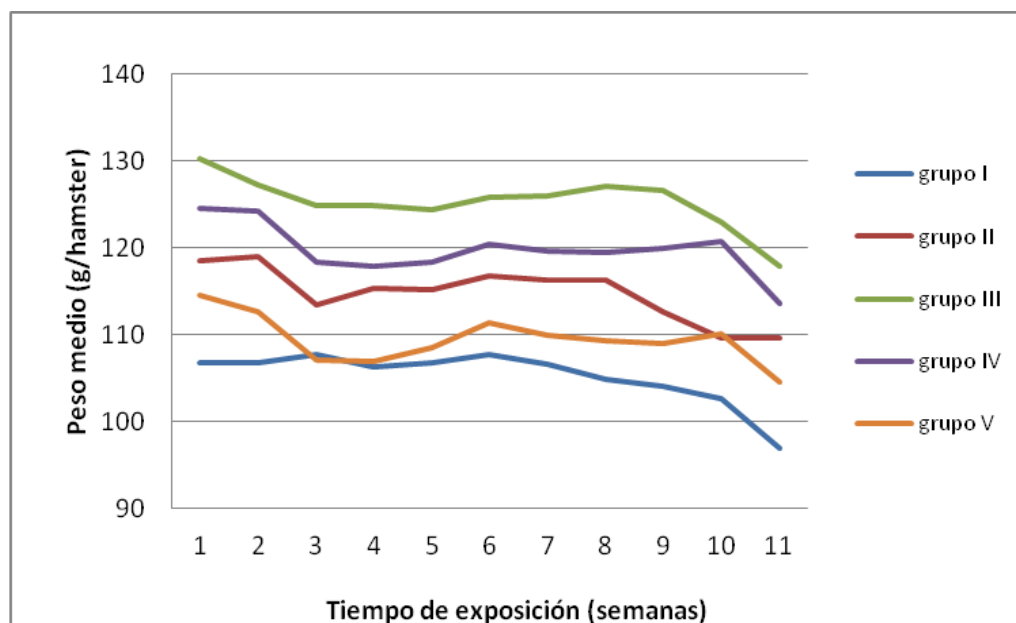
OBSERVACIONES GENERALES DE TODOS LOS GRUPOS

De los 64 animales utilizados en este estudio, 3 murieron de forma prematura. Estas muertes se produjeron en los primeros períodos del experimento y fueron debidas a problemas respiratorios asociados con el fármaco utilizado para anestesiarse a los hámsters. En el momento de la muerte, las mucosas no presentaban ningún tumor evidente. Las mucosas fueron extirpadas y procesadas para su evaluación histológica, y aunque en algún caso se observaron signos de displasia. Estos animales fueron excluidos del estudio. Dos de ellos pertenecían al grupo I, y el otro animal al grupo II.

Grupo	Tratamiento	Nº inicial de hámster	Nº final de hámster	Mortalidad (%)
I	DMBA	12	10	16,7
II	Apigenina K	10	9	10
III	Catequinas del cacao	10	10	0
IV	Eriocitrina	16	16	0
V	Ac. Rosmarínico	16	16	0

Tabla 1. Número total de animales y mortalidad por grupos.

Respecto a la evolución del peso corporal, constatamos una disminución progresiva en todos los grupos. Esto no suele ser lo habitual en animales jóvenes, que suelen aumentar su peso hasta alcanzar los 130g en el caso de los machos y los 150g en el de las hembras, y pensamos que pudo ser debido a que en las primeras semanas del experimento se produjo una menor ingesta de alimentos, debido a la irritación provocada por el agente carcinógeno, y una vez instauradas las lesiones, a la dificultad para comer por el volumen alcanzado por éstas o por la caquexia provocada por el cáncer. En la siguiente gráfica se puede observar la evolución del peso de los animales durante el periodo experimental (Tabla 2).



Gráfica 1. Efectos de la aplicación del DMBA sobre el peso de los animales.

A las 12 semanas de la aplicación del agente carcinógeno el peso final de los animales del grupo I (DMBA) fue menor que el del resto de los grupos, siendo estadísticamente significativo con los grupos III (catequinas del cacao) y IV (eriocitrina) ($p=0,000$ y $0,001$ respectivamente). La diferencia entre el peso inicial y final no fue estadísticamente significativa para ninguno de los grupos. En la tabla 2 se puede observar la media del peso inicial, final y la diferencia de peso de todos los grupos.

Todos los animales presentaron zonas de ulceración en las localizaciones donde inoculábamos intramuscularmente la anestesia (patas traseras), durante las últimas semanas del experimento. Las heridas se trataban con terramicina para evitar infecciones y con extracto de centella asiática para favorecer su reparación.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Pmínimo	Pmáximo
P inicio 1	10	106.8	8.297	2.623	92	119
2	9	118.56	11.304	3.768	107	142
3	10	130.30	14.268	4.512	106	148
4	16	125.13	10.24	2.56	110	138
5	16	114.56	12.87	3.22	95	137
P final 1	10	96.9	16.24	5.135	71	115
2	9	109.67	13.537	4.512	83	131
3	10	117.80	11.507	3.639	100	135
4	16	114.56	10.249	2.562	92	133
5	16	104.63	9.865	2.466	84	117
Dif peso 1	10	9.9	13.178	4.167	-3.00	37
2	9	8.8889	8.08462	2.69487	-5.00	25
3	10	12.50	12.46551	3.94194	-8.00	34
4	16	10.5625	9.79093	2.44773	-5.00	34
5	16	9.9375	8.7418	2.185	-6.00	26

Tabla 2. Análisis descriptivo de las medias de peso inicial, final y diferencia de peso de todos los grupos.

Características macroscópicas generales

A la tercera semana, un gran número de animales de cada grupo presentaron lesiones de aspecto granular en la superficie de la mucosa yugal tratada y, en ocasiones, proliferaciones exofíticas de color blanquecino de carácter inflamatorio. El estudio al microscopio óptico de estas áreas no reveló cambios displásicos en el epitelio, aunque sí un intenso infiltrado inflamatorio (Fig. 20 y 21).

Fue a partir de la octava semana cuando surgieron lesiones macroscópicas más relevantes con diversos grados de eritema y pequeñas tumoraciones en algunos de los animales (Fig. 22 y 23).

El T_{50} (es decir, tiempo en el que la mitad o más de los animales de cada grupo presentaban lesiones tumorales macroscópicas) fue igual en todos los grupos, coincidiendo con la semana novena de la aplicación del DMBA. A partir de este momento, el tamaño de las lesiones fue en aumento hasta el final de los experimentos (semana duodécima) (Fig. 24-29). La mucosa tratada de los hámsters no sólo presentaba lesiones tumorales únicas, sino que era frecuente la presencia de múltiples tumoraciones. En los animales con multiplicidad de lesiones se obtuvo el volumen tumoral medio mediante la suma de los volúmenes de cada uno de los tumores.



Fig. 20 y 21. Lesiones aparecidas a la tercera semana tras la aplicación del DMBA (Grupo III).



Fig 22 y 23. Lesiones a las 8 semanas de la aplicación del DMBA (Grupo I y II).



Fig. 24. Tumoración exofítica tras 12 semanas de tratamiento (Grupo IV).



Fig. 25. Neoplasia muy vascularizada tras 12 semanas de tratamiento (Grupo V).



Fig. 26. Tumoración nodular (Grupo II).



Fig. 27. Ulceración mucosa con pequeñas tumoraciones (Grupo III).



Fig. 28. Tumoración verrucosa de gran tamaño (Grupo I).

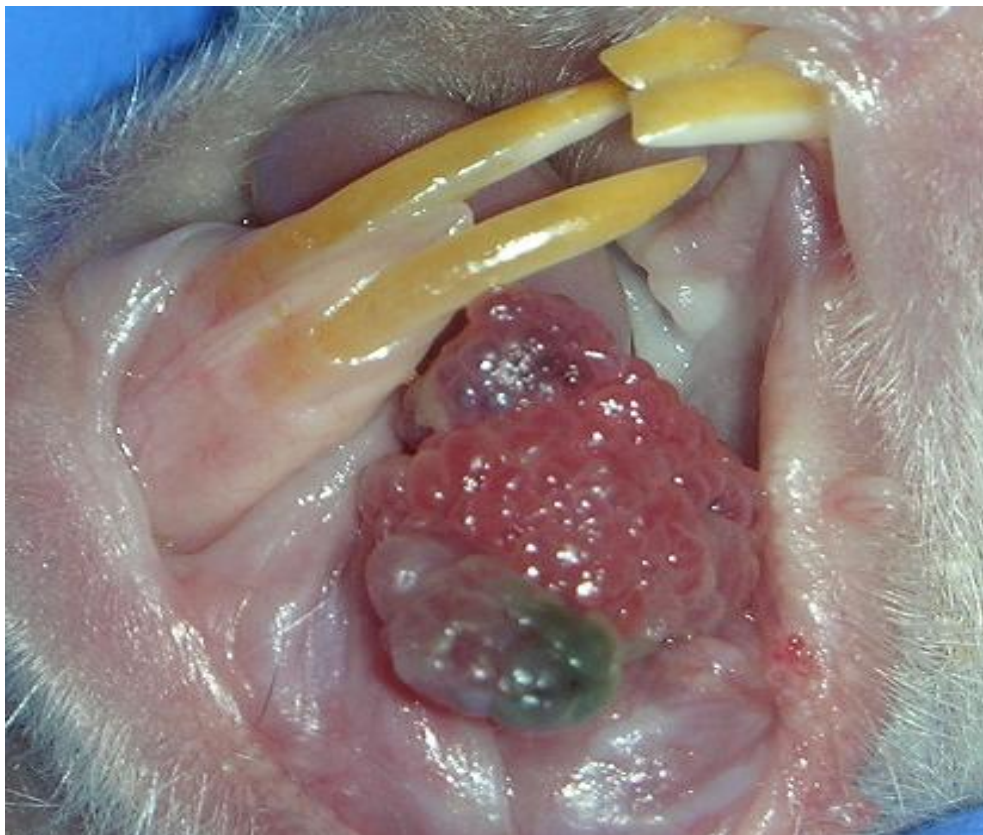


Fig. 29. Tumoración exofítica de superficie arracimada (Grupo III).

Características microscópicas generales

Histológicamente, observamos todo el espectro de la carcinogénesis. Dependiendo de la zona del epitelio oral analizada, observamos áreas de hiperplasia (fig. 30), displasia (Fig. 31), papiloma (Fig. 32) y carcinomas orales de células escamosas (COCE). Del total de los carcinomas orales observados, en función del grado de invasión los clasificamos en COCE *in situ* (Fig. 33), COCE con invasión exclusivamente de la lámina propia (Fig. 34) y COCE con invasión de la musculatura subyacente (Fig. 35). La distribución de los carcinomas generados en los distintos grupos, en función de su grado de invasión y grado de diferenciación, así sean bien diferenciados, moderadamente diferenciados e indiferenciados (Fig. 36), se han resumido en la Tabla 25. Con el propósito de realizar una estimación más precisa acerca del comportamiento biológico de las neoplasias observadas, también aplicamos el sistema de graduación del Frente de Invasión Tumoral de Bryne. Los resultados de la suma de las puntuaciones otorgadas a los parámetros propuestos por Bryne, se muestran en la Tabla 26.

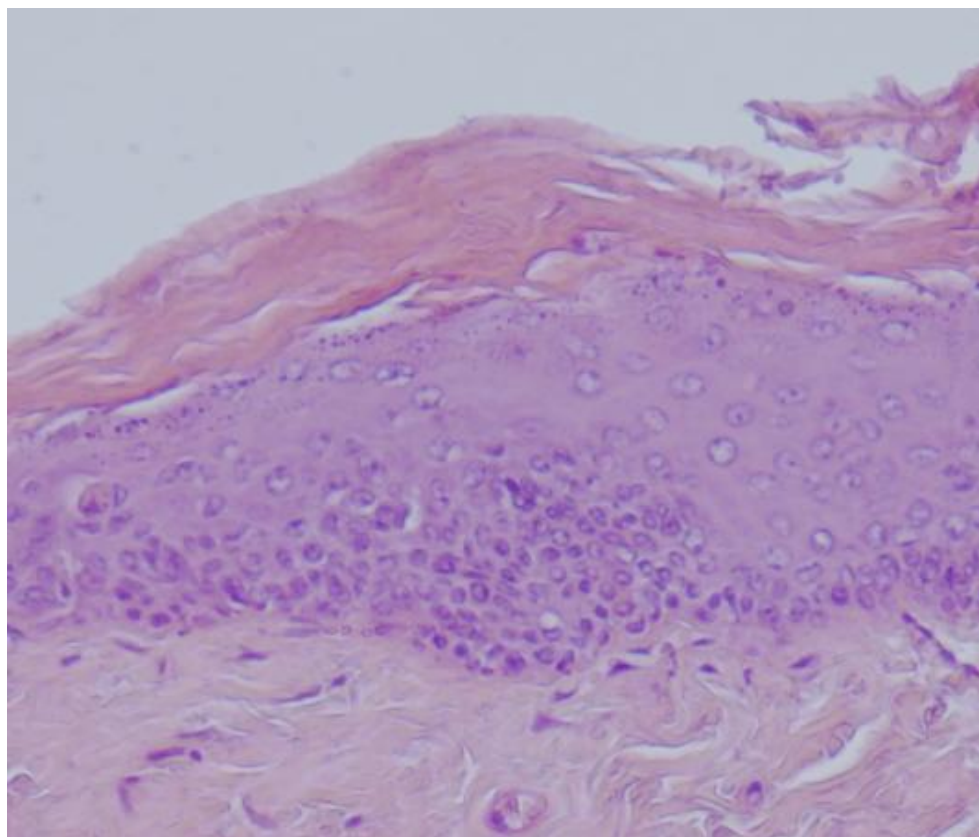


Fig. 30. Detalle de hiperplasia de las células basales. H.E., 312,5x

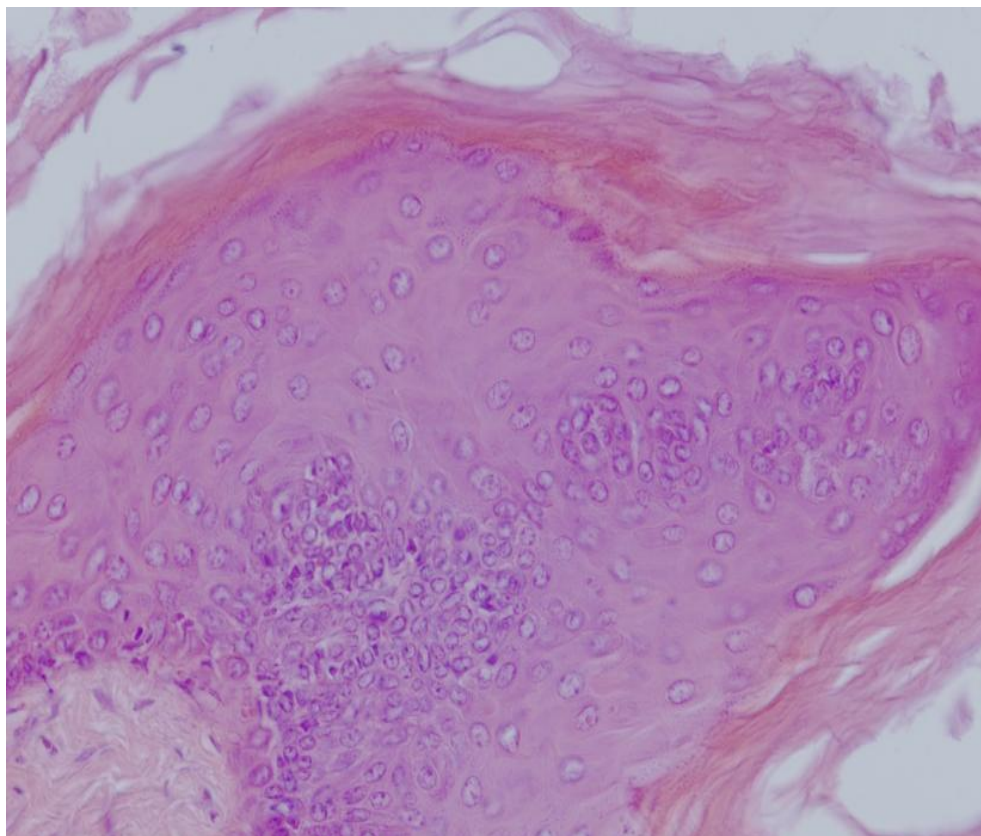


Fig. 31. Detalle de displasia. H.E., 312,5x

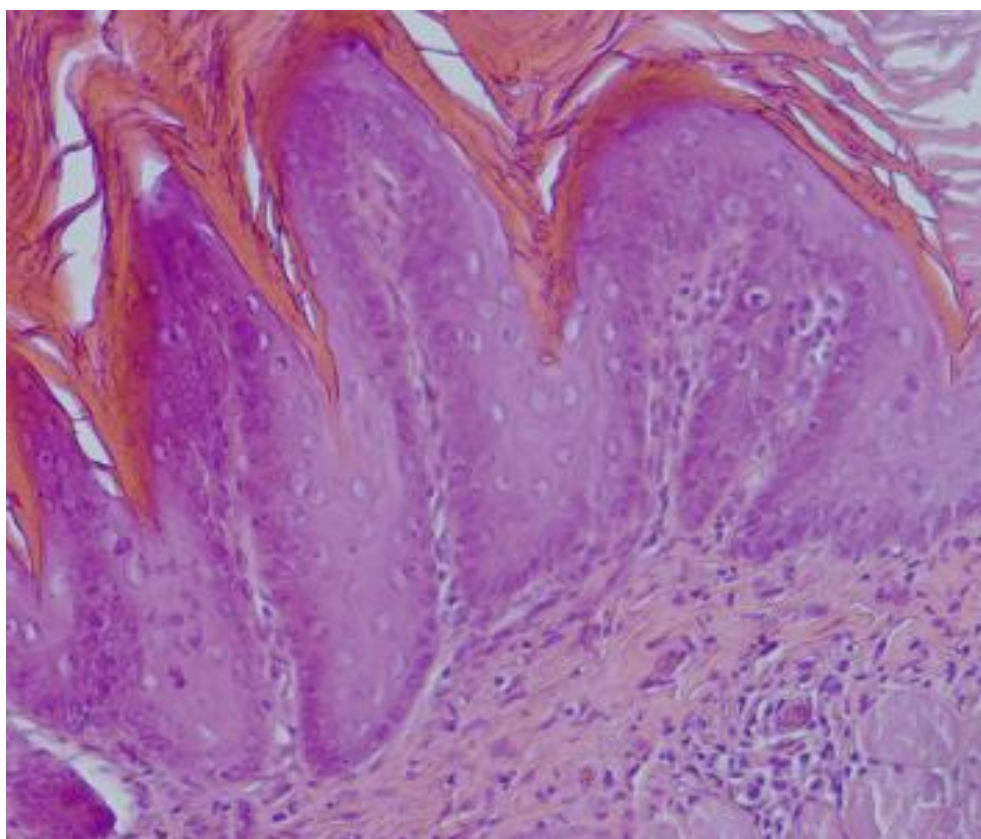


Fig. 32. Detalle de papiloma. H.E., 200x.

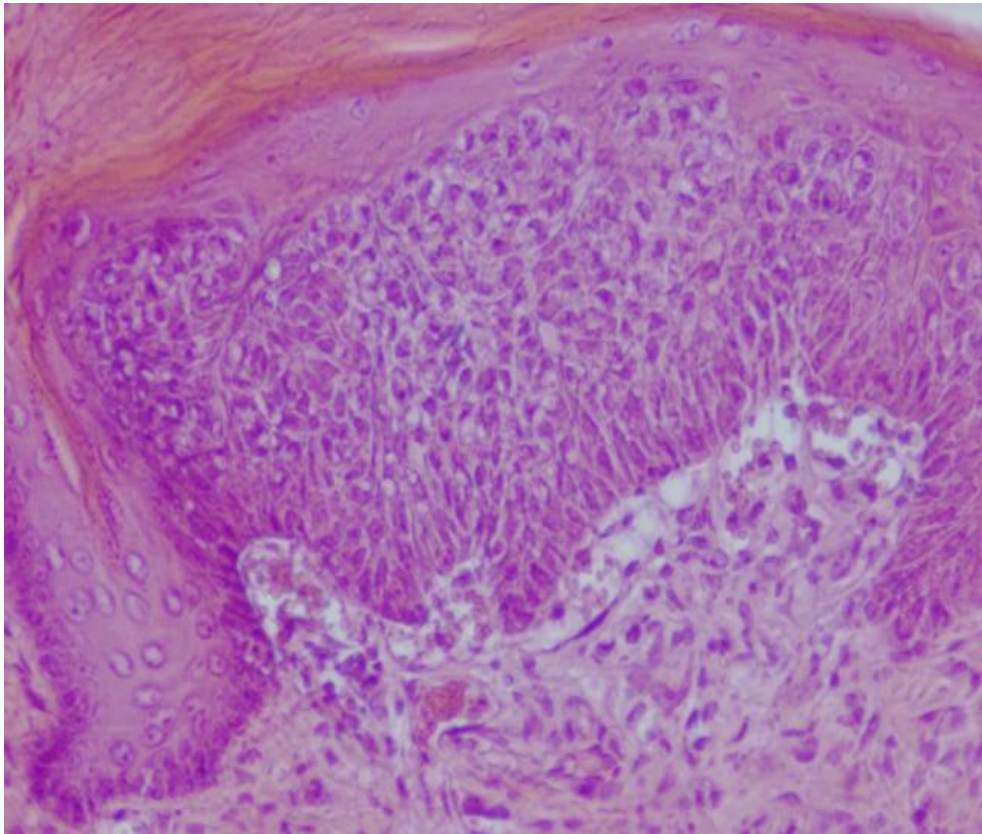


Fig 33. Detalle de COCE *in situ*. H.E., 125x.

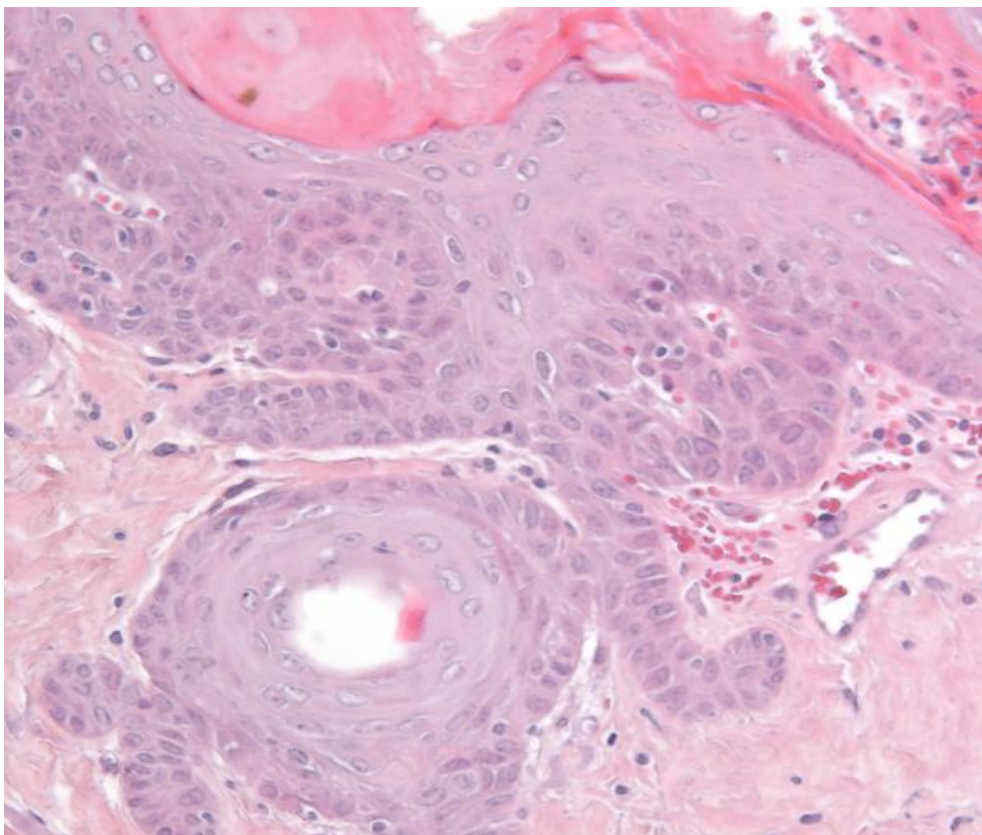


Fig. 34. Detalle de cordones de células invadiendo la lámina propia. H.E., 500x.

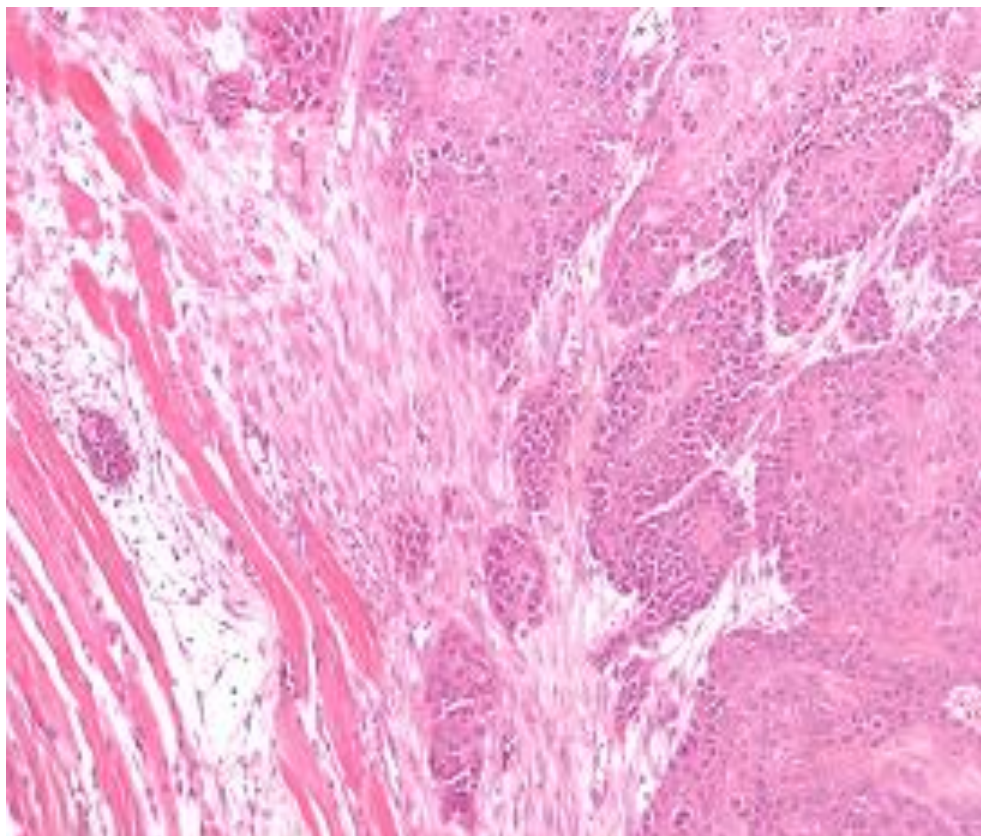


Fig. 35. Detalle de COCE con invasión en lámina propia y musculatura subyacente. H.E., 312,5x.

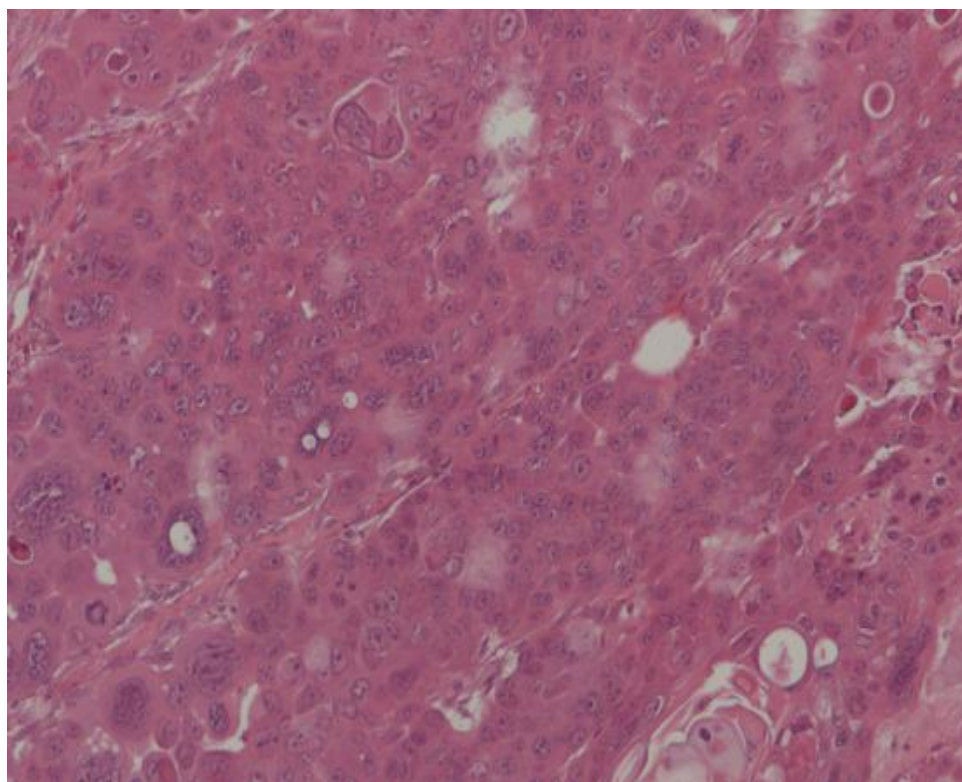


Fig. 36. Detalle de tumor indiferenciado del grupo control. H.E., 312,5x.

GRUPO I: CONTROL

Características macroscópicas

Finalizado el periodo de exposición al agente carcinógeno, la totalidad de animales del grupo control presentó tumoraciones macroscópicamente visibles en la mucosa yugal. La media del número de tumores visibles presentado por cada animal (multiplicidad) fue de $1,7 \pm 0,26$ y el volumen tumoral medio fue de $85,359 \pm 23,50 \text{ mm}^3$. (Tabla 3).

grupo I	presencia de tumores	multiplicidad de lesiones	volumen mm^3
animal 1	si	1	284,999
animal 2	si	1	49,832
animal 3	si	1	54,325
animal 4	si	3	76,650
animal 5	si	2	81,344
animal 6	si	2	50,667
animal 7	si	2	82,280
animal 8	si	1	18,804
animal 9	si	1	47,681
animal 10	si	3	107,007
media	100%	$1,7 \pm 0,26$	$85,359 \pm 23,50$

Tabla 3. Incidencia, multiplicidad y volumen tumoral de los carcinomas observados en el grupo I.

Características microscópicas

El análisis histopatológico de las muestras reveló que el grupo control (DMBA) presentó una incidencia de lesiones histológicas del 100%, y en todas ellas se identificaron áreas de displasia epitelial. Además, fue el grupo que presentó mayor incidencia de animales con carcinomas orales de células escamosas (9/10), siendo la media de carcinomas por animal de $1,4 \pm 2,667$ (Tabla 4), esta diferencia no presentó significancia estadística.

grupo I	Lesiones histológicas premalignas				Malignas	
	hiperplasia	papiloma	displasia	incidencia	carcinoma	incidencia
animal 1	1	0	1	1	1	1
animal 2	1	1	1	1	1	1
animal 3	1	1	1	1	1	1
animal 4	3	1	3	1	3	1
animal 5	2	2	2	1	2	1
animal 6	2	0	2	1	1	1
animal 7	2	2	2	1	2	1
animal 8	1	1	1	1	0	0
animal 9	1	1	1	1	1	1
animal 10	3	1	3	1	2	1
media	$1,7 \pm 0,26$	$1 \pm 0,21$	$1,7 \pm 0,26$	1	$1,4 \pm 0,26$	0,9

Tabla 4. Número de lesiones histológicas observadas por animal e incidencia de animales con cada una de ellas.

El número de carcinomas de células escamosas observado en este grupo fue de 14. De éstos, el 50% fueron carcinomas *in situ*, un 28,57% de los carcinomas invadían la lámina propia y el 21,43% restante invadía el músculo subyacente. De acuerdo al grado de diferenciación histológico de las lesiones observadas, el porcentaje de carcinomas bien diferenciados fue del 50%, el 37,71% fueron carcinomas moderadamente diferenciados y el 14,29% fueron carcinomas indiferenciados (Tabla 5).

grupo I	n° de carcinomas	carcinomas <i>in situ</i>	carcinomas en l. propia	carcinomas en musc.	carcinomas bien dif.	carcinomas mod dif.	carcinomas mal dif.
1	1	0	0	1	0	0	1
2	1	1	0	0	0	1	0
3	1	1	0	0	1	0	0
4	3	1	2	0	3	0	0
5	2	2	0	0	0	2	0
6	1	0	1	0	1	0	0
7	2	1	0	1	1	0	1
8	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	1	0	0	1	0
10	2	1	0	1	1	1	0
total	14	7	4	3	7	5	2

Tabla 5. Grado de invasión y diferenciación del número de tumores observados por animal.

Al evaluar los carcinomas presentados por los hámsters del grupo control mediante el sistema de graduación del FIT, obtuvimos una puntuación de $8 \pm 0,646$ (Tabla 6).

Frente de invasión tumoral	n	%
Escore 5	3	21,43
Escore 6	1	7,14
Escore 7	2	14,29
Escore 8	3	21,43
Escore 9	2	14,29
Escore 10	0	0,00
Escore 11	1	7,14
Escore 12	2	14,29
Escore 13	0	0,00
Escore total= $8 \pm 0,646$		

Tabla 6. Número y porcentaje de carcinomas según el escore obtenido mediante el sistema de graduación del FIT y escore total obtenido mediante la suma del total de puntuaciones (media $\pm$ DE).

GRUPO II: DMBA+ APIGENINA POTÁSICA

Características macroscópicas

Finalizado el experimento, el grupo tratado con apigenina potásica tuvo una incidencia de tumoraciones orales visibles del 88,89%, presentando uno de los animales la mucosa libre de tumor. La media de la multiplicidad de lesiones observadas en este grupo fue de $1,56 \pm 0,338$. El volumen tumoral medio presentado por los animales este grupo fue de $57,984 \pm 30,090$ (Tabla 7).

grupo II	presencia de tumoraciones	multiplicidad de lesiones	volumen mm ³
animal 1	no	0	0,00
animal 2	si	1	27,96
animal 3	si	1	44,57
animal 4	si	1	288,50
animal 5	si	2	6,11
animal 6	si	3	77,43
animal 7	si	3	54,83
animal 8	si	1	19,97
animal 9	si	2	2,48
media	88,89%	$1,56 \pm 0,338$	$57,984 \pm 30,090$

Tabla 7. Incidencia, multiplicidad y volumen tumoral de los carcinomas observados en el grupo II.

Características microscópicas

La incidencia del número de lesiones histológicas de hiperplasia, papiloma y displasia por animal, fue para el grupo II de 77,78%. En los animales que no presentaron ninguna alteración del estrato basal, había una marcada hiperqueratosis. La incidencia del número de animales del grupo II que presentaba carcinomas fue del 55,56%, la más reducida de todos los grupos (Tabla 4). El número de carcinomas de células escamosas observado en este grupo fue de 8, siendo la media de carcinomas por animal de $0,889 \pm 0,351$ (Tabla 8).

grupo II	Lesiones histológicas premalignas				Malignas	
	hiperplasia	papiloma	displasia	incidencia	carcinoma	incidencia
animal 1	0	0	0	0	0	0
animal 2	1	1	1	1	1	1
animal 3	1	1	1	1	1	1
animal 4	1	1	1	1	1	1
animal 5	2	2	0	1	0	0
animal 6	3	3	3	1	3	1
animal 7	3	3	2	1	2	1
animal 8	1	1	1	1	0	0
animal 9	0	0	0	0	0	0
media	1,33 ±0,372	1,33±0,372	1±0,333	0,778	0,89±0,351	0,5556

Tabla 8. Número de lesiones histológicas observadas por animal e incidencia de animales con cada una de ellas.

La mayoría de los carcinomas observados eran carcinomas *in situ* (75%). Sólo dos carcinomas invadían el corion en profundidad, uno de ellos se limitaba a la lámina propia y otro tumor invadía además la musculatura subyacente. Atendiendo al grado de diferenciación de las lesiones observadas, 5 de las 8 neoplasias eran carcinomas bien diferenciados (62,5%), y las tres neoplasias restantes eran carcinomas moderadamente diferenciados. Ningún animal presentó carcinomas indiferenciados (Tabla 9).

grupo II	nº de carcinomas	carcinomas <i>in situ</i>	carcinomas en l. propia	carcinomas en musc.	carcinomas bien dif.	carcinomas mod dif.	carcinomas mal df.
animal 1	0	0	0	0	0	0	0
animal 2	1	0	1	0	1	0	0
animal 3	1	1	0	0	1	0	0
animal 4	1	0	0	1	0	1	0
animal 5	0	0	0	0	0	0	0
animal 6	3	3	0	0	1	2	0
animal 7	2	2	0	0	2	0	0
animal 8	0	0	0	0	0	0	0
animal 9	0	0	0	0	0	0	0
total	8	6	1	1	5	3	0

Tabla 9. Grado de invasión y diferenciación del número de tumores observados por animal.

La puntuación obtenida por el grupo tratado con apigenina según el sistema propuesto por Bryne fue de $6,625 \pm 0,98$ (Tabla 10).

Frente de invasión tumoral	n	%
Escore 5	4	50,00
Escore 6	2	25,00
Escore 7	0	0,00
Escore 8	1	12,50
Escore 9	0	0,00
Escore 10	0	0,00
Escore 11	0	0,00
Escore 12	0	0,00
Escore 13	1	12,50
Escore total= $6,625 \pm 0,98$		

Tabla 10. Número y porcentaje de carcinomas según el escore obtenido mediante el sistema de graduación del FIT y escore total obtenido mediante la suma del total de puntuaciones (media $\pm$ DE).

GRUPO III: DMBA+ CATEQUINAS DEL CACAO

Características macroscópicas

Los animales del grupo III presentaron una incidencia tumoral del 90%. Si comparamos la multiplicidad tumoral, observamos que la media del número de tumores visibles por animal en este grupo fue $2,1 \pm 0,378$, siendo mayor a la del resto de grupos, no existiendo significancia estadística. Al evaluar el volumen tumoral, observamos que el volumen medio de los tumores de este grupo fue de $84,384 \pm 43,013 \text{ mm}^3$ (Tabla 11).

grupo III	presencia de tumoraciones	multiplicidad de lesiones	volumen mm^3
animal 1	si	1	27,227
animal 2	si	3	7,949
animal 3	si	3	438,884
animal 4	no	0	0,000
animal 5	si	4	163,340
animal 6	si	1	8,507
animal 7	si	2	20,715
animal 8	si	2	17,224
animal 9	si	2	124,811
animal 10	si	3	35,185
media	90%	$2,1 \pm 0.378$	$84,384 \pm 43,013$

Tabla 11. Incidencia, multiplicidad y volumen tumoral de los carcinomas observados en el grupo III.

Características microscópicas

El grupo III, presentó igual número de lesiones histológicas por animal que el grupo control, pero sólo el 70,6% de las lesiones displásicas evolucionaron a carcinoma. Siete de los diez animales presentaron carcinomas epidermoides. El número total de neoplasias de este grupo fue de 12, siendo la media del número de carcinomas presentes por animal de $1,2 \pm 0,338$ (Tabla 12).

De estos carcinomas, el 50% eran carcinomas in situ, y el otro 50% exclusivamente la lámina propia. Al valorar en las características histológicas de los carcinomas desarrollados en este grupo, observamos que el 41,67% fueron carcinomas bien diferenciados, el 50% carcinomas moderadamente diferenciados y el 8,33% indiferenciados (Tabla 13).

grupo III	Lesiones histológicas premalignas				Malignas	
	hiperplasia	papiloma	displasia	incidencia	carcinoma	incidencia
animal 1	1	1	1	1	1	1
animal 2	3	1	0	1	0	0
animal 3	3	3	3	1	2	1
animal 4	0	0	0	0	0	0
animal 5	4	4	4	1	4	1
animal 6	1	1	1	1	0	0
animal 7	2	2	2	1	1	1
animal 8	2	2	1	1	1	1
animal 9	2	2	2	1	1	1
animal 10	3	3	3	1	2	1
media	2,1±0,38	1,9±0,394	1,7±0,443	0,9	1,2±0,388	0,7

Tabla 12. Número de lesiones histológicas observadas por animal e incidencia de animales con cada una de ellas.

grupo III	nº de carcinomas	carcinomas in situ	carcinomas en l. propia	carcinomas en musc.	carcinomas bien dif.	carcinomas mod dif.	carcinomas mal df.
animal 1	1	1	0	0	1	0	0
animal 2	0	0	0	0	0	0	0
animal 3	2	1	0	1	0	1	1
animal 4	0	0	0	0	0	0	0
animal 5	4	1	3	0	0	4	0
animal 6	0	0	0	0	0	0	0
animal 7	1	0	1	0	1	0	0
animal 8	1	1	0	0	1	0	0
animal 9	1	0	1	0	0	1	0
animal 10	2	2	0	0	2	0	0
total	12	6	5	1	5	6	1

Tabla 13. Grado de invasión y diferenciación del número de tumores observados por animal.

El comportamiento biológico de los tumores se determinó evaluando los parámetros propuestos por Bryne, y el escore total de este grupo fue de $7 \pm 0,707$ (Tabla 14).

Frente de invasión tumoral	n	%
Escore 5	5	41,67
Escore 6	0	0,00
Escore 7	4	33,33
Escore 8	1	8,33
Escore 9	0	0,00
Escore 10	1	8,33
Escore 11	0	0,00
Escore 12	0	0,00
Escore 13	1	8,33
Escore total= $7 \pm 0,707$		

Tabla 14. Número y porcentaje de carcinomas según el escore obtenido mediante el sistema de graduación del FIT y escore total obtenido mediante la suma del total de puntuaciones (media $\pm$ DE).

GRUPO IV: DMBA+ ERIOCITRINA

Características macroscópicas

De los 16 animales pertenecientes a este grupo, 14 presentaron tumoraciones macroscópicamente visibles en la mucosa yugal, con lo que la incidencia tumoral fue del 87,5%. Este grupo se caracterizó por presentar mayor número de tumoraciones uniloculares y de gran tamaño. La media de la multiplicidad de lesiones por animal fue de $1,38 \pm 0,272$. Y el volumen tumoral medio de los animales de este grupo fue de $123,43 \pm 40,02 \text{ mm}^3$, superior al del resto de grupos del estudio (Tabla 15).

grupo IV	presencia de tumoraciones	multiplicidad de lesiones	volumen mm^3
animal 1	si	1	425,42
animal 2	si	3	38,23
animal 3	si	1	212,03
animal 4	no	0	0,00
animal 5	no	0	0,00
animal 6	si	3	51,89
animal 7	si	1	26,50
animal 8	si	1	73,57
animal 9	si	1	0,47
animal 10	si	1	11,49
animal 11	si	1	45,59
animal 12	si	4	230,77
animal 13	si	1	0,98
animal 14	si	1	50,93
animal 15	si	1	467,78
animal 16	si	2	339,26
media	87,5%	$1,38 \pm 0.272$	$123,43 \pm 40,02$

Tabla 15. Incidencia, multiplicidad y volumen tumoral de los carcinomas observados en el grupo IV.

Características microscópicas

La incidencia total del número de lesiones histológicas observadas en el grupo IV fue del 75%. El porcentaje de animales que finalmente desarrollaron neoplasias fue del 68,75%. El total de neoplasias observadas en este grupo fue de 15 y el promedio de carcinomas observado por animal fue de $0,96 \pm 0,249$ (Tabla 16).

De estos carcinomas, el 46,67% eran carcinomas *in situ*, el 40% de los carcinomas invadía la lámina propia y el 13,33% invadía el músculo subyacente. En función del grado de diferenciación, el 66,67% de las neoplasias eran tumores bien diferenciados, el 13,33% eran moderadamente diferenciados y el 20% eran tumores indiferenciados (Tabla 17).

El score obtenido por este grupo al evaluar los parámetros propuestos por Byrne fue de $7,6 \pm 0,827$ (Tabla 18).

grupo IV	Lesiones histológicas premalignas				Malignas	
	hiperplasia	papiloma	displasia	incidencia	carcinoma	incidencia
animal 1	1	1	1	1	1	1
animal 2	3	2	2	1	2	1
animal 3	1	1	1	1	1	1
animal 4	0	0	0	0	0	0
animal 5	0	0	0	0	0	0
animal 6	3	3	3	1	1	1
animal 7	1	1	1	1	1	1
animal 8	1	1	1	1	1	1
animal 9	0	0	0	0	0	0
animal 10	1	1	0	1	0	0
animal 11	1	1	1	1	1	1
animal 12	4	4	4	1	4	1
animal 13	0	0	0	0	0	0
animal 14	1	1	1	1	1	1
animal 15	1	1	1	1	1	1
animal 16	2	2	2	1	1	1
media	$1,25 \pm 0,296$	$1,18 \pm 0,278$	$1,125 \pm 0,287$	0,75	$0,93 \pm 0,249$	0,6875

Tabla 16. Número de lesiones histológicas observadas por animal e incidencia de animales con cada una de ellas.

grupo IV	nº de carcinomas	carcinomas <i>in situ</i>	carcinomas en l. propia	carcinomas en musc.	carcinomas bien dif.	carcinomas mod dif.	carcinomas mal df.
animal 1	1	0	0	1	0	0	1
animal 2	2	2	0	0	2	0	0
animal 3	1	0	0	1	0	0	1
animal 4	0	0	0	0	0	0	0
animal 5	0	0	0	0	0	0	0
animal 6	1	1	0	0	1	0	0
animal 7	1	1	0	0	1	0	0
animal 8	1	0	1	0	1	0	0
animal 9	0	0	0	0	0	0	0
animal 10	0	0	0	0	0	0	0
animal 11	1	1	0	0	1	0	0
animal 12	4	1	3	0	2	2	0
animal 13	0	0	0	0	0	0	0
animal 14	1	1	0	0	1	0	0
animal 15	1	0	0	1	0	0	1
animal 16	1	0	1	0	1	0	0
total	15	7	5	3	10	2	3

Tabla 17. Grado de invasión y diferenciación del número de tumores observados por animal.

Frente de invasión tumoral	n	%
Escore 5	6	40,00
Escore 6	2	13,33
Escore 7	2	13,33
Escore 8	0	0,00
Escore 9	1	6,67
Escore 10	1	6,67
Escore 11	0	0,00
Escore 12	1	6,67
Escore 13	1	6,67
Escore 14	1	6,67
Escore total= 7,6±0,827		

Tabla 18. Número y porcentaje de carcinomas según el escore obtenido mediante el sistema de graduación del FIT y escore total obtenido mediante la suma del total de puntuaciones (media±DE).

GRUPO V: DMBA+ ÁCIDO ROSMARÍNICO

Características macroscópicas

La incidencia del número total de lesiones visibles fue del 87,5%. La multiplicidad de lesiones fue inferior al resto de grupos ($1,125 \pm 0,155$). El volumen tumoral medio presentado por los animales de este grupo fue de $82,20 \pm 42,51$ (Tabla 19).

grupo V	presencia de tumoraciones	multiplicidad de lesiones	volumen mm ³
animal 1	si	1	66,723115
animal 2	si	1	671,426183
animal 3	si	1	3,051594
animal 4	si	1	0,904176
animal 5	no	0	0,000000
animal 6	si	2	28,297360
animal 7	si	1	59,081223
animal 8	si	2	3,006265
animal 9	si	1	264,569134
animal 10	si	1	27,226984
animal 11	si	2	57,190179
animal 12	si	1	82,393038
animal 13	si	2	34,335122
animal 14	si	1	16,615610
animal 15	si	1	0,340616
animal 16	no	0	0,000000
media	87,5%	$1,125 \pm 0,155$	$82,20 \pm 42,51$

Tabla 19. Incidencia, multiplicidad y volumen tumoral de los carcinomas observados en el grupo V.

Características microscópicas

Doce del total de animales de este grupo presentaron lesiones de hiperplasia, papiloma y displasia. La media de estas lesiones por animal, fue menor que el del resto de grupos. También fue el grupo con la media de carcinomas por animal más baja $0,625 \pm 0,155$ (Tabla 20). Con un porcentaje total de animales con presencia de carcinomas del 56,25%.

De estos carcinomas, el 70% eran carcinomas *in situ*, el 10% carcinomas que invadían la lámina propia y el 20% invadía la musculatura subyacente. Atendiendo a su grado de diferenciación, el 80% eran carcinomas bien diferenciados, el 10% moderadamente diferenciados y el otro 10% indiferenciados (Tabla 21).

grupo V	Lesiones histológicas premalignas				Malignas	
	hiperplasia	papiloma	displasia	incidencia	carcinoma	incidencia
animal 1	1	1	1	1	1	1
animal 2	1	1	1	1	1	1
animal 3	1	1	0	1	0	0
animal 4	0	0	0	0	0	0
animal 5	0	0	0	0	0	0
animal 6	2	2	2	1	1	1
animal 7	1	1	2	1	1	1
animal 8	2	1	0	1	0	0
animal 9	1	1	1	1	1	1
animal 10	1	1	1	1	1	1
animal 11	2	2	2	1	2	1
animal 12	1	1	1	1	1	1
animal 13	2	2	2	1	1	1
animal 14	1	1	1	1	0	0
animal 15	0	0	0	0	0	0
animal 16	0	0	0	0	0	0
media	1±0,182	0,937 ±0.17	0,875±0,201	0,75	0,625±0,155	0,5625

Tabla 20. Número de lesiones histológicas observadas por animal e incidencia de animales con cada una de ellas.

grupo V	nº de carcinomas	carcinomas <i>in situ</i>	carcinomas en l. propia	carcinomas en musc.	carcinomas bien dif.	carcinomas mod dif.	carcinomas mal df.
animal 1	1	1	0	0	1	0	0
animal 2	1	0	0	1	0	0	1
animal 3	0	0	0	0	0	0	0
animal 4	0	0	0	0	0	0	0
animal 5	0	0	0	0	0	0	0
animal 6	1	1	0	0	1	0	0
animal 7	1	1	0	0	1	0	0
animal 8	0	0	0	0	0	0	0
animal 9	1	0	0	1	0	1	0
animal 10	1	1	0	0	1	0	0
animal 11	2	2	0	0	2	0	0
animal 12	1	0	1	0	1	0	0
animal 13	1	1	0	0	1	0	0
animal 14	0	0	0	0	0	0	0
animal 15	0	0	0	0	0	0	0
animal 16	0	0	0	0	0	0	0
total	10	7	1	2	8	1	1

Tabla 21. Grado de invasión y diferenciación de los tumores observados.

El escore obtenido por este grupo mediante el sistema de Bryne fue de $7,1 \pm 0,982$ (Tabla 22).

Frente de invasión tumoral	n	%
Escore 5	5	50,00
Escore 6	2	20,00
Escore 7	0	0,00
Escore 8	0	0,00
Escore 9	1	10,00
Escore 10	0	0,00
Escore 11	0	0,00
Escore 12	1	10,00
Escore 13	1	10,00
Escore total= $7,1 \pm 0,982$		

Tabla 22. Número y porcentaje de carcinomas según el escore obtenido mediante el sistema de graduación del FIT y escore total obtenido mediante la suma del total de puntuaciones (media $\pm$ DE).

COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS

Características macroscópicas

El porcentaje de animales con tumoraciones visibles macroscópicamente fue mayor para el grupo control, con el total de sus animales con presencia de lesiones macroscópicas. Cuando comparamos la media del número de tumores visibles por hámster, observamos que todos los grupos tratados con flavonoides, a excepción del grupo III ($2,1 \pm 0,378$), presentan menor multiplicidad de tumores que el grupo control ($1,7 \pm 0,26$), no siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Si encontramos significación entre el grupo V ($1,19 \pm 0,136$) y grupo III ($p=0,002$). El volumen tumoral medio presentado por los animales del grupo control fue de $85,359 \pm 23,50$, muy superior al presentado por el grupo II ($57,984 \pm 30,090$), y escasamente superior al volumen presentado por el grupo V ($82,20 \pm 42,51$) y grupo III ($84,384 \pm 43,013$). El grupo IV presentó una media de volumen tumoral más elevada ($123,43 \pm 40,02$). Tales diferencias no mostraron significación estadística ($p > 0,005$), debido a la gran dispersión de los datos (Tabla 23).

Características microscópicas

El número de lesiones histológicas de hiperplasia, papiloma y displasia por animal, fue menor para los grupos tratados con compuestos fenólicos. A excepción del grupo III, que presentó mayor número de lesiones histológicas por animal que el grupo control, pero sólo un 70,6% de estas lesiones evolucionaron a carcinoma. Siendo los animales de los grupos tratados con apigenina potásica (Grupo II) y ácido rosmarínico (Grupo V) los que presentaron una menor incidencia de presencia de carcinomas, 55,56% (5/9) y 56,25% (9/16) respectivamente (Tabla 24). A pesar de que los todos los grupos tratados con polifenoles mostraron una menor incidencia tumoral que el grupo control, la diferencia no fue estadísticamente significativa al estudiarlo en el total de los grupos ($p > 0,005$).

La mayoría de los carcinomas generados en todos los grupos eran carcinomas *in situ*. Comparando los grupos, los grupos tratados con apigenina y ácido rosmarínico fueron los que tuvieron mayor proporción de carcinomas *in situ*, 75% y 70% respectivamente. El grupo de las catequinas del cacao (III), fue el que presentó mayor incidencia de carcinomas invadiendo la lámina propia (41,67%). El número de carcinomas invadiendo la musculatura subyacente fue mayor para el grupo control (3/14) (Tabla 25).

La distribución de los carcinomas observados según su grado de diferenciación, tomando como referencia la clasificación de Broders, fue similar para todos los grupos. El grupo tratado con ácido rosmarínico fue el que presentó mayor proporción de carcinomas bien diferenciados (80%), seguido del grupo IV (66,67%), grupo II (62,5%), grupo control (50%) y grupo III (41,67%). El mayor porcentaje de tumores anaplásicos lo obtuvo el grupo IV (20%), seguido del grupo control (14,29%). El grupo tratado con apigenina no presentó ningún carcinoma pobremente diferenciado; y tanto el grupo III (catequinas cacao), como el grupo V (ac. Rosmarínico) sólo presentaron un carcinoma indiferenciado (Tabla 25).

El comportamiento biológico de los carcinomas aparecidos en los distintos grupos se estimó de acuerdo al sistema de graduación del FIT de Bryne. Las lesiones del grupo control son las que obtuvieron mayor puntuación ($8 \pm 0,646$) y, por tanto, mayor grado de malignidad y peor pronóstico al ser evaluadas mediante este sistema. El score más bajo lo obtuvo el grupo tratado con apigenina $6,625 \pm 0,98$ (Tabla 26). Para tratar de eliminar el elevado grado de subjetividad que implican algunas de las variables de este sistema de gradación y, para facilitar el análisis de los resultados, consideramos indicado analizar las puntuaciones obtenidas por este sistema de graduación en función de que los scores fueran <9 o ≥ 9 . De este modo, el 35,71% de los carcinomas del grupo I obtuvo un score ≥ 9 , para el grupo II el porcentaje de carcinomas con una puntuación igual o superior a ese valor fue del 12,5%, el grupo III tuvo un porcentaje del 16,67%, el grupo IV un 33,33%, y por último el grupo V con un 30% de carcinomas con un valor ≥ 9 .

Grupo	Tratamiento	Nº de animales	TUMORES VISIBLES		
			Incidencia tumoral %	Nº de tumores	Volumen tumoral (mm ³)
I	Control DMBA	10	100	1,7±0,26	85,359±23,50
II	Apigenina K	9	88,89	1,56 ±0,338	57,984±30,090
III	Catequinas cacao	10	90	2,1±0,378	84,384±43,013
IV	Eriocitrina	16	87,5	1,38±0,272	123,43±40,02
V	Ac. Rosmarínico	16	87,5	1,125 ±0,155	82,20±42,51

Tabla 23. Incidencia, número de tumores y volumen tumoral de los diferentes grupos.

SECUENCIA DE CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN LA CARCINOGENESIS ORAL								
Grupo	Tratamiento	Nº de animales	LESIONES HISTOLÓGICAS PREMALIGNAS			MALIGNAS		
			Hiperplasia por animal ($\bar{x}$)	Papiloma por animal ($\bar{x}$)	Displasia por animal ($\bar{x}$)	Incidencia %	Carcinomas por animal ($\bar{x}$)	Incidencia %
I	DMBA	10	1,7±0.26	1.7±0.26	1.7±0.26	100	1,4±0,26	90
II	Apigenina K	9	1,33 ±0.372	1,33±0,372	1±0,333	77,78	0,89±0,351	55,56
III	Catequinas cacao	10	2,1±0.38	1,9±0.394	1,7±0,443	90	1,2±0,388	70
IV	Eriocitrina	16	1,25±0,296	1,18±0.278	1,125±0,287	75	0,93±0,249	68,75
V	Ac. Rosmarínico	16	1±0,182	0,937 ±0.17	0,875±0,201	75	0,625±0,155	56,25

Tabla 24. Número de lesiones histológicas observadas por animal e incidencia de animales con cada una de ellas.

RESULTADOS

	Nº carcinomas por grupo	Carcinomas <i>in situ</i> (%)	Carcinomas I. propia (%)	Carcinomas musc. (%)	Carcinomas bien difer. (%)	Carcinomas mod. dif. (%)	Carcinomas indiferenc. (%)
I	14	50	28,57	21,43	50	35,71	14,29
II	8	75	12,5	12,5	62,5	37,5	0
III	12	50	41,67	8,33	41,67	50	8,33
IV	15	46,67	33,33	20	66,67	13,33	20
V	10	70	10	20	80	10	10

Tabla 25. Grado de invasión y diferenciación de los tumores observados.

Grupo	Tratamiento	Nº de animales	Nº carcinomas	Escore Bryne
I	DMBA	10	14	8±0,646
II	DMBA+Apigenina	9	8	6,625±0,98
III	DMBA+Catequinas	10	12	7±0,707
IV	DMBA+Eriocitrina	16	15	7,6±0,827
V	DMBA+ Ácido Rosmarínico	16	10	7,1±0,982

Tabla 26. Puntuaciones obtenidas por los grupos según el sistema de graduación histológico del Frente de Invasión Tumoral de Bryne.

Los escores de cada uno de los parámetros propuestos por Bryne analizados de forma independiente se observan en las tablas 27-31.

Grupo	Grado de queratinización			
	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
Control DMBA	7	7	0	0
Apigenina K	7	1	0	0
Catequinas cacao	10	1	1	0
Eriocitrina	11	2	2	0
Ácido rosmarínico	8	2	0	0

Tabla 27. Detalle de los escores del grado de queratinización.

Polimorfismo nuclear				
Grupo	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
Control DMBA	4	8	2	0
Apigenina K	4	3	1	0
Catequinas cacao	5	6	1	0
Eriocitrina	8	4	3	0
Ácido rosmarínico	6	2	2	0

Tabla 28. Detalle de los escores del polimorfismo nuclear.

Patrón de invasión				
Grupo	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
Control DMBA	8	6	0	0
Apigenina K	6	1	1	0
Catequinas cacao	7	5	0	0
Eriocitrina	9	5	0	1
Ácido rosmarínico	7	2	1	0

Tabla 29. Detalle de los escores del patrón de invasión.

Estadío de invasión				
Grupo	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
Control DMBA	6	5	3	0
Apigenina K	6	1	1	0
Catequinas cacao	7	4	1	0
Eriocitrina	7	5	3	0
Ácido rosmarínico	7	1	2	0

Tabla 30. Detalle de los escores del estadío de invasión.

Infiltración linfoplasmocitaria				
Grupo	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
Control DMBA	8	6	0	0
Apigenina K	7	1	0	0
Catequinas cacao	10	2	0	0
Eriocitrina	11	4	0	0
Ácido rosmarínico	6	4	0	0

Tabla 31. Detalle de los escores de la respuesta inflamatoria.

RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

PCNA: El estudio con el marcador de proliferación PCNA no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos. Todas las muestras mostraban un marcaje severo (+++).

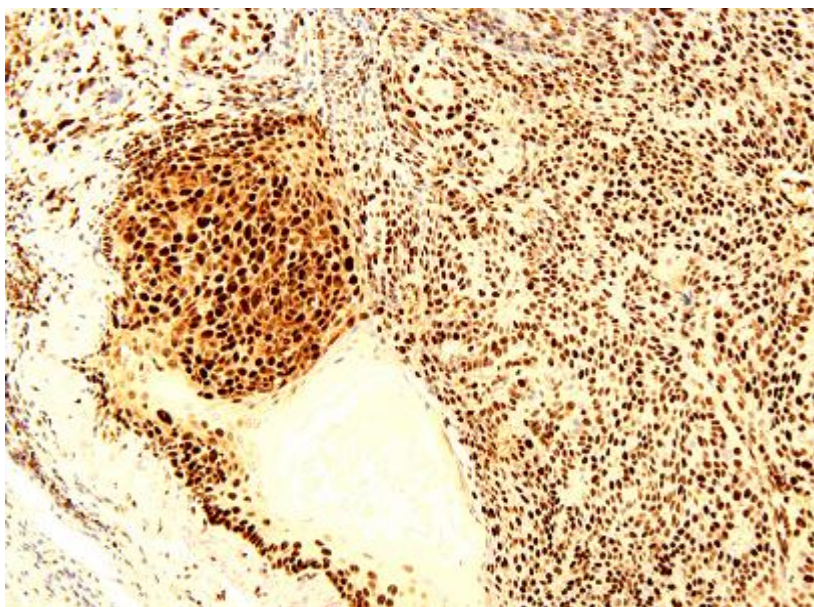


Fig 37. Inmunohistoquímica con el anticuerpo PCNA. 250x.

P-53: La proteína p53 también se encontraba sobreexpresada en el 100% de los carcinomas (tanto *in situ* como infiltrativos), con una intensidad severa (+++), también se ha detectado expresión del anticuerpo en las células basales donde existían procesos displásicos asociados en el epitelio.

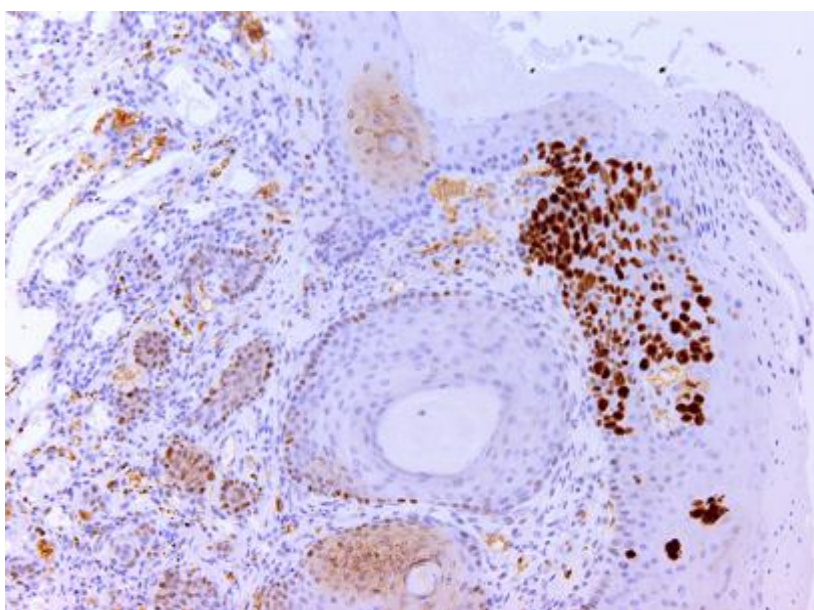


Fig. 38. Inmunohistoquímica con el anticuerpo. 200x.

DISCUSIÓN

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello ocupa el sexto lugar de todas las neoplasias malignas en el mundo (Warnakulasuriya, 2009). Los esfuerzos en la terapéutica y los avances en biología molecular y celular, no han reducido de forma significativa los índices de morbilidad y mortalidad en los últimos 50 años (Forastiere, 2001). Es importante conocer los mecanismos biológicos involucrados en el proceso de la carcinogénesis, para entender el desarrollo de los carcinomas y evaluar la eficiencia de los nuevos enfoques terapéuticos.

El uso de modelos animales para el estudio de la carcinogénesis está justificado desde que los agentes químicos se identificaron como los principales factores etiológicos en muchos tipos de cánceres, incluido el cáncer de cabeza y cuello (Vairaktaris, 2008). Son numerosos los modelos animales experimentales utilizados para el desarrollo de carcinomas de células escamosas en la cavidad oral de forma experimental, entre ellos se incluyen los hámster, ratas y ratones (Tang, 2004).

Para inducir el proceso de carcinogénesis en nuestro estudio, empleamos el modelo de carcinogénesis oral descrito por Salley en 1954. Este modelo fue posteriormente estandarizado por Morris en 1961, y consistía en la pincelación de la mucosa yugal del hámster sirio, tres veces por semana, con una solución del carcinógeno químico 7,12 dimetil-1,2- benzo[a]antraceno (DMBA) al 0,5%. Con esta técnica, las neoplasias malignas de la mucosa yugal del hámster están bien desarrolladas a las 12 semanas, y las lesiones premalignas, que se caracterizan por la disqueratosis, aparecen alrededor de la 8^a semana (Morris, 1961; Santis, 1964; Shklar, 1965). Este modelo es el mejor conocido para el estudio de la carcinogénesis oral. Probablemente su amplia difusión en la literatura radique en la gran similitud con la secuencia de procesos involucrados en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cáncer oral humano (Giménez-Conti, 1993; Shklar, 1999).

En nuestro estudio, el objetivo fundamental consistió en reproducir este modelo experimental de carcinogénesis para lograr el desarrollo de carcinomas de células escamosas en hámster, y así poder conocer sus características clínicas e histopatológicas y estudiar el posible efecto quimiopreventivo de algunos compuestos fenólicos.

La secuencia de aparición de los tumores observada en nuestro estudio se asemeja a la del modelo original de Salley, en el cual las lesiones iniciales aparecían en la semana octava y los carcinomas se desarrollaban entre la semanas 12 y 16. En nuestro estudio, la aparición de lesiones iniciales se produjo en la semana octava del tratamiento, y ya en la semana novena la mitad o más de los animales de cada grupo presentaban tumores (T_{50}), no existiendo diferencias entre los grupos tratados y control en cuanto al tiempo de aparición. En la semana duodécima, la práctica totalidad de los animales habían desarrollado tumores. Algunos de ellos presentaban un gran volumen tumoral ($>10\text{mm}$), que impedía su alimentación. Este periodo de doce semanas de inducción de la carcinogénesis oral, coincide con el reportado por otros autores (Shklar, 1966; Gómez, 2009). En cambio, otros autores describen periodos de tiempo superiores de aplicación del agente carcinógeno (14 semanas o más), para el desarrollo de tumores orales bien desarrollados (Meier, 2007; Balakrishnan, 2008; Manoharan, 2009). Posiblemente, esta discrepancia en el periodo de desarrollo de la lesiones, sea a consecuencia del modo de aplicación del agente carcinógeno, que en nuestro caso fue a través de una micropipeta y no a través de un pincel de pelo de camello, como se describe la bibliografía. Consideramos que esta técnica de aplicación resulta más eficaz ya que el agente carcinógeno queda confinado en un área determinada de la mucosa yugal y supone menos riesgos para el investigador. Este método de aplicación del agente carcinógeno había sido utilizado en anteriores experimentos por nuestro grupo de investigación (Gómez, 2009).

En la bibliografía, existen diversos trabajos en los que el desarrollo de los tumores va precedido de lesiones precancerosas, algunas de ellas en forma de placas blancas similares a la leucoplasia oral de humanos tanto macro como microscópicamente. De hecho, este modelo ha sido calificado como idóneo para

estudiar todo el espectro de lesiones de la carcinogénesis oral (Shklar, 1979, Vairaktaris, 2008). En nuestro experimento, sin embargo, no ocurrió tal fenómeno ya que las neoplasias se originaron en ausencia de lesiones premalignas previas. Sólo observamos, a las 3 semanas de la aplicación del DMBA, lesiones exofíticas blanquecinas con diverso grado de eritema seguidas de una regeneración posterior. Tras analizar microscópicamente estas lesiones, no observamos características displásicas, sólo un intenso infiltrado inflamatorio e hiperqueratosis. El desarrollo de lesiones inflamatorias en las primeras semanas del inicio del tratamiento también ha sido descrito por otros autores (James, 1966; Thilagaratnam, 1972; Meng, 1982). La aparente regeneración posterior de la superficie del epitelio podría atribuirse a una recuperación del efecto tóxico local agudo provocado por el carcinógeno.

Además del DMBA, también se han realizado estudios con otros carcinógenos químicos, como el benzo[a]pireno (B[a]P), 4-nitroquinolina-1-óxido y N-nitroso-N-metilurea, para inducir o promover la transformación neoplásica en animales de experimentación. Así Srinivasan et al. (2008) estudiaron la modulación quimiopreventiva de los polifenoles del té en el carcinoma oral inducido por 4-nitroquinoline-1-oxide. Tanaka (1994) también usó este carcinógeno químico en su investigación sobre el efecto antioxidante de la curcumina y hesperidina en el cáncer oral. Otro estudio llevado a cabo por Brandon et al. (2009), relacionó el efecto carcinogénico del benzo[a]pireno (B[a]P) y de los residuos de una planta de manufacturación de gas (MPG-7), con el del DMBA sobre la mucosa oral de hámsters. Establecieron que los animales tratados con MPG-7 sólo desarrollaban una leve hiperplasia, en cambio, los tratados con altas dosis de B[a]P desarrollaban carcinomas escamosos a las 32 semanas, con una incidencia del 100%. Por lo tanto, se puede considerar al B[a]P como un potente carcinógeno, aunque el periodo necesario para la inducción de tumores es superior al requerido por el DMBA.

Los recientes esfuerzos para controlar la incidencia del carcinoma oral de células escamosas, se centran en el desarrollo de estrategias quimiopreventivas eficaces. Así pues, prevenir o tratar las lesiones orales con agentes químicos naturales o sintéticos podría mejorar drásticamente los resultados clínicos. Por

tanto, la quimioprevención en este tipo de cáncer representa un enfoque prometedor, y requiere de su demostración a través de estudios experimentales.

La quimioprevención fue originalmente definida por Sporn en el año 1976 (Sporn, 1976) como “la potenciación farmacológica o fisiológica mediante las cuales la progresión de una lesión preneoplásica puede ser prevenida, detenida o revertida”. Desde entonces, un número creciente de sustancias naturales se han identificado como moduladoras del proceso de carcinogénesis; entre ellas se encuentran los flavonoides, que han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos en numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* (Birt, 2001; Vicente, 2003; Prasad, 2010).

Los flavonoides pueden actuar en distintas etapas del desarrollo de un tumor, por ejemplo, protegiendo al ADN del daño oxidativo, desactivando los carcinógenos, inhibiendo la expresión de genes mutagénicos y enzimas responsables de activar compuestos procarcinogénicos o activando sistemas responsables de la detoxificación. La mayoría de los trabajos sobre la actividad de los flavonoides están vinculados con su capacidad inhibitoria de enzimas y una actividad antiproliferativa (Benavente-García, 1997).

Se ha demostrado que los flavonoides pueden inhibir varias quinasas involucradas en la trasducción de señales, tales como las proteínas quinasa C, las tirosina quinasa, PI3-quinasa o S6 quinasa (Casagrande, 2001). Se ha observado que los flavonoides provocan la interrupción de la progresión del ciclo celular, bien en la etapa G1/S o G2/M, pero los mecanismos moleculares involucrados no están claros. Lo que sí se sabe es que actuarían en la modulación de múltiples proteínas regulatorias del ciclo celular, inhibiendo las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) encargadas de la fosforilación y desfosforilación de varias proteínas regulatorias (Pan, 2002). En resumen, los efectos antiproliferativos de los flavonoides parecen estar mediados por la inhibición de varias quinasas e inhibidores de quinasas involucradas en la interrupción del ciclo celular y la apoptosis y que esa inhibición depende de la estructura química del flavonoide.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para probar la eficacia de distintos compuestos fenólicos en la prevención del cáncer oral. Entre ellos destacan la epigallocatequina-3-galato (Masuda, 2001), los polifenoles del té (Li, 2002; Chandra Mohan, 2005), la genisteína (Yang, 2006), la naringina y la naringenina (Miller, 2008), la curcumina y la piperina (Manoharan, 2009), el ácido carnósico (Manoharan 2010) y la apigenina (Silvan, 2011).

En el presente estudio hemos investigado el efecto quimiopreventivo de los compuestos fenólicos: apigenina potásica, catequinas del cacao, eriocitrina y ácido rosmarínico. Algunos de estos compuestos polifenólicos fueron utilizados anteriormente por nuestro grupo de trabajo, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Rodríguez, 2002; Vicente, 2003; Yáñez, 2004). En este trabajo, dichos compuestos fueron administrados dos semanas antes de comenzar la inducción de la carcinogénesis y durante las 12 semanas de la exposición al agente carcinógeno, utilizando unas dosis equiparables a las de los modelos de consumo real.

La **apigenina** es un flavonoide común presente en la dieta, ampliamente distribuido en muchas frutas y verduras. Este compuesto natural presenta numerosas propiedades biológicas de interés. Tiene actividad antioxidante (Patel, 2007), antiinflamatoria (Liang, 1999), antimutagénica (Birt, 1997; Patel, 2007) y regula la carcinogénesis en todas sus etapas. Ha demostrado poseer propiedades inhibitorias del crecimiento en varias líneas de cáncer, incluido el de mama (Yin, 2001), colon (Wang, 2000), piel (Caltagirone, 2000), tiroides (Yin, 1999) y leucemia (Takahashi, 1998), pero en pocas ocasiones ha sido estudiado en el cáncer oral (Silvan, 2011). En nuestro trabajo, utilizamos un derivado de este flavonoide, obtenido mediante la adición de potasio a la apigenina aislada del pomelo; el producto de esta reacción, la apigenina potásica, es soluble en agua y puede, por tanto, disolverse en el agua de bebida.

La elección de la apigenina para el desarrollo de este estudio fue debida a las conocidas propiedades beneficiosas para la salud de este compuesto y a que había mostrado efectos quimiopreventivos, administrada por vía intraperitoneal, en un modelo de carcinogénesis oral en hámster realizado por nuestro grupo de investigación (Gómez, 2009). En este estudio, la apigenina

potásica redujo de forma significativa la incidencia tumoral, sólo dos de los ocho animales pertenecientes a este grupo (25%), presentaron tumores con un volumen de 2,1 y 15,7 mm³, y ninguna de las dos neoplasias invadía el corion en profundidad. En el presente trabajo, decidimos continuar con el estudio de este flavonoide, pero administrándolo por vía oral. Los resultados obtenidos fueron sensiblemente peores, el 55,6% de los animales tratados con apigenina potásica por vía oral, presentaron neoplasias con un volumen tumoral medio de 57,984±30,090 mm³. Esta discrepancia en los resultados pudo ser debida a que, por vía oral, la absorción es limitada y puede existir una inactivación hepática de los compuestos administrados por esta vía.

Otro antioxidante que introducimos en nuestro estudio fueron las **catequinas del cacao**. Se ha estudiado mucho sobre su papel en la prevención de la enfermedad coronaria (Kris-Etherton, 2002). Los efectos cardiovasculares beneficiosos de estos flavonoides se atribuyen a su capacidad para mejorar la función endotelial, por el aumento del óxido nítrico bioactivo (Taubert, 2007), sus propiedades antioxidantes naturales, y su capacidad para disminuir la coagulación de la sangre por la activación y agregación plaquetaria (Vlachopoulos, 2006). Con respecto al cáncer, conocemos muy pocos estudios que evidencien su actividad quimiopreventiva, y ninguno en relación con el cáncer oral. Se ha observado que los polifenoles del cacao inhiben la proliferación del cáncer de colon (Carnesecchi, 2002), cáncer de mama (Ramljak, 2005), reducen la actividad de las enzimas de los marcadores tumorales en la hepatocarcinogénesis (Amin, 2004), disminuyen la hiperplasia (Bisson, 2007) y la incidencia del cáncer de próstata (Bisson, 2008), inducen la inhibición completa del crecimiento en líneas celulares metastásicas y no metastásicas del cáncer de próstata (Jourdain, 2006) y disminuyen la proliferación de células endoteliales, disminuyendo de este modo la angiogénesis asociada a la patología tumoral (Kenny, 2004).

Respecto a la **eriocitrina**, sabemos que posee propiedades antiinflamatorias, disminuyendo la fragilidad y permeabilidad capilar, y anticancerígenas, ya que es capaz de secuestrar algunos radicales libres que están implicados en el cáncer (Manthey, 2002). Hemos encontrado pocos

estudios que hablen de forma específica de este compuesto y de su relación con la prevención del cancer. Uno de estos estudios fue el llevado a cabo por Ogata (2000), que descubrió que la eriocitrina y sus metabolitos secundarios inducen la apoptosis en las líneas celulares leucémicas HL-60. Otro estudio demostró que la eriocitrina inhibe la 5- y la 12-lipoxigenasa, que juega un importante papel en los procesos inflamatorios que afecta a la arteriosclerosis y cáncer (Nogata, 2007). En cambio, sí encontramos estudios sobre la actividad anticancerígena de productos como los cítricos y las hojas de menta, de los cuales constituye uno de los metabolitos más importantes. Existen estudios que demuestran la actividad antiproliferativa de los flavonoides de Citrus contra varias líneas celulares normales y tumorales (Kawaii, 1999). Y de otros flavonoides presentes también en los cítricos, como la naringina, naringenina, herperidina, neoshesperidina, tangeretina y nobiletina, en la carcinogénesis oral en hámster, inhibiendo la transformación neoplásica (Miller, 2008).

El **ácido rosmarínico** utilizado para este estudio fue extraído de la melisa (*Melissa officinalis*), pero puede encontrarse también en otras plantas lamiáceas como el romero. Un ensayo de citotoxicidad *in vitro* indicó que el aceite esencial de *M. officinalis* es muy eficaz contra una serie de líneas celulares de cáncer humano (A549, MCF-7, Caco-2, NS-60, K562) y una línea de células de ratón (B16F10). Este aceite posee actividad antioxidante, como lo demuestra la reducción del radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hydrazyl) observada en un estudio *in vitro* en varias líneas celulares tumorales humanas (de Sousa, 2004). La actividad antitumoral de los flavonoides del romero ha sido ensayada de forma experimental tanto *in vivo* como *in vitro*, con esperanzadores resultados (Peng, 2007; Scheckel, 2008). Entre otros hallazgos, cabe citar el incremento de la apoptosis de las células del cáncer hepático de la estirpe HepG2 (Wei, 2008), la protección frente al tumor mamario y cutáneo en ratones inducido por el dimetilbenzoantraceno (Singletary, 1991; Sancheti, 2006), la inhibición de la genotoxicidad inducida por benzopireno en células bronquiales humanas (Offord, 1995), y la acción antileucémica *in vivo* (Sharabani, 2006).

Al analizar las **características macroscópicas** de las lesiones observadas en nuestro estudio, comprobamos que todos los grupos tratados con los compuestos fenólicos mostraron una menor incidencia de tumoraciones visibles que el grupo control; así como una menor multiplicidad de lesiones, con la excepción del grupo III. En el caso del grupo tratado con apigenina, sólo cinco de los nueve animales desarrollaron tumores. Además, el volumen tumoral de este grupo ($57,984 \pm 30,090 \text{ mm}^3$), fue sensiblemente menor que del grupo control y que el del resto de grupos. El grupo tratado con ácido rosmarínico (grupo V) también obtuvo buenos resultados, con una incidencia tumoral del 56,25% y un número de lesiones tumorales visibles inferior al del resto de grupos ($1,19 \pm 0,136$). Tales diferencias no fueron estadísticamente significativas probablemente debido al tamaño de la muestra. La aparición de múltiples tumores puede ser debida al fenómeno de la cancerización de campo, que sugiere que las agresiones repetidas sobre las células epiteliales de la mucosa oral conllevan la aparición de mutaciones genéticas diferentes en las distintas células, que pueden conducir al desarrollo de múltiples tumores primarios independientes entre sí. El desarrollo de múltiples tumores primarios es una característica de malignidad ya que disminuye de forma marcada la supervivencia.

A **nivel microscópico**, observamos que las lesiones cancerosas siguen una progresión histológica del epitelio escamoso, desde la normalidad a hiperplasia de las células basales, papiloma (con o sin displasia), displasia leve/moderada/severa y cáncer, a medida que aumenta la exposición al carcinógeno. Los grupos tratados con compuestos fenólicos tenían menor número de lesiones orales de hiperplasia, papiloma y displasia por animal que el grupo control. A excepción del grupo III, que presentó mayor número de estas lesiones, pero que sólo evolucionaron a carcinoma el 70,6% de la lesiones displásicas observadas. En el caso del grupo control, hubo un mayor número de lesiones displásicas que progresaron a carcinomas (82,35%). El grupo control fue además el que presentó mayor número de carcinomas orales por animal ($1,4 \pm 0,26$), y en tres de los hámsters las neoplasias invadían la musculatura subyacente. Esto indica que las células displásicas y cancerosas fueron susceptibles a los efectos de los compuestos fenólicos administrados, ya que se

atenuó la progresión hacia el cáncer en estos grupos y las neoplasias tenían un patrón menos invasivo que las del grupo control.

Los carcinomas escamosos orales oscilan desde neoplasias queratinizadas bien diferenciadas hasta tumores anaplásicos. Atendiendo al grado de diferenciación histológico del tumor, Broders (1920) estableció la siguiente clasificación considerando cuatro categorías en función de la proporción de neoplasia con semejanzas con respecto al epitelio normal:

- Grado I: presenta el 75%-100% de las células diferenciadas.
- Grado II. La proporción de las células diferenciadas es del 50%-75%.
- Grado III: el 25%-50% de las células están diferenciadas.
- Grado IV: ausencia total de diferenciación.

Esta clasificación fue posteriormente modificada por la OMS, estableciendo sólo tres grados: bien diferenciado, moderadamente diferenciado e indiferenciado (Barnes, 2005). Este sistema ha sido ampliamente usado pero ha demostrado ser escasamente predictivo para evaluar el pronóstico y la supervivencia (Cade, 1957).

Esta falta de correlación entre el sistema de clasificación de Broders y el pronóstico de la lesión impulsó el desarrollo de otros sistemas de clasificación. Así Bryne, observó que las características histopatológicas de un tumor pueden diferir ampliamente dentro del mismo tumor. Consideró que las informaciones diagnósticas más útiles pueden ser deducidas del Frente de Invasión Tumoral (FIT), que es donde residen presumiblemente las células tumorales más agresivas, considerándose la región más representativa de la neoplasia a nivel pronóstico (Bryne, 1989). Así, estableció un sistema de puntuación sumatorio que considera los parámetros: grado de queratinización, polimorfismo nuclear, patrón y estadio de invasión así como grado de infiltración linfoplasmocitaria.

Este sistema de clasificación propuesto por Bryne, se desarrolló a partir del sistema de graduación multifactorial propuesto por Anneroth (1987), en el que incluía el recuento mitótico como un valor pronóstico. El uso de este parámetro morfológico como un marcador de pronóstico sigue siendo polémico

debido a la heterogeneidad del tumor, el desacuerdo entre los observadores, las variaciones en el tamaño del campo microscópico y también porque el tamaño de la célula no se toma en consideración. En la modificación de la clasificación realizada por Bryne et al., el parámetro de "número de mitosis" fue excluido, sin afectar al valor pronóstico de la clasificación y mejorando la reproducibilidad (Bryne, 1992). La suma de las puntuaciones otorgadas a cada parámetro resultaría en un score final que aportaría información sobre el pronóstico de la lesión. En un estudio retrospectivo realizado por Kurokawa et al. (2005), se estableció que aquellos pacientes con menos de 8 puntos de score según el sistema de graduación del FIT tenían un pronóstico significativamente mejor que aquellos con más de 8 puntos.

Atendiendo al **grado de diferenciación**, los grupos tratados con flavonoides mostraron mayor incidencia de carcinomas escamosos bien diferenciados que el grupo control, a excepción del grupo III. Cabe descartar el grupo tratado con ácido rosmarínico, con el 80% de los tumores bien diferenciados. Estos carcinomas bien diferenciados presentaban formaciones de queratina, que se podían observar dentro de las células individuales, lo que se conoce como disqueratosis, pero que con más frecuencia formaban masas lamelares teñidas de color rosa conocidas como perlas de queratina. El grupo experimental que presentó mayor grado de indiferenciación fue el grupo tratado con eriocitrina (20%), seguido del grupo control con un 14,29% de lesiones indiferenciadas. Estos tumores presentaban ausencia de queratinización, siendo la mayoría de células atípicas y con gran pleomorfismo.

La evaluación de los scores obtenidos por los diferentes grupos mediante el **sistema de graduación histológico de Bryne**, mostró que las lesiones del grupo control obtuvieron la mayor puntuación ($8 \pm 0,646$). Un mayor score implica un mayor grado de malignidad y, por tanto, un peor pronóstico. Pero consideramos que, el análisis del peso específico independiente de cada uno de los parámetros, puede ayudar a aportar más datos del comportamiento de la lesión y afrontar el problema de una forma más apropiada. Por este motivo, hemos analizado cada parámetro morfológico de forma independiente.

Así, al analizar el grado de queratinización, observamos que la alta producción de queratina es considerada como un buen dato en el pronóstico de la enfermedad y se le otorga un escore de 1, la puntuación para este parámetro morfológico aumenta cuando el grado queratinización es menor. Se correlaciona así con el sistema de clasificación histológica según Broder, en la cual el dato más característico de los carcinomas escamosos bien diferenciados, y por tanto de mejor pronóstico, es la formación de queratina. Observamos que los grupos tratados con polifenoles presentaban un gran número de tumores con alta producción de queratina. Siendo el grupo tratado con apigenina el que presentó mayor porcentaje de tumores con un escore de 1 en este parámetro (87,5%), seguido del grupo III (83,333%), grupo V (80%), grupo IV (73,3%) y por último lugar el grupo control (50%). El porcentaje de carcinomas con moderado grado de diferenciación (escore 2) fue de un 50% para el grupo control, muy superior al del resto de grupos. Cabe destacar que hubo un tumor del grupo III y dos tumores del grupo IV, con una producción mínima de queratina (escore 3).

Con respecto al dato histológico polimorfismo celular, el grupo tratado con ácido rosmarínico (Grupo V) fue el que presentó mayor índice de lesiones con mejor comportamiento biológico ya que el 60% de los tumores presentaba escaso polimorfismo celular frente al 28,57% del grupo control. El grupo control presentó mayor incidencia de lesiones con moderado polimorfismo (57,14%). El grupo tratado con eriocitrina fue el que obtuvo mayor número de lesiones con abundante polimorfismo nuclear.

El dato histológico del patrón de invasión es considerado por algunos autores como el de mayor importancia en el pronóstico de la sobrevida o supervivencia (SV) (Crissman, 1984; Muñoz-Guerra; 2006). Con respecto a este escore Bryne et al., reportaron una supervivencia a los 5 años del 70% y 30% ante el patrón de invasión escore 3 y 4 respectivamente (Bryne, 1995). Kademani et al., encontraron que las diferencias de SV entre los escore 1 y 4 son claramente distinguibles, este autor encontró a los 5 años una SV de 80%, 54%, 41% y 29% para los escores 1, 2, 3 y 4 respectivamente (Kademani, 2005). Por tanto, neoplasias que invaden con un patrón de tipo expansivo presentan un mejor pronóstico en términos de sobrevida que los casos con invasión en

cordones pequeños o difusos, correlacionándose directamente con un mayor riesgo de metástasis. Esto se debe probablemente a que las neoplasias, al presentar una mayor difusión del patrón de invasión (mayor escore), infiltran el estroma más rápidamente e invaden los vasos linfáticos con mayor frecuencia, representando una cohorte más agresiva (Einenkel, 2007). En nuestra investigación, los datos obtenidos referidos a este parámetro mostraron los grupos II y V tenían un patrón de invasión de tipo expansivo con bordes infiltrativos bien diferenciados; mientras que en el grupo control, III y IV presentaban un alto número de carcinomas que invadían predominantemente mediante cordones o bandas de células. El grupo IV, presentó además un carcinoma que invadía en profundidad y de manera difusa mediante pequeños grupos de células.

Analizando los escores del estadío de invasión, el grupo control fue el grupo experimental que presentó mayores puntuaciones. Cinco de los tumores desarrollados en este grupo invadían el corion en profundidad y tres de ellos, invadían además la musculatura subyacente. Esto indica un comportamiento más agresivo de las neoplasias presentadas por este grupo. Los mejores resultados los obtuvieron el grupo tratado con apigenina (grupo II) y ácido rosmarínico (grupo V), que presentaron una incidencia del 75% y 70%, respectivamente, de carcinomas *in situ*, es decir, no invasores.

Otro dato indicativo del pronóstico de la lesión es el infiltrado linfoplasmocitario, lo que representa la respuesta inflamatoria del estroma a la presencia de células cancerígenas. Según Bryne, a mayor respuesta inflamatoria mejor comportamiento neoplásico tendrá la lesión. En cambio, existen diversos estudios que han demostrado que células inflamatorias contribuirían al proceso de invasión y metástasis tumoral (Douglas, 2004). En nuestro estudio la mayoría de las lesiones de los grupos presentaban una marcada infiltración linfoplasmocitaria (escore 1). Queremos resaltar que el grupo tratado con apigenina (grupo II), presentó una marcada respuesta inflamatoria en el 87,5% de los carcinomas observados.

La determinación **inmunohistoquímica** de la expresión de genes relacionados con la proliferación celular y la oncogénesis, parece estar asociada con el pronóstico de algunos tumores orales. Así, el carcinoma oral de células escamosas se ha relacionado con la sobreexpresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos como pueden ser Ki67 (antígeno de proliferación nuclear), Bcl-2 oncoproteína, P-16 y, los que han sido objetivo de este trabajo, PCNA y p53.

El antígeno de proliferación celular PCNA, es una proteína nuclear asociada con la polimerasa δ del DNA, que está presente en las células proliferantes a lo largo de todo el ciclo celular. El nivel de la proteína se correlaciona con la proliferación celular y, específicamente, con la síntesis de DNA. Es ampliamente utilizado como marcador de proliferación, tanto en patología clínica como experimental. En nuestro estudio, todos los carcinomas sometidos a estudio con PCNA mostraron un marcaje severo (+++), por lo que podemos decir que todos ellos presentaban un grado de proliferación intenso.

P53 es una fosfoproteína implicada en el control del ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la conservación de la integridad genómica. Su mecanismo de acción consiste en un bloqueo transitorio del paso de fase G1 a fase S en células con daño en el ADN. Un aumento en la concentración de la proteína nativa conlleva la parada del ciclo celular antes de la síntesis replicativa de ADN. Esto impide la entrada en fase de mitosis, permitiendo la reparación del material genético dañado o, alternativamente, induciendo los mecanismos que llevan a la muerte celular por apoptosis, por medio de la inhibición de la síntesis de Bcl-2. La proteína normal se expresa en pequeñas cantidades, suficientes para el control de ciclo celular, por lo que, en condiciones normales, esta proteína no es observable mediante técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, en algunas ocasiones, cuando existen mutaciones que inactivan la proteína (al no existir, control por retroalimentación, de la producción de p53) las proteínas inactivas se acumulan en el núcleo celular (y a veces en el citoplasma) siendo detectables mediante este tipo de técnicas. Diferentes estudios han relacionado la positividad de p53 con los tumores de cabeza y cuello. Ogden y cols. (1992) y Leedy y cols. (1994), encontraron la mutación p53 en el CE de lengua.

Warnakulasuriya y cols. (1992 y 1994), en varios estudios, relacionaron que algunas lesiones premalignas de cabeza y cuello mostraron tener proteínas p53 mutadas. El aumento de la expresión de p53 se correlaciona con la actividad proliferativa y agresividad de carcinomas escamosos de cavidad oral (Saito, 1999). En nuestro estudio, todos los carcinomas marcados con el anticuerpo Anti-p53, mostraron una acumulación intensa (+++) de proteína anómala en el núcleo celular. Por tanto, podemos decir que uno de los mecanismos de activación de la carcinogénesis oral por parte del DMBA, es la alteración de la proteína p53.

En resumen, por todos los datos recogidos en este trabajo, podemos concluir que la apigenina potásica ha demostrado tener un efecto quimiopreventivo frente a la inducción de la carcinogénesis oral mediante la aplicación del carcinógeno DMBA. Macroscópicamente, los carcinomas de los hámsters que recibieron este flavonoide en el agua de bebida presentaban un volumen muy inferior al del resto de grupos ($57,984 \pm 30,090$). Microscópicamente, cabe destacar la baja incidencia de animales que presentaban carcinomas de células escamosas 55,56%, siendo el 75% de estos carcinomas *in situ*. Se trataba mayoritariamente de tumores bien y moderadamente diferenciados, los núcleos exhibían un grado moderado de pleomorfismo y las figuras mitóticas no eran muy abundantes. Además, fue el grupo que menor puntuación obtuvo mediante el sistema de graduación de Bryne ($6,625 \pm 0,98$).

Asimismo, el ácido rosmarínico también ha demostrado poseer un efecto inhibitorio sobre la carcinogénesis oral, ya que disminuyó la incidencia y multiplicidad de lesiones macroscópicamente visibles, aunque el volumen de estas lesiones no difería de los volúmenes observados en el grupo control. Además disminuyó la progresión de estas lesiones a carcinomas de células escamosas, con una media de carcinomas por animal de $0,625 \pm 0,155$ y una incidencia del 56,25%. Las características histológicas de los carcinomas generados en este grupo eran más favorables que las del grupo control, como así se desprende tras analizar los datos obtenidos al utilizar la clasificación de Broders, con el 80% de los tumores bien diferenciados frente al 50% del grupo

control; y la clasificación de Bryne, en la que el grupo tratado con ácido rosmarínico obtuvo un escore total de $7,1 \pm 0,982$ inferior al del grupo control $8 \pm 0,646$.

Por el contrario, en los grupos tratados con catequinas del cacao (grupo III) y eriocitrina (grupo IV) no se observó de forma tan clara un efecto beneficioso de la administración de dichos tratamientos. Los tumores desarrollados tenían de un volumen superior a los del grupo control. La media de lesiones histológicas premalignas por animal también fue superior para el grupo III, si bien es cierto que estos tratamientos disminuyeron la progresión a la formación neoplasias malignas, ya que la incidencia de animales con carcinomas de células escamosas fue del 70% para el grupo III y del 68,75% para el grupo IV. Sin embargo, el comportamiento biológico de estas neoplasias era más desfavorable que el observado en los grupos II y V, y muy similar al del grupo control. El grupo III presentó mayoritariamente tumores moderadamente diferenciados, y el grupo IV tuvo un porcentaje similar al grupo control de carcinomas indiferenciados. Al evaluar el grado de invasión, observamos que el porcentaje de carcinomas *in situ* de ambos grupos era inferior al observado en el grupo control. Ambos grupos obtuvieron escores más bajos que el grupo control, según el sistema de graduación histológica de Bryne.

Basándonos en los resultados obtenidos en esta investigación y los datos prometedores de varios estudios (Gómez, 2009; Silvan, 2011), consideramos que serían necesarios nuevos estudios para profundizar en la comprensión del mecanismo de acción de estos compuestos, así como para determinar su eficacia quimiopreventiva y su posible uso como nuevo enfoque terapéutico o preventivo en personas con riesgo de padecer cáncer oral.

CONCLUSIONES

La aplicación tópica de agente carcinógeno DMBA en la mucosa yugal del hámster sirio, originó el proceso de carcinogénesis en un periodo de tiempo menor que el establecido en la bibliografía.

Las lesiones neoplásicas desarrolladas mostraban microscópicamente un espectro lesional semejante al de la carcinogénesis humana.

Los carcinomas escamosos desarrollados mostraban positividad ante los marcadores inmunohistoquímicos PCNA y p53.

Todos los compuestos fenólicos estudiados han demostrado reducir la incidencia tumoral. La apigenina potásica y el ácido rosmarínico fueron los compuestos que mostraron mejores resultados, la primera reduciendo considerablemente el volumen tumoral de los carcinomas desarrollados en ese grupo, y ambos compuestos fueron los que redujeron de forma más significativa la incidencia y agresividad de los tumores desarrollados.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha A, Ruesga M, Rodríguez M, Martínez de Pancorbo M, Aguirre J.M. Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) en el cáncer y precáncer oral. Valencia. Med. oral patol. oral cir. Bucal. 2005;10(2):95-102.
- Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE y cols. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. J Agric Food Chem 1999; 47: 4184-8.
- Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. Cancer Res. 2004 Dec 1;64(23):8715-22.
- Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutrition. 2002;18(1):75-81.
- Amin I, Koh BK, Asmah R. Effect of cacao liquor extract on tumor marker enzymes during chemical hepatocarcinogenesis in rats. J. Med. Food 2004; 7: 7-2.
- Anderson WF, Hawk E, Berg CD: Secondary chemoprevention of upper aerodigestive tract tumors. Semin Oncol 2001; 28: 106.
- Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. Scand J Dent Res 1987; 95: 229-49.
- Antón A, Lizaso J. Nitritos, nitratos y nitrosaminas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid (España), 2001.
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. Lancet 2008; 371: 1695–1709.
- Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Taylor TH, Nguyen QA, Jensen J, Thompson W, Lagerberg W, Meyskens FL Jr. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. Clin Cancer Res. 2000;6(12):4684-91.

- Arts IC, Hollman PC, Kromhout D. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet*. 1999; 354:488.
- Avallone R, Zanolli P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem Pharmacol*. 2000 Jun 1;59(11):1387-94.
- Balakrishnan S, Menon VP, Manoharan S. Ferulic acid inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J Med Food*. 2008; 11(4):693-700.
- Baliga MS, Rao S. Radioprotective potential of mint: a brief review. *J Cancer Res Ther*. 2010;6(3):255-62.
- Bànkfalvi A, Piffkò J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 291-298
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon (France), IARC Press, 2005.
- Batsakis JG. The molecular biology of oral cancer. En: Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG. *Oral Cancer*. New York: Martin-Dunitz, 2003; pp. 167-81.
- Bazzano LA, He J, Ogden LG. Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study, *Arch. Int. Med* 2001; 161:2573–2578.
- Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr*. 2003;133(10):3248S-3254S.
- Bello J, López de Cerain A. *Fundamentos de ciencia toxicológica*. Madrid: Díaz de Santos, 2001.
- Benavente-García, O.; Castillo, J.; Marín, F. R.; Ortuño, A.; Del Río J. A. Uses and properties of Citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem*. 1997; 45: 4505–15.

- Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem*. 2008 Aug 13;56(15):6185-205.
- Berenblum I. The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res* 1941; 1: 44-50.
- Bhagwat, S.A., Haytowitz, D.B., Holden, J.M. 2011. USDA database for the flavonoid content of selected foods, release 3. U.S. Department of Agriculture. 2011.
- Birt DF, Mitchell D, Gold B, Pour P, Pinch HC. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res*. 1997;17(1A):85-91.
- Bisson JF, Guardia-Llorens MA, Hidalgo S, Rozan P, Messaoudi M. Protective effect of Acticoa powder, a cocoa polyphenolic extract, on prostate carcinogenesis in Wistar-Unilever rats. *Eur. J. Can. Prev*. 2008; 17: 54-61.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 1998; 48: 3282-3287.
- Boccia S, Hashibe M, Gallì P, De Feo E, Asakage T, Hashimoto T, Hiraki A, Katoh T, Nomura T, Yokoyama A, van Duijn CM, Ricciardi G, Boffetta P. Aldehyde dehydrogenase 2 and head and neck cancer: a meta-analysis implementing a Mendelian randomization approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(1):248-54.
- Bockmühl G, Wolf S, Schmidt A, Schwendel V, Jahnke V, Dietel M, et al. Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head Neck* 1998; 20: 145-51.
- Boutwell RK. Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Progr. Exptl. Tumor Res* 1964; 4: 207-250.

- Boyle JO, et al: The incidence of p53 mutation increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53:4477-80.
- Brandon JL, Conti CJ, Goldstein LS, DiGiovanni J, Gimenez-Conti IB. "Carcinogenic effects of MGP-7 and B[a]P on the hamster cheek pouch," *Toxicol. Pathol* 2009; 37(6): 733–740.
- Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332(11):712-717.
- Brennan JA, Sidransky D. Molecular staging of head and neck squamous carcinoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1996; 15(1): 3-10.
- Broders AC. Carcinoma. Grading and practical application. *Arch Pathol* 1926;2: 376-81.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-437.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992; 166: 375-81.
- Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch* 1995; 427: 277-281.
- Cade S, Lee ES. Cancer of the tongue: a study based on 653 patients. *Br J Surg* 1957;44:433-46.
- Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87: 595–600.

- Campisi G, Giovannelli L. Controversies surrounding human papilloma virus infection, head & neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment. *Head & Neck Oncology* 2009; 1:8.
- Carnero A, Hannon GJ. The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998;227:43-55.
- Carnesecchi S, Schneider Y, Lazarus SA, et al. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2002;175:147-55.
- Carretero Pelaez MA, Esparza Gomez GC, Figuero Ruiz E, Cerero Lapiedra R. Alcohol-containing mouthwashes and oral cancer. Critical analysis of literature. *Med Oral* 2004; 9(2):116-120.
- Casagrande, F.; Darbon, J. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin-dependet kinases CDK2 and CDK1. *Biochem.Pharmacol.* 2001; 61: 1205–1215.
- Caulin C, Nguyen T, Longley MA, Zhou Z, Wang XJ, Roop DR. Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity. *Cancer Res* 2004; 64: 5054-8.
- Chandra Mohan KV, Hara Y, Abraham SK, Nagini S. “Comparative evaluation of the chemopreventive efficacy of green and black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model,” *Clinical Biochemistry* 2005; 38: 879–886.
- Chang WW, Hu FW, Yu CC, Wang HH, Feng HP, Lan C, Tsai LL, Chang YC. Quercetin in elimination of tumor initiating stem-like and mesenchymal transformation property in head and neck cancer. *Head Neck.* 2012
- Chen D, Chen MS, Cui QC, Yang H, Dou QP. Structure–proteasome-inhibitory activity relationships of dietary flavonoids in human cancer cells. *Front Biosci* 2007;12:1935–45.

- Chen PN, Chu SC, Kuo WH, Chou MY, Lin JK, Hsieh YS. Epigallocatechin-3 gallate inhibits invasion, epithelial-mesenchymal transition, and tumor growth in oral cancer cells. *J Agric Food Chem*. 2011;59(8):3836-44.
- Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol Rep*. 2007;17:1525–31.
- Chiang SL, Chen PH, Lee CH, Ko AM, Lee KW, Lin YC, Ho PS, Tu HP, Wu DC, Shieh TY, Ko YC. Up-regulation of inflammatory signalings by areca nut extract and role of cyclooxygenase-2 -1195G>a polymorphism reveal risk of oral cancer. *Cancer Res*. 2008;68(20):8489-98.
- Choi S, Myers JN. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. *J Dent Res* 2008; 87(1):14-32.
- Choi EJ, Kim GH. Apigenin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *J Nutr Biochem*. 2009;20(4):285-90.
- Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J, Casson A, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Roth JA. Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Res* 1993; 53: 1676- 1683.
- Cleaver JR, Crowley E. UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci* 2002; 7: 1024.
- Cogliano V, Straif K, Baan R, et al. Smokeless tobacco and tobacco-related nitrosamines. *Lancet Oncol*. 2004; 5: 708.
- Collins I, Garrett MD. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; 5(4):366–73.
- Cooper K, Haffajee Z. bcl-2 and p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991;6:1699-703.

- Covacci A, Rappuoli R: *Helicobacter pylori*: after the genomes, back to biology. *J Exp Med* 197;807, 2003.
- Davies L, Welch HG: Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 135: 451-457.
- Crissman JD, Liu WY, Gluckman JL, Cummings G. Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer* 1984; 54: 2995- 001
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 2009;26(8):1001-43
- de Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattass CR. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56(5):677-81.
- Dipple A, Pigott MA, Bigger AH, Blake DM. 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-DNA binding in mouse skin: response of different mouse strains and effects of various modifiers of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1984;5(8):1087–90.
- Dolcetti R, Masucci MG: Epstein-Barr virus: induction and control of cell transformation. *J Cell Physiol* 2003; 196:207.
- Dorman HJ, Koşar M, Başer KH, Hiltunen R. Phenolic profile and antioxidant evaluation of *Mentha x piperita* L. (peppermint) extracts. *Nat Prod Commun.* 2009; 4(4):535-42.
- Douglas WG, Tracy E, Tan D, Yu J, Hicks WL Jr, Rigual NR, et al. Development of head and neck squamous cell carcinoma is associated with altered cytokine responsiveness. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 585-593.
- Einenkel J, Braumann UD, Horn LC, Pannicke N, Kuska JP, Schütz A, et al. Evaluation of the invasion front pattern of squamous cell cervical carcinoma by measuring classical and discrete compactness. *Comput Med Imaging Graph* 2007; 31: 428-435.
- Erdmann J: Recent studies attempt to clarify relationship between oral cancer and human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 638-639.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):342-8.

Fasanmade A, Kwok E, Newman L. Oral squamous cell carcinoma associated with khat chewing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 2007; 104(1): 53-55.

Feng L, Wang Z. Chemopreventive Effect of Celecoxib in Oral Pre-cancers and Cancers. *Laryngoscope* 2006; 116: 1842-5.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2001; 345(26): 1890-1900.

Fuhrman, B.; Volkova, N.; Coleman, R.; Aviram, M. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E0) mice and reduce macrophage atherogenicity. *J. Nutr.* 2005, 135, 722-728.

García García V, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. *Av.Odontoestomatol* 2005; 21 (6): 287-295.

García García V, Bascones Martínez A. Cáncer oral: Puesta al día. *Av. Odontoestomatol* 2009; 25 (5): 239-248.

Gerry F et al. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: A National Cancer Data Base Report. *Head Neck* 2002; 24: 165-180.

Gillison ML, et al: Evidence for a casual association between human papillomavirus and subset of head and neck cancers. *JNCI* 2000; 92:709.

Gimenez Conti IB, Slaga TG. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J Cell Biochem Suppl* 1993; 17F:83-90.

Gimenez-Conti IB, LaBate M, Liu F, Osterndorff E. p53 alterations in chemically induced hamster cheek pouch lesions. *Mol Carcinogenesis* 1996;16:197–202.

Gómez García FJ, López Jornet P, Álvarez Sánchez N, Castillo-Sánchez J, Banavente-García O, Vicente Ortega V. Effect of the phenolic compounds

- apigenin and carnosic acid in oral carcinogenesis induced by DMBA. Oral Dis 2012; In Press: doi: 10.1111/j.1601-0825.2012.01975.x.
- Gómez García FJ, Vicente Ortega V, Álvarez Sánchez N, López Jornet P. Estudio comparativo de la aplicación del hidrocarburo aromático policíclico 7,12-dimetil-1,2-benzatraceno (DMBA) sobre la mucosa oral del hámster y del cobaya. Rev Esp Patol 2009; 42 (4): 287-295
- Gómez García, FJ. Efecto del etanol y los compuestos fenólicos apigenina y ácido carnósico sobre la carcinogenesis oral por DMBA en hamster. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2009.
- González Moles MA, Gil Montoya JA, Ruiz Ávila I. Bases moleculares de la cancerización de la cavidad oral. AvOdontoestomatol 2008; 24(1):55-60.
- Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, Pindborg JJ, Bhonsle RB, Jainawalla PN, et al. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. Community Dent Oral Epidemiol. 1980; 8(6): 283-333.
- Gupta S, Afaq F and Mukhtar H: Involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. Oncogene 21: 3727-3738, 2002.
- Gupta S, Afaq F, 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(4): 914-920.
- Ha PK, Califano JA: The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. Oral Biol Med 2004; 15(4):188-196.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol 1990;162:285-94.

- Hallund, J.; Bugel, S.; Tholstrup, T.; Ferrari, M.; Talbot, D.; Hall, W.L.; Reimann, M.; Williams, C.M.; Wiinberg, N. Soya isoflavone-enriched cereal bars affect markers of endothelial function in postmenopausal women. *Br. J. Nutr.* 2006, 95, 1120-1126.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57–70.
- Hashibe M, Brennan P, Chuang SC 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 Biomarkers Prev* 2009; 18: 541–550.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96(2-3):67-202.
- Heidari MR, Dadollahi Z, Mehrabani M, Mehrabi H, Pourzadeh-Hosseini M, Behravan E, Etemad L. Study of antiseizure effects of *Matricaria recutita* extract in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1171:300-4.
- Hermann, F., Spieker, L., Ruschitzka, F., Sudano, I., Hermann, M., Binggeli, C., Luscher, T., Reisen, W., Noll, G., Corti, R. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* 2006; 92: 119-120.
- Hirota SK, Braga FP, Penha SS et al. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13: E227–E231.
- Hodgson, J.; Croft, K. Dietary flavonoids: Effects on endothelial function and blood pressure. *J. Sci. Food Agric.* 2006, 86, 2492-2498.
- Hong WK, Endicott J, Itri LM, Doos W, Batsakis JG, Bell R, Fofonoff S, Byers R, Atkinson EN, Vaughan C, et al. 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. *N Engl J Med.* 1986; 315(24):1501-5.
- Hong WK, Lippman SM, Itri LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM, Schantz SP, Kramer AM, Lotan R, Peters LJ, et al. Prevention of second primary tumors

- with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1990; 323(12):795-801.
- Hsu SM, Reine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29: 577-580.
- Hubbard, G.P.; Wolfram, S.; de Vos, R.; Bovy, A.; Gibbins, J.M.; Lovegrove, J.A. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: A pilot study. *Br. J. Nutr.* 2006, 96, 482-488.
- Husain Z, Fei Y, Roy S, Solt DB, Polverini P, Biswas DK. Sequential expression and cooperation interaction of c-Ha-ras and c-erbB genes in in vivo carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1264–8.
- Igney FH, Krammer PH: Death anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:277.
- Jabbar S, Strati K, Pitot HC, Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice. *Virology* 2010; 407: 60–7.
- James AG. The management of oropharyngeal cancer. *CA Cancer J Clin.* 1966;16(5):191-7.
- Jardine NJ. Phytochemicals and phenolics. En: *Chocolate and Cocoa Health and Nutrition*. Lan knight, 1999; 119-142.
- Jayasurya R, Sathyan K.M, Lakshminarayanan K, Abraham T, Nalinakumari, KR, Abraham EK, Nair MK, Kannan S. Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Mod. Pathol* 2005; 18: 1056–1066.
- Jefferies S, Foulkes WD: Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2001; 37:115.

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ.. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59(4): 225-49.
- Jeong, Y.J.; Choi, Y.J.; Kwon, H.M.; Kang, S.W.; Park, H.S.; Lee, M.; Kang, Y.H. Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *Br. J. Nutr.* 2005, 93, 581-591.
- Ji BT, Chow WH, Hsing AW, McLaughlin JK, Dai Q, Gao YT, Blot WJ and Fraumeni JF. Green tea consumption and the risk of pancreatic and colorectal cancers. *Int J Cancer* 1997; 70: 255–258
- Jiang WW, Fujii H, Shirai H, Mega H, Takagi M. Accumulative increase of loss of heterozygosity from leukoplakia to foci of early cancerization in leukoplakia of the oral cavity. *Cancer* 2001; 92:2349-56.
- Johnstone S, Logan RM. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2007; 36(3): 263-266.
- Joseph, J.A.; Shukitt-Hale, B.; Denisova, N.A.; Bielinski, D.; Martin, A.; McEwen, J.J.; Bickford, P.C. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J. Neurosci.* 1999, 19, 8114-8121.
- Jourdain C, Tenca G, Deguercey A, Troplin P, Poelman D. In-vitro effects of polyphenols from cocoa and beta-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *Eur J Cancer Prev.* 2006;15(4):353-61.
- Ju W, Wang X, Shi H, Chen W, Belinsky SA, Lin Y. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2007 May;71(5):1381-8.

- Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histological grade. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1599-1605.
- Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24(17): 2666-2672.
- Kane SV, Gupta M, Kakade AC, D' Cruz A. Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 795-803
- Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006;42(7):655-67
- Karim, M., McCormick, K., Kappagoda, C. Effects of cocoa procyanidins on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* 2000; 130(S): 2105S-2108S.
- Kawai, S.; Yomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci., Biotechnol., Biochem*. 1999, 63, 896-899.
- Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions [Review]. *Oncogene* 1997; 14:629-40.
- Kenny TP, Keen CL, Jones P, Kung HJ, Schmitz HH, Gershwin ME. Pentameric procyanidins isolated from *Theobroma cacao* seeds selectively downregulate ErbB2 in human aortic endothelial cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2004;229(3):255-63.
- Kern SE. Progressive genetic abnormalities in human neoplasia. En: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, et al. *The Molecular Basic of Cancer*. 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001, p 41-69.
- Keyes PH, Dale PP. A preliminary survey of the pouches and dentition of the Syrian hamster. *Ibid* 1944; 2S: 427.

- Kris-Etherton PM, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:41–9.
- Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B, Trop C, Bryne M. Tumor size, depth of invasion, and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 245-251.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619-642.
- Kumar A, Samarth RM, Yasmeen S, Sharma A, Sugahara T, Terado T, *et al.* Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita*. *Biofactors* 2004;22:87-91.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Patología Estructural y Funcional (Robbins y Cotran)*. Madrid: Ed. Elsevier, 7ª edición. 2005.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. *Patología Humana (Robbins)*. Madrid: Ed. Elsevier, 8ª edición, 2008.
- Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tomoyose T, Tanaka T, and others. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(6):329–33.
- La Vecchia C. Mouthwash and oral cancer risk: an update. *Oral Oncol.* 2009;45(3):198-200.
- Lee UL, Choi SW. The Chemopreventive Properties and Therapeutic Modulation of Green Tea Polyphenols in Oral Squamous Cell Carcinoma. *ISRN Oncology* 2011.
- Leedy DA, Trune DR, Kronz DJ, Weidner N, Cohen JI. Tumour angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Otolaryngology Head and Neck Surgery* 1994;111:417-422.

- Lepley DM and Pelling JC: Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. *Mol Carcinog* 19: 74-82, 1997.
- Li N, Chen X, Liao J, et al. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. *Carcinogenesis* 2002; 23:1307-13.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999; 20:1945–52.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*. 1999;20(10):1945-52.
- Lim YC, Lee SH, Song MH, et al. Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. *Eur J Cancer* 2006; 42: 3260-6.
- Lindenmeyer F, Li H, Menashi S, Soria C, Lu H. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr Cancer*. 2001;39(1):139-47.
- Lippma SM, Hong WK: Second malignant tumors in head and neck squamous cell carcinoma: the overshadowing threat for patients with early-stage disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17:691.
- Liu LZ, Fang J, Zhou Q, Hu X, Shi X, Jiang BH. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 635–43.
- Liu X, Zhang DY, Zhang W, Zhao X, Yuan C, Ye F. The effect of green tea extract and EGCG on the signaling network in squamous cell carcinoma. *Nutr Cancer*. 2011;63(3):466-75.

- Ludwig, A.; Lorenz, M.; Grimbo, N.; Steinle, F.; Meiners, S.; Bartsch, C.; Stangl, K.; Baumann, G.; Stangl, V. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 316, 659-665.
- Magee P.N. Toxic liver injury: The metabolism of dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* 1956; 64(4):676-682.
- Manach C, Scalbert A, Monand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79(5), 727-47.
- Manoharan S, Balakrishnan S, Menon VP, Alias LM, Reena AR. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med J.* 2009; 50(2): 139-46.
- Manoharan S, Vasanthaselvan M, Silvan S, Baskaran N, Kumar Singh A, Vinoth Kumar V. Carnosic acid: a potent chemopreventive agent against oral carcinogenesis. *Chem Biol Interact.* 2010; 188(3): 616-22.
- Mantena, S.K.; Baliga, M.S.; Katiyar, S.K. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2006, 27, 1682-1691.
- Manthey JA, Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 5837–43
- Mao L, et al: Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nature Med* 1996; 2:682.
- Marquardt, H. Chemical Carcinogenesis. In: Marquardt H, Schafer SG, McClellan RD, Welsch F. (Eds.) *Toxicology* 1999; 7: 151-179.
- Martinez-Valverde I, Periago M, Ros G. Nutritional meaning of the phenolic compounds from the diet. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición* 2000; 50(1):5.

- Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod* 2006; 102: 67-76.
- Masuda M, Suzui M, Weinstein IB. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):4220-9.
- Masuda M, Suzui M, Weinstein IB. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):4220-9.
- Mathur, S., Devaraj, S., Grundy, S., Jailal, I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr* 2002; 132: 3663-3667.
- McCullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Aust Dent J*. 2008;53(4):302-5.
- McGlynn Ka, Hunter K, LeVoyer T, Rousch J, Wise P, Michielli RA et al. Susceptibility to aflatoxin B1- related primary hepatocellular carcinoma in mice and Humans. *Cancer Res* 2003; 63(15): 4594-601.
- McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res*. 2006;20(7):519-30.
- Meier JD, Enepekides DJ, Poirier B, Bradley CA, Albala JA, Farwell DG. Treatment With 1-Alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (Vitamin D3) to Inhibit Carcinogenesis in Hamster Buccal Pouch Model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 133(11): 1149-1152.
- Meng CL. Experimental carcinogenesis. *Bull Dept Dent NDMC* 1982; 12: 18-34

- Merchant A, Husain SSM, Hosain M, Fikree FF, Pitiphat W, Siddiqui AR, Hayder SJ, Haider SM, Ikram M, Chuang SK, Saeed SA. Paan without tobacco: An independent risk factor for oral cancer. *Int. J. Cancer* 2000; 86, 128–131.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharmacol* 2000; 52: 673–839.
- Miller EG, Peacock JJ, Bourland TC, Taylor SE, Wright JM, Patil BS, et al. Inhibition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. *Nutr Cancer* 2008; 60: 69-74.
- Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, Osawa T. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver *Life Sci.* 2003;72(14):1609-16.
- Miyake Y, Yamamoto K, Osawa T. Metabolism of antioxidant in lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) by human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem* 1997; 45:3738–3742.
- Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* 1998; 33: 689–695.
- Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 2009; 45(4-5): 324-34
- Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Dent Res* 1961; 40: 3–15.
- Muñoz-Guerra MF, Capote Moreno AL, Gómez Marazuela EM, Gamallo Amat C. Estadios precoces de cáncer oral: pronóstico en relación con gradación histológica, linfagiogénesis intratumoral y expresión de factor de crecimiento endotelial vascular Tipo-C (VEGF-C). *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* 2006; 28: 25-40.

- Murphy GP, Lawrence W, Lenhhardt RE: American Cancer society Textbook of clinical Oncology, 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society 1995.
- Muscarella P, Knobloch TJ, Ulrich AB, Casto BC, Moniaux N, Wittel UA, et al. Identification and sequencing of the Syrian Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) p16(INK4a) and p15(INK4b) cDNAs and their homozygous gene deletion in cheek pouch and pancreatic tumour cells. *Gene* 2001;278(1-2): 235–43.
- Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122(1): 44-51.
- Myung SK, Bae WK, Oh SM, Kim Y, Ju W, Sung J, Lee YJ, Ko JA, Song JI, Choi HJ. Green tea consumption and risk of stomach cancer: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Int J Cancer* 2009; 124: 670– 7.
- Nair S, Pillai M: Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 2005; 11:350-359.
- Nakachi K, Imai K, Suga K. Epidemiological evidence for prevention of cancer and cardiovascular disease by drinking green tea. In: H. Ohigashi, T. Osawa, J. Watanabe and T. Yoshikawa, Editors, *Food Factors for Cancer Prevention*, Springer, Tokyo (1996), pp. 105–108.
- Nakatani N. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors*. 2000; 13(Suppl1-4):141–146.
- Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck*. 1996;18(5):441-9.
- Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002;52:195-215.

- Nogata Y, Ohta H, Ishii T, Sekiya K. Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-O-rutinoside) as an arachidonate lipoxygenase inhibitor from Lumie fruit (*Citrus lumia*) and its distribution in citrus species. *J Sci Food Agric* 2007; 87(1): 82–9.
- Nunez F, Dominguez O, Coto E, Suarez-Nieto C, Perez P, Lopez-Larrea C. Analysis of ras oncogene mutations in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Surg Oncol* 1992; 1: 405–11.
- Offord EA, Macé K, Ruffieux C, Malnoë A, Pfeifer AM. Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*. 1995; 16(9): 2057-62.
- Ogata S, Miyake Y, Yamamoto K, Okumura K, Taguchi H. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and its metabolites in HL-60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000; 64: 1075-1078.
- Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, Lane DP. Assessment of p53 protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. *J Pathol* 1992;166:389-394.
- Ohno M, Sakamoto KQ, Ishizuka M, Fujita S. Crude cacao *Theobroma cacao* extract reduces mutagenicity induced by benzo[a]pyrene through inhibition of CYP1A activity in vitro. *Phytother Res.* 2009;23(8):1134-9.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Terao J, Kondo K: Catechins and their oligomers linked by C4 --> C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. *Exp Biol Med* (Maywood) 2002; 227(1): 51-56.
- Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, Yasuda A, Yanagisawa R, Inoue K, Yoshikawa T. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *Biofactors*. 2004; 21: 127–31.

- Pan, M. H.; Chen, W. J.; Lin-Shiau, S. Y.; Ho, C. T.; Lin, J. K. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclindependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1677–1684.
- Papadimitrakopoulou VA, Hong WK, Lee JS, Martin JW, Lee JJ, Batsakis JG, Lippman SM. Low-dose isotretinoin versus beta-carotene to prevent oral carcinogenesis: long-term follow-up. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(3):257-8.
- Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;118:3030–3044. doi: 10.1002/ijc.21731.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
- Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007;30(1):233-45.
- Pavia M, Pileggi C, Nobile CGA, Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 2006; 86:1126-1134
- Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 1999; 287: 821-828.
- Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver. *Eur J Cancer Prev.* 2008;17(4):340-4.
- Peng CH, Su JD, Chyau CC, Sung TY, Ho SS, Peng CC, Peng RY. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(9): 2223-32.
- Petersen M, Simmonds MS. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003;62:121–5.

- Petersen PE. Strengthening the prevention of oral cancer: the WHO perspective. *Community dentistry and oral epidemiology* 2005; 33(6): 397-399.
- Petersen PE. Oral cancer prevention and control – The approach of the World Health Organization. *Oral Oncol* 2009; 45(4–5): 454–60.
- Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2007; 357(25): 2552-2561.
- Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* 2004; 39(3):155-65.
- Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB:. Targeting Inflammatory Pathways by Flavonoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Planta Med* 2010; 76: 1044–1063.
- Priyadarsini RV, Manikandan P, Kumar GH, Nagini S. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit hamster cheek pouch carcinogenesis by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA damage, antioxidants, invasion and angiogenesis. *Free Radic Res* 2009; 43, 492–504.
- Ramljak, D.; Romanczyk, L.J.; Metheny-Barlow, L.J.; Thompson, N.; Knezevic, V.; Galperin, M.; Ramesh, A.; Dickson, R.B. Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2005;4:537-546.
- Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res* 2008; 52: 507–526.
- Reed AL, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1996; 56(16): 3630-3633.
- Reichart PA, Zhang X. Misconceptions related to the areca nut chewing habits of Mainland China. *Oral Oncol*. 2007;43 (10):958–959

- Rein D, Lolito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 2000; 130: 2109-14.
- Rein, D., Paglieroni, T., Wun, T. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* 2000; 72, 30-35.
- Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2004. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2006.
- Ritter CA, Arteaga CL: The epidermal growth factor receptor-tyrosin kinase: a promising therapeutic target in solid tumors. *Semin Oncol* 2003; 30:3.
- Rodriguez J, Yañez J, Vicente V, Alcaraz M, Benavente-García O, Castillo J, Lozano JA. Effects of several flavonoids on the growth of B16 F10 and SK-Mel-1 Melanoma cell lines. Structure-activity relationship. *Melan Res*. 2002; 12: 99-107.
- Rodu B, Jansson C. Smokeless tobacco and oral cancer: a review of the risks and determinants. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(5): 252-63.
- Rosin MP, et al: Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6:357.
- Ross JA y Kasum CM: Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*, 2002, 22:19-34.
- Rousseau A, Lim MS, Lin Z, Jordan RC. Frequent cyclin D1 gene amplification and protein overexpression in oral epithelial dysplasias. *Oral Oncol* 2001; 37(3): 268-275.
- Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor –alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of head and neck. *Cancer* 1996; 78(6): 1284-1292.

- Sahu A, Rawal N, Pangburn MK. Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57: 1439–46.
- Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:226-32.
- Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian Hamster. *J Dent Res* 1954; 33: 253–62.
- Samman MA, Bowen ID, Taiba K, Antonius J, Hannan MA. Mint prevents shamma-induced carcinogenesis in hamster cheek pouch. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1795-801
- Sancheti G, Goyal PK. "Effect of Rosmarinus officinalis in modulating 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced skin tumorigenesis in mice." *Phytotherapy Research*; 2006; 20(11): 981-986.
- Santamaría J, Barbier L, Santamaría G. Tumores malignos de los tejidos blandos bucales, de los maxilares y de la mandíbula. En Echevarría JJ, Pumarola J, *El Manual de Odontología*. Barcelona: Masson, 2008, pp. 455-73.
- Santis H, Shklar G, Chauncey HH. Histochemistry of Experimentally Induced Leukoplakia and Carcinoma of the Hamster Buccal Pouch. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol* 1964; 17: 207-18.
- Saranath D, Chang SE, Bhoite LT, et al. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. *Br J Cancer* 1991; 63: 573–8.
- Sartor M, Steingrimsdottir H, Elamin F, Gaken J, Warnakulasuriya S, Partridge M, et al. Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *Br J Cancer* 1999;80:79-86.

- Sawair FA, Al-Mutwakel A, Al-Eryani K, Al-Surhy A, Maruyama S, Cheng J, Al-Sharabi A, Saku T. High relative frequency of oral squamous cell carcinoma in Yemen: qat and tobacco chewing as its aetiological background. *International Journal of Environmental Health Research* 2007; 17 (3): 185-195.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45(4): 287-306.
- Scheckel KA, Degner SC, Romagnolo DF. Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J Nutr.* 2008; 138(11): 2098-105.
- Schwartz JL, Shklar G, Flynn E, Trickler D. The administration of beta carotene to prevent and regress oral carcinoma in the hamster cheek pouch and the associated enhancement of the immune response. *Adv Exp Med Biol* 1990;262:77–93.
- Schwartz JL, Shklar G. Verification in syngeneic hamsters of in vitro transformation of hamster oral mucosa by 7,12- dimethylbenz(a)anthracene. *Eur J Cancer* 1997;33:431–8.
- Schwartz JL, Sloane D, Shklar G. Prevention and inhibition of oral cancer in the hamster buccal pouch model associated with carotenoid immune enhancement. *Tumour Biol* 1989;10:297–309.
- Schwartz JL. Molecular and biochemical control of tumour growth following treatment with carotenoids and tocopherols. In: Prasad K, Santamaria L, Williams RM, editors. *Nutrition and cancer prevention and treatment*. New Jersey: Humana Press; 1995. p. 287–316.
- Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions: computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. *J Am Dent Assoc* 1999;130:1445-57.
- Sciuba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase management. *JADA* 2001;132:12s-18s.

- Scully C. Oral cancer; The evidence for sexual transmission. *British Dental Journal* 2005; 199: 203–207.
- Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology. *Oral Oncol* 2007; 43(2):107-15.
- Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 599–612.
- Sharabani H, Izumchenko E, Wang Q, Kreinin R, Steiner M, Barvish Z, Kafka M, Sharoni Y, Levy J, Uskokovic M, Studzinski GP, Danilenko M. Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 2006; 118(12): 3012-21.
- Shklar G. Methabolic Characteristics of Experimental Hamster Pouch Carcinomas. *Ibid* 1965; 20: 336-339.
- Shklar G. Experimental oral pathology in the Syrian hamster. *Prog Exp Tumor Res* 1972; 16:518-38.
- Shklar G, Schwartz J, Trickler D, Reid S. Regression of experimental cancer by oral administration of combined alpha-tocopherol and beta-carotene. *Nutr Cancer*. 1989;12(4):321-5.
- Shklar G: Development of experimental oral carcinogenesis and its impact on current oral cancer research. *J Dent Res* 1999; 78:1768-1772.
- Shukla S, Gupta S. Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther* 2006;5(4):843-52.
- Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(10):1833-45.

- Shukla S, Gupta S. "Apigenin and Cancer Chemoprevention". En Biactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables. New York: Academic Press; 2010. Vol. 41, pp 665.
- Sidransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*. 1995; 7(3): 229-233.
- Silberman S, Shklar G. The effect of a carcinogen (DMBA) applied to the hamster buccal pouch in combination with croton oil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963; 16:1344-1360.
- Silvan S, Manoharan S, Baskaran N, Anusuya C, Karthikeyan S, Prabhakar MM. Chemopreventive potential of apigenin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced experimental oral carcinogenesis. *European Journal of Pharmacology* 2011; 670: 571-577.
- Silverman S Jr, Migliorati C, Barbosa J. Toluidine blue staining in the detection of oral precancerous and malignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984;57:379-82.
- Silverman S Jr. Oral cancer. 4^a ed. Hamilton: American Cancer Society, BC Decker; 1998. p. 25-33.
- Sindhu G, Manoharan S. Anti-clastogenic effect of berberine against DMBA-induced clastogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;107:818-24.
- Singletary KW, Nelshopp JM. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer Lett*. 1991; 60(2): 169-75.
- Slaga TJ, Huberman E, Digiovanni J. The importance of the "Bay Region" diol-epoxide in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene skin tumor initiation and mutagenesis. *Cancer let* 1979; 6: 213-220.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer* 1953; 6:962.

- Soni S, Kaur J, Kumar A, et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology* 2005; 68(4–6): 314–325.
- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976; 35: 1332-8.
- Sporn MB, Suh N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:537–43.
- Srinivasan P, Suchalatha S, Babu PV, Devi RS, Narayan S, Sabitha KE, Shyamala Devi CS. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. *Chem Biol Interact.* 2008;172(3):224-34.
- Srinivasan P, Suchalatha S, Babu PV, et al. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. *Chem Biol Interact* 2008; 172: 224-34.
- Stadler ME, Patel MR, Couch ME, Hayes DN. Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008;22(6):1099-124
- Stavric B. Mutagenic food flavonoids. *Federation Proceedings.* 1984; 43: 2454-2458.
- Steinberg FM, Holt RR, Schmitz HH and Keen CL. Cocoa procyanidin chain length does not determine ability to protect LDL from oxidation when monomer units are controlled. *J Nutr Biochem* 2002;13:645-652.
- Stich HJ, Parida BB, Brunnemann KD. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of reverse

- smokers, khaini tobacco chewers and gudakhu users. *Int J Cancer* 1992;50:172–6.
- Stott B, Wyse M. *Oncogenes: the (autosomal) dominant evil*. The Science Creative Quartely. 2003.
- Sumitani K, Kamijo R, Toyoshima T, et al. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines suppression of prostaglandin E2 production. *J Oral Pathol Med* 2001; 30(1):41-47.
- Suzuki R, Kohno H, Suzui M, Yoshimi N, Tsuda H, Wakabayashi K, Tanaka T. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis* 2006; 27(3):619–630.
- Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J: Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12(6):418-24.
- Takahashi T, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T. Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998; 62: 2199–2204.
- Takuji T, Mayu T, Takahiro T. Oral Carcinogenesis and Oral Cancer Chemoprevention: A Review. *Pathology Research International* 2011: 1-10.
- Talaska G: Aromatic amines and human urinary bladder cancer: exposure sources and epidemiology. *J Environ Sci Health Part C* 2003; 21:29.
- Tanaka T, Makita H, Ohinishi M, et al. Chemoprevention of 4- nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of beta-carotene. *Cancer Res* 1994; 54: 4653-59.

- Tanaka T. Chemoprevention of oral carcinogenesis. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995; 31B:3-15.
- Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modelles in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 301-13.
- Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schömig E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 298: 49–60
- Taylor LP, Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol.* 2005;8(3):317-23.
- Teicher B. (ed.) *Tumor Models in Cancer Research*. Totowa: Humana Press, 2002.
- Thilagaratnam CN, Main JHP. Changes in cell cycle characteristics in hámster cheek pouch epithelium during treatment with DMBA. *Journal of Oral Pathology* 1972; 1: 89-102.
- Thomas S, Wilson A. A quantitative evaluation of the aetiological role of betel quid in oral carcinogenesis. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1993;29B(4):265-71.
- Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 2007; 104: 466-479.
- Tsai YS, Lee KW, Huang JL, Liu YS, Juo SH, Kuo WR, Chang JG, Lin CS, Jong YJ. Arecoline, a major alkaloid of areca nut, inhibits p53, represses DNA repair, and triggers DNA damage response in human epithelial cells. *Toxicology* 2008; 249(2-3) :230-7.
- Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2002 Nov;31(10):598-604.

- Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 204-208
- Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, Yapijakis C, Patsouris E. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol*, 2008; 44:315-324.
- Vicente Ortega V, Martínez Conesa C, Yañez Gascón J, Alcaraz Baños M, Canteras Jordana M. Melanoma metastásico pulmonar. Efectos del etanol y de flavonoides. *Rev Esp Patol*. 2003; 36(4): 425-32.
- Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, *et al*. Identification of genes over expressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* 2000;110:374-81.
- Vlachopoulos C, Alexopoulos N, Stefanadis C, *et al*. Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals: cocoa instead of ambrosia? Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. *Curr Hypertens Rep* 2006; 8: 205–11.
- Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods*. 1992;151(1-2):237-44
- Walaszek Z, Hanausek M, Slaga TJ. Mechanisms of chemoprevention. *Chest*. 2004; 125: 128S-133S.
- Wallenius K, Lekholm U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitrocholine N-oxide. *Odontol Revy* 1973; 24(1):39–48
- Wan, Y., Vinson, J., Etherton, T., Proch, J., Lazarus, S., Kris-Etherton, P. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *J Am Clin Nutr* 2001; 74: 596-602.

- Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, Sesso HD. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am.J.Clin.Nutr.* 2009; 89(3): 905-912.
- Wang W, Heideman L, Chung CS, Pelling JC, Koehler KJ, Birt DF. Cellcycle arrest at G2-M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* 2000; 28: 102–10.
- Wang, W.; Heideman, L.; Chung, C.S.; Pelling, J.C.; Koehler, K.J.; Birt, D.F. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.* 2000, 28, 102-110.
- Warnakulasuriya KA, Johnson NW: Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* 1992; 21:404-408.
- Warnakulasuriya KA. Association of overexpression of p53 oncoprotein with the state of cell proliferation in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1994; 23:246-0.
- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; 45: 309-316.
- Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res* 1990; 50: 499–502.
- Wei FX, Liu JX, Wang L, Li HZ, Luo JB. Expression of bcl-2 and bax genes in the liver cancer cell line HepG2 after apoptosis induced by essential oils from *Rosmarinus officinalis*. *Zhong Yao Cai.* 2008; 31(6):877-9.
- Weinstein IB. The Origins of Human Cancer: Molecular Mechanisms of Carcinogenesis and Their Implications for Cancer Prevention and Treatment. Twenty-Seventh G. H. A. Memorial Lecture. *Cancer Res* 1988; 48: 4135-4143.
- Welbourne JP. The biology of cancer. En: Marx RE, Stern D. Oral and maxillofacial pathology. A rationale for diagnosis and treatment. Chicago: Quintessence Publishing Co. 2003; pp. 283-90.

- Whitsett, T., Carpenter, M., Lamartinere, C., Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats, *J. Carcinog.* 2006, 5, 15 –25.
- Wilkey JF, Buchberger G, Saucier K, et al. Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline- 1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. *Mol Carcinog* 2009; 48: 853–61.
- Willett W C. Dieta, nutrición y prevención del cancer. En: *Nutrición en salud y enfermedad*. 9ª ed. Mc Graw Hill, México, 2002; 2:1441-1452.
- Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol* 2000; 53: 165–72.
- Willis RA. *The Spread of Tumours in the Human Body*. London, Butterworth & Co, 1952.
- Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 20049-20052.
- Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and qualification. *Food Res.* 2000; 33:423-477.
- Wong DTW. TGF and oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 1993;29:3–7.
- Yamamoto, H., Sakakibara,J., Nagatsu,A. and Sekiya,K. Inhibitors of arachidonate lipoxygenase from defatted perilla seed. *J. Agric. Food Chem* 1998; 46: 862-865.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT and Newmark HL: Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21: 381-406, 2001.
- Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 25-54.

- Yang SF, Yang WE, Kuo WH, Chang HR, Chu SC, Hsieh YS. Antimetastatic potentials of flavones on oral cancer cell via an inhibition of matrix-degrading proteases. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 287–294.
- Yang SF, Yang WE, Kuo WH, Chang HR, Chu SC, Hsieh YS. Antimetastatic potentials of flavones on oral cancer cell via an inhibition of matrix-degrading proteases. *Arch Oral Biol*. 2008 Mar;53(3):287-94.
- Yang Y, Zhou ZT, Ge JP. Effect of genistein on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamster. *Carcinogenesis*. 2006;27(3):578-83.
- Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-García O, Canteras M, Lozano Teruel JA. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition and Cancer*. 2004; 49(2): 191-99.
- Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 1999; 9: 369–376.
- Yin F, Giuliano AE, Law RE, Van Herle AJ. Apigenin inhibits growth and induces G2-M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 2001; 21: 413–20.
- Zern, T.L.; Wood, R.J.; Greene, C.; West, K.L.; Liu, Y.; Aggarwal, D.; Shachter, N.S.; Fernandez, M.L. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J. Nutr.* 2005, 135, 1911-1917.
- Zhang ZF, et al.: Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8(12): 1071-8.
- Zhang X, Reichart PA. A review of betel quid chewing, oral cancer and precancer in Mainland China. *Oral Oncol*. 2007; 43(5): 424–430
- Zheng P.W. et al. Apigenin induced apoptosis through p53- dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci* 2005; 76: 1367–1379.).

Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in neck and head cancer: its role and treatment implications. Radiation oncology (London, England) 2006; 1:11.

Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C, et al. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. Int JCancer. 2003; 105(5): 681-6.

Zur Hausen H: Oncogenic DNA viruses. Oncogene 2001; 20:7820.

Zur Hausen H: Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002, 2:342-350.

ANEXO I. CERTIFICADO DE APROBACIÓN DE LA COMISIÓN BIOÉTICA.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Investigación



COMISIÓN DE BIOÉTICA

INFORME DE LA COMISIÓN DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

D. Francisco Alonso de Vega, Profesor Titular de Universidad, miembro de la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia, en funciones de Secretario.

CERTIFICA:

Que D^a. Beatriz Baldasqín Cáceres ha presentado el proyecto de tesis "*Efecto de los compuestos fenólicos apigenina, catequinas del cacao, ácido rosmarínico y eriocitrina sobre la carcinogenesis oral inducida por DMBA en hamsters*" a la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo establecido el día 19 de septiembre de 2011¹, acuerda por unanimidad emitir informe favorable, desde el punto de vista bioético, **CONDICIONADO** a que en el Proyecto se incluya la referencia específica y se tenga en cuenta el contenido (no sólo de número de animales, sino de otros extremos como forma de sacrificio... etc.) de lo dispuesto en la legislación española, en concreto el RD 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, en la Ley 32/2007 de 7 de noviembre para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio así como lo establecido en la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Diario Oficial de la Unión Europea).

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión, en Murcia 19 de septiembre de 2011.

Vº Bº
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN
DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Fdo.: Gaspar Ros Berruezo

¹ A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de noviembre de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del P.A.C. (B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

ANEXO II. ABREVIATURAS.

4NQO 4-nitroquinolina 1-óxido

u-PA Uroquinasa-activador del plasminógeno

PA Plasminógeno

8-OHdG 8-hidroxideoxiguanosina

Ac Anticuerpo

ADN Ácido desoxirribonucleico

ANOVA Análisis de varianza

Apaf-1 Factor activador de proteasas apoptóticas

ARN Ácido ribonucleico

Bak Proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2

B[a]P Benzo[a]pireno

Bax Proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2

Bcl-2 Proteína fundadora de la familia de proteínas reguladoras de la apoptosis

Bcl-XL Proteína anti-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2

CDK Quinasa dependiente de ciclinas

CDKi Inhibidor de las quinasas dependiente de ciclinas

COX- 2 Ciclooxygenasa 2

DMBA Dimetil-benzo[a]antraceno

DMSO Dimetil sulfóxido

EGCG Galato epigallocatequina

ANEXO II. ABREVIATURAS.

EGF Factor de crecimiento epidérmico

EGF-R Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ERK Quinasa regulada por señales extracelulares

H-ras Harvey ras (oncogen familia ras)

HTLV-1 Virus tipo 1 de la leucemia humana de células T

HVSK Herpesvirus del sarcoma de Kaposi

IARC Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IC Concentración inhibitoria

INK Inhibidor de quinasa

KOH Hidróxido de potasio

K-ras Kisten ras (oncogen familia ras)

MAPK Proteína quinasa activada por mitógenos

MEK Proteína quinasa MAPK

N-ras Neuroblastoma ras (oncogen familia ras)

p21 Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas

p53 Proteína supresora de tumores

PG Prostaglandina

PET Tomografía por emisión de positrones

pRB Proteína retinoblastoma

RL Radical libre

ANEXO II. ABREVIATURAS.

ROS Especie reactiva de oxígeno

RM Resonancia magnética

TAC Tomografía axial computarizada

TNF Factor de necrosis tumoral

u-PA Uroquinasa-activador del plasminógeno

UV Ultravioleta

VEB Virus Epstein-Barr

VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular

VHB Virus de la hepatitis B

VHC Virus de la hepatitis C

VIH Virus de inmunodeficiencia humana

VPH Papilomavirus humano