



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

**“ESTUDIO *IN VITRO* DE LOS EFECTOS DEL RESVERATROL Y
LA IRRADIACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD, APOPTOSIS,
MIGRACIÓN Y EL CICLO CELULAR EN EL CARCINOMA ORAL
DE CÉLULAS ESCAMOSAS”**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

ANTONIO NAVARRO ATIÉNZAR

MURCIA, 2012

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. CÁNCER ORAL.....	7
1.1.1. Generalidades.....	7
1.1.2. Clasificación de los tumores malignos de los tejidos blandos orales.....	8
1.1.3. Carcinoma oral de células escamosas.....	9
1.1.4. Epidemiología.....	10
1.1.5. Etiopatogenia.....	11
1.1.6. Etapas del desarrollo del cáncer.....	12
1.1.7. Apoptosis celular: rutas de señalización.....	13
1.1.8. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento.....	17
1.2. ANTIOXIDANTES.....	20
1.2.1. Generalidades.....	20
1.2.2. Polifenoles.....	21
1.2.2.1. Estructura y tipos de polifenoles.....	21
1.2.2.2. Frecuencia y contenido.....	25
1.2.2.3. Biodisponibilidad y metabolismo.....	27
1.2.2.4. Polifenoles y enfermedades humanas.....	29
1.2.2.5. Polifenoles y cáncer.....	32
1.2.3. Resveratrol.....	34
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	40
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	41
2.2. OBJETIVOS.....	42
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	44
3.1. MATERIAL.....	45
3.2. MÉTODOS.....	51
3.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	56

4. RESULTADOS.....	59
4.1. Efecto del resveratrol y la irradiación sobre la viabilidad celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.....	60
4.2. Efecto del resveratrol y la irradiación sobre la apoptosis celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.....	65
4.3. Efecto del resveratrol y la irradiación sobre la migración celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA PJ 15.....	69
4.4. Efecto del resveratrol y la irradiación sobre el ciclo celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.....	73
5. DISCUSIÓN.....	78
6. CONCLUSIONES.....	84
7. BIBLIOGRAFÍA.....	86

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Apaf-1: factor activador de proteasas apoptóticas-1.

Bad: inductor de muerte asociado a Bcl-2 (subfamilia BH3).

Bax: proteína proapoptótica X asociada a Bcl-2 (subfamilia Bax).

Bak: proteína proapoptótica asociada a Bcl-2 (subfamilia Bax).

Bcl-2: proteína antiapoptótica identificada en el gen 2 del linfoma de células B.

BclxL: proteína antiapoptótica identificada en el gen extra-largo del linfoma de células B.

BH: dominios de homología a Bcl-2.

Bid: inductor de muerte asociado a Bcl-2 (subfamilia BH3).

Bik: inductor de muerte asociado a Bcl-2 (subfamilia BH3).

BimL: inductor de muerte asociado a Bcl-2 (subfamilia BH3).

BIP: proteína de unión a inmunoglobulina.

Bok/mtd: proteína proapoptótica asociada a Bcl-2 (subfamilia Bax).

COCE: carcinoma oral de células escamosas.

COX: ciclooxygenasa.

DD: dominios de muerte.

DED: dominio efector de muerte.

DISC: complejo de señalización inductor de muerte.

DMEM: medio de Eagle modificado de Dulbecco.

DMSO: dimetil sulfóxido.

DR5: receptor de muerte 5.

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético.

ER: retículo endoplasmático.

FADD: proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte citosólico.

Fas: proteína de superficie con un dominio de muerte celular.

Fas-L: ligando de Fas.

GRP78: proteína reguladora de glucosa 78.

Gy: gray.

HDL: lipoproteína de alta densidad.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

IMDM: medio Iscove modificado de Dulbecco.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolo.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida).

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NOXA: inductor de muerte asociado a Bcl-2 (subfamilia BH3).

O₂⁻: anión superóxido.

OH $\cdot$: radical hidroxilo.

PARP: poliADPribosa sintetasa.

PBS: tampón fosfato salino.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PUMA: inductor de muerte asociado a Bcl-2 (subfamilia BH3).

RNasa: ribonucleasa A.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RSV: resveratrol.

SBF: suero bovino fetal.

SFN: sulforafano.

SIRT-1: sirtuina-1.

TNF: factor de necrosis tumoral.

TRAIL: ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER ORAL.

1.1.1. Generalidades

El cáncer representa un importante problema de salud pública que afecta a muchos países alrededor del mundo, y el cáncer oral es uno de los 10 tipos más comunes de cáncer (Scully C y cols., 2005). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 35 - 55% de los cánceres humanos y aproximadamente el 15% de los cánceres de la orofaringe pueden atribuirse a deficiencias en la alimentación o a dietas no balanceadas (Taghavi N y Yazdi I, 2007).

La nutrición y la salud están estrechamente relacionadas, ya que la desnutrición puede poner en peligro nuestra salud. Las consecuencias son un mayor riesgo de desarrollar determinadas enfermedades. De éstas, el cáncer es de especial importancia, ya que ocupa el segundo lugar entre las causas más importante de muerte prematura en adultos a nivel mundial, después de las enfermedades cardiovasculares (Gallus S y cols., 2003).

El cáncer es el resultado de la transformación de células normales debido a mutaciones en el ADN, carcinógenos genotóxicos y promoción del crecimiento de las células mutadas por sobreexpresión de determinados factores. Así, el cáncer es el producto de la interacción de los factores genéticos y factores ambientales como la radiación ionizante, tabaquismo, agentes infecciosos y factores dietéticos, que se desarrolla a lo largo de un tiempo y pasa por muchas etapas (Taghavi N y Yazdi I, 2007).

La hipótesis actual en la carcinogénesis del cáncer oral es que existe una acumulación de mutaciones genéticas en las células epiteliales de la cavidad oral y mutágenos en el tabaco (posiblemente facilitados por el alcohol) identificados como agentes etiológicos. Se estima que el 75% de todos los

cánceres de boca en los países occidentales pueden ser atribuidos al tabaco y al alcohol (Madani AH y cols., 2012).

1.1.2. Clasificación de los tumores malignos de los tejidos blandos orales.

En función del tejido del que derivan encontramos (Tabla 1):

Tabla 1: CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES MALIGNOS DE LOS TEJIDOS BLANDOS ORALES (García V y Bascones A, 2009).

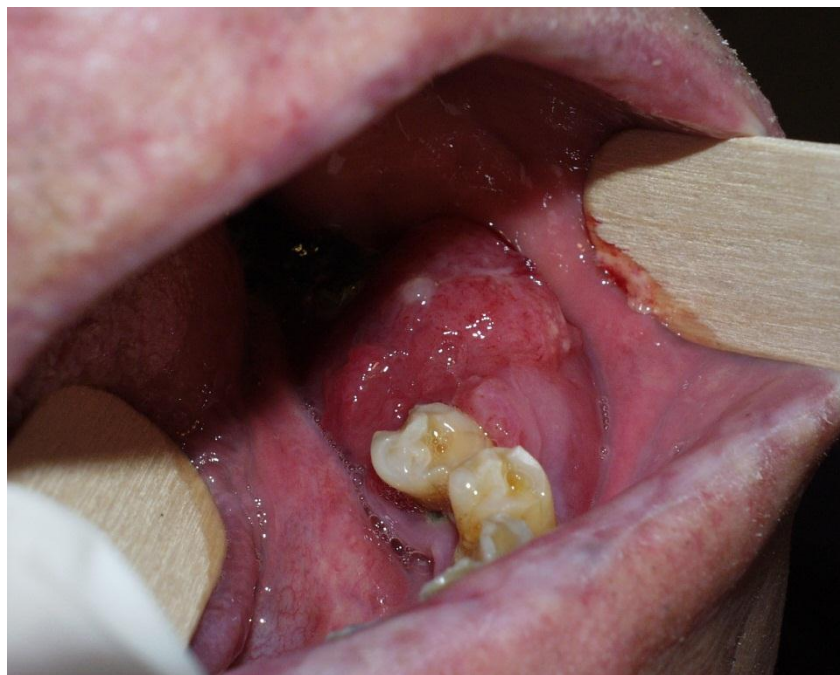
1. Tumores malignos derivados del epitelio:
-Carcinoma oral de células escamosas o epidermoide (90%)
-Carcinoma verrucoso
-Carcinoma de células fusiformes
-Melanoma
-Adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide
-Carcinoma basocelular
2. Tumores malignos derivados del tejido conectivo:
-Fibrosarcoma
-Fibrohistocitoma maligno
-Liposarcoma
-Angiosarcoma
-Neurosarcoma
-Rabdomiosarcoma
-Leiomiomasarcoma
3. Metástasis en partes blandas de la cavidad bucal
4. Neoplasias del sistema inmune con afectación oral
-Linfoma No Hodgkin
-Plasmocitoma-mieloma múltiple

1.1.3. COCE.

En la cavidad bucal, el carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más frecuente. A pesar de la fácil accesibilidad a la cavidad oral para el examen visual directo, los tumores malignos son a menudo no detectados con la suficiente antelación y, como resultado, la tasa de supervivencia del cáncer oral se ha mantenido esencialmente sin cambios en los últimas 3 décadas (Pereira MC y cols., 2007).

El COCE es el más frecuente de los tumores malignos de cabeza y cuello, representando aproximadamente el 3% de los tumores malignos del organismo y es responsable de más de quinientos mil nuevos cánceres diagnosticados cada año en todo el mundo (Figura 1) (Fan S y cols., 2011).

Figura 1: Carcinoma oral de células escamosas en paciente masculino de 72 años.



1.1.4. Epidemiología.

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) de cabeza y cuello es uno de los principales problemas de salud en todo el mundo. Suele aparecer en pacientes mayores de 50 años de edad. Alrededor de 47.000 casos de COCE se estima que se produjeron en el año 2009, con una previsión de 11.000 muertes ocasionadas por la enfermedad (Falaki y cols., 2011).

El COCE es una causa importante de morbilidad y mortalidad con una tasa de supervivencia a los 5 años que es menor del 50%. Una causa común de mortalidad en los pacientes que sufren la enfermedad es la aparición de un segundo tumor primario, que se produce a un ritmo anual del 3% al 5% (Braakhuis y cols., 2002; Kim JV y cols., 2010).

La incidencia en España es de 5,7-12,9 casos por 100.000 hombres/año y de 0,6-2,1 casos por 100.000 mujeres/año, aunque estas cifras se están igualando con la adopción por parte de la mujer de hábitos nocivos similares a los de los hombres (García V y Bascones A, 2009).

En el pasado, COCE se encontraba principalmente en hombres de edad avanzada con factores de riesgo como el tabaco y el consumo excesivo de alcohol (Zygogianni AG. y cols., 2011), sin embargo; varios estudios han demostrado que actualmente entre el 1 y 6 por ciento de los cánceres orales se presentan en pacientes menores de 40 años de edad (Shiboski CH y cols., 2005; Falaki F y cols., 2011). Aunque ha habido una tendencia decreciente en la incidencia general de COCE, la incidencia en adultos jóvenes parece estar aumentando en todo el mundo (Sasaki y cols., 2005; Toner M y O'Reagan, 2009).

Parece que el comportamiento biológico y la etiología del COCE en pacientes jóvenes son diferentes a los grupos de mayor edad y algunos estudios indican que el cáncer oral en pacientes jóvenes es más agresivo (Kuriakose M y cols., 1992).

1.1.5. Etiopatogenia.

Podríamos empezar diciendo que la etiología del cáncer oral es desconocida, sin embargo, existen una serie de factores de riesgo que podrían actuar como agentes carcinogénicos favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (García V y Bascones A, 2009).

El tabaco es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de lesiones premalignas y del cáncer oral, en especial del COCE. 8 de cada 10 pacientes con cáncer oral son fumadores de tabaco en sus diversas formas: cigarrillos, puros, tabaco de mascar, tabaco en pipa, etc. Los componentes más carcinogénicos del tabaco son la nicotina, hidrocarburos aromáticos polinucleares y el polonium, siendo perjudiciales localmente y favoreciendo la absorción de sustancias carcinógenas (Rodu B y Jansson C, 2004).

Baan R y cols., 2007, han examinado los efectos de beber alcohol con el riesgo de cáncer, siendo el etanol de las bebidas alcohólicas un carcinógeno clasificado para los seres humanos. Una relación de causalidad se ha establecido entre el consumo de alcohol y el cáncer del tracto aerodigestivo superior.

Desde hace tiempo se reconoce que existe una fuerte asociación entre el consumo excesivo de alcohol y el tabaquismo. Aproximadamente el 80% de los pacientes dependientes del alcohol, fuman cigarrillos. Además, la dependencia a la nicotina parece más grave en los fumadores con una historia de dependencia al alcohol. El uso concomitante de tabaco y el alcohol contribuye a una mayor incidencia de varios tumores malignos, especialmente en cánceres de cabeza y cuello. Las personas que fuman y beben alcohol son casi 38 veces más propensas a desarrollar un cáncer de cabeza y cuello que las personas que no lo hacen (Zygogianni AG y cols., 2011).

En el estudio de Morita M y cols., 2002, encontraron que las mutaciones en el gen p53 estaban presentes más a menudo en los tumores de los bebedores de alcohol que fumaban cigarrillos (76% de los 105 pacientes estudiados) que en los no bebedores que fumaban cigarrillos (42% de los pacientes) o en los no bebedores que no fumaban (14% de los pacientes).

Aparte de los factores de riesgo principales como son el tabaco y el alcohol, se incluyen otros como mala alimentación, el virus del papiloma humano, la inmunosupresión, radiaciones solares e ionizantes, el liquen plano, el consumo de marihuana, la mala higiene dental, la fibrosis oral submucosa, el reflujo gastroesofágico y varios síndromes hereditarios (García V y Bascones A, 2009).

También es importante resaltar que una historia familiar de cáncer se asocia con un inicio temprano del COCE y los cánceres ocurren en grupos familiares con hábitos de riesgo diferentes que sugieren que la enfermedad no sólo se debe a que las familias tienden a tener los mismos hábitos (Toner M y O'Regan EM, 2009; Coutinho-Camillo CM y cols., 2010).

1.1.6. Etapas del desarrollo del cáncer.

La carcinogénesis es un proceso secuencial que implica la transformación de una célula normal en una célula tumoral. Este proceso requiere la acción acumulativa de una serie de acontecimientos en un clon celular (Boyle P y Levin B, 2000). En este sentido, se considera que para alcanzar la malignidad, las células deben adquirir ciertas características transformantes:

1. Autosuficiencia de crecimiento celular y potencial replicativo ilimitado.
2. Indiferencia a señales antiproliferativas.
3. Evasión de la apoptosis.

4. Capacidad de inducir y mantener la angiogénesis.
5. Capacidad de invadir otros órganos y desencadenar metástasis.

Esta secuencia de eventos, puede resumirse en un modelo simple que presenta tres fases de intervención “iniciación-promoción-progresión” para prevenir, ralentizar o revertir el proceso de transformación tumoral:

- Iniciación: fase relativamente rápida pero reversible que comprende la exposición de las células a un agente carcinogénico, así como su distribución y transporte a los órganos y tejidos donde puede producirse su activación metabólica, detoxificación y la interacción de las especies reactivas con el ácido desoxirribonucleico (ADN) celular para provocar un daño oxidativo.
- Promoción: fase relativamente larga en comparación con la fase previa y en la que la célula dañada persiste, se replica y puede originar un foco de células preneoplásicas. En esta fase se producen también procesos de angiogénesis.
- Progresión: fase final e irreversible de la carcinogénesis en la que se produce un crecimiento descontrolado de las células tumorales que gradualmente pasan de ser células premalignas a células neoplásicas y aumentan su potencial de invasividad, por lo que pueden llegar a invadir nuevos tejidos diana (metástasis) (Surth YJ, 2003).

1.1.7. Apoptosis celular: rutas de señalización.

La apoptosis o muerte celular programada, que fue descrita por primera vez en 1972 por Kerr JF y cols., es un mecanismo de “suicidio celular” genéticamente definido. Fisiológicamente, la apoptosis interviene en la eliminación de los tejidos dañados, el desarrollo embrionario, la renovación tisular y la regulación del sistema inmune (MacFarlane M y Williams AC, 2004;

Ramos S, 2007). No obstante, en ciertas ocasiones se produce un defecto en su regulación que puede conducir a diversas enfermedades. Así, el incremento de la tasa de apoptosis contribuye al desarrollo de enfermedades degenerativas como el Parkinson o enfermedades autoinmunes, mientras que la falta de respuesta a las señales apoptóticas puede conducir al desarrollo del cáncer (Ramos S, 2007).

En este sentido, la modulación de la expresión y la activación de los componentes moleculares claves en el proceso apoptótico se considera una estrategia terapéutica muy importante en este tipo de enfermedades (Rawal RM y cols., 1999; Ramos S, 2007; Ramos S 2008).

La apoptosis es un proceso complejo que conduce a la muerte celular programada, afectando ya sea a la mitocondria (la vía intrínseca) o la activación de receptores de muerte celular (vía extrínseca). Las vías intrínseca y extrínseca inducen la activación de caspasas, que se clasifican como caspasas iniciadoras (caspasas-2, -8, -9 Y -10) y caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7). A continuación, las dos vías convergen para inducir la activación de la caspasa-3, lo que lleva a la apoptosis. Daños en el ADN y el estrés oxidativo son las señales comunes que activan la apoptosis por la vía mitocondrial, lo que lleva a la ruptura de la membrana mitocondrial y la liberación al citoplasma del citocromo C (Hu ML, 2011).

Ruta intrínseca de la apoptosis

Diversos estímulos apoptóticos convergen en la inducción de la apoptosis a través de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, lo que conduce a la activación de la caspasa iniciadora (caspasa-9).

Un paso crítico en la activación de esta ruta es la liberación selectiva de polipéptidos desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma, como el componente de la cadena de transporte electrónico del citocromo C. A continuación, el citocromo C se une a una molécula de andamiaje denominada Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas-1), que tras un cambio en su

conformación promovido por 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP), se une a la procaspasa-9. Finalmente, el conjunto de múltiples moléculas de Apaf-1 y la caspasa-9 activa forman un complejo de más de 700 kDa denominado "apoptosoma" que induce la activación proteolítica de la caspasa-3, inicia el desensamblaje celular y provoca la muerte programada de la célula (Green DR y Kroemer G, 2004; MacFarlane M y Williams AC, 2004).

Los miembros de la familia bcl-2 (gen 2 del linfoma de células B) constituyen las principales moléculas reguladoras de la vía intrínseca de la apoptosis. Se han descrito aproximadamente 20 polipéptidos que dependiendo de su función y estructura pueden dividirse en tres grupos (Cory S y cols., 2003):

-Grupo I: se incluyen los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bcl-2, BclxL, etc.). Se caracterizan por contener 4 dominios BH (dominio de homología Bcl-2) y conservados (BH1-BH4). Además, la mayoría de los miembros de este grupo contiene un dominio transmembrana C-terminal que los une a la superficie citoplásmica de las membranas intracelulares, como la membrana mitocondrial externa.

-Grupo II: en este grupo se encuentran los miembros proapoptóticos que se caracterizan porque carecen del dominio BH4 N-terminal, pero contienen otros dominios BH (Bax, Bak y Bok/mtd).

-Grupo III: en este grupo se incluyen los miembros proapoptóticos que sólo comparten una secuencia limitada de homología en el dominio BH3 con el resto de los miembros de la familia Bcl-2 (Bid, Bad, Bik, Bim, PUMA, NOXA, etc.) (Cory S y cols., 2003).

El balance entre los niveles de expresión y el estado de los miembros pro- y antiapoptóticos de esta familia de proteínas va a determinar la liberación del citocromo C. Bax y Bak son los miembros encargados de mediar directamente la liberación del citocromo C al citoplasma (Cory S y cols., 2003; MacFarlane M y Williams AC, 2004).

Ruta extrínseca de la apoptosis

La activación de esta ruta apoptótica comienza en la superficie celular tras la unión de un ligando específico, que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF, Fas-L, TRAIL, etc) al dominio extracelular de su respectivo receptor de muerte, perteneciente a la superfamilia del receptor del TNF (TNFR). El conjunto de TNFR tiene en su región intracelular los “dominios de muerte” (DD) esenciales para transducir el estímulo apoptótico, siendo la ruta de señalización mediada por el receptor de muerte Fas la que mejor se conoce (MacFarlane M y Williams AC, 2004).

El ligando de Fas (Fas-L) se une a su receptor e induce la agregación de otros receptores de Fas, los cuales una vez activados reclutan a las proteínas adaptadoras FADD, que también tienen en su estructura dominios DD. Las proteínas FADD poseen además un “dominio efector de muerte” (DED) que les sirve para reclutar a las caspasas iniciadoras (caspasas-8 ó -10). El ensamblaje de todas estas proteínas forma un complejo denominado complejo de señalización inducido por muerte (DISC) que conduce a la autoactivación y liberación de las caspasas-8 ó -10 activas, para a continuación, promover la activación proteolítica de las caspasas efectoras (caspasas-3 y/ó -7) (Scaffidi y cols., 1998; MacFarlane M y Williams AC, 2004).

En algunas células denominadas células de tipo I, la activación de estas caspasas efectoras es suficiente para inducir apoptosis mientras que en las células tipo II, la inducción de la apoptosis requiere una amplificación de la señal a través de la interacción de las vías de señalización extrínseca e intrínseca. De esta manera, las caspasas iniciadoras (caspasas-8 y/ó -10) promueven la activación proteolítica de Bid, lo que resulta en la liberación de proteínas mitocondriales, como el citocromo c, y la posterior activación de la procaspasa-9 (MacFarlane M y Williams AC, 2004).

1.1.8. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

La detección del cáncer oral y las estrategias de diagnóstico convencional tienen como foco la cabeza, el cuello y el examen oral de tejidos blandos con la inspección y la palpación sistemática, tanto extraoral como intraoralmente. Lesiones de la mucosa identificadas en este proceso se evalúan por características tales como el tamaño, color, textura y contorno, así como la historia de la lesión. En aquellas lesiones sospechosas de la mucosa se realiza una biopsia para confirmar la presencia de alteraciones y el grado de la displasia (Williams PM y cols., 2008).

La enfermedad se produce en un lugar que es fácilmente accesible para su examen visual, sin embargo, y lamentablemente, con frecuencia se diagnostica en una etapa avanzada, cuando el deterioro funcional debido al tratamiento y las tasas de mortalidad son altos (Poh CF y cols., 2001).

No hay diferencias entre hombres y mujeres en cuanto al pronóstico, aunque algunos autores han publicado tasas de supervivencia inferiores en las mujeres, que se atribuyen a la demora en la búsqueda de atención médica y la menor aceptación del tratamiento. La correlación del pronóstico con la edad parece controvertida, y algunos autores no muestran ninguna relación entre ellos, mientras que otros demuestran un peor pronóstico en pacientes de edad avanzada (de Cássia Braga Ribeiro K y cols., 2003; Zygogianni AG y cols., 2011).

El COCE tiene una alta incidencia de metástasis cervicales y en ocasiones metástasis contralaterales debido a las ricas intercomunicaciones linfáticas en relación con el plexo submucoso de la cavidad oral, que se comunican libremente a través de la línea media. Es ampliamente aceptado que la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos es uno de los factores más importantes relacionados con la supervivencia del COCE, y varios estudios han demostrado esta influencia por la drástica disminución de las

tasas de supervivencia en pacientes con ganglios positivos en el cuello (Fan S y cols., 2011).

El procedimiento básico para comprobar los ganglios linfáticos del cuello es el examen físico, pero el examen clínico por sí solo no es suficiente para establecer el verdadero alcance de la participación local y las metástasis regionales (Rassekh CH y cols., 1995). Por lo tanto, métodos de diagnóstico, como tomografía computarizada (TC), resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET) y la ultrasonografía (USG) y la citología guiada con ultrasonidos y aguja fina, se recomienda para aumentar la eficacia de la evaluación del cuello en pacientes con carcinoma oral, y algunos de ellos se han convertido en los procedimientos de detección de rutina en los últimos años (Nieuwenhuis EJ y cols., 2002).

Para facilitar el seguimiento clínico y terapéutico de los pacientes se emplea la clasificación TNM: T (Tamaño del tumor primario); N (Presencia de ganglios linfáticos); M (Metástasis a distancia). De una forma más desglosada las subdivisiones correspondientes son:

a) T1: Tumor menor o igual a 2 cm; T2: Tumor mayor de 2 cm pero menor de 4 cm; T3: Tumor mayor de 4 cm; T4: El tumor invade estructuras adyacentes.

b) N0: No hay metástasis ganglionares; N1: Hay metástasis en un ganglio linfático homolateral menor o igual a 3 cm; N2a: Metástasis en un ganglio homolateral mayor de 3 cm pero menor de 6; N2b: Metástasis en múltiples ganglios homolaterales, menores de 6 cm; N3. Metástasis en un ganglio linfático mayor de 6 cm.

c) M0: No hay metástasis a distancia; M1: Hay metástasis a distancia.

El factor más importante en la supervivencia es la etapa de la enfermedad en que se diagnostica. De forma práctica se establece el estadiaje tumoral que comprende:

- Estadio 1: T1 M0 N0.
- Estadio 2: T2 M0 N0.
- Estadio 3: T3 N0 M1; T1 N1 M0; T2 N1 M0; T3 N1 M0.
- Estadio 4: T4 M0 N0; Tx M2-3 N0; Tx Nx M1.

Los estadios I y II engloban el período inicial, donde la tasa de supervivencia suele ser elevada, mientras que los estadios III y IV representan las fases avanzadas de la enfermedad, donde el pronóstico empeora drásticamente (Sobin LH y cols., 1988).

La gran mayoría de los cánceres que se encuentran en la cavidad oral son carcinomas de células escamosas. Este tipo de cáncer de la cavidad oral puede ser tratado con radiación, cirugía o terapia combinada. La terapia de modalidad individual se intenta por lo general en las primeras etapas de desarrollo del cáncer. El tratamiento multimodal es por lo general empleado para tumores más avanzados (Genden EM y cols., 2010).

Además, para hacer frente a la disminución de la prevalencia del COCE, debería evitarse el consumo de tabaco, limitar la ingesta de alcohol, elegir una dieta predominantemente rica en verduras y frutas, reducir la ingesta de grasas, carne roja o procesada, evitar la exposición de la carne directamente al fuego, el uso de papel de aluminio para envolver la carne antes de asar, y el uso de hornos de microondas con el fin de reducir la formación de aminas heterocíclicas. El consumo de niveles óptimos de micronutrientes como la vitamina C, E, β -caroteno, ácido fólico y los antioxidantes es recomendado (Taghavi N y Yazdi I, 2007).

1.2. ANTIOXIDANTES

1.2.1. Generalidades.

Los seres vivos aerobios necesitan oxígeno para generar energía. El oxígeno puede reaccionar con otros elementos químicos, produciendo radicales libres. Estas sustancias son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados en su órbita externa. Son inestables y muy reactivas, ya que una vez formadas pueden captar un electrón de otras moléculas cercanas. El organismo dispone de un sistema de defensa antioxidante capaz de eliminar estos radicales libres, una vez formados. Estos incluyen enzimas como las superóxido dismutasas, las glutatión peroxidasas, la glutatión reductasa, la catalasa, las fosfolipasas y la poli-ADP-ribosa sintetasa (PARP), entre otras. Además, dispone de diferentes sustancias no enzimáticas como glutatión, taurina, coenzima Q, vitamina C, E y carotenoides (Cuerda C y cols., 2011).

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la generación y degradación de radicales libres. Cuando este equilibrio se rompe, bien por producción de radicales en exceso, bien por disminución de los sistemas de defensa, se origina lo que se conoce como daño oxidativo. Este daño se debe a la capacidad que tienen los radicales libres de actuar sobre las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos de la célula. Cuando los radicales libres interactúan con estos componentes celulares, se originan alteraciones estructurales y funcionales. Como consecuencia de ello, se produce un deterioro de la homeostasis de la célula y la aparición de diferentes enfermedades crónicas, e incluso la muerte celular (Cuerda C y cols., 2011).

El daño oxidativo juega un papel importante en la patogénesis del cáncer, que podría surgir de incorrectos hábitos alimenticios y estilos de vida. Este proceso puede causar daño en el ADN, que es un mecanismo básico para la inducción de cáncer (Krajcovicova-Kudlackova M y Dusinska M, 2004).

Los antioxidantes de la dieta juegan un papel importante en la defensa frente al envejecimiento y frente a las enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, el cáncer y la enfermedad cardiovascular (Brown AA y Hu FB, 2001; Ceriello A y Testa R, 2009). Pueden inhibir o disminuir la producción de determinados componentes mutágenos, que pueden inducir el cáncer, por ejemplo, al freír o asar a las proteínas de determinados alimentos, sobre todo de la carne, generando aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, acrilamida o nitrocompuestos (Zheng W y Lee SA, 2009).

La nitrosamina específica del tabaco, que es uno de los factores etiológicos más importantes del COCE, e hidrocarburos aromáticos policíclicos que experimentan activación específica y procesos de desintoxicación, pueden ser importantes carcinógenos. Sus reacciones son controladas por antioxidantes como la quercetina en las verduras, la genisteína en la soja o el sulforafano del brócoli (Weisburger JH, 1999).

1.2.2. Polifenoles.

1.2.2.1. Estructura y tipos de polifenoles.

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

Principalmente se producen en formas conjugadas, con uno o más residuos de azúcar vinculados a grupos hidroxilo, aunque los vínculos directos del azúcar (polisacárido o monosacárido) a un carbono aromático también existen. Asociaciones con otros compuestos, como ácidos carboxílicos y

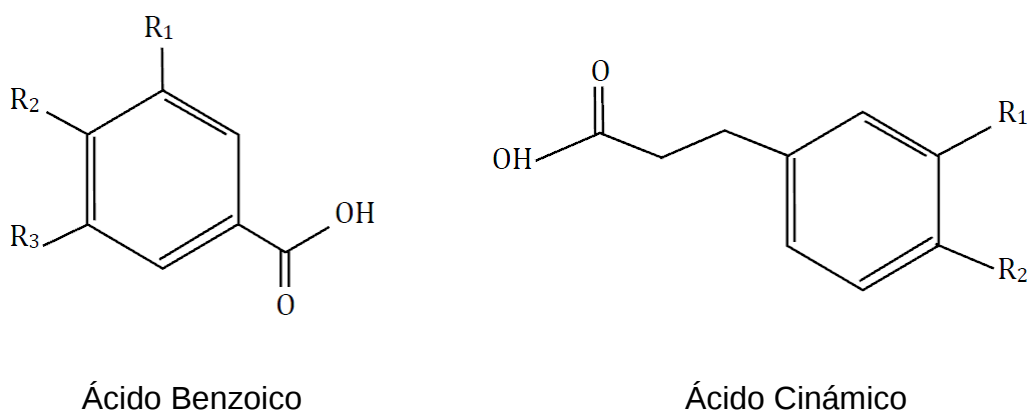
orgánicos, aminas, lípidos y con otros fenoles son también comunes (Kondratyuk TP y Pezzuto JM, 2004).

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

Ácidos Fenólicos

Los ácidos fenólicos se encuentran abundantemente en los alimentos y se dividen en dos clases: derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico (Figura 2). El contenido de ácido hidroxibenzoico de plantas comestibles es generalmente bajo, con la excepción de ciertas frutas rojas, rábano negro y cebolla, que pueden tener concentraciones de varias decenas de miligramos por kilogramo de peso fresco. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los anteriores y consisten principalmente en ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. (Shahidi F y Naczki M, 1995).

Figura 2: Estructuras químicas de los ácidos fenólicos.

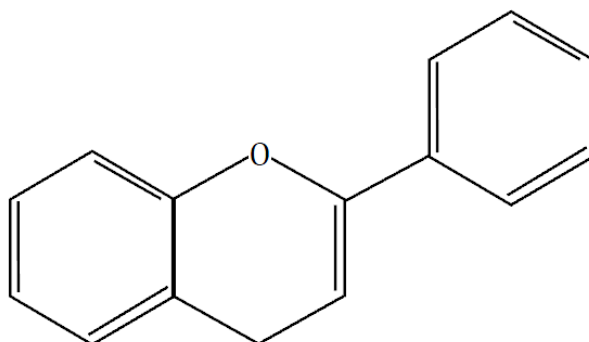


Flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo más estudiado de los polifenoles. Este grupo tiene una estructura básica común, que consta de dos anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (Figura 3). Más de 4.000 variedades de flavonoides han sido identificados, muchos de los cuales son responsables de los atractivos colores de las flores, frutas y hojas de las plantas (de Groot H y Rauen U, 1998).

Según la base de variación en el tipo de heterociclo involucrado, los flavonoides se puede dividir en seis subclases: flavonoles, flavonas, flavononas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas. Las diferencias individuales dentro de cada grupo surgen a partir de la variación en el número y disposición de los grupos hidroxilo y su grado de alquilación y/o glicosilación. La quercetina, myricetina, catequinas, etc, son algunos de los flavonoides más comunes (Spencer JP y cols., 2008).

Figura 3: Estructura química de los flavonoides.

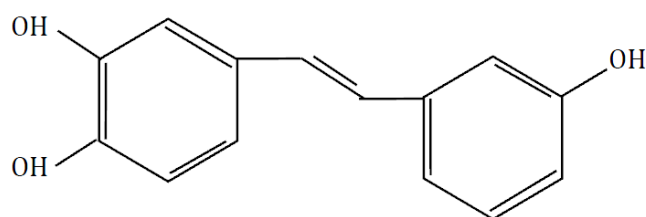


Flavonoides

Estilbenos

Contienen dos fracciones fenólicas conectadas por un puente metileno de dos carbonos (Figura 4). La aparición de estilbenos en la dieta humana es bastante baja. La mayoría de los estilbenos en las plantas actúan como fitoalexinas, compuestos antifúngicos que se sintetizan sólo en respuesta a la infección o agresiones. Uno de los mejor estudiados, es el resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno), que se encuentra en gran cantidad en las uvas. Un producto derivado de la uva, el vino tinto, también contiene gran cantidad de resveratrol (Adlercreutz H y Mazur W, 1997).

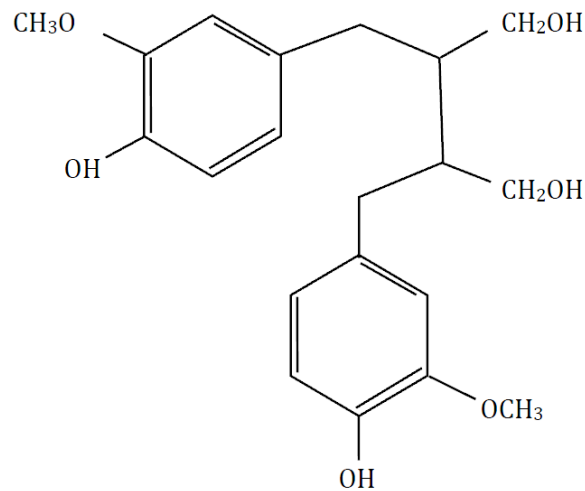
Figura 4: Estructura química de los estilbenos.



Estilbenos

Lignanos

Los lignanos son compuestos difenólicos que contienen una estructura 2,3-dibenzylbutano que está formada por la dimerización de dos residuos de ácido cinámico (Figura 5). Muchos de ellos, como el secoisolariciresinol, son considerados fitoestrógenos. La fuente dietética más rica es la linaza, el cual contiene secoisolariciresinol (hasta 3,7 g / kg de peso seco) y pequeñas cantidades de matairesinol (Adlercreutz H y Mazur W, 1997).

Figura 5: Estructura química de los lignanos.

Lignanos

1.2.2.2. Frecuencia y contenido.

Frutas, hortalizas y algunas bebidas, como el té y el café, son particularmente ricas en polifenoles, y aproximadamente 8000 compuestos diferentes han sido identificados (Ramos S, 2007). La distribución de los compuestos fenólicos en niveles tisulares, celulares y subcelulares no es uniforme. Los ácidos fenólicos insolubles se encuentran en paredes celulares, mientras que los fenoles solubles están presentes dentro de las vacuolas de las células vegetales (Wink M, 1997).

Ciertos polifenoles como la quercetina se encuentran en todos los productos vegetales, frutas, verduras, cereales, zumos de frutas, té, vino, infusiones, etc, mientras que flavanonas e isoflavonas son específicos para ciertos alimentos en particular. En la mayoría de los casos, los alimentos contienen mezclas complejas de polifenoles. Las capas exteriores de las plantas contienen niveles más altos de compuestos fenólicos que las partes internas (Simon BF y cols., 1992).

Numerosos factores influyen en el contenido de los polifenoles de las plantas, éstos incluyen el grado de madurez en el momento de la cosecha, los factores ambientales, procesamiento y almacenamiento. El contenido de polifenoles de los alimentos se ve en gran medida afectado por factores ambientales, así como por factores edáficos como el tipo de suelo, exposición al sol, la lluvia, etc. El grado de maduración afecta considerablemente a las concentraciones y proporciones de los diversos tipos de polifenoles. En general, se ha observado que el contenido de ácidos fenólicos disminuye durante la maduración, mientras que las concentraciones de antocianina aumentan (Manach C y cols., 2004).

Otro factor que afecta directamente al contenido de los polifenoles es el almacenamiento de los alimentos. Algunos estudios han demostrado que el contenido de polifenoles en los alimentos cambia durante el almacenaje, la razón es debida a la fácil oxidación de estos polifenoles (Manach C y cols., 2004). Las reacciones de oxidación tienen como resultado la formación de sustancias más o menos polimerizadas, que conducen a cambios en la calidad de los alimentos, en particular en el color y características organolépticas. Tales cambios pueden ser beneficiosos, como es el caso del té negro, o perjudiciales como en el caso de la fruta. El almacenamiento de harina de trigo tiene como resultado una marcada pérdida de ácidos fenólicos (Sosulski FW y cols., 1982). Después de seis meses de almacenamiento, la harina contenía los mismos ácidos fenólicos en términos cualitativos, pero sus concentraciones son 70% más bajas en comparación con el producto fresco. El almacenaje en frío, en cambio, tiene un ligero efecto sobre el contenido de polifenoles en manzanas, peras o cebollas (Price KR y cols., 1997).

Cocinar los alimentos también tiene un efecto importante sobre la concentración de los polifenoles. Las cebollas y los tomates pierden entre 75% y 80% de su contenido en quercetina inicial después de hervirlos durante 15 minutos, el 65% después de cocinarlos en un microondas, y un 30% después de freírlos (Crozier A y cols., 1997).

1.2.2.3. Biodisponibilidad y metabolismo.

La biodisponibilidad se define como la proporción de un antioxidante que se digiere, absorbe, y es utilizado en el metabolismo normal, sin embargo, la medición de la biodisponibilidad depende en gran medida de la cantidad estimada de antioxidantes que se absorben. Por otro lado, la bioaccesibilidad es un término comúnmente utilizado y definido como la cantidad de un nutriente ingerido que está disponible para la absorción en el intestino después de la digestión. En estos términos, la biodisponibilidad depende estrictamente de la bioaccesibilidad (Hedren E y cols., 2002).

Recientemente, se estima que la ingesta media diaria total de flavonoides en los EE.UU. puede ser de 189,7 mg / día, donde las fuentes principales de alimentos son el té (157 mg), zumos de frutas cítricas (8 mg), vino (4 mg) y cítricos (3 mg) (Chun OK y cols., 2007). Posiblemente, la ingesta dietética de polifenoles podría ser mucho mayor en los países en donde las personas consumen grandes cantidades de alimentos de origen vegetal. Obviamente, la ingestión humana de polifenoles en la dieta es muy superior a la de vitaminas C (100-200mg / d) y E (7-10 mg / d), aunque la biodisponibilidad de los polifenoles en la dieta es muy baja (Hu ML, 2011).

La actividad antioxidante de los polifenoles de la dieta es probablemente limitada debido a sus bajas concentraciones in vivo, excepto en el tracto gastrointestinal donde están presentes en altas concentraciones y pueden entrar en contacto directo con las células sin haberse sometido a la absorción y al metabolismo (Hu ML, 2011).

Muchos polifenoles, al ser glucósidos, ésteres, o polímeros presentes en las plantas, pueden no ser absorbidos en el tracto intestinal porque son hidrolizados o reducidos por la microflora intestinal. Así mismo, existen otros componentes en los alimentos que pueden interferir en la absorción intestinal al interaccionar con los polifenoles, creando complejos químicos que son difíciles de absorber en el intestino, como pueden ser los alimentos con gran cantidad de fibra (Palafox-Carlos H y cols., 2011; Ishimoto H y cols., 2012).

Una vez que estos compuestos pasan a través de la barrera biológica que supone el tracto intestinal, el metabolismo de las células epiteliales intestinales y / o en los hepatocitos se convertirá en el mayor de los obstáculos para su biodisponibilidad (Gao S y Hu M, 2010).

Glucuronidación y sulfatación son las vías metabólicas principales de los compuestos fenólicos en el hígado, así como ciertas enzimas del citocromo P450. Sin embargo, muchos de los mecanismos por los que actúan los metabolitos originados al ser metabolizados los polifenoles no son bien conocidos debido a la falta de identificación de los mismos, así como a su baja disponibilidad comercial. De esto modo, Ishimoto y cols., 2012, realizaron un estudio donde comprobaron la capacidad oxidativa de varios polifenoles y sus metabolitos, descubriendo que algunos de estos últimos tienen un mayor efecto antioxidativo que sus predecesores.

Es importante identificar los metabolitos circulantes, incluyendo las posiciones de los grupos conjugantes en la estructura del polifenol, debido a que las posiciones pueden afectar a las propiedades biológicas de los conjugados. Los metabolitos polifenólicos circulan en la sangre unidos a proteínas, en particular la albúmina que representa la proteína principal responsable de la unión. La albúmina juega un papel importante en la biodisponibilidad de los polifenoles. La afinidad de los polifenoles por la albúmina varía en función de su composición química (Dangles O y cols., 2001).

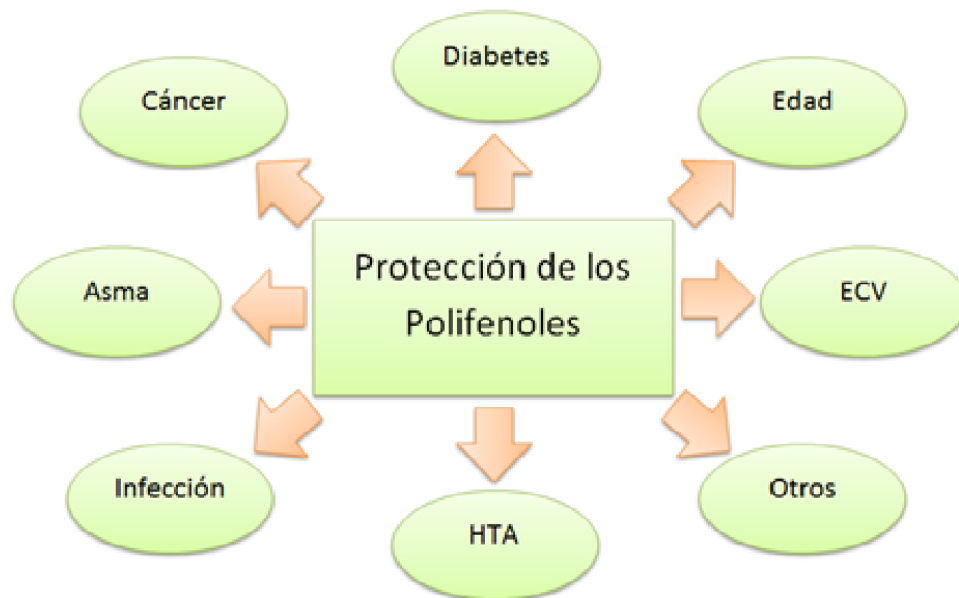
La unión a la albúmina puede tener consecuencias para la tasa de eliminación de los metabolitos y para su liberación a las células y tejidos. Es posible que la captación celular de metabolitos sea proporcional a su concentración en moléculas libres. Todavía no está claro si los polifenoles tienen que estar en la forma libre para ejercer su actividad biológica, o que los polifenoles unidos a la albúmina puedan ejercer algunos efectos biológicos (D'Archivio M y cols., 2007; Dufour C y cols., 2007).

Finalmente, la acumulación de polifenoles en los tejidos es la fase más importante de su metabolismo, porque esa es la concentración que es biológicamente activa para ejercer los efectos de los polifenoles. Los estudios han demostrado que los polifenoles son capaces de penetrar tejidos, particularmente aquellos en los que se han metabolizado tales como el intestino y el hígado. La excreción de polifenoles con su derivados ocurre a través de la orina y la bilis. Se ha observado que los metabolitos extensamente conjugados son más propensos a ser eliminados en la bilis, mientras que los pequeños conjugados, como monosulfatos, son preferentemente excretados en la orina. La concentración de metabolitos excretados en la orina es aproximadamente correlativa a la concentración máxima plasmática. Por esto, los efectos beneficiosos para la salud de los polifenoles dependerán tanto de la ingesta como de su biodisponibilidad (D'Archivio M y cols., 2007).

1.2.2.4. Polifenoles y enfermedades humanas.

Varios estudios biológicos sobre polifenoles han demostrado su actividad antioxidante, antiviral, antimutagénica, antimicrobiana y antitumoral, sugiriendo que el consumo de polifenoles dietéticos podría contribuir a prevenir enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, hipertensión, asma, envejecimiento, cáncer o diabetes (Figura 6) (Pandey KB y Rizvi SI, 2009; Kawai Y, 2011; Ishimoto H y cols., 2012). Descubriéndose en la última década que la actividad para la captación de radicales libres de muchos de los polifenoles presentes en la dieta es más fuerte que la del ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E) o glutatión, los antioxidantes más frecuentes en el cuerpo humano (Hotta H y cols., 2002; Sakakibara H y cols., 2002).

Figura 6: Estudios epidemiológicos han revelado que los polifenoles proporcionan una protección significativa contra el desarrollo de varias enfermedades crónicas tales como las enfermedades cardiovasculares (ECV), cáncer, diabetes, infecciones, envejecimiento, asma, etc.



Diversos estudios revelan como varios polifenoles pueden disminuir el riesgo de sufrir arterioesclerosis y enfermedades cardiovasculares. Los resultados más significativos de estos estudios clínicos muestran un aumento de la capacidad antioxidante en el plasma o en la orina, una disminución en la oxidación del colesterol LDL y peroxidación de lípidos, una disminución de glucosa en plasma o el colesterol total, y un aumento en colesterol HDL (Basu A y cols., 2010).

A su vez, numerosos estudios muestran los efectos antidiabéticos de los polifenoles. Las catequinas del té se han investigado por su potencial efecto anti-diabético. Los polifenoles pueden afectar la glucemia a través de diferentes mecanismos, incluyendo la inhibición de la absorción de glucosa en el intestino o de su absorción periférica en los tejidos (Rizvi SI y Zaid MA, 2001; Rizvi SI y cols., 2005).

Varias investigaciones sugieren que la combinación de compuestos polifenólicos con efectos antioxidantes / anti-inflamatorios encontrados en frutas y verduras puede mostrar eficacia contra el envejecimiento (Cao G y cols., 1998; Joseph JA y cols., 2005). El grupo de los flavonoides conocidos como antocianinas, son particularmente abundantes en frutas con colores brillantes como las bayas, uvas y semillas de uva. Las antocianinas son responsables de los colores en las frutas, y se ha demostrado que tienen potente actividad antioxidante / anti-inflamatoria, así como potencial para inhibir la peroxidación de lípidos y los mediadores inflamatorios de la ciclooxigenasa (COX 1 y 2) (Seeram NP y cols., 2003).

El estrés oxidativo y el daño a macromoléculas del cerebro es un importante proceso en las enfermedades neurodegenerativas. La enfermedad de Alzheimer es uno de los desórdenes neurológicos más comunes que ocurren y afecta a 18 millones de personas en todo el mundo. Debido a que los polifenoles poseen esta naturaleza antioxidante, su consumo puede proporcionar una protección neurológica (Letenneur L y cols., 2007). Se ha observado así que las personas que beben entre tres a cuatro vasos de vino al día tienen un 80% menor incidencia de demencia y enfermedad de Alzheimer en comparación con los que no bebían o consumían menos cantidad de vino (Scarmeas N, 2007).

La evidencia epidemiológica de que los polifenoles pueden proteger contra la enfermedad pulmonar obstructiva proviene de estudios que han informado de asociaciones negativas entre la ingesta de manzana y la prevalencia e incidencia de asma, y una asociación positiva con la función pulmonar. El aumento del consumo de isoflavonas de soja, como la genisteína, se asoció con una mejor función pulmonar en pacientes asmáticos (Tabak C y cols., 2001; Woods R.K y cols., 2003; Smith L.J y cols., 2004).

Las propiedades anti-microbianas de productos vegetales han sido reconocidas desde hace muchos años, recientemente se ha renovado el interés por las bayas y sus componentes fenólicos, tales como las antocianinas y elagitaninos. Varios extractos ricos en polifenoles procedentes de bayas

inhiben el crecimiento de bacterias enteropatógenas como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Giardia* y especies de *Campylobacter*, y fueron bacteriostáticos para 3 cepas de *Staphylococcus aureus* (Anthony JP y cols., 2011).

Además, existen una gran variedad de estudios acerca de varios polifenoles presentes en diferentes tipos de té y zumos de arándanos, que demuestran las propiedades bactericidas de estos componentes contra el *S.mutans* o *S.sobrinus*, dos de los microorganismos causantes de la caries dental, además de la inhibición en la formación de la placa bacteriana por *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*, dos de las especies de bacterias asociadas con periodontitis crónica (Ooshima T y cols., 1993; Matsumoto M y cols., 2003; Yamanaka A y cols., 2004; Bonifait L y Grenier D, 2010).

1.2.2.5. Polifenoles y cáncer.

Los polifenoles son una parte esencial de la dieta humana, siendo los flavonoides y ácidos fenólicos los más comunes en los alimentos. No es de extrañar que exista una creciente conciencia de que una menor incidencia de cáncer en ciertas poblaciones puede ser debida probablemente al consumo de ciertos nutrientes, especialmente las dietas ricas en polifenoles. En consecuencia, una disección sistemática del efecto quimiopreventivo de los compuestos polifenólicos en los últimos años ha respaldado sus efectos beneficiosos para la salud, incluyendo diversas propiedades anticancerígenas. Teniendo en cuenta los retos de la terapia del cáncer, utilizar fármacos naturales para impedir o revertir la carcinogénesis en sus primeras etapas, sigue siendo el enfoque más práctico y prometedor para el tratamiento de pacientes con cáncer (Link A y cols., 2010).

Los polifenoles dietéticos pueden ejercer sus efectos contra el cáncer a través de varios mecanismos posibles, tales como la eliminación de agentes cancerígenos, la modulación de la señalización de las células cancerosas y

actividades enzimáticas antioxidantes, inducción de apoptosis, así como la detención del ciclo celular (Hu ML, 2011). Estos efectos se han observado en varias localizaciones, incluyendo la boca, estómago, duodeno, colon, hígado, pulmón, glándula mamaria o la piel. Muchos polifenoles, tales como quercetina, catequinas, las isoflavonas, lignanos, flavanonas, ácido elágico, resveratrol y la curcumina han sido probados, todos mostraron efectos protectores en algunos modelos, aunque sus mecanismos de acción resultaron ser diferentes (Johnson IT y cols., 1994).

La evidencia que se acumula está mostrando que muchos fitoquímicos, como el licopeno, la curcumina y el sulforafano, son capaces de ejercer también actividades antioxidantes indirectas mediante el aumento de la expresión de determinadas enzimas antioxidantes y proteínas citoprotectoras. (Hu ML, 2011).

Los polifenoles son más conocidos por sus propiedades antioxidantes y sus habilidades para actuar eliminando las especies reactivas del oxígeno (ROS). ROS incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$). ROS se forman como subproductos de la respiración mitocondrial o por el trabajo de ciertas oxidasas. ROS están implicados en muchos procesos celulares, actuando como segundos mensajeros en la activación de varias vías de señalización que conducen a la activación de la transcripción factores, mitogénesis, la expresión génica, y la inducción de la apoptosis o muerte celular programada (Babich H y cols., 2011).

El exceso de producción de ROS, según lo indicado por un cambio en el estado redox celular, puede conducir al daño oxidativo de proteínas, lípidos, y ADN. Para prevenir el estrés oxidativo, la neutralización del exceso de ROS se logra mediante las enzimas antioxidantes, incluyendo superóxido dismutasa (SOD) para desintoxicar $O_2^{\cdot-}$ y catalasa y glutatión peroxidasa para H_2O_2 (Moskaug JØ y cols., 2005).

Por otro lado, hay algunos autores que reflejan que el consumo de altas dosis de compuestos fenólicos incluso puede ser perjudicial para nuestra salud. La capacidad antioxidante es una de las razones por las que los compuestos fenólicos pueden prevenir el crecimiento de las células cancerosas. Sin embargo, Decker EA argumentó que los polifenoles tienen efectos anti-oxidación y pro-oxidación. Así mismo, Fukumoto LR y Mazza G descubrieron una doble actividad antioxidante y prooxidante para una variedad de polifenoles derivados de plantas incluyendo el ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido sirínigico, ácido vinílico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, miricetina, quercetina, rutina, kaempferol, catequina, epicatequina, delphinidina, y malvidina (Decker EA, 1997; Fukumoto LR y Mazza G, 2000).

1.2.3. Resveratrol.

El resveratrol (3,4',5-trihidroxi-trans-estilbeno) fue aislado por primera vez en 1940 como un ingrediente de las raíces del eléboro blanco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) y desde entonces ha sido identificado en los extractos de más de 70 otras especies de plantas. Es un producto natural polifenólico compuesto que se ha encontrado en una amplia variedad de especies de plantas, incluidas las uvas, cacahuetes, diferentes tipos de bayas y extractos de raíces de hierbas como el *Polygonum Cuspidatum*. (Jang M y cols., 1997). Además, es uno de los principales constituyentes del vino tinto (Gupta SC y cols., 2011).

El resveratrol se encuentra actualmente reconocido como una molécula bioactiva con potenciales efectos beneficiosos sobre la salud debido a su amplia gama de propiedades farmacológicas y a la falta de efectos nocivos. Este polifenol es bien conocido por su acción antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, cardioprotectora, neuroprotectora, y luchar contra el envejecimiento (Baur JA y Sinclair DA, 2006).

Los efectos beneficiosos sobre la salud del resveratrol pueden ser obstaculizados por su baja biodisponibilidad oral, que ha sido atribuida a la absorción intestinal incompleta o a un metabolismo intestinal extenso (Juan ME y cols., 2010). No hay evidencia directa para demostrar que la baja biodisponibilidad del resveratrol es debida a su baja solubilidad en agua. Sin embargo, diversos investigadores están tratando de sintetizar análogos de resveratrol para mantener sus actividades biológicas, pero con una solubilidad en agua mejorada (Pettit GR y cols., 2005).

Efecto antioxidante y antiinflamatorio

El resveratrol puede inducir importantes enzimas celulares antioxidantes, por ejemplo, las enzimas glutathione peroxidase, hemoxigenase o superóxido dismutase, en las células cardíacas y vasculares, que se traduce en una marcada atenuación del estrés oxidativo. El resveratrol además regula la expresión vascular y cardíaca de TNF- α e inhibe las NADPH oxidases en los vasos sanguíneos. Es significativo como el resveratrol también puede inhibir la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno en el tejido vascular. Así mismo, resveratrol tanto in vivo como a concentraciones nutricionalmente relevantes in vitro demostró que inhibe varios procesos inflamatorios, incluyendo la activación de NF- κ B, la expresión de genes inflamatorios y la atenuación de la adhesividad de los monocitos en el endotelio, contribuyendo a sus efectos cardioprotectores contra el envejecimiento (Csiszar A, 2011).

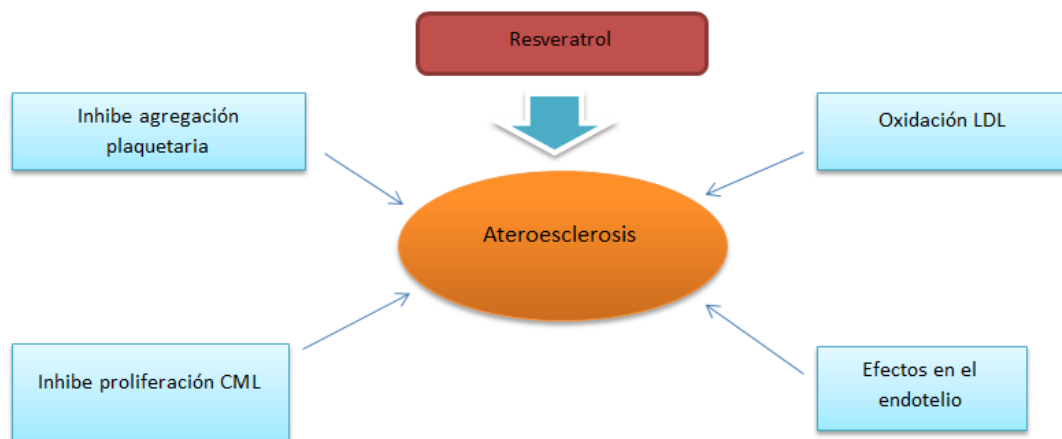
Efecto cardioprotector y antiagregante

El resveratrol impide la agregación de las plaquetas a través de la inhibición preferencial de la ciclooxigenasa 1 (COX 1), que sintetiza tromboxano A₂, un inductor de la agregación plaquetaria y vasoconstrictor. Además de esto, el resveratrol es capaz de relajar las arterias aisladas y los anillos de aorta en la rata. La capacidad de estimular los canales dependientes de potasio y estimular la señalización del óxido nítrico en el endotelio son otras vías por las que el resveratrol ejerce su actividad como vasodilatador (Harikumar KB y Aggarwal BB, 2008; Pirola L y Frojdo S, 2008).

La oxidación de las partículas de LDL se asocia fuertemente con el riesgo de enfermedades coronarias del corazón y los infartos de miocardio. Los estudios han demostrado que el resveratrol inhibe potencialmente la oxidación de las partículas de LDL a través de la quelación del cobre o por liberación directa de radicales libres. El resveratrol es el compuesto activo en el vino tinto al que se le atribuye la "paradoja francesa", la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares entre los franceses a pesar de la ingesta en la dieta de grasas y hábito tabáquico (Cucciolla V., 2007; Shakibaei M y cols., 2009).

Por último, debemos saber que RSV inhibe la proliferación *in vitro* de las células del músculo liso humano y de conejo (CML), en respuesta a la estimulación por PDGF, endotelina, angiotensina II, y mitógenos del suero. Reduce la proliferación endotelial, atenúa el engrosamiento de la capa íntima seguida de la denudación del endotelio en conejos y reduce el área media de las placas ateroscleróticas (Figura 7) (Wu J.M y cols., 2011).

Figura 7: Esquema que representa la cardioprotección por el resveratrol atribuida a su capacidad de actuar en múltiples objetivos que inciden en la aterogénesis : oxidación de LDL, la agregación plaquetaria, la proliferación de células musculares lisas (CML) y el daño de las células endoteliales (CE).



Efecto anticancerígeno

RSV ha demostrado actividad anti-tumoral *in vitro* en diversas células tumorales y en la inhibición *in vivo* de tumores en modelos experimentales de animales. Es capaz de inhibir el crecimiento del cáncer de manera dependiente de la dosis y del tiempo. RSV provoca la detención del ciclo celular debido a la inducción de muerte celular por apoptosis (Soto BL y cols., 2011).

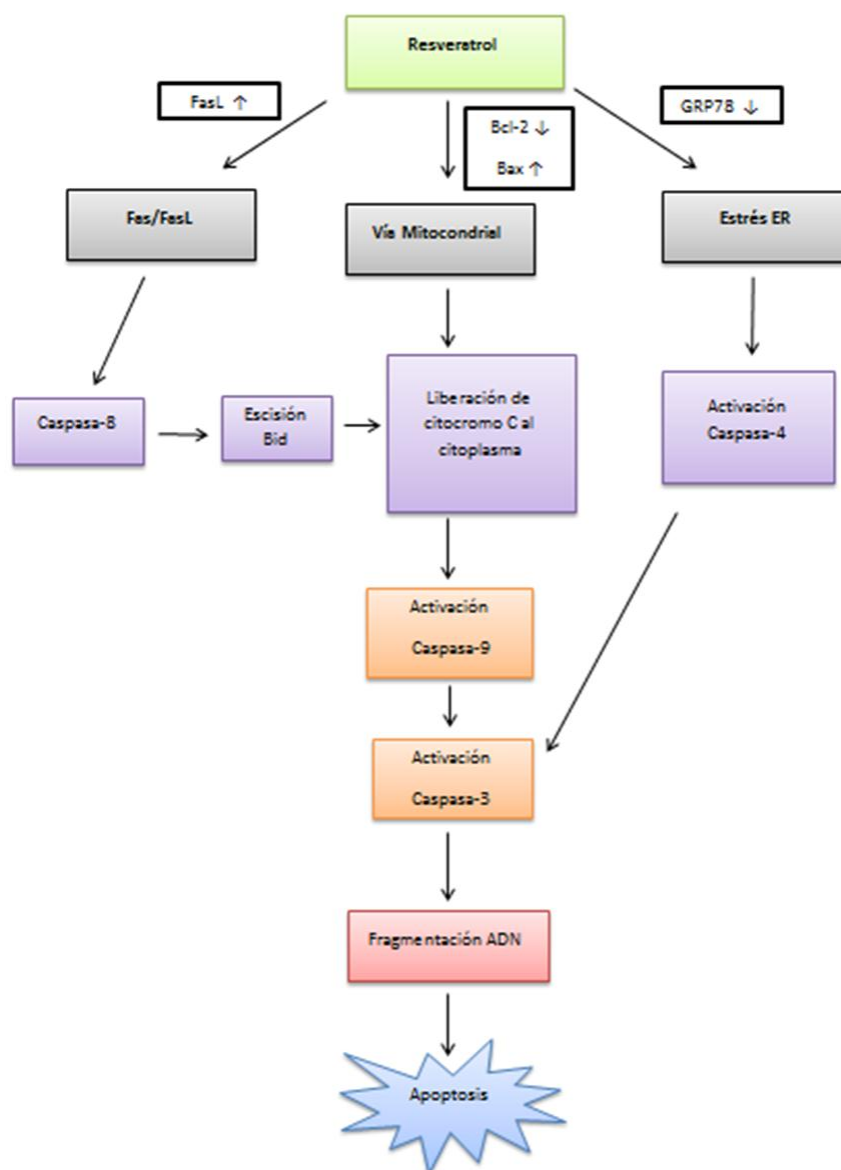
El resveratrol previene todas las etapas de desarrollo de cáncer (iniciación, promoción y progresión) y se ha encontrado que es eficaz en la mayoría de los tipos de cáncer, incluyendo el de pulmón, piel, mama, próstata, estómago y colorrectal. También se sabe que suprime la angiogénesis y la metástasis. Datos más extensos en cultivos de células humanas indican que el resveratrol puede modular múltiples vías involucradas en el crecimiento celular, la apoptosis y la inflamación. Los efectos anti-cancerígenos del resveratrol parecen estar estrechamente relacionados con su actividad antioxidante, y se ha demostrado que inhiben la ciclooxigenasa, hidroxidroxidasa, la proteína quinasa C, la fosforilación de Bcl-2 y diversos reguladores del ciclo celular (Athar M y cols., 2007; Bishayee A, 2009).

De esta forma, parece ser que el resveratrol actúa sobre las 2 vías mediadoras de la apoptosis: aumentando la expresión en la membrana celular de receptores de muerte como Fas (Nagata S, 1997) y facilitando la vía mitocondrial al disminuir la expresión de Bcl-2 y aumentar la de proteínas como Bax (Green DR y Reed JC, 1998; Ferri KF y Kroemer G, 2001). Además, regula la expresión de GRP78 en la vía del retículo endoplasmático; una nueva vía descubierta recientemente que también facilita la apoptosis. Todos estos procesos conducen a la activación de diferentes caspasas que concluyen con la fragmentación del ADN celular y apoptosis (Figura 8) (Lee As, 2001; Rao RV y cols., 2004; Zhang Z y cols., 2006).

La mayoría de los informes indican que el resveratrol sensibiliza las células tumorales para que actúen otros agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, se ha demostrado que sensibiliza líneas celulares de cáncer humano (neuroblastoma, el glioblastoma, el carcinoma de mama, carcinoma de

próstata, leucemia y carcinoma pancreático) a ciertos agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina, citarabina, actinomicina D, el taxol, y metotrexato, aumentando la apoptosis (Fulda S y Debatin KM, 2004). Del mismo modo, el resveratrol potencia la apoptosis inducida por agentes quimioterápicos como el cisplatino, el gefitinib, y paclitaxel en células de cáncer de pulmón (Zhao W y cols., 2011).

Figura 8: Esquema modelo por el que el resveratrol induce apoptosis celular.



Otros efectos

Durante la última década se han propuesto varios mecanismos para explicar las acciones glicoreguladoras del RSV. Se ha demostrado que este polifenol aumenta la actividad de *sirtuina-1* (SIRT1) y mejora la secreción de insulina y su sensibilidad, aumenta el número y la función mitocondrial y reduce la glucosa, favoreciendo a los pacientes que padecen diabetes (Vang O y cols., 2011).

Varios estudios en animales han indicado que RSV tiene un efecto neuroprotector. Este efecto ha sido documentado en varios modelos animales incluyendo los conejos, ratones o ratas y observando diferentes resultados finales, tales como reducción de la peroxidación lipídica y la destrucción de las células neurológicas, la atenuación de las áreas de lesiones inducidas, la tolerancia inducida por una lesión cerebral, la reducción de la frecuencia de las convulsiones, alteración de la coordinación motora y el mejoramiento del aprendizaje (Vang O y cols., 2011). El papel del resveratrol en la enfermedad de Alzheimer todavía no está claro, aunque algunos estudios recientes sobre los compuestos bioactivos del vino de tinto indican que el resveratrol modula múltiples mecanismos de la enfermedad de Alzheimer (Anekonda TS, 2006).

Por último, se ha estudiado también el efecto del RSV sobre los osteoclastos y osteoblastos. Es de interés que el RSV tiene potencial tanto para antagonizar la actividad de los osteoclastos como para promover la de los osteoblastos, ya que podría servir como coadyuvante en el tratamiento de, por ejemplo, la osteonecrosis por bisfosfonatos o la osteoporosis (Kupisiewicz K y cols., 2010).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:

2.1. JUSTIFICACIÓN

La creciente incidencia del COCE, con 5000 nuevos casos anuales y su reciente aumento en la población más joven, demuestra la necesidad de un mejor entendimiento de la epidemiología, diagnóstico, tratamiento y pronóstico de esta enfermedad.

A pesar de estas estadísticas, la esperanza es impulsada por los recientes progresos que se están realizando en nuestra comprensión del cáncer y en la aparición de tecnologías prometedoras que podrían ayudar a los profesionales de la salud en la detección, evaluación de riesgos y manejo de esta enfermedad.

El complejo proceso de la carcinogénesis es debido principalmente a factores ambientales y la dieta es una de esos factores, jugando un papel vital en la etiología de varias formas de cáncer humano, tales como el cáncer oral y de cabeza y cuello. Hay pruebas convincentes de que podemos reducir el riesgo de cáncer, incluyendo el cáncer oral, a través de cambios en nuestros hábitos alimenticios.

Una dieta rica en verduras, frutas, antioxidantes, té y fibra disminuye el riesgo de cáncer bucal y faríngeo, debido a que estos nutrientes pueden prevenir la activación de los carcinógenos y aumentar su desintoxicación, especialmente los efectos del tabaco, que es uno de los factores más importante implicados en el cáncer oral.

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

Por todo ello, son necesarios múltiples estudios preclínicos que optimicen el uso de los diferentes antioxidantes dietéticos para intentar mejorar las tasas de supervivencia de los pacientes y su calidad de vida.

2.2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo pueden ser descritos en dos niveles; un objetivo general que determina el planteamiento global de la investigación y unos objetivos específicos que articulan y ordenan los diversos aspectos del objetivo general.

El **objetivo general** fue el estudio *in vitro* del efecto del resveratrol y la irradiación sobre el carcinoma oral de células escamosas.

El objetivo general fue desglosado en una serie de objetivos específicos que nos permiten sistematizar y responder a los diferentes aspectos que nuestro estudio planteó:

Objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto del resveratrol y la irradiación sobre la viabilidad celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.
2. Estudiar el efecto del resveratrol y la irradiación sobre la apoptosis celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.
3. Estudiar el efecto del resveratrol y la irradiación sobre la migración celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.

4. Estudiar el efecto del resveratrol y la irradiación sobre el ciclo celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

El trabajo de campo se llevó a cabo de Enero de 2011 a Abril de 2012, dentro de las instalaciones del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) en las Secciones de Cultivo de Tejidos, Radioprotección y Residuos y Análisis de Imagen de la Universidad de Murcia en Murcia, España.

3.1. MATERIAL

LÍNEA CELULAR

-Línea celular de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ15 (European Collection of Cells Cultures).

Esta línea de carcinoma oral de células escamosas fue establecida en 1997 a partir de un tejido procedente de una lengua de un varón de 45 años de edad. Estas células adherentes han demostrado tener características epiteliales bien diferenciadas, expresando laminina y citoqueratinas (Figura 9).

Para la línea celular PE/CA PJ 15 hemos utilizado el medio IMDM (medio Iscove modificado de Dulbecco) suplementado al 10% con suero fetal bovino, estreptomycin y penicilina al 1% y glutamina (1mM). Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y en una atmósfera al 95% de oxígeno y 5% de CO₂ (Figura 10).

Figura 9: Línea celular PE/CA-PJ15 en proceso de incubación. (10x).

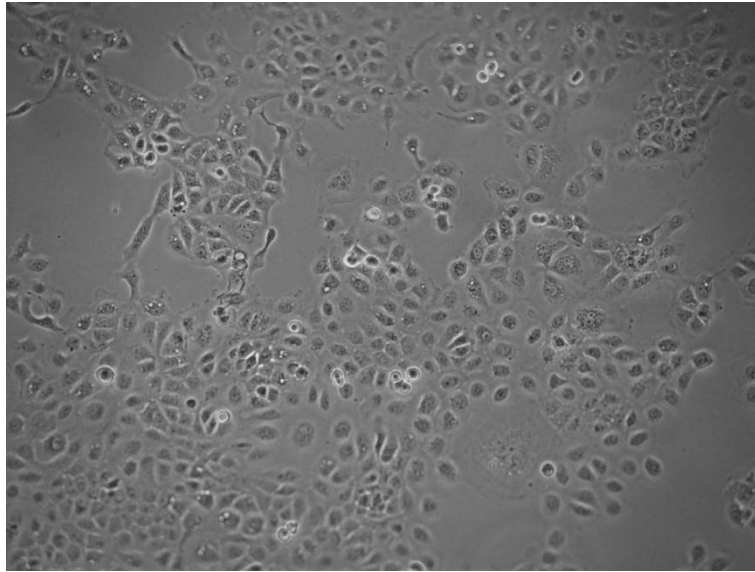


Figura 10: Incubadora a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y en una atmósfera al 95% de oxígeno y 5% de CO₂.



MÉTODO DE CULTIVO

Realizamos los cultivos a partir de viales criocongelados en nitrógeno líquido a -196°C . Descongelamos los viales rápidamente en un baño a 37°C , pasando el contenido del vial a un frasco de cultivo de 75cm^2 con 10ml de medio de cultivo. Cuando las células se habían unido al sustrato, cambiamos de nuevo el medio para eliminar el crioprotector (dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%) que contenía el vial.

Para el cultivo masivo utilizamos frascos de 75cm^2 y medio de cultivo IMDM (medio Iscove modificado de Dulbecco). Todo el instrumental usado fue esterilizado previamente y realizamos la manipulación de las células en cabinas de flujo laminar vertical Telstar Bio-II-A. Controlamos el crecimiento celular periódicamente mediante un microscopio invertido de contraste de fases.

Para realizar los subcultivos y obtener las células necesarias para realizar los diferentes estudios, tratamos los cultivos confluentes con 3ml de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0,25% y 0,53mM, respectivamente), durante 10 minutos a 37°C . Tras despegar las células mediante agitación y añadir 3ml de medio suplementado con suero bovino fetal, fueron centrifugadas a 1000rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar la tripsina. Resuspendimos el sedimento en 2ml de medio fresco para realizar el conteo de células vivas usando azul tripan en una cámara hemocitométrica y comprobando que la viabilidad celular media fuera del 99% como mínimo. A partir de la densidad celular obtenida calculábamos la cantidad necesaria para el subcultivo o para los ensayos.

REACTIVOS

-El medio Iscove modificado de Dulbecco (IMDM), la glutamina, la penicilina, la estreptomycin, el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), el dimetil sulfóxido (DMSO), el PBS, la ribonucleasa A

(RNasa) pancreática bovina, el yoduro de propidio procedían de Sigma-Aldrich (Sigma Co; España).

- El suero bovino fetal (SBF) se compró a Gibco (EEUU).

- El etanol se obtuvo de Scharlab (Scharlab S.L; España).

- El kit de apoptosis Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, 10X pertenece a Roche (Roche Diagnostics GmbH; Alemania).

APARATOS

- Lector de placas de 96 pocillos (Servicio de Cultivo de Tejidos, Servicio de Apoyo a la investigación (SAI), Universidad de Murcia) modelo FLUOstar Galaxy (BMG Lab. Technologies, USA), que realiza medidas de absorbancia en placas múltiples de 96 pocillos, y que dispone de los siguientes filtros: 340, 380, 405, 490, 520, 550, 560 y 690nm (Figura 11).

Figura 11: Lector de placas FLUOstar Galaxy.



- Microscopio óptico (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia) Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon corp; Japón) equipado con contraste de fases, objetivos de 4, 10, 20 y 40 aumentos y epifluorescencia con un conjunto de filtros para ultravioleta (Ex330-380; Di400; Ba435), azul (Ex470-

490; Di510; Ba435) y verde (Ex510-560; Di580; Ba610). Acoplado a un sistema de videofilmación y fotografía digital (Figura 12).

Figura 12: Microscopio óptico Nikon Eclipse TE2000-U.



-Irradiador de rayos X de la marca YXLON (YXLON International AS, Dinamarca) de 200kV y 4,5mA (Servicio de Radioprotección y Residuos, SAI, Universidad de Murcia), que consta de una unidad control modelo SMART 583 E y un tubo de rayos X modelo SMART 200 E (Figura 13).

Figura 13: Irradiador de rayos X YXLON



-Citómetro de flujo (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia) modelo FACSCalibur™ (Becton Dickinson, EEUU) equipado con láser de argón de 15mW a 488nm y detectores para fluorescencia a longitudes de onda aproximadas de 530, 585 y 661nm (Figura 14).

Figura 14: Citómetro de flujo FACSCalibur™.



COMPUESTO POLIFENÓLICO

Para los ensayos hemos utilizado el 3,4',5-Trihydroxy-*trans*-stilbene 5-[(1*E*)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol, comúnmente llamado resveratrol, proporcionado por Sigma-Aldrich (Sigma Co; España) (Figura 15 y 16).

Figura 15: Estructura química del resveratrol.

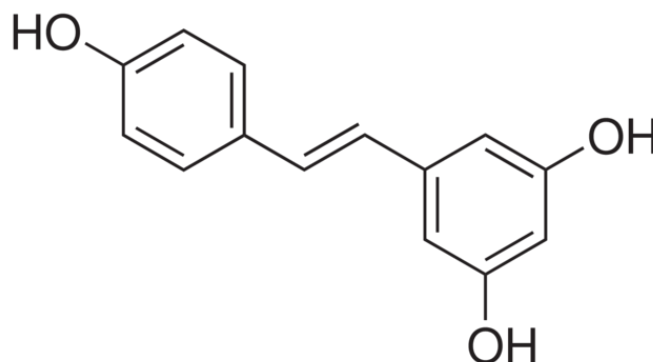


Figura 16: Resveratrol proporcionado por Sigma-Aldrich.



3.2. MÉTODOS

1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Tratamientos

La línea celular PE/CA-PJ 15 fue tratada con resveratrol a las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50 y 100 μ M, durante 24, 48 y 72 horas. Además, las células fueron sometidas a dosis de radiación de 0, 1, 2.5 y 5 Gy dependiendo del grupo asignado.

Ensayo de la viabilidad celular (MTT)

Las células PE/CA-PJ 15 fueron cultivadas a una densidad de 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos durante 24 horas, tras lo que añadimos el tratamiento preparado, realizando réplicas de 10 por cada tratamiento. Pasadas las 24, 48 o 72 horas de incubación con el resveratrol, eliminamos el medio e incubamos las células según las condiciones de

cultivo con 200µl de MTT recién disuelto en medio durante 4 horas. Pasado este tiempo, eliminamos el medio con el MTT no metabolizado y añadimos 100µl de DMSO a cada pocillo para solubilizar el formazano producido por las células viables. Posteriormente se leyeron las placas en el FLUOstar Galaxy, utilizando una longitud de onda de 570nm para la lectura y 690nm como longitud de onda de referencia.

2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA APOPTOSIS

Tratamientos

La línea celular PE/CA-PJ 15 fue tratada con resveratrol a las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50 y 100µM, durante 24, 48 y 72 horas. Además, las células fueron sometidas a dosis de radiación de 0, 1, 2.5 y 5 Gy dependiendo del grupo asignado.

Ensayo de apoptosis mediante el kit Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, 10X

Las células PE/CA PJ-15 fueron cultivadas a una densidad de 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos durante 24 horas, tras lo que añadimos el tratamiento preparado, realizando réplicas de 3 por cada tratamiento. Pasadas las 24, 48 o 72 horas de incubación con el resveratrol, eliminamos el medio de cultivo y procedimos según las instrucciones del fabricante añadiendo 200µl de Lysis Buffer e incubamos durante 30 minutos a una temperatura de 21°C. Centrifugamos las placas con el lisado a 200g durante 10 minutos. Posteriormente, transferimos 20µl del sobrenadante de nuestras muestras centrifugadas y 3 replicas de control positivo cuidadosamente a las microplacas proporcionadas en el kit. Añadimos 20µl de tampón de incubación y 80µl del inmunoreactivo (Anti-Histona-Biotina y anti-DNA-POD). Incubamos la placa en agitación a 300rpm durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras ese tiempo, retiramos la solución por succión y aclaramos cada pocillo 3 veces con 250-300µl de tampón de incubación. Pipeteamos a cada pocillo 100µl de la solución ABTS e incubamos de nuevo en agitación a 250rpm hasta que se

produjera la reacción colorimétrica, aproximadamente durante unos 20 minutos. Para finalizar, se añadieron 100µl de la solución de parada ABTS y se midieron las placas de 96 pocillos utilizando el lector FLUOstar Galaxy a una longitud de onda de referencia aproximada de 490nm.

3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR.

Tratamientos

La línea celular PE/CA PJ 15 fue tratada con resveratrol a las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50 y 100µM. Además, las células fueron sometidas a dosis de radiación de 0, 1, 2.5 y 5 Gy dependiendo del grupo asignado.

Ensayo de migración celular (wound healing assay)

Para este ensayo, cultivamos las células a una densidad adecuada en placas de 6 pocillos hasta que alcanzaran la confluencia. En ese momento, despejamos de células varias zonas (wounds) paralelas utilizando una punta amarilla de pipeta estéril, cambiamos el medio de cultivo para retirar las células despegadas y administramos los tratamientos por duplicado. Tomamos imágenes de las zonas despejadas, teniendo como referencia marcas realizadas en el fondo del pocillo con rotulador permanente, tras despejar las zonas (0 horas), a las 4 y a las 8 horas de tratamiento, utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U.

Análisis cuantitativo de la distancia de migración

Evaluamos la distancia recorrida por las células en cada fotografía mediante técnicas de análisis de imagen (Sistema MIP-4, Digital Image System, Barcelona; Servicio de Análisis de Imagen, SAI, Universidad de Murcia) (Figura 17). Para ello, todas las imágenes fueron transformadas a escala de grises y calibradas (X: 1,88679 µm; Y: 1,88679), tras lo que se tomaron 10 medidas del espacio libre de células; calculando posteriormente el valor medio.

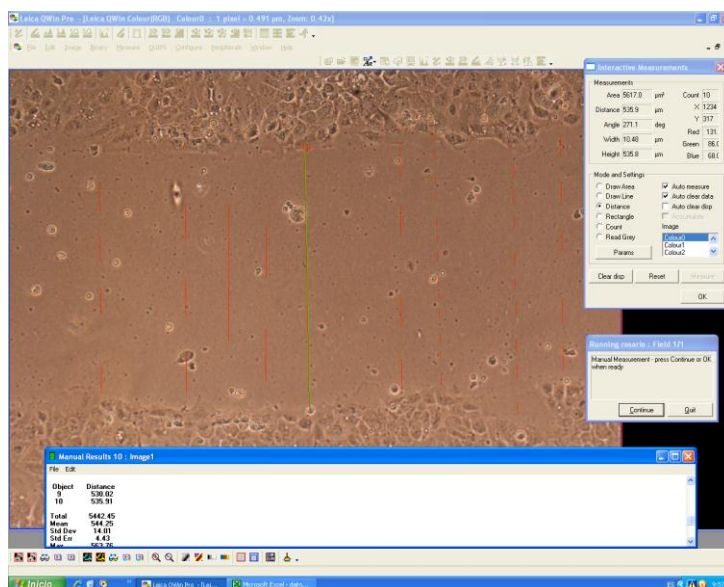
Determinamos la distancia de migración comparando el ancho del espacio libre en cada momento con respecto a la medida de esa misma zona a tiempo cero, según la siguiente fórmula (Valster, 2005):

$$\text{Distancia de migración} = (A_0/2) - (A_t/2)$$

A_0 = Ancho del espacio libre de células inicial

A_t = Ancho del espacio libre de células a tiempo t

Figura 17: Sistema MIP-4, Digital Image System Barcelona.



4. ESTUDIO DEL EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL CICLO CELULAR.

Tratamientos

La línea celular PE/CA-PJ 15 fue tratada con resveratrol a las siguientes concentraciones: 50 y 100µM, durante 24, 48 y 72 horas. Además, las células fueron sometidas a dosis de radiación de 0, 1, 2.5 y 5 Gy dependiendo del grupo asignado.

Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo

Cultivamos la línea celular a una densidad adecuada en placas de 6 pocillos (PE/CA-PJ15: 200.000 células), permitiendo que las células crecieran durante 24 horas antes de añadir los tratamientos. Tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con resveratrol, las células, con una confluencia menor del 80%, fueron recolectadas mediante tripsinización y centrifugadas a 214g durante 10 minutos. Las células fueron resuspendidas en 200µl de PBS y fijadas con etanol (70% en PBS) a 4°C durante 30 minutos. Más tarde, se centrifugaron de nuevo a 214g durante 10 minutos y resuspendidas en 800µl de PBS. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 100µl de yoduro de propidio (concentración final de 40µg/ml) y 100µl de RNasa (concentración final de 100µg/ml).

El contenido de ADN de las células teñidas fue estudiado mediante un citómetro de flujo modelo FACSCalibur™ utilizando el láser de argón de 488nm para tomar datos de FSC (forward scatter), SSC (side scatter) y de intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio (PLA-2) de 20000 eventos.

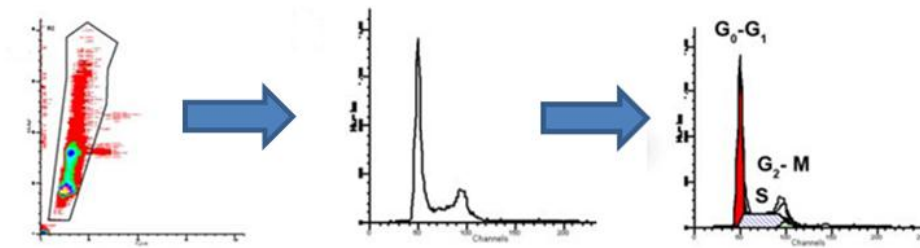
Los datos fueron analizados mediante el software CELLQUEST y el programa MODFIT (Becton Dickinson, EEUU). Esta técnica permite calcular la intensidad de fluorescencia de un fluorocromo que se une al ADN (yoduro de propidio), permite distinguir las células que se encuentran en las diferentes fases G_0 - G_1 , G_2 -M o S del ciclo celular. Los resultados finales se expresan en porcentajes de células con tres contenidos distintos de ADN:

1-Contenido fase G_0 - G_1 .

2-Contenido de fase S.

3-Contenido de fase G_2 -M (Figura 18).

Figura 18: Análisis de datos mediante el software CELLQUEST y sistema MODFIT.



3.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® (versión 12.0) para Windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

Estadística inferencial:

Para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería rechazar (cuando esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia), cuando la probabilidad mínima de rechazo (el llamado “p-valor”) no sea superior al nivel crítico estándar de 0.05. Para ello, se ha realizado el siguiente contraste para el estudio de las asociaciones entre las variables cuantitativas continuas:

- Test «ANOVA» de un factor: Para comparar tres o más medias (de muestras independientes), cuando eran tres o más las variables que se comparaban.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efecto del resveratrol y la irradiación sobre la viabilidad celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.

El tratamiento de la línea celular PE/CA PJ 15 con resveratrol (0-100 μ M) e irradiación (0,1, 2.5 y 5 Gy) durante 24, 48 o 72 horas provocó una disminución significativa de la viabilidad celular, que resultó dependiente de la duración de la incubación, de la concentración de polifenol utilizada y de la dosis de radiación.

24 horas

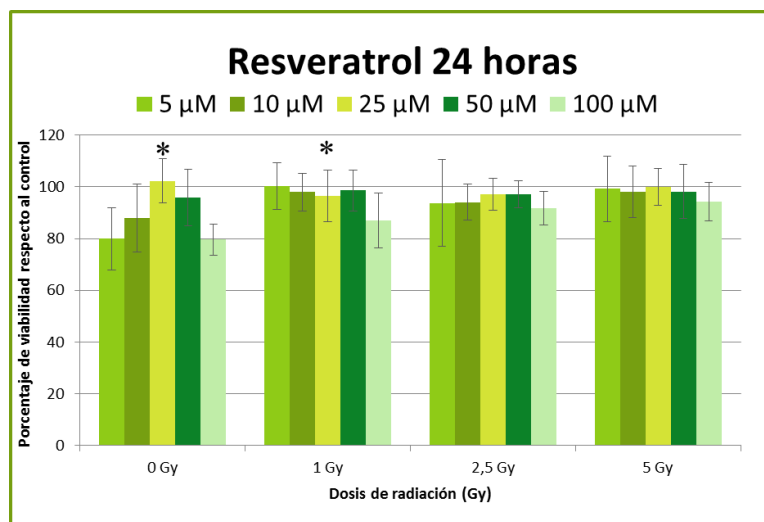
La concentración mínima que disminuyó la viabilidad celular respecto al control (0 μ M) de forma significativa fue la de 5 μ M, sin aplicar dosis de radiación (0Gy). Sin embargo, la concentración que produce una mayor disminución en la viabilidad celular en todos los casos es la de 100 μ M, tanto sin aplicar dosis de radiación como a 1, 2.5 y 5 Gy, respectivamente.

Aunque encontramos datos muy significativos sin recibir dosis de radiación, con 24 horas de incubación, las diferencias en cuanto a la viabilidad celular dentro de los grupos que recibieron radiación, todavía no son muy relevantes (Tabla 2 y Figura 19).

Tabla 2: Porcentaje de viabilidad de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 μ M) durante 24 horas respecto al control (media $\pm$ desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas. Resv.: resveratrol.

	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5Gy
Resv. 5 μ M	79,90 $\pm$ 12,01	100,39 $\pm$ 9,05	93,75 $\pm$ 16,86	99,24 $\pm$ 12,66
Resv. 10 μ M	88,02 $\pm$ 13,07	98,01 $\pm$ 7,26	93,98 $\pm$ 6,96	97,99 $\pm$ 10,01
Resv. 25 μ M	102,28 $\pm$ 8,61	96,49 $\pm$ 9,86	97,14 $\pm$ 6,15	100,08 $\pm$ 7,15
Resv. 50 μ M	95,78 $\pm$ 10,83	98,61 $\pm$ 7,83	97,24 $\pm$ 5,23	98,18 $\pm$ 10,49
Resv. 100 μ M	79,65 $\pm$ 6,01	87,04 $\pm$ 10,55	91,62 $\pm$ 6,45	94,28 $\pm$ 7,47
p-valor	<0,001	0,016	0,622	0,725

Figura 19: Porcentaje de viabilidad de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 μ M) durante 24 horas respecto al control (media $\pm$ desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas. Resv.: resveratrol.



(0Gy, $p < 0,001$; 1Gy, $p = 0,016$; 2.5Gy, $p = 0,622$; 5Gy, $p = 0,725$)

48 horas

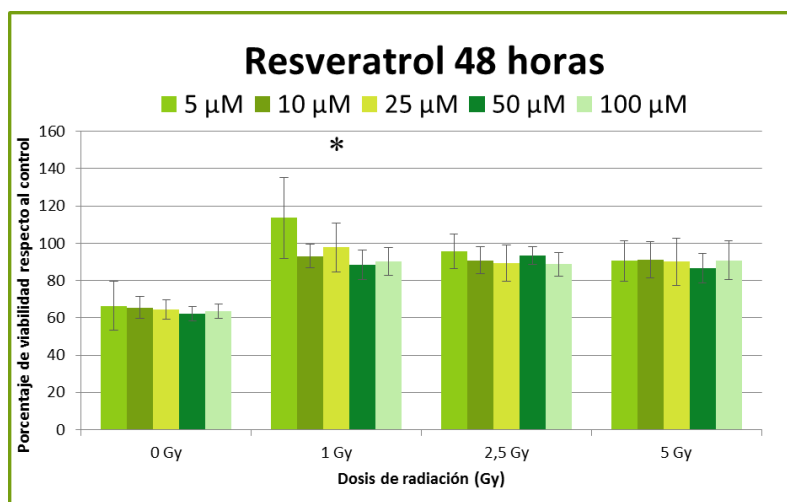
Tras 48 horas de tratamiento, la concentración mínima que disminuyó de forma significativa la viabilidad celular respecto al control no tratado fue 10 μ M a una dosis de radiación de 1Gy. Así mismo, la concentración que produjo una mayor disminución de la viabilidad celular fue en todos los casos la de 50 μ M, a

excepción del grupo de células que recibió 2.5Gy de radiación, donde la máxima disminución de la viabilidad celular respecto al control tuvo lugar a una concentración de 100µM (Tabla 3 y Figura 20).

Tabla 3: Porcentaje de viabilidad de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 µM) durante 48 horas respecto al control (media ± desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas. Resv.: resveratrol.

	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy
Resv. 5 µM	66,32 ± 13,10	113,56 ± 21,65	95,37 ± 9,11	90,51 ± 10,76
Resv. 10 µM	65,57 ± 5,86	93,09 ± 6,21	90,81 ± 7,37	91,05 ± 9,61
Resv. 25 µM	64,42 ± 5,18	97,67 ± 13,21	89,37 ± 9,74	90,01 ± 12,65
Resv. 50 µM	62,05 ± 3,88	88,41 ± 8,12	93,47 ± 4,81	86,73 ± 7,88
Resv. 100 µM	63,49 ± 3,71	90,16 ± 7,44	88,72 ± 6,21	90,82 ± 10,28
p-valor	0,704	<0,001	0,268	0,881

Figura 20: Porcentaje de viabilidad de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 µM) durante 48 horas respecto al control (media ± desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas. Resv.: resveratrol.



(0Gy, p=0,704; 1Gy, p<0,001; 2.5Gy, p=0,268; 5Gy, p=0,881)

72 horas

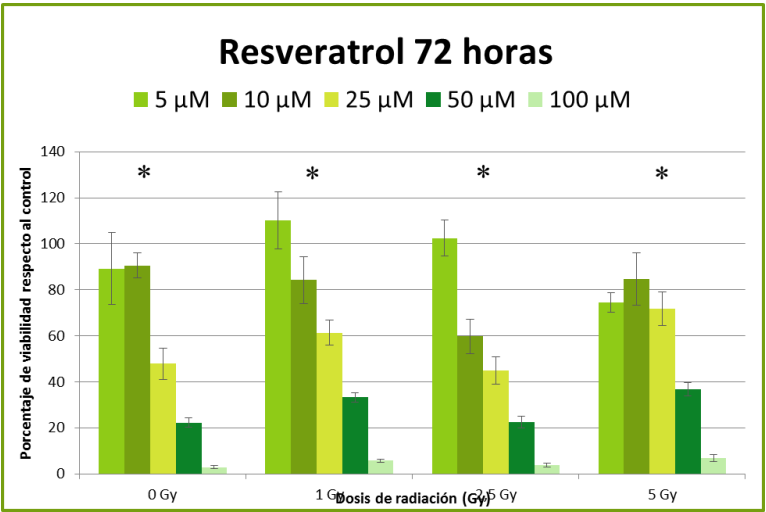
Transcurridas 72 horas de incubación, la concentración mínima de resveratrol que produce un descenso significativo de la viabilidad celular con respecto al control es la de 5 μ M, sin recibir dosis de radiación y con 5Gy, puesto que con 1Gy y 2.5Gy de radiación, la concentración mínima es de 10 μ M.

En este caso, la disminución de la viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento, es mucho más acentuada que con 24 y 48 horas de incubación. Existen diferencias significativas en todos los grupos de radiación, siendo la concentración de 100 μ M la que provoca un severo descenso de la viabilidad celular en todos los casos (Tabla 4 y Figura 21).

Tabla 4: Porcentaje de viabilidad de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 μ M) durante 72 horas respecto al control (media $\pm$ desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas. Resv.: resveratrol.

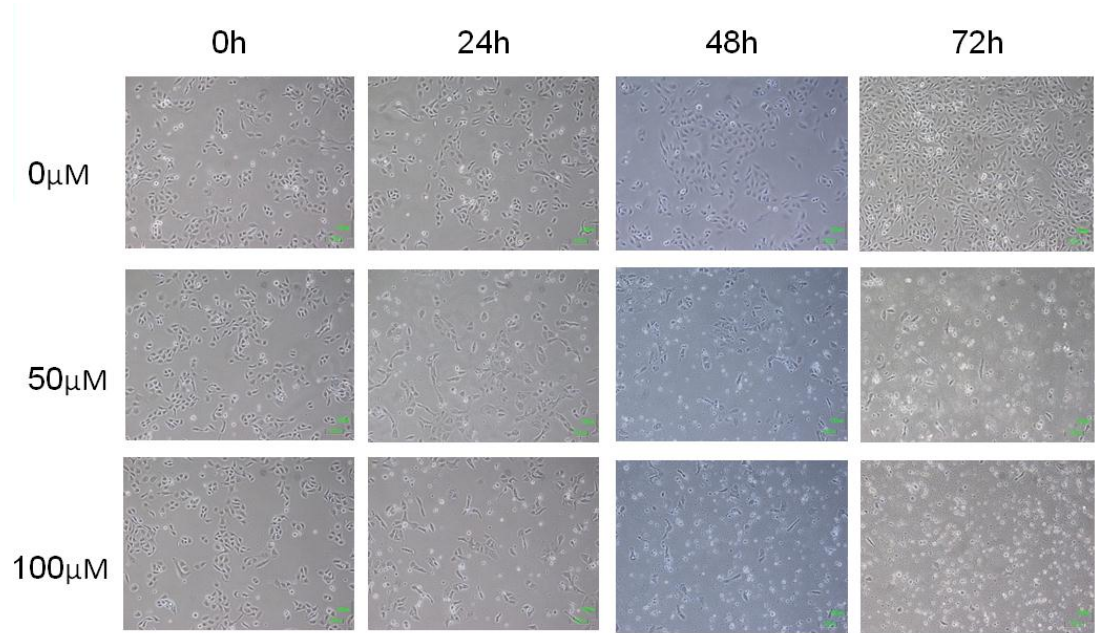
	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy
Resv. 5 μ M	89,17 $\pm$ 15,62	110,24 $\pm$ 12,44	102,74 $\pm$ 7,77	74,46 $\pm$ 4,11
Resv. 10 μ M	90,60 $\pm$ 5,48	84,18 $\pm$ 10,15	59,79 $\pm$ 7,43	84,66 $\pm$ 11,37
Resv. 25 μ M	47,81 $\pm$ 6,87	61,25 $\pm$ 5,46	44,92 $\pm$ 5,86	71,82 $\pm$ 7,36
Resv. 50 μ M	22,21 $\pm$ 1,95	33,18 $\pm$ 2,01	22,34 $\pm$ 2,56	36,71 $\pm$ 2,93
Resv. 100 μ M	2,90 $\pm$ 0,64	5,67 $\pm$ 0,76	3,68 $\pm$ 0,87	6,78 $\pm$ 1,42
p-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Figura 21: Porcentaje de viabilidad de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 μ M) durante 72 horas respecto al control (media $\pm$ desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas. Resv.: resveratrol.



(0Gy, $p < 0,001$; 1Gy, $p < 0,001$; 2.5Gy, $p < 0,001$; 5Gy, $p < 0,001$)

Figura 22: Aspecto de las células de la línea PE/CA-PJ15 cultivadas durante 24, 48 y 72 horas en presencia de 0, 50 y 100 μ M de resveratrol.



4.2. Efecto del resveratrol y la irradiación sobre la apoptosis celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.

El tratamiento de la línea celular PE/CA PJ 15 con resveratrol (0-100 μ M) e irradiación (0,1, 2.5 y 5 Gy) durante 24, 48 o 72 horas provocó un aumento significativo de la apoptosis celular, que resultó

dependiente de la duración de la incubación, de la concentración de polifenol utilizada y de la dosis de radiación.

24 horas

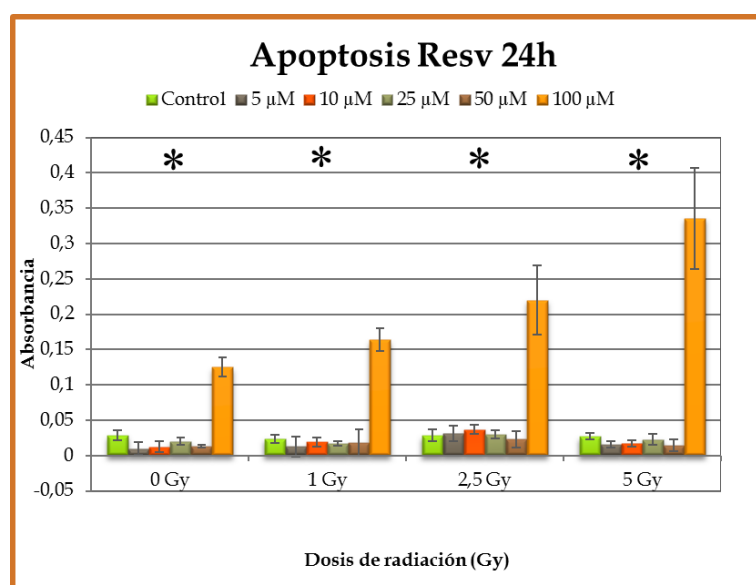
La incubación de las células PE/CA PJ 15 con resveratrol durante 24 horas no produjo un aumento significativo de la apoptosis en la mayoría de los grupos de concentración, manteniéndose todos los valores comprendidos entre 5-50 μ M próximos a los de las células control.

La concentración mínima que produjo un mayor aumento de la apoptosis de manera significativa en valores absolutos fue 5 μ M a 2.5Gy de dosis de radiación. Sin embargo, con una concentración de 100 μ M, los datos son muy significativos en todos los grupos de radiación, elevándose notablemente la cantidad de apoptosis conforme aumentamos la dosis de radiación desde 0Gy a 5Gy (Tabla 5 y Figura 23).

Tabla 5: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 μ M) durante 24 horas (media $\pm$ desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas.

	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy
Control	0,0282 $\pm$ 0,0073	0,0236 $\pm$ 0,0055	0,0284 $\pm$ 0,0086	0,0271 $\pm$ 0,0043
5 μ M	0,0099 $\pm$ 0,0091	0,0129 $\pm$ 0,0144	0,0311 $\pm$ 0,0109	0,0157 $\pm$ 0,0047
10 μ M	0,0124 $\pm$ 0,0079	0,0194 $\pm$ 0,0066	0,0369 $\pm$ 0,0065	0,0174 $\pm$ 0,0047
25 μ M	0,0202 $\pm$ 0,0054	0,0170 $\pm$ 0,0036	0,0297 $\pm$ 0,0056	0,0224 $\pm$ 0,0078
50 μ M	0,0135 $\pm$ 0,0022	0,0185 $\pm$ 0,0040	0,0231 $\pm$ 0,0114	0,0144 $\pm$ 0,0080
100 μ M	0,1252 $\pm$ 0,0136	0,1637 $\pm$ 0,0165	0,2197 $\pm$ 0,0491	0,3354 $\pm$ 0,0718
p-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Figura 23: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 μ M) durante 24 horas (media $\pm$ desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas



(0Gy, $p < 0,001$; 1Gy, $p < 0,001$; 2.5Gy, $p < 0,001$; 5Gy, $p < 0,001$)

48 horas

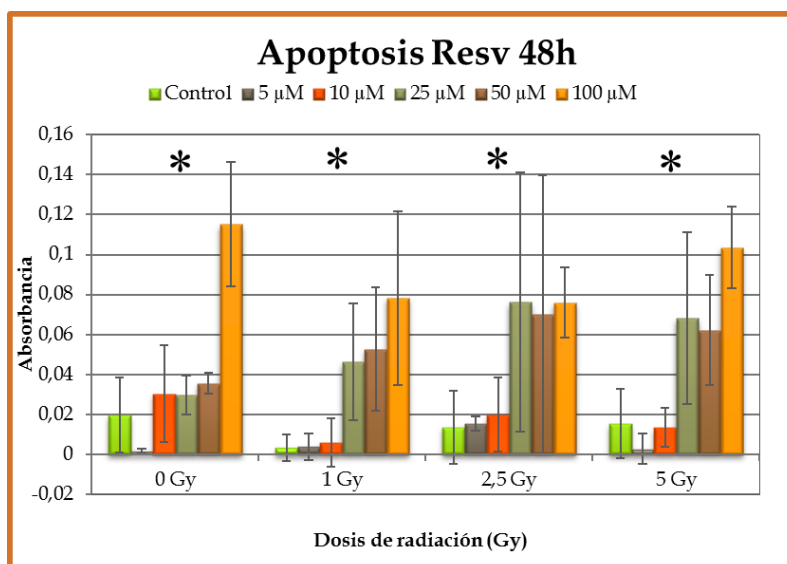
Después de 48 horas de tratamiento se observa una menor actividad sobre la apoptosis celular. Sin embargo, podemos observar como las mayores concentraciones (25-100 μ M) provocan un aumento gradual significativo de la apoptosis celular en todos los grupos de radiación.

El tratamiento que mayor aumento de la apoptosis celular provoca con datos muy significativos en ambos grupos es 100µM a 0 y 5Gy de dosis de radiación (Tabla 6 y Figura 24).

Tabla 6: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 µM) durante 48 horas (media ± desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas.

	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 gy
Control	0,0197 ± 0,0189	0,0034 ± 0,0068	0,0136 ± 0,0182	0,0271 ± 0,0043
5 µM	0,0017 ± 0,0014	0,0039 ± 0,0068	0,0154 ± 0,0036	0,0028 ± 0,0076
10 µM	0,0304 ± 0,0242	0,0060 ± 0,0121	0,0199 ± 0,0185	0,0135 ± 0,0096
25 µM	0,0297 ± 0,0099	0,0463 ± 0,0293	0,0761 ± 0,0648	0,0681 ± 0,0429
50 µM	0,0356 ± 0,0054	0,0527 ± 0,0307	0,0699 ± 0,0097	0,0622 ± 0,0274
100 µM	0,1152 ± 0,0311	0,0782 ± 0,0435	0,0759 ± 0,0175	0,1034 ± 0,0204
p-valor	<0,001	0,014	0,038	0,001

Figura 24: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 µM) durante 48 horas (media ± desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas.



(0Gy, p<0,001; 1Gy, p=0,014; 2.5Gy, p=0,038; 5Gy, p=0,001)

72 horas

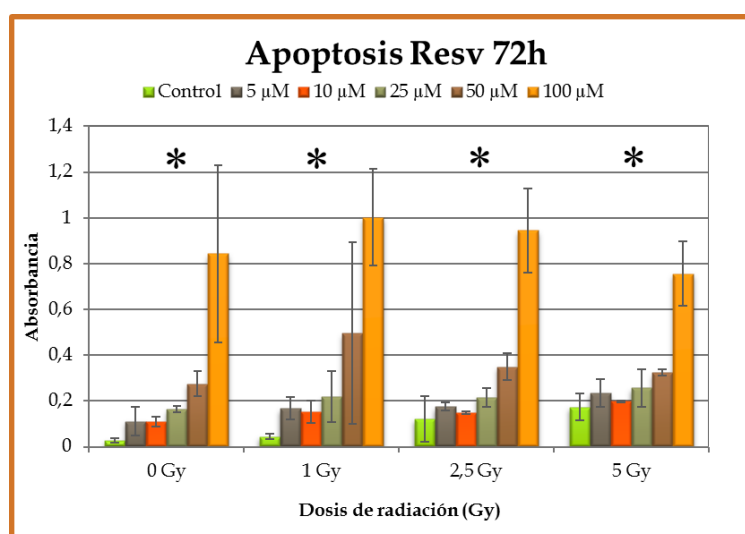
Transcurridas 72 horas de incubación se observa un repunte en la actividad de la apoptosis celular. De esta forma, volvemos a observar como las mayores concentraciones (25-100µM) provocan un aumento gradual significativo de la apoptosis celular en todos los grupos de radiación.

El tratamiento que mayor aumento de la apoptosis celular provoca con datos muy significativos en todos los grupos vuelve a ser 100µM a 1Gy de dosis de radiación (Tabla 7 y Figura 25).

Tabla 7: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 µM) durante 72 horas (media ± desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas.

	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 gy
Control	0,0281 ± 0,0099	0,0451 ± 0,0111	0,1236 ± 0,0995	0,1734 ± 0,0581
5 µM	0,1111 ± 0,0624	0,1674 ± 0,0494	0,1762 ± 0,0177	0,2352 ± 0,0614
10 µM	0,1097 ± 0,0219	0,1534 ± 0,0488	0,1481 ± 0,0056	0,1995 ± 0,0035
25 µM	0,1647 ± 0,0127	0,2178 ± 0,1112	0,2164 ± 0,0413	0,2568 ± 0,0813
50 µM	0,2759 ± 0,0541	0,4961 ± 0,3967	0,3501 ± 0,0585	0,3249 ± 0,0125
100 µM	0,8436 ± 0,3858	1,0027 ± 0,2106	0,9447 ± 0,1822	0,7559 ± 0,1403
p-valor	0,001	0,001	<0,001	<0,001

Figura 25: Valores absolutos de absorbancia de la línea celular PE/CA PJ 15 irradiada (0-5 Gy) y tratada con resveratrol (5-100 μ M) durante 72 horas (media $\pm$ desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 10 medidas.



(0Gy, $p=0,001$; 1Gy, $p=0,001$; 2.5Gy, $p<0,001$; 5Gy, $p<0,001$)

4.3. Efecto del resveratrol y la irradiación sobre la migración celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA PJ 15.

El tratamiento de la línea celular PE/CA PJ 15 con resveratrol de 0-100 μ M e irradiación (Tabla 8), produce un descenso de la migración celular de manera significativa a:

-1Gy tras 8 horas de tratamiento, siendo la concentración de 100 μ M la que produce un mayor efecto (Figura 27).

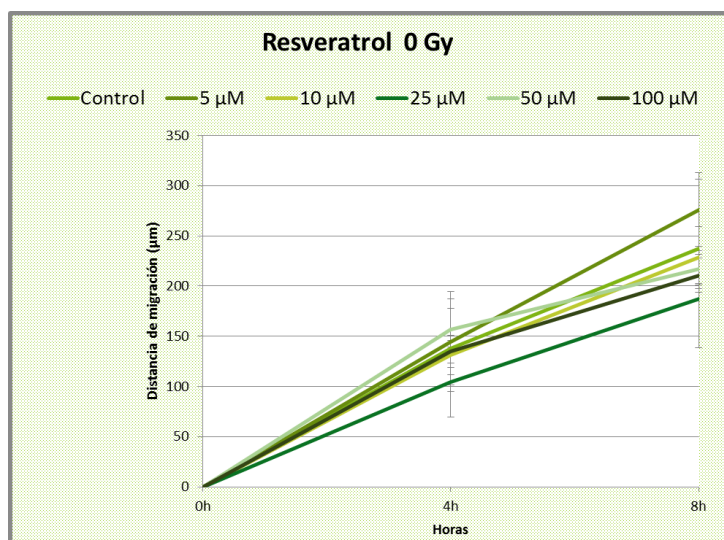
-2.5Gy tras 8 horas de tratamiento, siendo igualmente 100 μ M la concentración que ocasionó un mayor efecto sobre la migración celular (Figura 28).

-5Gy tanto a las 4 como a las 8 horas de tratamiento. Sin embargo, a las 4 horas la concentración que más disminuye la migración celular es 50 μ M, volviendo a remontar la de 100 μ M transcurridas las 8 horas de tratamiento (Figura 29).

Tabla 8: Distancia de migración (μm ; media $\pm$ desviación estándar) de la línea celular PE/CA PJ 15 tratada con resveratrol (5-100 μM) e irradiada con 0, 1, 2.5 y 5 Gy; cada valor es la media de 8 medidas.

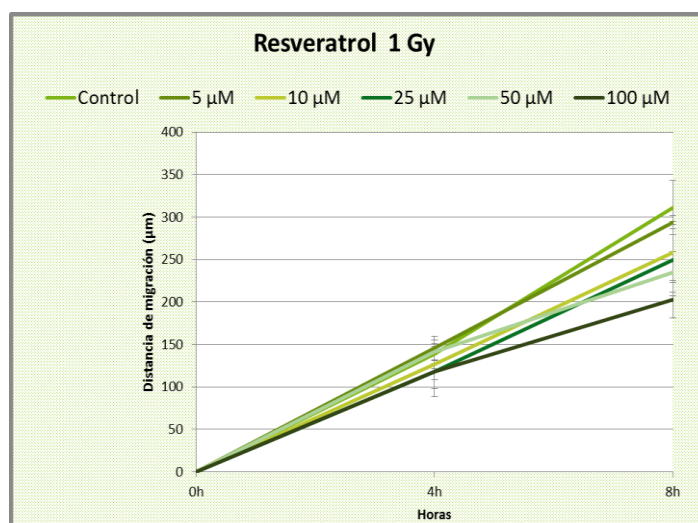
	0Gy		1Gy		2.5Gy		5Gy	
Tiempo	T4	T8	T4	T8	T4	T8	T4	T8
Control	137,41 $\pm$ 40,03	237,23 $\pm$ 69,35	138,44 $\pm$ 17,01	311,33 $\pm$ 31,94	158,62 $\pm$ 5,22	295,95 $\pm$ 25,87	173,58 $\pm$ 19,81	305,56 $\pm$ 26,72
5 μM	144,19 $\pm$ 42,81	276,12 $\pm$ 36,38	145,59 $\pm$ 14,21	294,17 $\pm$ 7,93	141,27 $\pm$ 23,04	276,64 $\pm$ 45,84	146,85 $\pm$ 4,95	276,23 $\pm$ 10,57
10 μM	131,05 $\pm$ 19,58	228,30 $\pm$ 30,79	126,89 $\pm$ 28,64	258,49 $\pm$ 35,94	152,04 $\pm$ 37,74	253,02 $\pm$ 14,86	130,25 $\pm$ 13,01	249,14 $\pm$ 26,26
25 μM	104,21 $\pm$ 34,96	186,98 $\pm$ 48,34	117,94 $\pm$ 29,77	249,34 $\pm$ 41,78	127,44 $\pm$ 8,43	259,28 $\pm$ 44,84	109,25 $\pm$ 22,32	196,33 $\pm$ 22,62
50 μM	156,91 $\pm$ 37,68	216,95 $\pm$ 14,68	141,36 $\pm$ 9,15	235,38 $\pm$ 24,03	129,01 $\pm$ 22,36	203,86 $\pm$ 50,31	118,87 $\pm$ 8,17	188,91 $\pm$ 15,73
100 μM	134,60 $\pm$ 11,44	210,73 $\pm$ 17,08	118,05 $\pm$ 9,37	203,31 $\pm$ 21,82	101,86 $\pm$ 40,96	195,21 $\pm$ 21,31	126,72 $\pm$ 19,37	186,81 $\pm$ 12,76
p-valor	0,386	0,104	0,246	0,001	0,082	0,006	<0,001	<0,001

Figura 26: Distancia de migración (μm ; media $\pm$ desviación estándar) de la línea celular PE/CA PJ 15 tratada con resveratrol (5-100 μM) sin irradiar; cada valor es la media de 8 medidas.



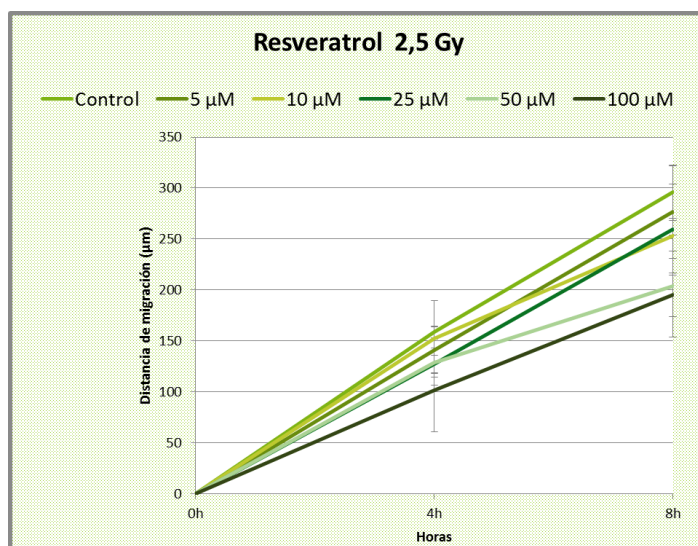
(t4, $p=0,386$; t8, $p=0,104$)

Figura 27: Distancia de migración (μm ; media $\pm$ desviación estándar) de la línea celular PE/CA PJ 15 tratada con resveratrol (5-100 μM) e irradiada con 1Gy; cada valor es la media de 8 medidas.



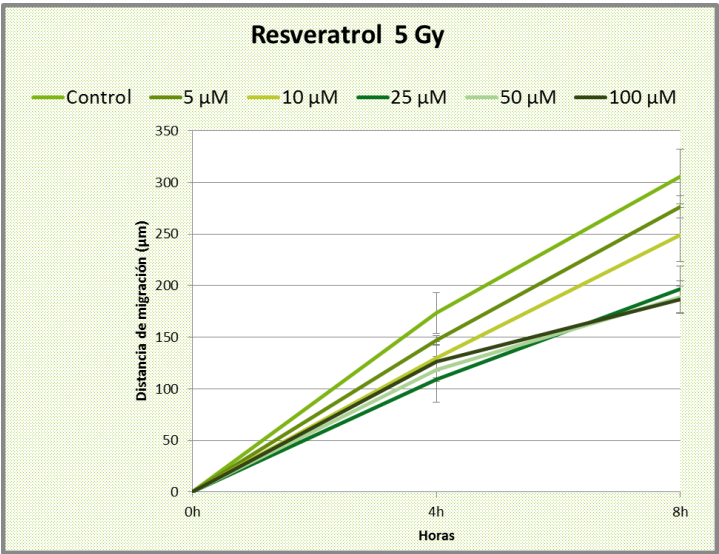
(t4, $p=0,246$; t8, $p=0,001$)

Figura 28: Distancia de migración (μm ; media $\pm$ desviación estándar) de la línea celular PE/CA PJ 15 tratada con resveratrol (5-100 μM) e irradiada con 2,5Gy; cada valor es la media de 8 medidas.



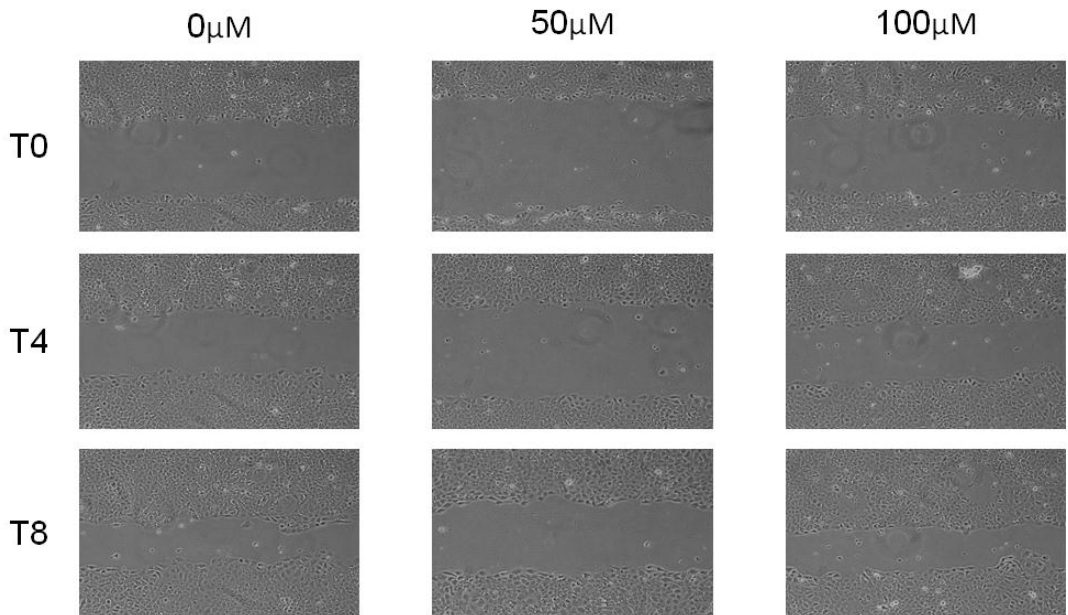
(t4, $p=0,082$; t8, $p=0,006$)

Figura 29: Distancia de migración (μm ; media $\pm$ desviación estándar) de la línea celular PE/CA PJ 15 tratada con resveratrol (5-100 μM) e irradiada con 5Gy; cada valor es la media de 8 medidas.



(t4, $p<0,001$; t8, $p<0,001$)

Figura 30: Migración de células de la línea PE/CA-PJ15 tratadas con resveratrol 0, 50 y 100 μM transcurridas 0, 4 y 8 horas de incubación.



4.4. Efecto del resveratrol y la irradiación sobre el ciclo celular en la línea de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ 15.

La incubación de las células PE/CA PJ15 con resveratrol a concentraciones de 50µM y 100µM durante 24-72 horas causó severas alteraciones en el ciclo celular, ya que hubo cambios significativamente estadísticos en el porcentaje de células que se encontraban en cada una de las fases, en todos los grupos de estudio.

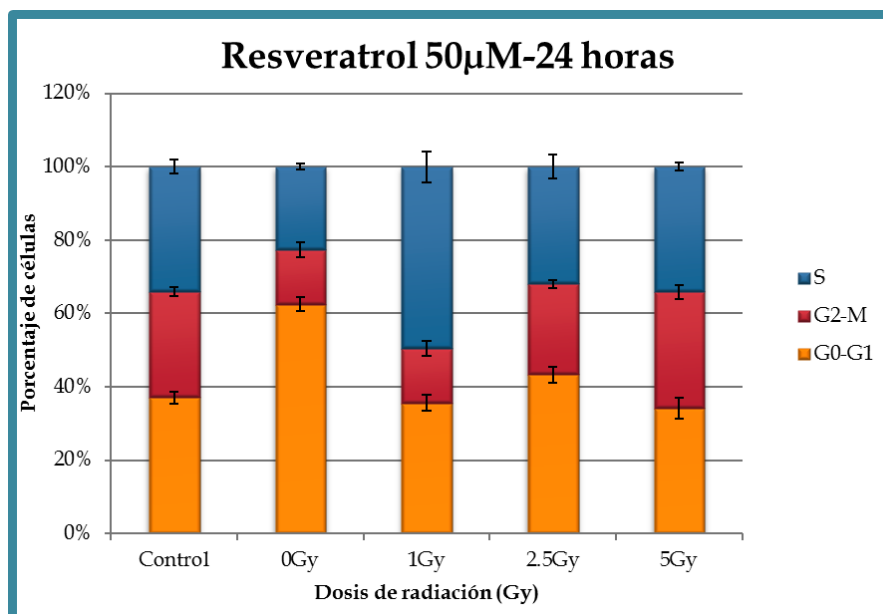
Las células no tratadas se encontraban a las 24 horas distribuidas casi por igual en las 3 fases del ciclo celular, sin embargo, conforme transcurren las 48-72 horas, se produce un aumento de la fase G_0-G_1 en detrimento de la fase S.

24horas-50µM: se produce un ligero aumento de la fase S en la mayoría de los grupos de estudio a consta de la disminución de la fase G_2-M (Tabla 9 y Figura 31).

Tabla 9: Efectos de la combinación de resveratrol (50 µM) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 24 horas de incubación (ANOVA).

	G_0-G_1	G_2-M	S
Control	37,05 ± 1,64	28,84 ± 1,16	34,11 ± 1,84
50µM	62,50 ± 1,93	14,85 ± 2,09	22,64 ± 0,81
50µM-1Gy	35,61 ± 2,13	14,88 ± 2,06	49,51 ± 4,21
50µM-2.5Gy	43,31 ± 2,24	24,68 ± 1,06	32,01 ± 3,31
50µM-5Gy	34,18 ± 2,94	31,66 ± 1,88	34,15 ± 1,11
p-valor	<0,001	<0,001	<0,001

Figura 31: Efectos de la combinación de resveratrol (50 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 24 horas de incubación (ANOVA).



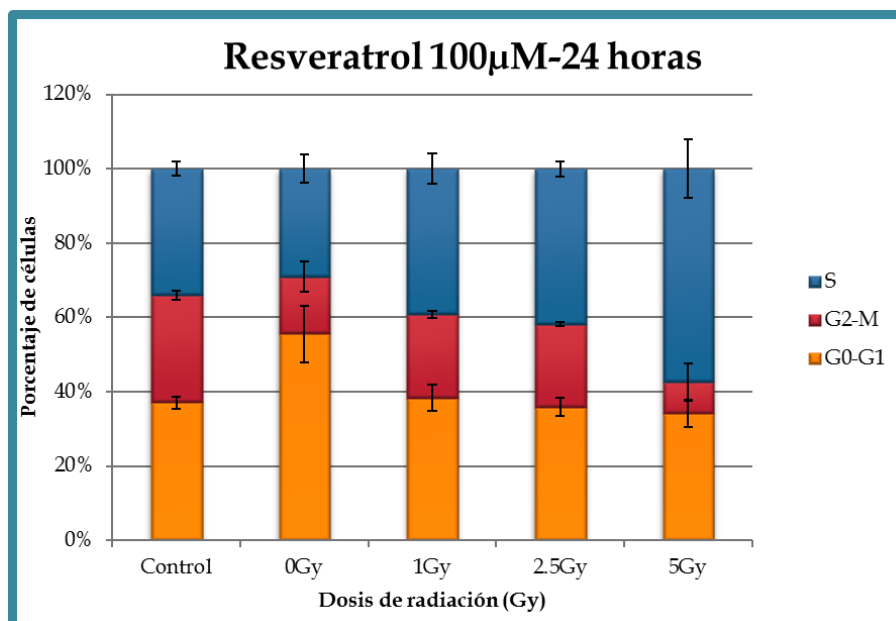
(G₀-G₁, p<0,001; G₂-M, p<0,001, S, p<0,001)

100μM-24horas: se produce un aumento de la fase S conforme vamos aumentando la dosis de radiación en detrimento de la fase G₂-M. Si no aplicamos dosis de radiación, el aumento en el porcentaje celular se produce entonces en la fase G₀-G₁ (Tabla 10 y Figura 32).

Tabla 10: Efectos de la combinación de resveratrol (100 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 24 horas de incubación (ANOVA).

	G ₀ -G ₁	G ₂ -M	S
Control	37,05 ± 1,64	28,84 ± 1,16	34,11 ± 1,84.
100μM	55,53 ± 7,64	15,39 ± 4,14	29,07 ± 3,83.
100μM-1Gy	38,25 ± 3,51	22,53 ± 0,97	39,21 ± 4,05.
100μM-2.5Gy	35,87 ± 2,42	22,27 ± 0,51	41,91 ± 2,01.
100μM-5Gy	34,07 ± 3,59.	8,59 ± 4,81	57,32 ± 7,83.
p-valor	0,001	<0,001	<0,001

Figura 32: Efectos de la combinación de resveratrol (100 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 24 horas de incubación (ANOVA).



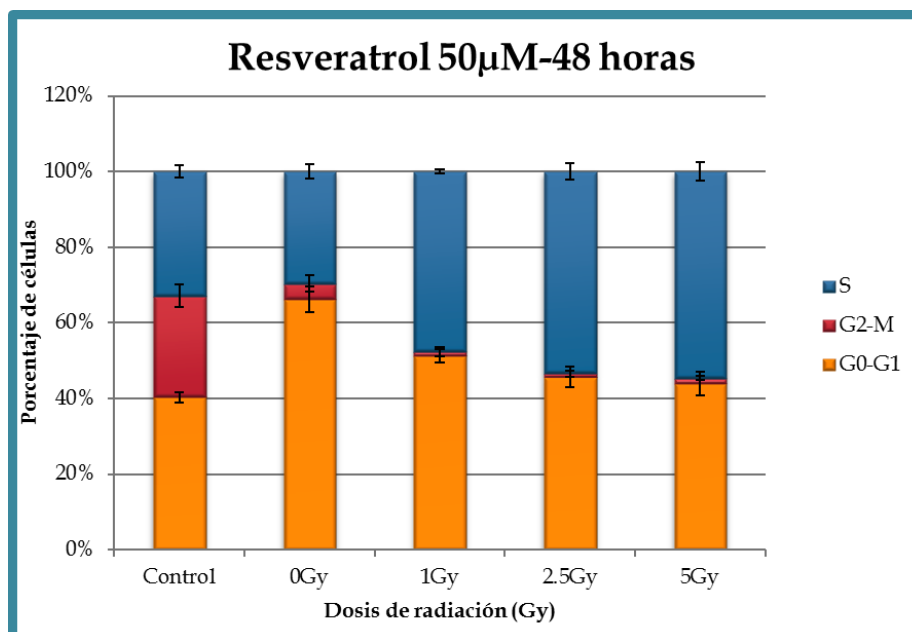
(G_0-G_1 , $p=0,001$; G_2-M , $p<0,001$, S , $p<0,001$)

50 μ M-48horas: se produce una disminución muy relevante de la fase G_2-M conforme aumentamos la dosis de radiación, provocando el aumento de la fase S , a diferencia del grupo donde no aplicamos radiación, donde el aumento del porcentaje celular se observa en la fase G_0-G_1 (Tabla 11 y Figura 33).

Tabla 11: Efectos de la combinación de resveratrol (50 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 48 horas de incubación (ANOVA).

	G ₀ -G ₁	G ₂ -M	S
Control	40,33 $\pm$ 1,31	26,79 $\pm$ 2,92	32,87 $\pm$ 1,62
50 μ M	66,21 $\pm$ 3,48	4,08 $\pm$ 2,18	29,71 $\pm$ 1,89
50 μ M-1Gy	51,19 $\pm$ 1,74	1,19 $\pm$ 1,23	47,61 $\pm$ 0,61
50 μ M-2.5Gy	45,66 $\pm$ 2,71	0,85 $\pm$ 0,89	53,49 $\pm$ 2,17
50 μ M-5Gy	43,87 $\pm$ 3,11	1,51 $\pm$ 0,56	54,61 $\pm$ 2,54
p-valor	<0,001	<0,001	<0,001

Figura 33: Efectos de la combinación de resveratrol (50 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 48 horas de incubación (ANOVA).



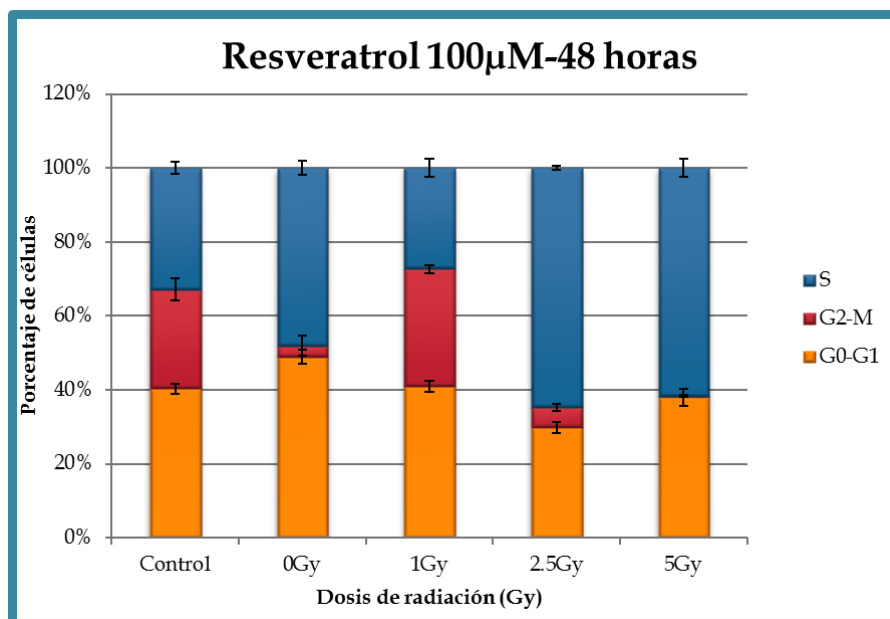
(G₀-G₁, p<0,001; G₂-M, p<0,001, S, p<0,001)

100 μ M-48horas: aumento de la fase S en la mayoría de los grupos de estudio en detrimento de la fase G₂-M, donde llega a ser casi inexistente al someter las células a 5Gy de dosis radiación (Tabla 12 y Figura 34).

Tabla 12: Efectos de la combinación de resveratrol (100 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 48 horas de incubación (ANOVA).

	G ₀ -G ₁	G ₂ -M	S
Control	40,33 ± 1,31	26,79 ± 2,92	32,87 ± 1,62
100 μ M	48,91 ± 1,89	3,01 ± 2,72	48,07 ± 1,96
100 μ M-1Gy	40,93 ± 1,48	31,78 ± 1,09	27,28 ± 2,36
100 μ M-2.5Gy	29,72 ± 1,48	5,46 ± 0,94	64,81 ± 0,62
100 μ M-5Gy	37,92 ± 2,31	0,31 ± 0,28	61,77 ± 2,35
p-valor	<0,001	<0,001	<0,001

Figura 34: Efectos de la combinación de resveratrol (100 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 48 horas de incubación (ANOVA).



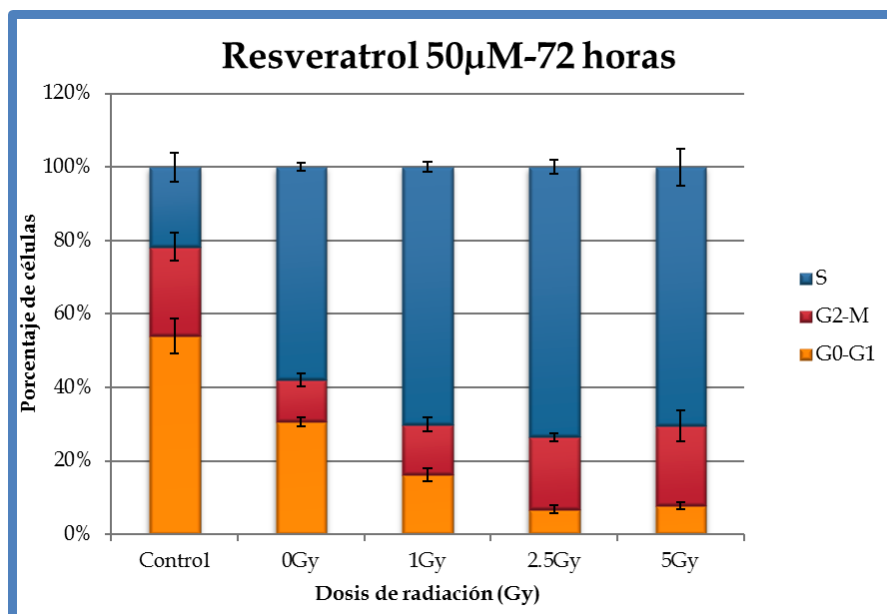
(G₀-G₁, p<0,001; G₂-M, p<0,001, S, p<0,001)

50 μ M-72horas: disminución en el porcentaje celular de las fases G₀-G₁ y G₂-M en todos los grupos de estudio y conforme aumentamos la dosis de radiación, a favor del crecimiento de la fase S (Tabla 13 y Figura 35).

Tabla 13: Efectos de la combinación de resveratrol (50 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 72 horas de incubación (ANOVA).

	G ₀ -G ₁	G ₂ -M	S
Control	53,95 $\pm$ 4,74	24,32 $\pm$ 3,84	21,73 $\pm$ 3,92
50 μ M	30,72 $\pm$ 1,22	11,29 $\pm$ 1,85	57,98 $\pm$ 1,18
50 μ M-1Gy	16,22 $\pm$ 1,68	13,63 $\pm$ 1,89	70,13 $\pm$ 1,31
50 μ M-2.5Gy	6,82 $\pm$ 1,21	19,59 $\pm$ 1,06	73,58 $\pm$ 1,91
50 μ M-5Gy	7,80 $\pm$ 0,85	21,65 $\pm$ 4,19	70,55 $\pm$ 4,99
p-valor	<0,001	0,001	<0,001

Figura 35: Efectos de la combinación de resveratrol (50 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 72 horas de incubación (ANOVA).



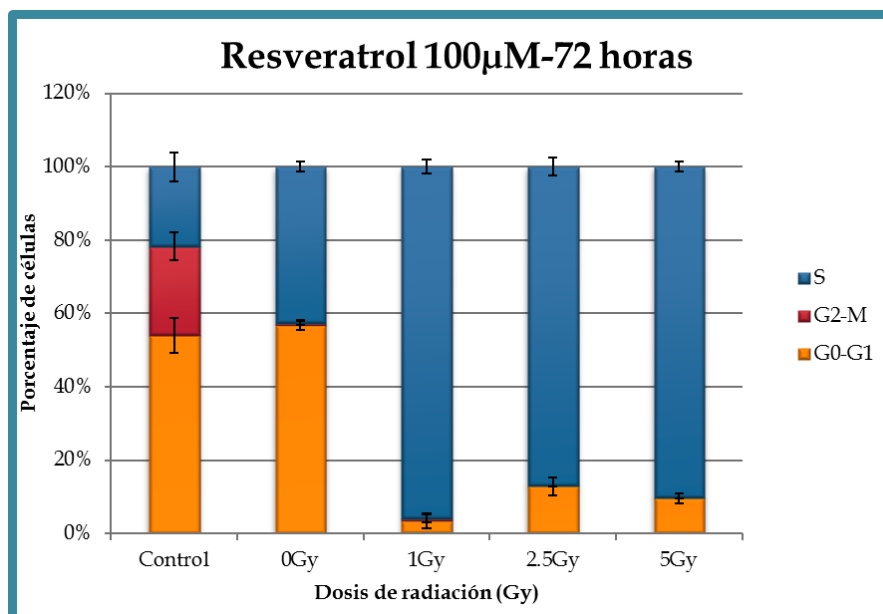
(G₀-G₁, p<0,001; G₂-M, p=0,001, S, p<0,001)

100 μ M-72horas: se produce una disminución en el porcentaje celular de las fases G₀-G₁ y G₂-M y conforme aumentamos la dosis de radiación, a favor del crecimiento masivo de la fase S. Sin embargo, en el grupo de células que no recibió radiación, no se produjo un aumento de la fase S tan relevante (Tabla 14 y Figura 36).

Tabla 14: Efectos de la combinación de resveratrol (100 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 72 horas de incubación (ANOVA).

	G ₀ -G ₁	G ₂ -M	S
Control	53,95 $\pm$ 4,74	24,32 $\pm$ 3,84	21,73 $\pm$ 3,92
100 μ M	56,73 $\pm$ 1,35	0,55 $\pm$ 0,57	42,71 $\pm$ 1,38
100 μ M-1Gy	3,51 $\pm$ 2,07	0,57 $\pm$ 0,99	95,92 $\pm$ 1,91
100 μ M-2.5Gy	12,83 $\pm$ 2,41	0 $\pm$ 0	87,16 $\pm$ 2,41
100 μ M-5Gy	9,61 $\pm$ 1,32	0 $\pm$ 0	90,39 $\pm$ 1,32
p-valor	<0,001	<0,001	<0,001

Figura 36: Efectos de la combinación de resveratrol (100 μ M) e irradiación sobre el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, después de 72 horas de incubación (ANOVA).



(G₀-G₁, p<0,001; G₂-M, p<0,001, S, p<0,001)

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El cáncer oral es el quinto cáncer más incidente y la séptima causa más común de muerte por cánceres en el mundo. La incidencia anual en todo el mundo de cáncer oral se estimó en 274.000 casos, lo que representa el 2,5% de todos los tumores malignos en el año 2002. (Chen HM y cols., 2011).

Aunque el tratamiento de la enfermedad en estadios tempranos (estadios I o II) tiene con frecuencia éxito, las recurrencias de la enfermedad ocurren aproximadamente en el 20% al 30% de los pacientes, en particular las locales o linfáticas. Para pacientes con enfermedad avanzada (estadios III o IV), la terapia estándar es mucho menos exitosa. Menos del 30% de ellos consiguen cura. A pesar de los avances recientes en cirugía, radioterapia y quimioterapia, la tasa de supervivencia global a los 5 años para los pacientes en fases avanzadas de la enfermedad es de las más bajas de los principales tipos de cáncer y no ha cambiado durante las últimas dos décadas (Funk GF y cols., 2002; Neville BW y Day TA, 2002). Como utilizando los tratamientos estándar no se consigue curar esta enfermedad, es necesario continuar con la investigación de nuevos agentes quimioterapéuticos.

Durante los últimos años, se ha focalizado una gran atención sobre los antioxidantes naturales presentes en alimentos y bebidas debido a su función en la prevención del cáncer (Surh, 2003). Entre éstos, el resveratrol ha ganado interés como agente quimiopreventivo capaz de inducir la apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer (Ulrich S y cols., 2005; Fulda y Debatin, 2006). Además, el tratamiento con resveratrol parece no causar efecto apoptótico en las células y tejidos normales (Baur y Sinclair, 2006; Bishayee, 2009).

Estas propiedades se apreciaron por primera vez cuando Jang M y cols., (1997), demostraron que el resveratrol posee un carácter quimiopreventivo y citostático a través de las tres grandes etapas de la carcinogénesis, es decir, iniciación, promoción y progresión. Desde entonces, se ha producido un aluvión

de artículos que informan acerca de la implicación del resveratrol en la quimioprevención del cáncer a través de una amplia gama de acciones, que no son del todo bien conocidas. Al parecer, el resveratrol promueve la apoptosis en células de cáncer mediante el bloqueo de las proteínas anti-apoptóticas de expresión o por inhibición de la transducción de diversas señales. (Fulda S y Debatin KM, 2006).

En el presente estudio, hemos optado por utilizar dosis de resveratrol que van desde 5 μ M a 100 μ M para el tratamiento de las células, basándonos en nuestra búsqueda de los estudios realizados por otros. Para el resveratrol, la mayoría de los estudios *in vitro* utilizan concentraciones que oscilan entre 1-100 μ M. Sin embargo, las concentraciones que muestran un efecto detectable sobre la viabilidad celular son entre 25-100 μ M. (Simon HU y cols., 2000).

En nuestro estudio, el resveratrol ha mostrado un efecto citotóxico sobre la línea celular PE/CA-PJ15 de carcinoma oral de células escamosas. Dicho efecto, se puso de manifiesto tanto en la medición de la viabilidad celular como en la apoptosis. En ambos casos, el efecto de resveratrol aumenta de manera directamente proporcional a la concentración y al tiempo. La viabilidad celular fue menor transcurridas las 72 horas de incubación celular y utilizando la concentración mayor de 100 μ M, al igual que ocurre con la apoptosis celular, que aumenta de manera considerable transcurridas las 72 horas de tratamiento. Existen gran cantidad de estudios que demuestran las propiedades del resveratrol frente a la viabilidad celular y la apoptosis celular, en líneas celulares de cáncer de próstata (Rashid A y cols., 2011), páncreas (Roy SK y cols., 2011; Zhou JH y cols., 2011), colon (Vanamala J y cols., 2011), linfomas (Hussain AR y cols., 2011) y cáncer nasofaríngeo (Huang TT y cols., 2011). Del mismo modo, Zhang Q y cols., (2005), observaron como el resveratrol a dosis de 0-100 μ M es capaz de disminuir la viabilidad celular en una línea de carcinoma oral de células escamosas de lengua.

Si comparamos el efecto del resveratrol con otros estudios que utilizan diferentes agentes polifenólicos sobre la misma línea celular, como el realizado

por López-Jornet P y cols., (2011), encontramos que transcurridas las 72 horas de tratamiento, la disminución de la viabilidad celular es mucho mayor que la que proporciona la curcumina, si bien las concentraciones empleadas de resveratrol son más altas.

En el estudio de Huang TT y cols., 2011, encontraron que el resveratrol puede actuar en las 3 vías mediadoras de la apoptosis sobre tres líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo, uno de ellas de carcinoma de células escamosas: aumentando la expresión en la membrana celular de receptores de muerte como FasL, facilitando la vía mitocondrial al disminuir la expresión de Bcl-2 y aumentar la de proteínas como Bax y regulando la expresión de GRP78 en la vía del retículo endoplasmático. Todos estos procesos conducen a la activación de diferentes caspasas que concluyen con la fragmentación del ADN celular y apoptosis.

Hussain AR y cols., 2011, descubrieron que el resveratrol favorece la apoptosis en una línea celular de linfoma B a través de la activación de las caspasas 3 y 9 y la escisión de PARP. Así mismo, en el estudio de Wang Y y cols., (2012) observaron como el pterostilbeno, un análogo natural dimetilado del resveratrol, provocó apoptosis celular de manera dependiente de la dosis en dos líneas celulares de tumor de mama a través de la escisión de PARP. En el estudio de Roslie H y cols., 2012, encontraron que uno de los estilbenos análogos del resveratrol produjo apoptosis en la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica al activar las caspasas 3 y 9. Además, descubrieron de manera evidente que esta apoptosis se producía por la vía mitocondrial. El estudio de Jiang H y cols., (2010), también mostró que la combinación de resveratrol y sulforafano a concentraciones de 25µM aumenta la apoptosis en una línea celular de glioma mediante la activación de la caspasa-3 por la vía mitocondrial, al favorecer la liberación del citocromo C al citoplasma.

En cuanto al efecto que presenta el resveratrol sobre la migración celular, nuestros resultados han mostrado que este polifenol provoca una fuerte inhibición en la capacidad de migración celular en nuestra línea de estudio. En

el estudio de Jiang H y cols., (2010), encontraron como el resveratrol inhibe la migración celular en una línea celular de glioma, y este efecto es mucho mayor al combinarlo con el tratamiento de sulforafano, un isotiocianato que se encuentra en grandes concentraciones en coliflores. La distancia después de un tratamiento combinado con RSV y SFN fue del 91% en comparación a la distancia del control a las 0 horas, lo que indica que la migración de células fue casi completamente inhibida. Cicha I y cols., (2011), también observaron que el resveratrol a concentraciones de 10-20 μ M inhibe la migración endotelial y monocítica.

El presente estudio también mostró que el resveratrol produce en la línea celular estudiada un arresto del ciclo celular en la fase S en detrimento de las fases G₀-G₁ y G₂-M. En el estudio de Baarine M y cols., (2011), realizado sobre una línea de celular tumoral de corazón en ratones, encontraron que el RSV es un potente inductor de apoptosis asociada con una acumulación de las células en la fase S del ciclo celular, mientras que en las células musculares cardíacas normales RSV no induce la muerte celular. Soto BL y cols., (2011), observaron como el RSV interfiere en la proliferación y ciclo celular de manera dependiente de la dosis (1.5-50 μ M) en líneas celulares humanas de melanoma, neuroblastoma y en esplenocitos y células sanguíneas mononucleares de ratón.

La radioterapia es una modalidad terapéutica establecida para varios tipos de cáncer. La radioterapia es limitada debido a su toxicidad grave hacia las células normales cuando se aplica a dosis altas, mientras que tiene un mínimo efecto sobre las células cancerosas a dosis bajas. Por lo tanto, la búsqueda de agentes y modalidades que podrían aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la radiación es muy importante. (Reagan-Shaw S y cols., 2008).

Nuestros resultados revelan un efecto sinérgico en la línea celular PE/CA-PJ15, cuando sumamos la radioterapia al tratamiento con resveratrol. Tras 24 horas de incubación, observamos mayor tasa de apoptosis al aplicar 5Gy de dosis de radiación, al igual que ocurre con 1Gy y 2.5Gy transcurridas las 72 horas de

tratamiento. Del mismo modo, la migración celular disminuye considerablemente conforme aumentamos la dosis de radiación, siendo la concentración de 100 μ M y aplicando 5Gy donde observamos la mayor inhibición migratoria. A su vez, al aumentar la dosis de radiación podemos observar como los efectos del resveratrol sobre el ciclo celular cambian, favoreciéndose el incremento de la fase S en detrimento de las otras dos fases del ciclo. En un estudio reciente, Rashid A y cols., 2011, encontraron que el tratamiento con resveratrol (0-10 μ M) combinado con 2-8 Gy de dosis de radiación sobre dos líneas celulares de cáncer de próstata provocó una mayor disminución de la viabilidad celular, aumento de la apoptosis celular y mayor arresto del ciclo celular en la fase S, que las células no tratadas o tratadas exclusivamente con resveratrol. Zoberi I y cols., 2002, demostraron que el tratamiento previo con resveratrol en células de cáncer cervical aumenta el efecto de la radiación ionizante de forma dosis-dependiente. Además, el resveratrol también inhibe la división celular y causa la detención del ciclo celular en la fase S.

De todas maneras, son precisos nuevas investigaciones para determinar o evaluar el uso potencial del resveratrol, tanto como agente preventivo que podemos obtener fácilmente en diversas frutas y plantas, como su uso específico a mayores concentraciones como coadyuvante en el tratamiento contra el cáncer oral. Por lo tanto, este tipo de estudio abre nuevas líneas de investigación, en las que se pueden valorar los efectos combinados de los polifenoles con los quimioterápicos más empleados y, a su vez, su uso conjunto con la radiación, para optimizar todos los recursos que están a nuestro alcance.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El mayor efecto del resveratrol sobre la viabilidad celular de la línea celular PE/CA-PJ15 se produjo transcurridas 72 horas de incubación y con 100 μ M de dosis de tratamiento.
2. El resveratrol mostró un efecto sinérgico sobre la apoptosis celular al combinarlo con irradiación, apareciendo mayores cifras de apoptosis a dosis de 100 μ M y 5Gy, en la línea PE/CA-PJ15 de COCE.
3. Dosis de 50 μ M y 100 μ M de resveratrol mostraron un mayor efecto sobre la migración celular en la línea celular PE/CA-PJ15 de COCE en combinación con una dosis de radiación de 5Gy.
4. El tratamiento con resveratrol sobre la línea celular PE/CA-PJ15 de COCE produce un arresto del ciclo celular en la fase S que es directamente proporcional a la concentración, tiempo de incubación y dosis de radiación.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 1997; 29:95-120.
2. Anekonda TS. Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 2006; 52:316-26.
3. Anthony JP, Fyfe L, Stewart D, McDougall GJ. Differential effectiveness of berry polyphenols as anti-giardial agents. *Parasitology* 2011; 138:1110-6.
4. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR y cols. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224:274-83.
5. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V y cols. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol* 2007; 8:292-93.
6. Baarine M, Thandapilly SJ, Louis XL, Mazué F, Yu L, Delmas D. Pro-apoptotic versus anti-apoptotic properties of dietary resveratrol on tumoral and normal cardiac cells. *Genes Nutr* 2011; 6:161-9.

7. Babich H, Schuck AG, Weisburg JH, Zuckerbraun HL. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *J Toxicol* 2011; 2011:467305.
8. Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev* 2010; 68:168-77.
9. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:493-506.
10. Beckman CH. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol Mol Plant Pathol* 2000; 57:101-10.
11. Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: From rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2:409-418.
12. Bonifait L, Grenier D. Cranberry polyphenols: potential benefits for dental caries and periodontal disease. *J Can Dent Assoc* 2010; 76:130.
13. Boyle P, Levin B. World Cancer Report 2008. World Health Organization. Lyon: IARC Press 2008: 344-9.

14. Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, Van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff R.H. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002; 24:198-206.

15. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation on endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 71: 673-86.

16. Cao G, Booth SL, Sadowsky JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:1081-7.

17. Ceriello A, Testa R. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:32-6.

18. Chen HM, Liu CM, Yang H, Chou HY, Chiang CP, Kuo MY. 5-aminolevulinic acid induces apoptosis via NF- κ B/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22 cells. *J Oral Pathol Med* 2011; 40:483-9.

19. Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 2007; 137:1244-52.

20. Cicha I, Regler M, Urschel K, Goppelt-Struebe M, Daniel WG, Garlischs CD. Resveratrol inhibits monocytic cell chemotaxis to MCP-1 and prevents spontaneous endothelial cell migration through Rho kinase-dependent mechanism. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18:1031-42.

21. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22:8590-607.
22. Coutinho-Camillo CM, Lourenco SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2010; 57:304-16.
23. Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J Agric Food Chem* 1997; 45:590-5.
24. Csiszar A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215:117-22.
25. Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, Zappia V, Della Ragione F. Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle* 2007; 6:2495-510.
26. Cuerda C, Luengo L.M, Valero M.A, Vidal A, Burgos R, Calvo F, y cols. Antioxidants and diabetes mellitus: review of the evidence. *Nutr Hosp.* 2011; 26:68-78.

27. Dangles O, Dufour C, Manach C, Morand C, Remesy C. Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol* 2001; 335:319-33.

28. Dao TM, Waget A, Klopp P, Serino M, Vachoux C, Pechere L, y cols. Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control. *PLoS One* 2011; 6:e20700.

29. D'Archivio M, Filesi C, Benedetto RD, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 2007; 43:348-61.

30. de Cássia Braga Ribeiro K, Kowalski LP, Latorre Mdo R. Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129:219-28.

31. de Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 1998; 12: 249-55.

32. Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev* 1997; 55:396-8.

33. Dufour C, Loonis M, Dangles O. Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radic Biol Med* 2007; 43:241-52.

34. Falaki F, Dalirsani Z, Pakfetrat A, Falaki A, Saghravanian N, Nosratzahi T, y cols. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: a retrospective study and review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16: 473-7.
35. Fan S, Tang QL, Lin YJ, Chen WL, Li JS, Huang ZQ, y cols. A review of clinical and histological parameters associated with contralateral neck metastases in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci* 2011; 3:180-91.
36. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001; 3:E255-63.
37. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000; 48:3597-604.
38. Fulda S, Debatin KM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev* 2006; 30:217-23.
39. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* 2004; 23:6702-11.

40. Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK, Hoffman HT. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a National Cancer Data Base report. *Head Neck* 2002; 24:165–80.
41. Gallus S, Bosetti C, Franceschi S, Levi F, Negri E, La Vecchia C. Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol, nutritional, and hormonal factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 514-17.
42. Gao S, Hu M. Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. *Mini Rev Med Chem* 2010; 10:550-67.
43. García V, Bascones A. Cáncer oral: Puesta al día. *Av. Odontoestomatol* 2009; 25: 239-48.
44. Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suárez C, Owen RP, y cols. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267:1001-17.
45. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305: 626-29.
46. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381):1309-12.

-
47. Gupta SC, Kannappan R, Reuter S, Kim JH, Aggarwal BB. Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215:150-60.
48. Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 2008; 7:1020-35.
49. Hedren E, Diaz V, Svanberg U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:425–30.
50. Hotta H, Nagano S, Ueda M, Tsujino Y, Koyama J, Osakai T. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:123-32.
51. Hu ML. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med J* 2011; 34:449-60.
52. Huang TT, Lin HC, Chen CC, Lu CC, Wei CF, Wu TS, y cols. Resveratrol induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via activation of multiple apoptotic pathways. *J Cell Physiol* 2011; 226:720-8.
53. Hussain AR, Uddin S, Bu R, Khan OS, Ahmed SO, Ahmed M, y cols. Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines. *PLoS One* 2011; 6:e24703.

54. Ishimoto H, Tai A, Yoshimura M, Amakura Y, Yoshida T, Hatano T, y cols. Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76:395-9.
55. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, y cols. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275:218-20.
56. Jiang H, Shang X, Wu H, Huang G, Wang Y, Al-Holou S y cols. Combination treatment with resveratrol and sulforaphane induces apoptosis in human U251 glioma cells. *Neurochem Res* 2010; 35:152-61.
57. Johnson IT, Williamson G, Musk SRR. Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients? *Nutr Res Rev* 1994; 7:175-204.
58. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:313-6.
59. Juan ME, González-Pons E, Planas JM. Multidrug resistance proteins restrain the intestinal absorption of trans-resveratrol in rats. *J Nutr* 2010; 140:489-95.

60. Kawai Y. Immunochemical detection of food-derived polyphenols in the aorta: macrophages as a major target underlying the anti-atherosclerotic activity of polyphenols. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75:609-17.
61. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
62. Kim JW, Amin AR, Shin DM. Chemoprevention of head and neck cancer with green tea polyphenols. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3:900-9.
63. Kondratyuk TP, Pezzuto JM. Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health. *Pharm Biol* 2004; 42:46-63.
64. Krajcovicova-Kudlackova M, Dusinska M. Oxidative DNA damage in relation to nutrition. *Neoplasma* 2004; 51: 30-3.
65. Kupisiewicz K, Boissy P, Abdallah BM, Hansen FD, Erben RG, Savouret JF, y cols. Potential of resveratrol analogues as antagonists of osteoclasts and promoters of osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 2010; 87:437-49.
66. Kuriakose M, Sankaranarayanan M, Nair MK, Cherian T, Sugar AW, Scully C y cols. Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992; 28B:113-20.

67. Lee AS. The glucose-regulated proteins: Stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 2001; 26:504–10.
68. Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues J, Barberger-Gateau P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol* 2007; 165:1364-71.
69. Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol.* 2010; 80:1771-92.
70. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Gómez-García F. Effect of curcumin and irradiation in PE/CA-PJ15 oral squamous cell carcinoma. *Acta Odontol Scand* 2011; 69:269-73.
71. MacFarlane M y Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 2004; 5: 674-78.
72. Madani AH, Dikshit M, Bhaduri D. Risk for oral cancer associated to smoking, smokeless and oral dip products. *Indian J Public Health* 2012; 56:57-60.
73. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727-47.

74. Matsumoto M, Hamada S, Ooshima T. Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* mt8148. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 228: 73–80.
75. Morita M, Saeki H, Mori M, Kuwano H, Sugimachi K. Risk factors for esophageal cancer and the multiple occurrence of carcinoma in the upper aerodigestive tract. *Surgery* 2002; 131:S1-S6.
76. Moskaug JØ, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:277S-283S.
77. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88:355-65.
78. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions [review]. *CA Cancer J Clin* 2002; 52:195–215.
79. Nieuwenhuis EJ, Castelijns JA, Pijpers R, van den Brekel MW, Brakenhoff RH, van der Waal I, y cols. Wait-and-see policy for the NO neck in early-stage oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma using ultrasonography-guided cytology: is there a role for identification of the sentinel node? *Head Neck* 2002; 24: 282–89.

-
80. Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T y cols. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res* 1993; 27: 124–9.
81. Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci* 2011; 76:R6-R15.
82. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2:270-8.
83. Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc* 2007; 73:339-44.
84. Pettit GR, Anderson CR, Gapud EJ, Jung MK, Knight JC, Hamel E, Pettit RK. Antineoplastic agents. 515. Synthesis of human cancer cell growth inhibitors derived from 3,4-methylenedioxy-5,4'-dimethoxy-3'-amino-Z-stilbene. *J Nat Prod* 2005; 68:1191-7.
85. Pirola L, Frojdo S. Resveratrol: One Molecule, Many Targets. *IUBMB Life* 2008; 60: 323-32.
86. Poh CF, MacAulay CE, Laronde DM, Williams PM, Zhang L, Rosin MP. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: diagnosis and screening in a technical era. *Periodontol* 2000 2011; 57:73-88.

87. Price KR, Bacon JR, Rhodes MJC. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *J Agric Food Chem* 1997; 45:938-42.
88. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res* 2008; 52: 507-26.
89. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem* 2007; 18:427-42.
90. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 2004; 11:372–80.
91. Rashid A, Liu C, Sanli T, Tsiani E, Singh G, Bristow RG, y cols. Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways. *Radiat Oncol* 2011; 6:144.
92. Rassekh CH, Johnson JT, Myers EN. Accuracy of intraoperative staging of the N0 neck in squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 1995; 105: 1334-36.

93. Rawal RM, Patel DD, Patel BP, Patel MM, Wadhwa MK, Patel PS, y cols. Assessment of glutathione-S-transferase and glutathione reductase in patients with squamous-cell carcinoma of buccal mucosa. *Int J Cancer* 1999; 83:727-31.
94. Reagan-Shaw S, Mukhtar H, Ahmad N. Resveratrol imparts photoprotection of normal cells and enhances the efficacy of radiation therapy in cancer cells. *Photochem Photobiol* 2008; 84:415-21.
95. Rizvi SI, Zaid MA. Insulin like effect of epicatechin on membrane acetylcholinesterase activity in type 2 diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28:776-8.
96. Rizvi SI, Zaid MA, Anis R, Mishra N. Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32:70-5.
97. Rodu B, Jansson C. Smokeless tobacco and oral cancer: a review of the risks and determinants. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15:252-63.
98. Roslie H, Chan KM, Rajab NF, Velu SS, Kadir SA, Bunyamin I. 3,5-dibenzoyloxy-4'-hydroxystilbene induces early caspase-9 activation during apoptosis in human K562 chronic myelogenous leukemia cells. *J Toxicol Sci* 2012; 37:13-21.

99. Roy SK, Chen Q, Fu J, Shankar S, Srivastava RK. Resveratrol inhibits growth of orthotopic pancreatic tumors through activation of FOXO transcription factors. PLoS One 2011; 6:e25166.
100. Sakakibara H, Ashida H, Kanazawa K. A novel method using 8-hydroperoxy-2'-deoxyguanosine formation for evaluating antioxidative potency. Free Radic Res 2002; 36:307-16.
101. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. J Oral Pathol Med 2005; 34:129-33.
102. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, y cols. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J 1998; 17:1675-87.
103. Scarmeas N, Luchsinger JA, Mayeux R, Stern Y. Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality. Neurology 2007; 69:1084-93.
104. Scully C, Newman L, Bagan J. The role of the dental team in preventing and diagnosing cancer: 2. Oral cancer risk factors. Dent Update 2005; 32:261–2, 264–6, 269–70.
105. Seeram NP, Cichewicz RH, Chandra A, Nair MG. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from crabapple fruits. J Agric Food Chem 2003; 51:1948-51.

106. Shahidi F, Naczk M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc, 1995.
107. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. Mol Nutr Food Res 2009; 53:115-28.
108. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the US population ages 20-44 years. Cancer 2005; 103:1843-49.
109. Simon BF, Perez-Illzarbe J, Hernandez T, Gomez-Cordoves C, Estrella I. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. J Agric Food Sci 1992; 40:1531-5.
110. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 2000; 5:415-18.
111. Smith LJ, Holbrook JT, Wise R, Blumenthal M, Dozor AJ, Mastronarde J, y cols. Dietary intake of soy genistein is associated with lung function in patients with asthma. J Asthma 2004; 41:833-43.
112. Sobin LH, Hermanek P, Hutter RV. TNM classification of malignant tumors. A comparison between the new (1987) and the old editions. Cancer 1988; 61:2310-4.

113. Sosulski FW, Krygier K, Hogge L. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruitjuices. J Agric Food Chem 1982; 30:337-40.
114. Soto BL, Hank JA, Darjatmoko SR, Polans AS, Yanke EM, Rakhmilevich AL, y cols. Anti-tumor and immunomodulatory activity of resveratrol in vitro and its potential for combining with cancer immunotherapy. Int Immunopharmacol. 2011; 11:1877-86.
115. Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Minihaane AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. Br J Nutr 2008; 99:12-22.
116. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat. Rev. Cancer 2003; 3:768-780.
117. Tabak C, Arts ICW, Smit HA, Heederik D, Kromhout D. Chronic obstructive pulmonary disease and intake of catechins, flavonols, and flavones. The MORGEN study. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164:61-4.
118. Taghavi N, Yazdi I. Type of food and risk of oral cancer. Arch Iran Med 2007; 10:227-32.
119. Toner M, O'Regan EM. Head and neck squamous cell carcinoma in the young: a spectrum or a distinct group? Part 1. Head Neck Pathol 2009; 3:246-8.

120. Ulrich S, Wolter F, Stein JM. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49:452-61.

121. Vanamala J, Radhakrishnan S, Reddivari L, Bhat VB, Ptitsyn A. Resveratrol suppresses human colon cancer cell proliferation and induces apoptosis via targeting the pentose phosphate and the talin-FAK signaling pathways-A proteomic approach. *Proteome Sci* 2011; 17:9:49.

122. Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, y cols. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* 2011; 6:e19881.

123. Wang Y, Ding L, Wang X, Zhang J, Han W, Feng L y cols. Pterostilbene simultaneously induces apoptosis, cell cycle arrest and cyto-protective autophagy in breast cancer cells. *Am J Transl Res* 2012; 4:44-51.

124. Weisburger JH. Antimutagens, anticarcinogens, and effective worldwide cancer prevention. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1999; 18: 85-93.

125. Williams PM, Poh CF, Hovan AJ, Ng SP, Rosin MP. Evaluation of a suspicious oral lesion. *JCDA* 2008; 74:275–280.

-
126. Wink M. Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles, *Adv Bot Res* 1997; 25:141-69.
127. Woods RK, Raven JM, Wolfe R, Ireland PD, Thien FCK, Abramson MJ. Food and nutrient intakes and asthma risk in young adults. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:414-21.
128. Wu JM, Hsieh TC, Wang Z. Cardioprotection by resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. *Am J Cardiovasc Dis* 2011; 1:38-47.
129. Yamanaka A, Kimizuka R, Kato T, Okuda K. Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:150–54.
130. Yoo S, Murata R.M., Duarte S. Antimicrobial Traits of Tea- and Cranberry-Derived Polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2011; 45:327-35.
131. Zhang Q, Tang X, Lu QY, Zhang ZF, Brown J, Le AD. Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4:1465-74.

-
132. Zhang Z, Lee YC, Kim SJ, Choi MS, Tsai PC, Xu Y, y cols. Palmitoyl-protein thioesterase-1 deficiency mediates the activation of the unfolded protein response and neuronal apoptosis in INCL. *Hum Mol Genet* 2006; 15:337–46.
133. Zhao W, Bao P, Qi H, You H. Resveratrol down-regulates survivin and induces apoptosis in human multidrug-resistant SPC-A-1/CDDP cells. *Oncol Rep* 2010; 23:279-86.
134. Zheng W, Lee SA. Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk. *Nutr Cancer* 2009; 61:437–46.
135. Zhou JH, Cheng HY, Yu ZQ, He DW, Pan Z, Yang DT. Resveratrol induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124:1695-9.
136. Zoberi I, Bradbury CM, Curry HA, Bisht KS, Goswami PC, Roti Roti JL, y cols. Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines. *Cancer Lett* 2002; 175:165-73.
137. Zygogianni AG, Kyrgias G, Karakitsos P, Psyrris A, Kouvaris J, Kelekis N, y cols. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of aol and smoking. *Head Neck Oncol* 2011;3:2.