



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE RADIACIONES LASER HELIO  
NEÓN DE BAJA POTENCIA EN TUMORES MALIGNOS DE  
GLÁNDULAS SUBMANDIBULARES EN RATAS”**

TESISTA:

**OD. ALEJANDRO FEDERICO ZANOTTI**

DIRECTOR:

**PROF. DR. LUIS MARIO PLAVNIK**

**CÓRDOBA, 2019**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
Escuela de Posgrado

**Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Odontología**

**“Efectos de la aplicación de Radiaciones Laser Helio Neón de Baja Potencia en tumores malignos de glándulas submandibulares en ratas”**

**Tesista: Odontólogo Alejandro Federico Zanotti**

**Director: Dr. Luis Mario Plavnik**

**Co directora: Dra. Claudia Sotomayor**

**-2019-**

**COMISION DE TESIS:**

**Dr. Luis Mario Plavnik.** Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.

**Dra. Ana Maria Zarate.** Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.

**Dr. Hugo Juri.** Facultad de Ciencias Medicas, Universidad Nacional de Córdoba.

**TRIBUNAL DE TESIS:**

**Dra. Ana Maria Zarate.** Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.

**Dr. Hugo Juri.** Facultad de Ciencias Medicas, Universidad Nacional de Córdoba.

**Dra. Silvia Carino.** Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Tucumán.

## **DEDICATORIA**

*A mi madre Olga que aunque ya no está en este mundo, la siento a mi lado todos los días de mi vida.*

*A mi padre Raúl por su ejemplo de responsabilidad, rectitud, sacrificio y coraje.*

*A mi esposa Betiana por su amor, paciencia y comprensión.*

*A mis hijos Valentin y Angela que son el motivo de mi vida.*

*A mis hermanos Raúl y Mariana por estar siempre a mi lado.*

## **Agradecimientos**

*A la universidad Nacional de Córdoba por brindarme la posibilidad de poder desarrollar este trabajo.*

*A mi director Luis Mario Plavnik por guiarme con dedicación y paciencia siendo un pilar fundamental de este trabajo.*

*A mi co directora Dra Sotomayor por el gran apoyo y abrirme las puertas de su laboratorio para poder realizar este trabajo.*

*A mi comisión de tesis Dra Zarate, Dr. Juri y en la última etapa a la Dra Carino por sus constantes e invaluables sugerencias.*

*A la Dra Pascualini por su desinteresada colaboración.*

*A la Dra Di Tada por sus invaluables aportes.*

*A la Dra Brunotto por sus aportes en bioestadística.*

*Al Dr. Cejas por enseñarme y acompañarme, su colaboración y ayuda fue indispensable para realizar este trabajo.*

*A la Dra Vigezzi por brindarme su conocimientos y apoyo humano.*

*Al Sr calderón por su constante colaboración.*

*Al Dr Forte y Dra Cabanillas por su apoyo incondicional.*

## CERTIFICADO COMITÉ DE ETICA



1613 - 2013  
400  
AÑOS

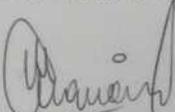
Córdoba, 6 de Agosto de 2013.

Referente a la solicitud de Evaluación del procedimiento a seguir en cuanto al uso y cuidado de animales de laboratorio en el Proyecto: "EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE RADIACIONES LASER DE BAJA POTENCIA EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES DE GLANDULAS SUBMANDIBULARES EN RATAS", luego de recibir las aclaraciones incorporadas por el doctorando Od. Alejandro Zanotti, este comité resuelve **APROBAR** el proyecto.

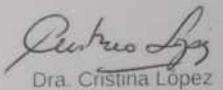
Las actuaciones de este Comité se limitan a la evaluación de las características relacionadas estrictamente al cuidado y uso de animales de experimentación vertidas en el presente Proyecto. La originalidad y pertinencia del mismo quedan fuera de la competencia de este Comité y por lo tanto no son considerados en esta instancia.

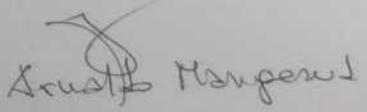
  
Dra. Nori Tolosa de Talamoni

  
Dra. Vilma Campana

  
Dra. Marina F. Ponzo

  
Dra. Ana Carolina Martini

  
Dra. Cristina López

  
Dra. Susana Mangano



SECRETARÍA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
Facultad de Ciencias Médicas  
U. N. C.

**INDICE**

ABREVIATURAS .....	1
RESÚMEN.....	2
SUMMARY .....	3
INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO.....	4
CICLO CELULAR Y MUERTE CELULAR.....	8
Necrosis.....	8
Apoptosis.....	8
Cambios morfológicos en la apoptosis.....	9
Cambios bioquímicos en la apoptosis .....	10
Mecanismos de apoptosis.....	11
a- La vía mitocondrial intrínseca.....	12
b- La vía del receptor de muerte extrínseco .....	12
c-La vía común.....	13
d-La vía del retículo endoplásmico intrínseco .....	13
Apoptosis y carcinogénesis .....	13
BIOMARCADORES .....	16
Biomarcadores tumorales.....	17
Biomarcadores tisulares en tumores de glándulas salivales .....	18
Balance de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas .....	21
TRATAMIENTOS DE TUMORES DE GLÁNDULAS SALIVALES .....	24
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL .....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
MATERIALES .....	27
METODOLOGÍA .....	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
RESULTADOS.....	37
ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO .....	38
ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO:.....	44
ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO: .....	47
COLORACIÓN DAPI .....	50
ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.....	52
P53.....	52
Bcl2 .....	53
Ki 67.....	55

DISCUSIÓN .....	57
CONCLUSIONES .....	62
BIBLIOGRAFIA.....	64

## **ABREVIATURAS**

- CA: Cuerpos Apoptóticos
- DMBA: Dimetil Benzantraceno
- FasL: Ligando Fas
- FE-SEM: Scanning Electron Microscope - Field Emission
- GC: Grupo Control
- GE: Grupo Experimental
- H/E: Hematoxilina-Eosina
- HE NE: Helio Neón
- ICAM1: Moléculas de Adhesión Intercelular 1
- IHQ: Inmunohistoquímica
- MEC: Carcinomas de Células Mioepiteliales
- PS: fosfatidilserina
- PSA: Antígeno Prostático Específico
- RE: retículo endoplásmico
- RLBP: Radiaciones Laser de Baja Potencia
- RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
- TNFR1: Receptor TNF Tipo 1
- VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

## RESÚMEN

Las neoplasias de glándulas salivales causan destrucción glandular, y producen serios trastornos funcionales que afectan la calidad de vida del paciente. Normalmente existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, pero en el cáncer, aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de genes estimulantes (oncogenes) o bien a la inactivación de genes supresores de la carcinogénesis. Esto provoca alteraciones en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, produciéndose una proliferación desenfrenada celular y que, puestas de manifiesto inmunohistoquímicamente dan indicio de lo que está sucediendo con él. Los tratamientos de estos tumores son bastante restringidos (resección o radioterapia) y poseen un elevado índice de efectos secundarios. Estudios preliminares sobre el efecto de altas densidades de Radiaciones Laser de Baja Potencia sobre glándulas salivales informaron aumento de la apoptosis en ambos casos, lo que convertiría a estas radiaciones en un tratamiento alternativo.

**OBJETIVO:** Estudiar el efecto que las RLBP, en densidades de energía altas, producen sobre tumores malignos inducidos con DMBA, en glándulas submandibulares de rata. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se utilizaron sesenta (60) ratas macho Wistar de  $\pm 120$  g de peso corporal distribuidos en dos grupos de 30 animales: Grupo control (**GC**) y Grupo experimental (**GE**). Los animales de ambos grupos fueron anestesiados intraperitonealmente con una solución de Xilazina/Ketamina, y se les expusieron las glándulas submandibulares. A ellas se les inyectó 50  $\mu$ l de DMBA. Las ratas del GC se mantuvieron vivas durante 150 días post inyección; a las del GE se las mantuvo vivas durante 150 días post inyección y luego, se les aplicó laser de HE-Ne durante 6,5 minutos, sacrificándolas a las 12 horas post irradiación extirpándoseles las glándulas submandibulares. Treinta (30) derechos fueron fijadas en formol al 10% tamponado y procesadas según la técnica de rutina, obteniéndose cortes seriados teñidos con Hematoxilina-Eosina. Con ello se realizaron estudios histopatológicos, histomorfométricos y con microscopía electrónica de barrido, (FE-SEM). Veinticuatro (24) glándulas del lado izquierdo se procesaron inmunohistoquímicamente para p53, Bcl2 y Ki 67 y seis (6) con DAPI. **RESULTADOS:** Los tumores fueron en todos los casos carcinomas a células mioepiteliales. Histopatológicamente se detectó que en los casos experimentales se observaron aumento de las células tumorales apoptóticas en relación a los controles. Estos datos se corroboraron con el análisis estadístico histomorfométrico y de la coloración de Dapi que estableció diferencias estadísticamente significativas en ambos casos. El estudio con FE\_SEM permitió confirmar que las figuras nucleares correspondientes a apoptósis eran las mismas que las observadas a microscopía óptica. Las marcaciones inmunohistoquímicas establecieron que p53 no se marcaba pero Bcl2 y Ki 67 se inmunomarcaron en mayor cantidad y estadísticamente significativas en los animales del GE. **CONCLUSIÓN:** Estos hallazgos nos permiten postular que el efecto de las RLBP sobre tumores de glándulas submandibulares de ratas, inducidos con DMBA, es el de modificar el ciclo celular de la célula tumoral aumentando el proceso apoptótico en ellas.

## SUMMARY

Salivary gland neoplasms cause glandular destruction producing serious functional impairments that affect the patient's quality of life.

Usually, there exist an equilibrium between cellular proliferation and apoptosis; despite that, where cancer is present, mutation can appear, giving place to the activation of genes stimulators (called oncogenes) or to the inactivation of carcinogenic gene suppressors. This phenomenon induces alterations in the cell cycle regulation and apoptosis, producing an unrestrained cellular proliferation, manifesting the issue through immunohistochemistry.

Treatments for these tumors (resection or radiotherapy) are quite restricted and present a high rate of side effects. Preliminary studies about the effects of high densities doses of low-level laser therapy on salivary glands showed an apoptosis increase. So, RLBP could be a recommended alternative therapy

**Objective:** to study the effects of higher RLBP doses on malignant tumors induced with DMBA on the submandibular glands of rats.

**Materials and Methods:** Sixty (60) male Wistar rats with a corporal weight of  $\pm 120$  g were divided into two groups of thirty (30) a **Control Group** (CG) and an **Experimental Group** (EG). Each animals were intraperitoneally anesthetized with Xylazine/Ketamine to surgically expose the submandibular glands and injected with 50  $\mu$ L of DMBA. The rats from the **CG** were kept alive for one hundred and fifty (150) days post injection and exposed to a HE-Ne laser pulse of 6.5 minutes. The subjects were necropsied twelve (12) hours post radiation, proceeding and the submandibular glands were extracted. Thirty (30) were embedded in formaldehyde following routine procedures, procuring a series of tinted cuts with hematoxylin-eosin stains. The tissues were histopathology and histomorphometry studied and subjected to a field-emission scanning electron microscopy (FESEM). Twenty-four (24) glands from the left side were immunohistochemistry processed for p53, Bcl2, and Ki67. Six (6) with DAPI.

**Results:** All the tumors, were myoepithelial carcinoma cells. In the experimental groups, by histopathology, an increase of tumorous apoptotic cells in relation to the control group were detected. These indications were corroborated with the statistics histomorphometric analysis and the DAPI fluorescence imaging that established significant statistical differences in both cases. The study with FE\_SEM confirmed that the nuclear figures correspond to apoptotic cells, which were the same observed by optical microscopy. The immunohistochemical markers established that p53 was not marked, but Bcl2 and Ki 67 were immunomarked in a higher quantity and statistically significant in animals from the EG group.

**Conclusion:** the results of the current study allow us to claim that the effect of RLBP on submandibular glands of rats induced with DMBA is to modify the tumorous cell cycle by increasing the apoptotic cell process.

## INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

Las glándulas salivales, por las funciones de su producto de secreción: la saliva, tienen una importancia fundamental en el mantenimiento de las condiciones biológicas y medio ambientales del ecosistema estable y complejo que es la cavidad bucal.

Las glándulas salivales se pueden clasificar según su tamaño (mayores o menores) o por la naturaleza química de su secreción (serosa, mucosa o mixta). La saliva serosa es una secreción acuosa liviana, mientras que la saliva mucosa es más viscosa y pesada, debido a la presencia de una glucoproteína, la mucina. Las glándulas salivales mayores comprenden tres glándulas pares: parótida (serosa), submandibular (seromucosa) y sublingual (mucoserosa) (Benn & Thomson, 2014). (Cuadro 1).

Las glándulas salivales menores son las que aportan el mayor porcentaje de mucinas y se clasifican en palatinas, genianas, labiales y linguales.

Glándulas	Secreción	Componentes
Glándula Parótida	Serosa	Amilasa, Proteínas ricas en Prolina, Aglutininas, Cistatina, Lisozimas, Glucoproteínas extraparotidias, Na, Ca, Cl, PO4, K, IgA
Glándula Sublingual	Mucosa	Mucinas: MG1, MG2, Lisozimas, Na, Ca, Cl, PO4, Amilasas, IgA
Glándula Submaxilar	Mixta	Cistatina, Na, K, Ca, Cl, PO4, Amilasa, cistatina, IgA, Mucinas MG1

**CUADRO 1. Tipos de secreción salival y componentes.**

El fluido salival es una secreción exocrina, con un 99% de agua, que contiene una variedad de electrolitos y proteínas que interactúan y son responsables de las diversas funciones atribuidas a la saliva. La saliva total o entera se refiere a la mezcla compleja de los fluidos de las glándulas salivales y surco gingival, el trasudado de la mucosa oral, faríngea y de las vías aéreas superiores, bacterias, restos de alimentos, células sanguíneas y epiteliales, así como trazas de medicamentos o productos químicos (Pereyra Lima et al, 2010).

En términos generales, las secreciones serosas ayudan a eliminar los restos epiteliales y partículas de alimentos de la superficie gingival, mucosa bucal y el dorso de la lengua, mientras que las secreciones mucosas colaboran en unir los alimentos masticados en un bolo y proteger el epitelio oral de la acción abrasiva de partículas de alimentos (Dodds et al, 2005).

Sin embargo, la saliva es un fluido complejo que es más que la suma de sus partes. Los diversos componentes tienen múltiples funciones, y también interactúan para mejorar o inhibir las acciones de otros componentes (Humphrey & Williamson, 2001).

Entre las funciones de la saliva destacamos las nombradas en el cuadro 2.

<b>FUNCIÓN</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>COMPONENTES</b>
<b>Lubricación</b>	Recubre, protege contra la irritación mecánica, térmica y química. Ayuda al flujo de aire, el habla y la deglución.	Glicoproteínas, mucinas
<b>Limpieza</b>	A través de la humidificación colabora con la masticación, remueve restos de alimentos y favorece la deglución.	Agua
<b>Reserva iónica</b>	Modula la desmineralización y la remineralización de los dientes.	Fosfato de calcio, estaterinas y proteínas ricas en prolina
<b>Amortiguadora</b>	Regula el pH del biofilm.	Bicarbonato de fosfatos y urea
<b>Acción antibacteriana</b>	Biomoléculas inmunológicas y no inmunológicas que ayudan a controlar la microflora bucal.	Inmunoglobulinas A, A <sub>s</sub> , G, M, proteínas, mucinas, péptidos y enzimas (lactoferrina, lisosima y peroxidasas)
<b>Aglutinación</b>	Coagrega bacterias de la saliva, acelerando su eliminación hacia la cavidad bucal.	Glicoproteínas, estaterinas, aglutininas, proteínas ricas en histadina y en prolina
<b>Formación de película</b>	Formación de una capa protectora proteica sobre la superficie del diente.	Macromoléculas proteicas, estaterina, histadina, cistatina, proteínas ricas en prolina, y MG 1.
<b>Digestión</b>	Comienza la digestión del almidón y de las grasas.	α amilasa
<b>Gustación</b>	La acción solvente e hipotónica de la saliva aumenta la capacidad de sabor	Proteínas, gustinas y Zinc

	al permitir la interacción entre nutrientes y papilas gustativas.	
<b>Hidratación</b>	La deshidratación y sequedad de la boca estimula el deseo de beber.	
<b>Curación de heridas</b>	Acelera procesos de cicatrización por estimulación de la proliferación celular y la angiogénesis.	Factores de Crecimiento: factor de transformación del crecimiento $\beta$ , Epidermal, fibroblástico, similar a insulina.

**CUADRO 2. Funciones y componentes de la saliva.**

Las glándulas salivales son influenciadas por numerosos factores (drogas, enfermedades sistémicas, radiaciones, etc) que pueden causar alteraciones a nivel estructural y por ende sobre la síntesis y secreción salival lo cual acarrea trastornos funcionales como alteraciones en la lubricación y por lo tanto en la masticación, deglución percepción del gusto, alto índice de caries, ardor y lesiones de los tejidos blandos de la cavidad bucal (Cuadro 3) (Logemann et al, 2001; Jensen et al, 2002).

<b>Microflora oral alterada</b>	Acumulación de moco
<b>Problemas dentales</b>	Disfunción oral, dolor, incomodidad oral nocturna
<b>Boca seca</b>	Quemaduras orofaríngea
<b>Disgeusia</b>	Infecciones orofaríngeas
<b>Disfagia</b>	Acumulación de placa
<b>Retención de alimentos en la boca</b>	Problemas del habla
<b>Cambios en la mucosa</b>	Sed

**CUADRO 3. Disfunción de las glándulas salivales.**

Las neoplasias de glándulas salivales, entre otros factores, son una de las causantes de la destrucción glandular. Si bien son de baja frecuencia entre los tumores de cabeza y cuello (1%) son los de más alto índice de mortalidad y morbilidad (Mehanna et al, 2010). Estas neoplasias poseen una incidencia general anual de aproximadamente 2,5 a 3,0 casos por 100.000 personas en el mundo, dependiendo de la región geográfica, más frecuentes en Malasia y China, y el sexo (Speight & Barrett,

2002; Actis, 2005). Las mujeres son más frecuentemente afectadas, pero hay una cierta variación de género por el tipo de tumor (Escovich & Novelli, 2002). Las neoplasias malignas de las glándulas salivales constituyen más del 0,5-1% de todos los tipos de cáncer y, aproximadamente, de 3 a 5% de todos los de la cabeza y el cuello. Ya sean lesiones benignas (80%), o malignas (0,5%) producen modificaciones a nivel del parénquima glandular y por lo tanto en la función de las mismas.

La transformación de células normales en tumorales puede ser inducida por distintos agentes carcinogénicos como, químicos, físicos o infecciosos (drogas, medicamentos, radiaciones, virus, bacterias, etc). Ellos provocan anomalías en el material genético de las células durante la replicación normal del ADN. Las anomalías genéticas encontradas en las células cancerosas pueden ser de diferentes tipos: mutación puntual, translocación, amplificación, delección y ganancia o pérdida de todo un cromosoma (Junco et al, 2006). Entender la conducta de las células cancerosas significa conocer los procesos biológicos que regulan el ciclo celular y la apoptosis.

## **CICLO CELULAR Y MUERTE CELULAR**

Las células de un organismo no viven indefinidamente y su vida media depende del tipo celular. Hay células cuyo período de vida es largo, como las musculares o las neuronas, mientras que la vida de otras es efímera, como algunas células sanguíneas y epiteliales, que se renuevan a partir de sus células progenitoras. El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites, constante; las células que mueren se sustituyen por otras, proceso que está regulado y que asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular. El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte (Lizarbe Irachetam, 2007). La muerte celular puede ser por:

### **Necrosis**

La necrosis (del griego nekros "muerte") es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, e irreversible, derivada de una situación patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia, solo ocurre entonces cuando el daño es letal. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos o, por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, las estructuras celulares se deterioran, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias (Ramírez Agudelo & Rojas López, 2010).

### **Apoptosis**

Muerte celular que conlleva a la activación de mecanismos específicos que indican a la célula que se produzca un suicidio o muerte celular programada que son una serie

de eventos que culminan en la muerte. Este tipo de muerte celular es empleado por los organismos multicelulares durante el desarrollo en la morfogénesis y en el mantenimiento del homeostasis tisular en el organismo adulto, así como para controlar el número de células eliminando células infectadas, mutadas o dañadas (Espinosa, 2014). Este tipo de muerte celular se realiza de una forma ordenada y silenciosa, y confiere ventajas al organismo durante su ciclo vital.

El término "apoptosis" se deriva de las palabras griegas "απο" y "πτωσις" que significa "dejar caer" y se refiere a la caída de las hojas de los árboles en otoño. Se utiliza, en contraste con la necrosis, para describir la situación en la que una célula persigue activamente un rumbo hacia la muerte al recibir ciertos estímulos (Espinosa, 2014). Desde que la apoptosis fue descrita por primera vez en la década de 1970, (Kerr et al, 1972) sigue siendo uno de los procesos más investigados en biología. Al ser un proceso altamente selectivo, la apoptosis es importante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Mehanna et al, 2010; Kumar et al, 2018).

### **Cambios morfológicos en la apoptosis**

Las alteraciones morfológicas de la muerte celular apoptótica que afectan tanto al núcleo como al citoplasma son notablemente similares en todos los tipos de células y especies (Goldar et al, 2015; Galluzzi et al, 2018). Por lo general, se requieren varias horas desde el inicio de la muerte celular hasta la fragmentación celular final. Sin embargo, el tiempo empleado depende del tipo de célula, el estímulo y la vía apoptótica (Galluzzi et al, 2017). Las características morfológicas de la apoptosis en el núcleo son la condensación de cromatina y la fragmentación nuclear, que se acompañan de un redondeo de la célula, una reducción del volumen celular (picnosis) y una retracción de los pseudópodos (Kroemer et al, 2005). La condensación de cromatina comienza en la periferia de la membrana nuclear, formando una estructura en forma de media luna o anillo. La cromatina se condensa aún más hasta que se rompe dentro de una célula con una membrana intacta, una característica descrita como cariorrexis (Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002). La membrana plasmática está intacta durante todo el proceso. En la etapa posterior de la apoptosis, algunas de las características morfológicas incluyen la formación de ampollas en la membrana, la modificación ultraestructural de los orgánulos citoplásmicos y la pérdida de la integridad de la membrana (Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002). Por lo general, las células fagocíticas engloban las células apoptóticas antes de que se presenten los cuerpos apoptóticos. Esta es la razón por la que la apoptosis se descubrió muy tarde en la historia de la biología celular en 1972 y los cuerpos apoptóticos se ven *in vitro* en

condiciones especiales. Si los restos de células apoptóticas no son fagocitadas, como en el caso de un entorno de cultivo celular artificial, experimentarán una degradación que se parece a la necrosis y la condición se denomina necrosis secundaria (Ziegler & Groscurth, 2004).

### **Cambios bioquímicos en la apoptosis**

En términos generales, se pueden observar tres tipos principales de cambios bioquímicos en la apoptosis: 1) activación de caspasas, 2) degradación de ADN y proteínas y 3) cambios de membrana y reconocimiento por células fagocíticas (Kumar et al, 2018). Al principio de la apoptosis, hay expresión de fosfatidilserina (PS) en las capas externas de la membrana celular, que ha sido "volteada" desde las capas internas. Esto permite el reconocimiento temprano de las células muertas por los macrófagos, lo que resulta en la fagocitosis sin la liberación de componentes celulares proinflamatorios (Hengartner, 2001). Esto es seguido por un desglose característico del ADN en piezas grandes de 50 a 300 kilobases (Vaux & Silke, 2003). Más tarde, hay una división internucleosómica, por endonucleasas, del ADN en oligonucleosomas en múltiplos de 180 a 200 pares de bases aunque esto es característica de la apoptosis, no es específica ya que la escala de ADN típica en la electroforesis en gel de agarosa también se puede observar en células necróticas (Elmore, 2007).

Otra característica de la apoptosis es la activación de un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de cisteína proteasas llamadas caspasas. La "c" de "caspasa" se refiere a una cisteína proteasa, mientras que la "aspasa" se refiere a la propiedad única de la enzima para escindir-se después de los residuos de ácido aspártico (Kumar et al, 2018). Las caspasas activadas escinden muchas proteínas celulares vitales y rompen el esqueleto nuclear y el citoesqueleto. También activan la ADNasa, que degrada aún más el ADN nuclear (Lavrik et al, 2005). Aunque los cambios bioquímicos explican en parte algunos de los cambios morfológicos en la apoptosis, es importante tener en cuenta que los análisis bioquímicos de la fragmentación del ADN o la activación de caspasas no deben usarse para definir la apoptosis, ya que la apoptosis puede ocurrir sin fragmentación del ADN oligonucleosómico y puede ser caspasa independiente (Galluzzi et al, 2018). Si bien muchos ensayos y experimentos bioquímicos se han utilizado para detectar la apoptosis, el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD) ha propuesto que la clasificación de las modalidades de muerte celular dependa exclusivamente de criterios morfológicos porque no existe una equivalencia clara entre los cambios ultraestructurales y características de muerte celular bioquímica (Galluzzi et al, 2018).

## Mecanismos de apoptosis

Comprender los mecanismos de la apoptosis es crucial y ayuda a entender la patogénesis de afecciones que resultan de un desorden de este tipo (O'Brien et al, 2008). Esto, a su vez, puede ayudar en el desarrollo de terapias que se dirigen a ciertos genes o vías apoptóticas. Las caspasas son fundamentales para el mecanismo de la apoptosis, ya que son tanto iniciadores como ejecutoras. Hay tres caminos por los cuales las caspasas pueden ser activadas. Las dos vías de iniciación comúnmente descritas son las vías intrínseca (o mitocondrial) y extrínseca (o receptor de la muerte) (Figura 1). Ambas vías conducen finalmente a una vía común o a la fase de ejecución de la apoptosis. Una tercera vía de iniciación menos conocida es la vía del retículo endoplásmico intrínseco (O'Brien et al, 2008).

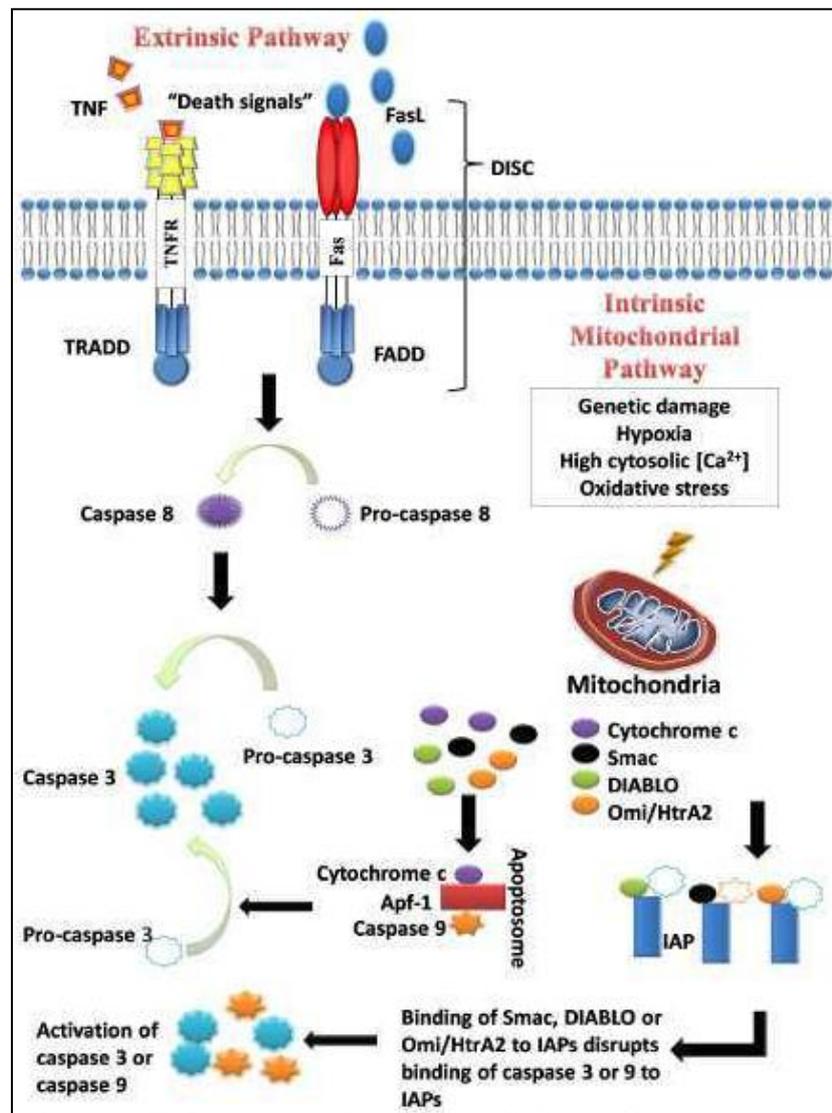


FIGURA 1. Vía intrínseca y extrínseca en la apoptosis. Extraído de Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2011.

**a- La vía mitocondrial intrínseca**

Como su nombre lo indica, la ruta intrínseca se inicia dentro de la célula. Los estímulos internos como el daño genético irreparable, la hipoxia, las concentraciones extremadamente altas de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico y el estrés oxidativo severo son algunos desencadenantes del inicio de la vía mitocondrial intrínseca (Ramírez Agudelo & Rojas López, 2010). Independientemente de los estímulos, esta vía es el resultado del aumento de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de moléculas pro-apoptóticas como el citocromo-c en el citoplasma (Danial & Korsmeyer, 2004; Nikolettou et al, 2013). Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, que llevan el nombre del gen BCL2 originalmente observado en el punto de corte cromosómico de la translocación del cromosoma 18 a 14 en el linfoma folicular no Hodgkin. Hay dos grupos principales de las proteínas Bcl-2, las proteínas pro-apoptóticas (por ejemplo, Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las proteínas antiapoptóticas (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). No es la cantidad absoluta sino el equilibrio entre las proteínas pro y anti-apoptóticas lo que determina si se iniciará la apoptosis (Nagler et al, 2003; Carlinfante et al, 2005). Otros factores apoptóticos que se liberan desde el espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma incluyen el factor inductor de apoptosis (AIF), el segundo activador de caspasa derivado de mitocondrias (Smac), la proteína de unión IAP directa con baja pl (DIABLO) y Omi / proteína de alta temperatura requerida A (HtrA2) (Kroemer et al, 2007). La liberación citoplásmica de citocromo c activa la caspasa 3 a través de la formación de un complejo conocido como apoptosoma que se compone de citocromo c, Apaf-1 y caspasa 9 (Kroemer et al, 2007). Por otro lado, Smac / DIABLO u Omi / HtrA2 promueve la activación de las caspasas uniéndose al inhibidor de las proteínas de la apoptosis (IAP) que posteriormente conduce a la interrupción de la interacción de las IAP con caspasa-3 o -9 (Kroemer et al, 2007; LaCasse, 2008).

**b- La vía del receptor de muerte extrínseco**

La vía del receptor de muerte extrínseco, como su nombre lo indica, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a receptores de muerte. Aunque se han descrito varios receptores de muerte, los receptores de muerte más conocidos son el receptor TNF tipo 1 (TNFR1) y una proteína relacionada llamada Fas (CD95) y sus ligandos se denominan TNF y ligando Fas (FasL) respectivamente (Hengartner, 2001). Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta proteínas adaptadoras como el dominio de muerte asociado al receptor de TNF (TRADD) y el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), así como cisteínas proteasas como la caspasa 8. La unión del ligando de muerte al receptor de muerte da como resultado la

formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo de proteína ligando-receptor-adaptador completo se conoce como el complejo de señalización inductor de la muerte (DISC) (O'Brien et al, 2008). DISC luego inicia el ensamblaje y la activación de la procaspasa 8. La forma activada de la enzima, caspasa 8 es una iniciadora de la apoptosis mediante la escisión de otras caspasas (Naval et al, 2004).

### **c-La vía común**

La fase de ejecución de la apoptosis implica la activación de una serie de caspasas. La caspasa cadena arriba para la vía intrínseca es caspasa 9 mientras que la de la vía extrínseca es caspasa 8. Las vías intrínseca y extrínseca convergen a caspasa 3. La caspasa 3 luego escinde el inhibidor de la desoxirribonucleasa activada por caspasa, que es responsable de la apoptosis nuclear. Además, las caspasas inducen la escisión de proteínas quinasas, proteínas del citoesqueleto, proteínas de reparación del ADN y subunidades inhibitoras de la familia de las endonucleasas. También tienen un efecto sobre el citoesqueleto, el ciclo celular y las vías de señalización, que en conjunto contribuyen a los cambios morfológicos típicos en la apoptosis (Ghobrial et al, 2005).

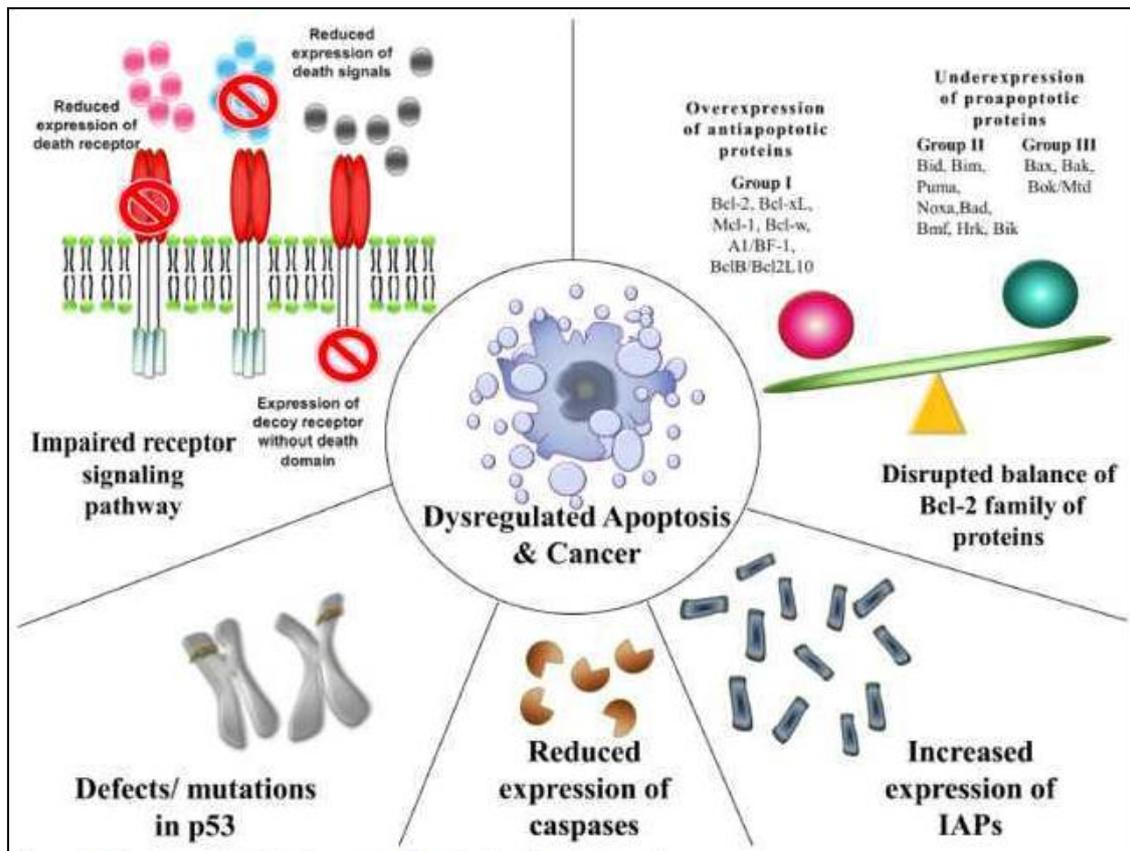
### **d-La vía del retículo endoplásmico intrínseco**

Esta vía del retículo endoplásmico intrínseco (RE) es una tercera vía y es menos conocida. Se cree que es dependiente de caspasa 12 e independiente de mitocondrias (Szegezdi et al, 2003). Cuando el RE se lastima por tensiones celulares como hipoxia, radicales libres o inanición de glucosa, hay un despliegue de proteínas y una síntesis proteica reducida en la célula, y una proteína adaptadora conocida como factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) se disocia del procaspase-12 lo que resulta en la activación de este último (O'Brien et al, 2008).

### **Apoptosis y carcinogénesis**

En condiciones normales existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, pero en el cáncer, aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de ciertos genes estimulantes o bien a la inactivación de genes supresores de la carcinogénesis. De este modo el equilibrio se rompe y la balanza se inclina hacia la proliferación desenfrenada y la inmortalización de la célula. Esto resulta en una inhibición de la forma fisiológica de muerte celular, la apoptosis, la cual participa entre otros procesos en la eliminación de células mutadas o dañadas (Sanchez, 2013). Ya en la década de 1970, Kerr había vinculado apoptosis a la eliminación de células potencialmente malignas, hiperplasia y progresión tumoral (Kerr et al, 1972).

Existen genes más propensos a sufrir esas mutaciones; cuando estos se encuentran en su estado normal, se denominan protooncogenes y son los encargados de regular el ciclo celular y la apoptosis. Existen alelos mutados estimulantes de la carcinogénesis, los oncogenes y otros alelos también mutados que codifican genes supresores de tumores y están relacionados a la inhibición del ciclo celular. En general, una única mutación en el material genético celular no produce la transformación de una célula sana en cancerosa requiriéndose múltiples mutaciones (Sanchez, 2013). Estas desencadenarán la codificación de oncoproteínas que regulan el ciclo celular a diferentes niveles actuando sobre factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales intracelulares, factores de transcripción nuclear y sobre proteínas de control del ciclo celular (Carlinfante et al, 2005). Por lo tanto, la apoptosis reducida o su resistencia juega un papel vital en la carcinogénesis. Hay muchas maneras en que una célula maligna puede adquirir una reducción en la apoptosis o resistencia a la apoptosis. En general, los mecanismos por los que se produce la evasión de la apoptosis pueden dividirse ampliamente en: 1) equilibrio alterado de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, 2) función reducida de la caspasa y 3) alteración de la señalización del receptor de la muerte (Figura 2).



**FIGURA 2. Mecanismos que contribuyen a la evasión de la apoptosis y la carcinogénesis. Extraído de Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2011.**

Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto una serie de biomarcadores de oncogenes y genes supresores de tumores, que se utilizan como indicadores de malignidad (Hanahan & Weinberg, 2011; Hanahan & Weinberg, 2017).

## **BIOMARCADORES**

Los biomarcadores pueden definirse como una serie de características biológicas que pueden ser evaluadas y medidas de manera objetiva y que proporcionan información sobre procesos biológicos normales o patológicos. Ellos permiten discernir entre ambos procesos, así como también definir el punto de la enfermedad en el que se encuentra una persona, la progresión de la situación patológica y su respuesta a un tratamiento (Pernía et al, 2014).

Los primeros biomarcadores utilizados en la práctica clínica para el diagnóstico de enfermedades fueron indicadores fisiológicos (temperatura corporal, frecuencia cardíaca o presión sanguínea) fácilmente accesibles y relacionados con la fisiopatología de la enfermedad. Los grandes avances en campos como la bioquímica del siglo XX, posibilitaron la aparición de nuevos biomarcadores analizados en fluidos corporales como la sangre, el plasma y diferentes tejidos. Los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol o enzimas hepáticas son ejemplos de ese grupo (DeVita et al, 2015). La aparición de las tecnologías genómica, proteómica, etc, en los últimos años, ha provocado la aparición de nuevos biomarcadores que se corresponden con variaciones en la estructura, en la secuencia o en los niveles de expresión de genes, proteínas, metabolitos y proporcionan una visión molecular de las patologías permitiendo, en algunos casos, la integración de información procedente tanto del genotipo como del fenotipo. Los nuevos biomarcadores permiten detectar señales tempranas de la presencia de una patología o el riesgo de desarrollarla en el futuro, lo que contribuye a una medicina personalizada (Pernía et al, 2014). En el año 2001, un grupo de expertos del Instituto Nacional de Salud (NIH, National Institute of Health) sentó las bases de las definiciones y conceptos básicos relacionados con los biomarcadores (Bethesda, 2001), esos conceptos contienen las principales aplicaciones de los biomarcadores en la práctica clínica:

- Valor diagnóstico: identifican pacientes con una patología concreta, discerniendo entre individuos sanos y enfermos.
- Capacidad predictiva: anticipan la posibilidad de desarrollar una enfermedad antes de que se produzcan sus síntomas.
- Utilidad pronóstica: indican la posibilidad de cambios que pueden producirse en el curso de la enfermedad.
- Respuesta: permiten predecir la respuesta de un paciente frente a un determinado tratamiento.

### **Biomarcadores tumorales**

Un marcador tumoral es una molécula biológica presente en la sangre, en algunos líquidos del cuerpo, como la orina o la saliva, y en algunos tejidos, cuya presencia o cantidad es indicadora de neoplasias en el organismo.

Ella expresa los cambios medibles, ya sean bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición aun tumor. Esas moléculas, generalmente proteicas, traducen las alteraciones en las secuencias de los genes, en sus niveles de expresión o en los cambios que se producen en la estructura de las proteínas y, por tanto, funcionan como indicadores de los procesos que ocurren en una población celular en un momento determinado (DeVita et al, 2015).

### **Clasificación patogénica**

Las moléculas que se usan como marcadores tumorales tienen procedencia y funciones muy diversas (Gruvberger-Saal et al, 2006).

1. Proteínas auténticamente tumorales. Son oncoproteínas de localización celular, específicas de cada tumor, que participan, en muchos casos, en la transformación maligna, especialmente en la etapa de iniciación. Algunas tienen valor patognomónico y su eliminación tras el tratamiento es el principal indicio de la eficacia terapéutica.
2. Las oncoproteínas que intervienen de manera genérica en el desarrollo del cáncer, por ejemplo las relacionadas con la actividad proliferativa, la angiogénesis, y la diseminación de la enfermedad, entre otros factores. Los genes que las codifican se expresan activamente en la célula tumoral y su análisis, con técnicas cada vez más apropiadas, ha permitido determinar, en muchos tumores, un perfil que contiene información importante sobre sus propiedades biológicas.
3. Los inespecíficos, que están presentes también en personas normales o con patologías no tumorales. Se trata de proteínas extracelulares cuyas concentraciones en el suero o en otros líquidos orgánicos guardan relación, fundamentalmente, con la masa tumoral. Su valor como marcador radica en su cuantificación más que en su presencia, pero pueden ser útiles en la clínica debido a su accesibilidad. El antígeno prostático específico (PSA) es uno de los ejemplos más representativos (McShane & Hayes, 2012).

Los marcadores tumorales pueden ser detectados en los tejidos mediante técnicas de inmunohistoquímica, citometría de flujo y de biología molecular. La inmunohistoquímica (IHQ) es uno de los procedimientos habituales para el análisis de biomarcadores tumorales en tejidos. Ésta corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Se basan en su capacidad de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración. Con técnicas IHQ o con RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), es posible demostrar metástasis en el 20-60% de los ganglios que fueron negativos en las exploraciones de rutina con hematoxilina-eosina lo que, en teoría, obliga a modificar el estadio clínico (Rosenberg et al, 2002).

### **Biomarcadores tisulares en tumores de glándulas salivales**

El diagnóstico histopatológico de los tumores de las glándulas salivales como el adenoma pleomorfo, tumor de Warthin, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoideoquístico, usualmente no son difíciles en los casos típicos. Sin embargo, se observan diversas características histomorfológicas, numerosos tipos, variantes y patrones histológicos similares en diferentes entidades tumorales. Por lo tanto, estos tumores pueden presentar un reto diagnóstico considerable (Nagao et al, 2012). En general, el diagnóstico se realiza según la clasificación de la OMS. Aunque esta clasificación es compleja, tiene ventajas con respecto a los aspectos pronósticos y terapéuticos, debido a que el comportamiento biológico de cada tipo de tumor es diferente (Barnes et al, 2005).

En la práctica clínica, el diagnóstico histopatológico de estos tumores se efectúa a través de la evaluación del patrón de crecimiento, de los límites del tumor, la arquitectura histológica, la estructura y diferenciación celular, y los componentes del estroma tumoral, junto con la información clínica.

Aunque la tinción con hematoxilina-eosina (H/E) sigue siendo el método estándar utilizado para el diagnóstico de tumores de las glándulas salivales, la inmunohistoquímica (IHQ) puede mejorar la precisión de tal análisis, aunque su función puede ser limitada.

Los tumores de glándulas salivales, además de mostrar diversos aspectos histológicos, exhiben diferenciación con relación a las células que constituyen la glándula salival morfológicamente normal (Fonseca et al, 2012). Como se ha

mencionado anteriormente, las glándulas salivales comprenden conductos y acinos con cuatro tipos de células: ductales, acinares, mioepiteliales y basales. Todas ellas son, por lo general, pan-citoqueratina (CK) positivo. Las células ductales y acinares son antígeno de membrana epitelial (EMA) y antígeno carcinoembrionario (CEA) positivo, mientras que sólo las células acinares son  $\alpha$ -amilasa positiva. Tanto las células mioepiteliales como las basales son CK14 y p63 positivo y EMA y CEA negativo. La expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso (SMA), calponina, podoplanina (Hata et al, 2010) y vimentina se observó sólo en las células mioepiteliales, en tanto que la tinción de la proteína S-100 es variable para los cuatro tipos de células (Ianez et al, 2010).

Para evaluar la malignidad y determinar un pronóstico, el Ki-67 es el marcador más frecuentemente empleado en el carcinoma mucoepidermoide, adenoideoquístico y de células acinares, carcinoma ex-adenoma pleomorfo y el ductal salival, así como otros tipos de cáncer (Americo et al, 2016). Por ejemplo, no se han detectado recurrencias de carcinoma mucoepidermoide y de células acinares con un índice Ki-67 menor al 5%. También se reportó un peor pronóstico en los casos que presentaron un índice mayor al 10 % (Vacchi Suzzi et al, 2005). p53 también es considerado un factor de pronóstico para el carcinoma adenoideoquístico y el ductal salival, en tanto que HER2 / neu lo es para este último (Seethala, 2011). Los siguientes marcadores son indicativos de peor pronóstico en lo que respecta a algunos carcinomas: CK20 (células pequeñas) (Nagao, 2004), Bcl-2 (adenoideoquístico) (Jia et al, 2004), Ecadherina (adenoideoquístico) (Franchi et al, 1999), p27 (adenoideoquístico y mucoepidermoide) (Okabe et al, 2001), MUC1 (mucoepidermoide) (Handra-Luca et al, 2005), factor de crecimiento endotelial vascular (adenoideoquístico) (Zhang et al, 2005).

La inmunohistoquímica es una herramienta útil para investigar características como la naturaleza y el estado de diferenciación celular, proliferación celular, y expresión de proteínas del tumor, para facilitar un diagnóstico diferencial o efectuar un pronóstico.

Una exhaustiva revisión bibliográfica acerca de la utilización de diferentes marcadores tumorales en neoplasias de glándulas salivales, en función de su empleo y resultados obtenidos, nos permitió seleccionar los siguientes:

**✓ P53**

Se identificó por primera vez en 1979 como una proteína relacionada con la transformación y se encontró acumulada en los núcleos de células cancerosas que se unían estrechamente al antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40). Inicialmente, se descubrió que era débilmente oncogénico. Más tarde, se descubrió que la propiedad oncogénica se debía a una mutación p53, o lo que luego se denominó "ganancia de la función oncogénica" (Gasco & Crook, 2003; Mai et al, 2017). P53 es una fosfoproteína implicada en el control del ciclo celular, la reparación del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), la apoptosis y la conservación de la integridad genómica. Está codificada por el gen del mismo nombre (p53) localizado en el cromosoma 17p13.1. El P53 es una proteína tetramérica de localización nuclear, que mediante interacción con el ADN provoca la activación de la transcripción de varios genes entre los que se encuentran p21WAF1, MDM2, bax y GADD45. Se llama así por su peso molecular, es decir, 53 kDa. No solo participa en la inducción de la apoptosis, sino que también es un actor clave en la regulación, desarrollo, diferenciación, amplificación genética, recombinación del ADN, segregación cromosómica y senescencia celular del ciclo celular. Su mecanismo de acción consiste en un bloqueo transitorio del paso de fase G1 a fase S en células con daño en el ADN. Un aumento en la concentración de la proteína nativa conlleva la parada del ciclo celular antes de la síntesis replicativa de ADN. Esto impide la entrada en fase de mitosis, permitiendo la reparación del material genético dañado o, alternativamente, induciendo los mecanismos que llevan a la muerte celular por apoptosis (Goldar et al, 2015), o por medio de la inhibición de la síntesis de bcl-2. Cuando el gen p53 está inactivado, las células continúan replicándose (sin la corrección de las mutaciones del ADN) y se produce una inestabilidad genética con un alto riesgo de acumulación de alteraciones múltiples que conduce a la formación de un tumor. Por ello, el gen p53 es considerado el guardián del genoma (Menezes et al, 2010).

La proteína salvaje posee una vida media corta, de seis a treinta minutos, por lo que no es detectable por IHQ. Por el contrario, la proteína mutante tiene una vida media extensa y puede ser analizada mediante esa técnica (Pan et al, 2017).

**✓ Familia de proteínas Bcl-2**

La familia de proteínas Bcl-2 está compuesta por proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la apoptosis, especialmente a través de la vía intrínseca ya que actúan antes del daño celular irreversible y principalmente a nivel mitocondrial (Roy et al, 2014). Bcl-2 fue la

primera proteína de esta familia que se identificó hace más de 20 años y está codificada por el gen BCL 2 (Nagler et al, 2003; Dolka et al, 2016). Todos los miembros Bcl-2 están ubicados en la membrana mitocondrial externa. Son reguladores responsables de la permeabilidad de la membrana ya sea en forma de un canal iónico o mediante la creación de poros (Roy et al 2014). Considerando su función y los dominios de homología Bcl-2 (BH), los miembros de la familia Bcl-2 se dividen en tres grupos.

1. Las proteínas antiapoptóticas que contienen los cuatro dominios BH y protegen a la célula de los estímulos apoptóticos. Algunos ejemplos son Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1 / Bfl-1 y Bcl-B / Bcl2L10.
2. Las proteínas sólo BH3, llamadas así porque en comparación con los otros miembros, están restringidas al dominio BH3. Los ejemplos en este grupo incluyen Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk y Bik. En tiempos de estrés celular como el daño en el ADN, la privación del factor de crecimiento y el estrés del retículo endoplasmático, se activan las proteínas sólo BH3, que son iniciadoras de la apoptosis. Por lo tanto, son pro-apoptóticos.
3. Los miembros del tercer grupo contienen los cuatro dominios BH y también son pro-apoptóticos. Algunos ejemplos incluyen Bax, Bak y Bok / Mtd.

Cuando hay una alteración en el equilibrio de los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2, el resultado es la apoptosis desregulada en las células afectadas. Esto puede deberse a una sobreexpresión de una o más proteínas antiapoptóticas o a una infraexpresión de una o más proteínas proapoptóticas o una combinación de ambas.

### **Balance de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas**

Se ha informado que muchas proteínas ejercen una actividad pro o antiapoptótica en la célula. No es la cantidad absoluta sino la relación de estas proteínas pro y antiapoptóticas la que desempeña un papel importante en la regulación de la muerte celular. Además, se ha encontrado que la sobreexpresión o la subexpresión de ciertos genes (de ahí las proteínas reguladoras resultantes) contribuyen a la carcinogénesis al reducir la apoptosis en células cancerosas (Menezes et al, 2010).

En este sentido la bibliografía permite observar una correlación entre las proteínas p53 y Bcl-2 (Rabinovich & Sotomayor, 1999; Haddad & Shin, 2008; Menezes et al, 2010) entre otras y el desarrollo de lesiones neoplásicas. La p53 que es un potente inhibidor de la progresión del ciclo celular, regula el crecimiento y la apoptosis de células cuyo ADN ha sido dañado (Impola et al, 2004; Brunotto et al, 2005). Su

importancia es la elevada incidencia de su mutación, encontrándose en el 50% de los cánceres estudiados. Esta mutación estructural produce una inactivación de su tipo salvaje e interrumpe su normal funcionamiento y puede contribuir a la malignidad de los tumores. Las Bcl-2 son una familia constituida por miembros pro y antiapoptóticos. Su mecanismo de acción es permeabilizar la membrana mitocondrial permitiendo la salida del citocromo c, asociado a la activación de las caspasas (Speight & Barrett, 2002; Hu et al, 2007). Los miembros que facilitan la salida de citocromo c (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 y A1) hacia el citoplasma se comportan como proapoptóticos, por el contrario otros miembros impiden la desaparición del citocromo c inhibiendo consecuentemente la apoptosis (Baxm Bad, Bid, Bak, Bcl-XS, Bik, Bim y HRK) (Gasco & Crook, 2003; Hu et al, 2007 Haddad & Shin, 2008). La interacción entre estas dos proteínas ha demostrado una significativa correlación inversa entre ellas (Loevvschall & Arenhotd Bindslev, 1994; Barbosa Pinheiro et al, 2002; Brunotto et al, 2006; Schartinger et al, 2012). Brunotto y col. (2006) postulan que mutaciones silenciosas observadas de p53 podrían originar una forma “inactiva” de p53. Esta proteína “inactiva”, mediante alteraciones génicas de la Bcl-2 induciría la pérdida de la sensibilidad de la Bcl-2 a la regulación ejercida (represión) por p53. Finalmente este hecho resulta en el desequilibrio del balance p53/Bcl-2.

#### ✓ **Ki-67**

Ki-67 es una proteína nuclear no histónica que se expresa en las células durante las fases activas de su ciclo (G1, S, G2, M) y que está ausente en aquellas en estado de reposo (G0). Por ello, el anticuerpo monoclonal Ki-67 permite la detección inmunohistoquímica de células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de crecimiento celular (Tian et al, 2016). Hasta hace unos años, la aplicación del Ki-67 estaba restringida a tejidos congelados, ya que el epítopo antigénico se perdía con la fijación en formol. Sin embargo, estudios más recientes condujeron al descubrimiento del anticuerpo monoclonal MIB1, el cual permite detectar el antígeno en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, facilitando el estudio de muestras de archivo. Se ha demostrado que la especificidad del anticuerpo MIB1 es similar a la del anticuerpo original Ki-67. A diferencia del índice mitótico que sólo evidencia división celular actual, el Ki-67 es un fiel marcador de la actividad proliferativa que se relaciona con el grado tumoral, aunque también ha sido descrito como un factor pronóstico en carcinomas (Larsen et al, 2012). Numerosos estudios señalan que la proliferación celular es mayor en los tumores malignos que en los benignos de glándulas salivales (Okabe et al, 2001; Larsen et al, 2012), demostrando utilidad en el diagnóstico diferencial y en el pronóstico de adenoma

pleomorfo, carcinoma adenoideo quístico, adenocarcinoma polimorfo de bajo grado y carcinoma mucoepidermoide (Tadbir et al, 2012). Larsen L y col. (2012) demostraron que Ki-67 es un importante factor pronóstico independiente de las características clínicas e histopatológicas de los carcinomas de glándulas salivales (Larsen et al, 2012). Otros autores, destacan una elevada expresión de Ki-67 en la etapa inicial de tumores malignos T1-T2 N0 de glándulas salivales mayores (Vacchi-Suzzi et al, 2010).

## **TRATAMIENTOS DE TUMORES DE GLÁNDULAS SALIVALES**

Los tratamientos de tumores de glándulas salivales en general son quirúrgicos debiendo realizarse la resección de alguna de ellas. La radioterapia constituye una importante alternativa terapéutica en caso en que haya márgenes quirúrgicos positivos, y cuando el grado de malignidad sea elevado, haya compromiso de algún nervio o se detecten ganglios positivos y también cuando pueda producirse siembra del tumor durante la cirugía por rotura de la cápsula (Goyal et al, 2015). Sin embargo, ambos tratamientos producen efectos indeseables asociados al tratamiento, como xerostomía, mucositis, estomatitis, infecciones, etc. que llevan a la sequedad bucal, con ardor y dificultades para tragar, hablar, además de un índice alto de caries rampantes.

Como se ha mencionado y la bibliografía existente lo documenta, las posibilidades de tratamiento de este tipo de patologías, entonces son bastante restringidas y poseen un elevado índice de efectos secundarios (Silvestre-Donat & Puente Sandoval, 2008).

Surge por esta razón la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas que minimicen los efectos secundarios y que brinden una calidad de vida superior a lo que ofrecen los tratamientos convencionales.

Las Radiaciones Laser de Baja Potencia (RLBP), teniendo en cuenta algunas características que poseen, podría considerárselas como una posible alternativa en el tratamiento de cáncer.

Las RLBP actúan principalmente a nivel de los citocromos mitocondriales aumentando los niveles de ATP. Dependiendo de la cantidad de estas radiaciones depositadas por cm<sup>2</sup> (densidad de energía) esta acción se puede ver estimulada hasta el doble de sus valores normales. Está ampliamente comprobado que densidades de energía bajas de estas radiaciones (2-8 Joul/cm<sup>2</sup>) inducen una activación y estimulación de diferentes tipos celulares y sus funciones (síntesis y secreción de proteínas, crecimiento diferenciación y motilidad celular, potenciales de membrana, afinidad a ligandos, liberación de neurotransmisores, fagocitosis, síntesis de prostaglandinas, etc). Esta actividad biológica de las RLBP se conoce como función bioestimulante (Malberti et al, 2003). Sin embargo, cuando se depositan densidades altas de energía (9 Joul/cm<sup>2</sup> en adelante) su efecto es inhibitorio o produce destrucción tisular (Plavnik et al 2011). Plavnik y col. (2003) estudiando acerca de este efecto de las radiaciones Láser de baja potencia de He-Ne sobre glándulas salivales normales de cobayos observaron que, lejos de provocar un efecto estimulante del parénquima glandular, indujo procesos apoptóticos del epitelio secretor. Estos resultados se podrían explicar

teniendo en cuenta que agentes que actúan permeabilizando la membrana mitocondrial permitirían la salida del citocromo c, que se asocia a la activación de las caspasas y por lo tanto al proceso apoptótico. Volker Hans Schartinger y col. (2012) establecieron en estudios in vitro que las RLBP con diodos producían una disminución de la proliferación tanto en líneas de células epiteliales no-neoplásica como neoplásicas bronquiales. Se verificó además un efecto proapoptótico significativo sólo en células del carcinoma. Fang Wang y col. (2005) utilizando altas densidades de RLBP de He-Ne inducían apoptosis en adenocarcinomas de pulmón humanos. Plavnik y col. (2011) en un estudio preliminar sobre el efecto de RLBP sobre tumores inducidos con un carcinógeno químico 9,1-dimethyl 1,2 benzathraceno (DMBA) en glándulas submandibulares de rata, observaron, que estas radiaciones producían inhibición del crecimiento de células tumorales.

La efectividad de la terapia láser se fundamenta en el aporte de suficiente energía para que mediante su absorción y transformación en los tejidos pueda generarse el proceso terapéutico. Existen dos tipos de emisión de energía luminosa: la continua y la pulsada, por lo que el cálculo de las dosificaciones variará de acuerdo al tipo de energía utilizada. Otro parámetro a tener en cuenta sería la potencia exacta de emisión que nos indica la energía que se entrega por segundos y está relacionada con el tipo de emisión y la potencia de salida del equipo. Su unidad de medida es el watt (W). Si el láser emite en régimen continuo la energía sólo será identificada por su potencia de emisión. Como ya vimos anteriormente, debemos tener siempre bien claro que la Energía (E) solamente depende del tiempo empleado y de la potencia de emisión utilizada, mientras que cuando hablamos de Densidad de Energía (D.E.) dependerá de la superficie donde es depositada la energía, que viene dada por el spot del emisor láser. La Densidad de Energía (D.E) no es más que la relación existente entre la energía suministrada por un emisor láser y la superficie del spot primario de éste, no del área total de tratamiento. Se expresa en Julios/cm<sup>2</sup> (J/cm<sup>2</sup>). Nosotros utilizamos un emisor de radiaciones laser de baja potencia de He-Ne de pulso continuo de 7mW de potencia con un diámetro de salida (spot) de 0.2mm en una sola sesión durante 6,5 minutos, depositándose 50 Joul/cm<sup>2</sup> (Hernández Díaz A, 2012.)

Si consideramos al cáncer como una enfermedad genético-molecular con fuertes modificaciones en el funcionamiento celular, y considerando las modificaciones que sobre él pueden ejercer las RLBP proponemos la siguiente hipótesis.

## HIPÓTESIS

La aplicación de Radiaciones Láser de Baja Potencia Helio Neón en densidades altas sobre tumores inducidos con 9,1-dimethyl 1,2 benzathraceno (DMBA) en glándulas submandibulares de ratas producen modificaciones del ciclo celular induciendo fenómenos apoptóticos en las células cancerosas.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto que las RLBP, en densidades de energía altas, producen sobre tumores malignos inducidos con DMBA, en glándulas submandibulares de rata.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar histopatológicamente el efecto de las RLBP de Helio -Neón sobre tumores malignos inducidos con DMBA en glándulas submandibulares de rata.
2. Estudiar las modificaciones histopatológicas en tumores malignos inducidos con DMBA en glándulas submandibulares de rata, a través de la microscopía electrónica de barrido.
3. Estudiar histomorfométricamente los cambios producidos por el efecto de las RLBP de Helio -Neón sobre tumores malignos inducidos con DMBA en glándulas submandibulares de rata.
4. Evaluar las modificaciones nucleares presentes en células apoptóticas *"in situ"* con la coloración DAPI producidas sobre células tumorales malignas inducidas con DMBA, de glándulas submandibulares de rata por irradiación con RLBP.
5. Estudiar inmunocitoquímicamente oncogenes y supresores de tumores como p53 y Bcl2, cuando tumores malignos inducidos con DMBA de glándulas salivales de rata son irradiados con RLBP.
6. Estudiar inmunocitoquímicamente las modificaciones en la expresión de Ki67 (biomarcador de proliferación celular) cuando tumores malignos inducidos con DMBA de glándulas submandibulares de rata son irradiados con RLBP.

## MATERIALES

Se utilizaron sesenta (60) ratas macho Wistar de  $\pm 120$  g de peso corporal que fueron alimentadas con comida especial para ratas y agua ad libitum. Los mismos fueron alojados en el Bioterio de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Odontología de la UNC y se mantuvieron en grupos de cinco animales de 120 gr cada uno en jaulas de 48 cm por 38 cm y una altura de 20 cm a 24 °C de temperatura con un ciclo de luz oscuridad de 12 horas. El manejo de los animales se realizó siguiendo los lineamientos del National Institute of Health (NIH) y de la reglamentación para el cuidado y uso de animales de experimentación de la Facultad de Ciencias Médicas y Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba.

Los animales se distribuyeron en dos grupos:

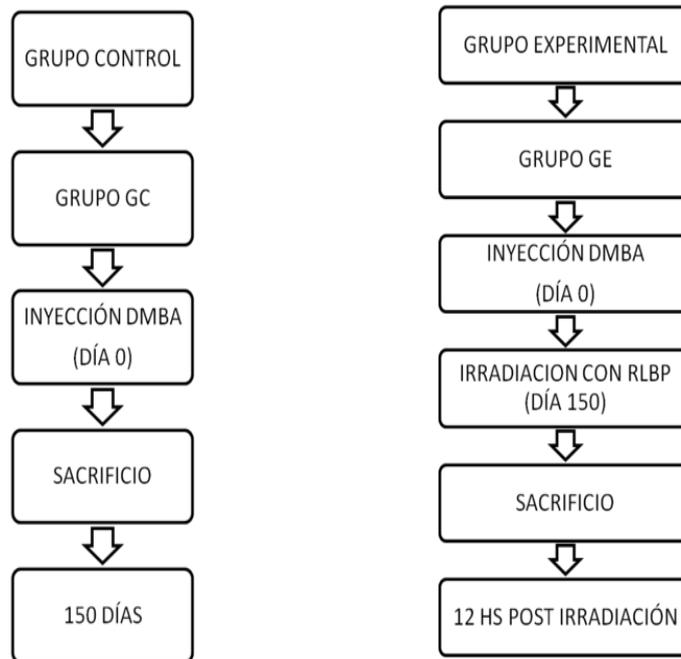
Grupo 1 control (GC): n= 30 ratas a las cuales se les inyectó DMBA en glándulas submandibulares para inducir la tumorigénesis. Se las mantuvieron vivas durante 150 días post inyección. En ese tiempo experimental aparecían tumores de un diámetro de 4x2x1,50 cm de forma ovalada, sin lesiones cutáneas superficiales, sin compromiso de las funciones vitales del animal.

Grupo 2 experimental (GE): n=30 ratas a las cuales se les inyectó DMBA en glándulas submandibulares para inducirles la tumorigénesis. Se las mantuvieron vivas durante 150 días post inyección. Pasado este tiempo experimental, se les aplicó RLBP con densidad de energía alta. Los animales de este grupo se sacrificaron 12 horas post irradiación. Los tiempos experimentales fueron seleccionados de acuerdo a los datos aportados por la bibliografía con respecto a el tiempo necesario para que aparezcan los tumores, y teniendo en cuenta el momento post irradiación donde la misma ejerció su mayor efecto.

Brunotto y col (2006) observaron que a los 150 días de tiempo experimental post inyección de DMBA en glándulas submandibulares de ratas, estas desarrollaban tumores malignos de manera inequívoca. De manera experimental nosotros tomamos varios tiempos experimentales y observábamos el desarrollo tumoral con estudios histológicos, de tumores malignos a los 150 días post inyección con DMBA en glándulas submandibulares de rata.

Estos antecedentes determinaron utilizar solamente este tiempo experimental en este trabajo. Esto determinó también el momento de irradiación con RLBP ya que se obtenían células cancerosas sobre las cuales irradiar ya que en los otros tiempos no había.

Por otro lado Plavnik y col (2003) demostraron que a las 12 hs post irradiación con RLBP sobre glándulas submandibulares de rata se producían las mayores modificaciones a nivel estructural, ultraestructural y funcional (perfil electroforético del material secretado) del estroma glandular. En el 2011 el mismo equipo de trabajo corroboró que a las 12 hs post irradiación con RLBP de He Ne se producían las mayores modificaciones en tumores malignos en glándulas submandibulares de rata.



**Diagrama de metodología de trabajo**

## METODOLOGÍA

Los animales fueron anestesiados con una solución de 1.28mg Xilazine / 8mg Ketamine / 100mg de peso corporal inyectada por vía intraperitoneal (Figura 3). Posteriormente se realizó una incisión a la altura de la línea media desde la base mandibular hasta el esternón exponiendo ambas glándulas submandibulares (Figura 4). Se inyectaron 50 µl de 9,10-dimetil 1,2 benzantraceno (DMBA) disuelto en acetona al 0,5% en la zona media de cada glándula (Figura 5 y 6) y se suturó la herida cuidadosamente (Figura 7). El bioterio cuenta con una fuente de calor para la fase de recuperación. Como método analgésico postquirúrgico se utilizó 200mg de Ibuprofeno por litro de agua durante 4 días. Sobre la herida cutánea se colocó una crema antibiótica (Fortderm) para evitar contaminaciones superficiales.

Los animales controles se sacrificaron con etanol intraperitoneal al 70% luego de haber realizado la anestesia correspondiente, a los 150 días post inyección de DMBA. A los animales del Grupo Experimental (GE) al mismo tiempo experimental, luego de exponer las glándulas submandibulares, se los irradió con un láser de baja potencia de Helio-Neón de 7mW de potencia con un diámetro de 0.2mm de modo continuo en una sola sesión durante 6,5 minutos, depositándose 50 Joul/cm<sup>2</sup> (Figura 8), según lo establecido en la bibliografía ( Hernández Díaz A, 2012) en el Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN), donde se establecieron pautas para la Dosimetría en Laseres de Baja Potencia. .



**Figura 3. Anestesia**



**Figura 4. Se exponen ambas glándulas**



**Figura 5. Inyección con DMBA**



**Figura 6. Ambas glándulas con DMBA**



**Figura 7. Sutura**

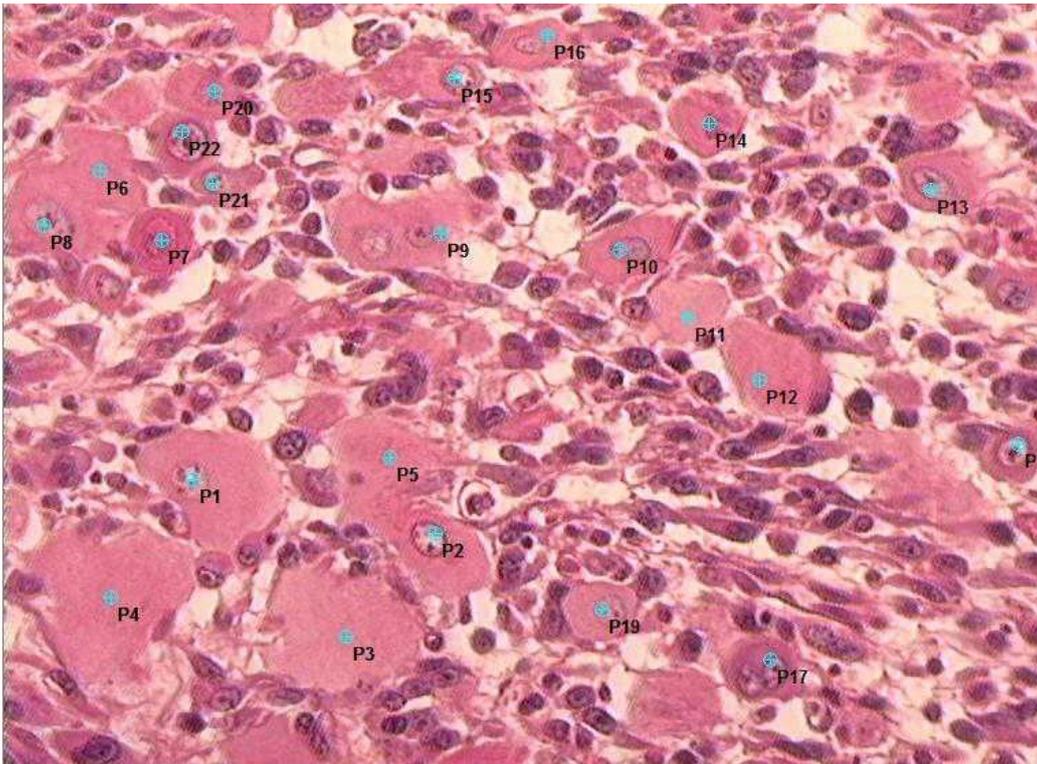


**Figura 8. Aplicación de RLBP 150 días post inyección con DMBA**

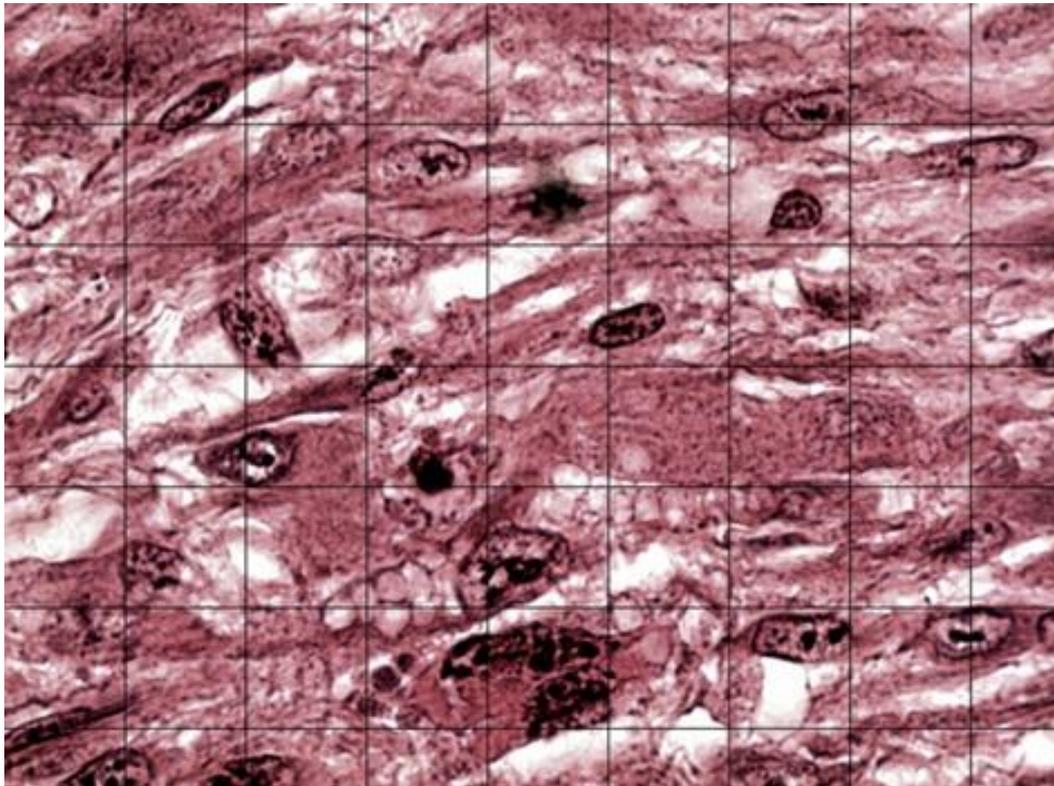
Pasados los tiempos experimentales propuestos, a los animales de ambos grupos se les extirparon los tumores con glándula residual de ambos lados.

Treinta (30) muestras de tumor y glándula residual del lado derecho fueron fijadas en formol al 10% taponado con acetil piridina clorhídrico, pH 7. El material se procesó según la técnica de rutina y se obtuvieron cortes seriados que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, en el laboratorio de histopatología del Área de Biología Oral (ABO) de la Facultad de Odontología de la UNC. Se evaluaron los cambios histopatológicos y se midieron histomorfológicamente con el programa Image Pro Plus 4 en el departamento de Microscopía del Área de Biología Oral (ABO) y en la Cátedra A de Biología Celular de la Facultad de Odontología de la UNC con las siguientes características histológicas a saber:

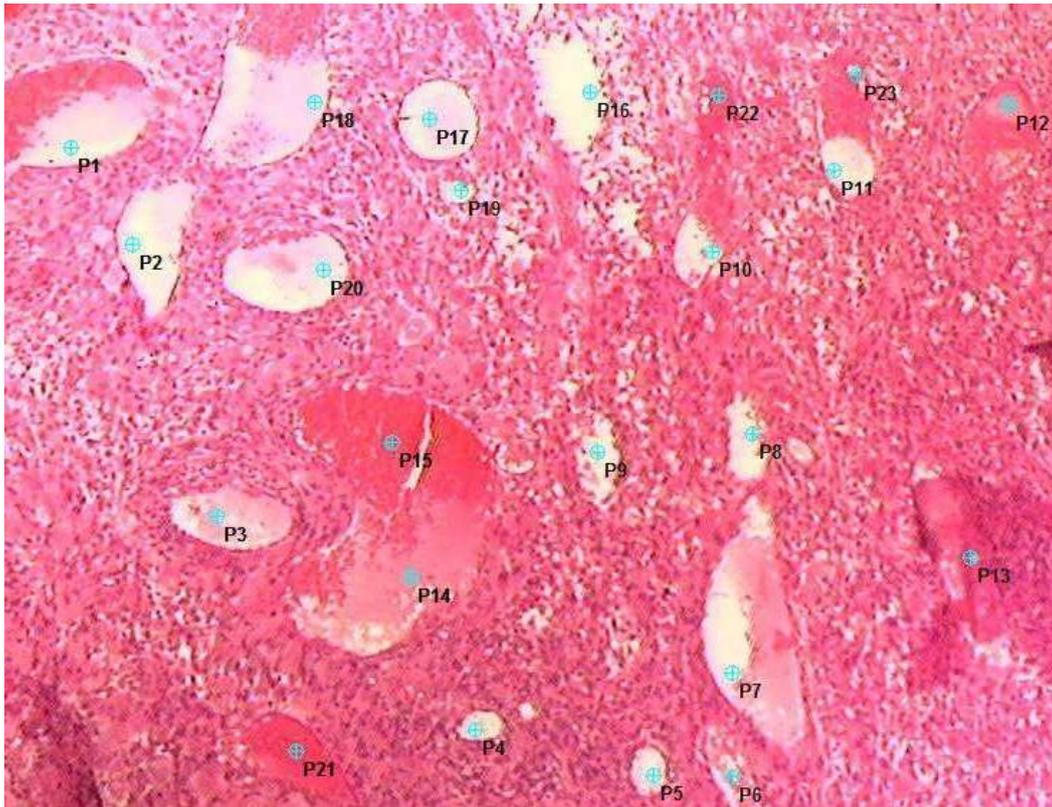
- ✓ Cantidad de células gigantes tumorales que presentaron las siguientes características: células redondeadas, acidófilas de citoplasma homogéneo y de gran tamaño. (Figura 8).
- ✓ Cantidad de células fusiformes y redondeadas pequeñas apoptóticas que presentaban núcleos con cromatina condensada periférica. Se utilizaron dos métodos para cuantificarlas:
  - El de sin grilla (Figura 8).
  - El que las utiliza grilla con divisiones de  $50 \mu\text{m}^2$  contando la cantidad de células que se encuentre por campo (Figura 9).
- ✓ Diámetros y cantidad de vasos sanguíneos por campos: se identificaban vasos y diámetros mayores y menores de los mismos (Figura 10 y 11).



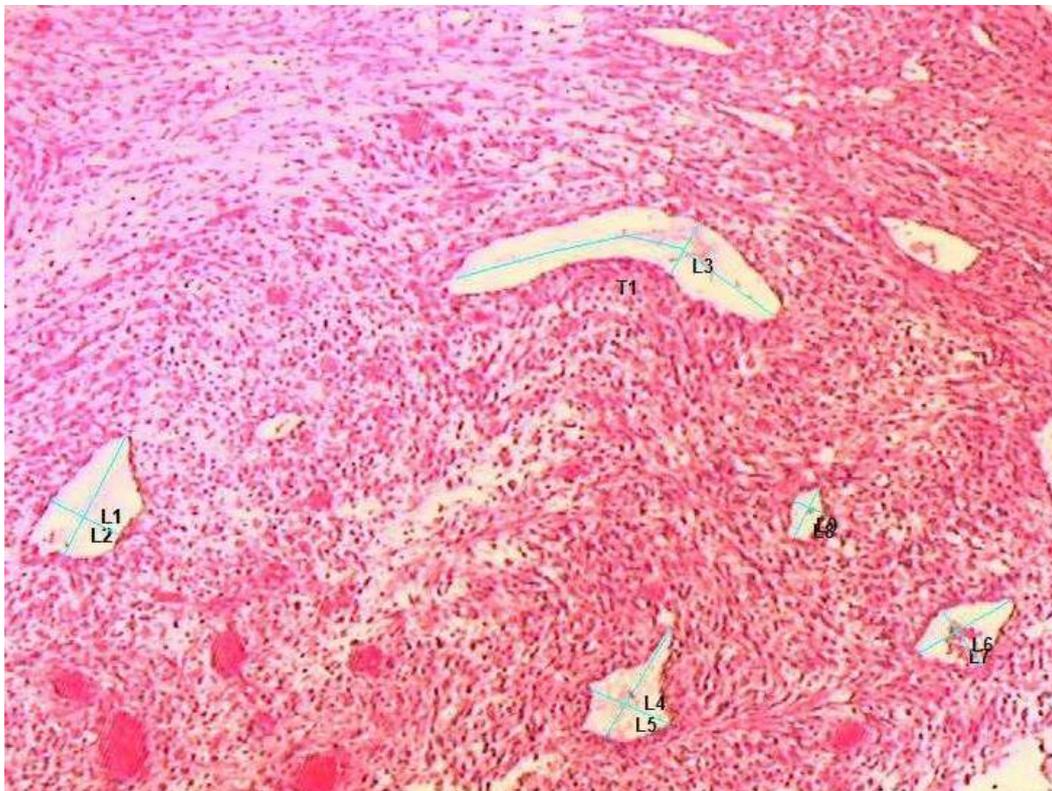
**FIGURA 8.** Microfotografía de tumor, la flecha indican las células acidófilas, gigantes y con núcleos pleomórficos que son las que se van a contar para realizar la histomorfometría (H/E20x).



**FIGURA 9.** Microfotografía de tumor, se observa grilla para crear áreas de 50 micras<sup>2</sup> y así poder cuantificar células apoptóticas observando los núcleos con cuerpos apoptóticos (H/E 100X).



**FIGURA 10.** Microfotografía donde se observa el modo de contar vasos sanguíneos por campo por imagen (H/E 4X).

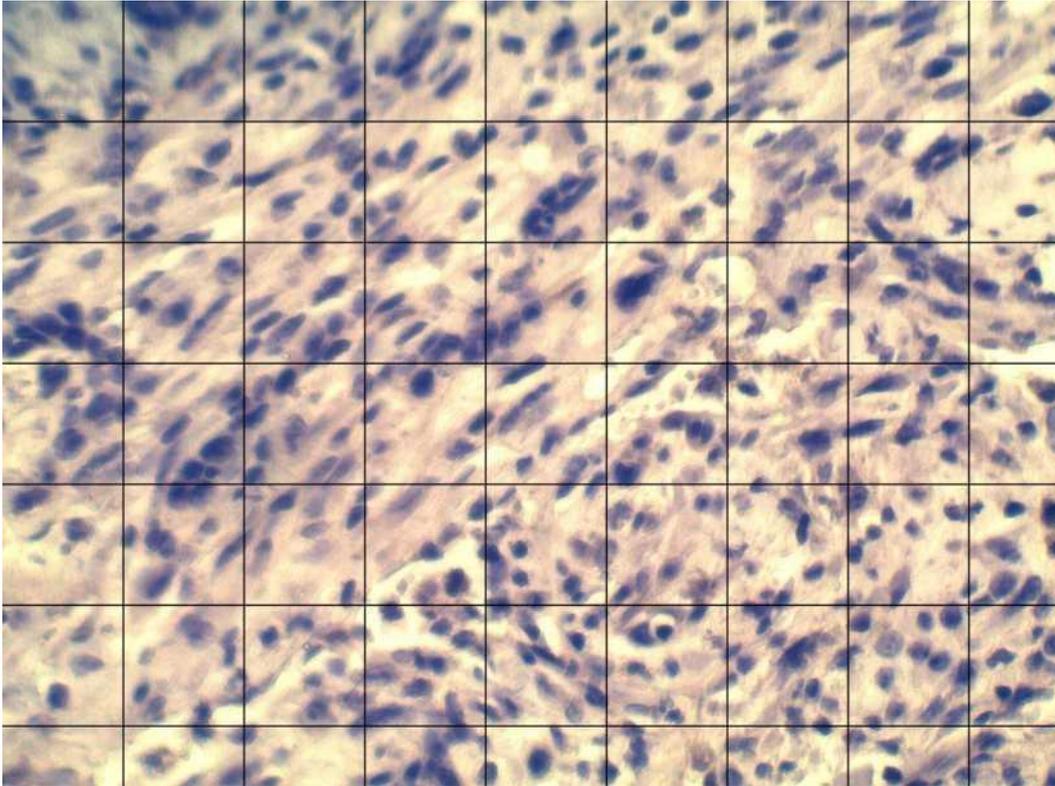


**FIGURA 11.** Microfotografía donde se observa el modo de medir el tamaño de los vasos sanguíneos por campo por imagen, considerando el eje longitudinal y el transversal de los mismos (H/E 4X).

Con el mismo material incluido en parafina se realizaron estudios histopatológicos con microscopía electrónica de barrido, Scanning Electron Microscope Sigma Zeiss. Field Emission (FE-SEM) en la Facultad de Matemática, Astronomía y Física (FAMAF) de la UNC. Para el procesamiento del material se tomaron cortes histológicos de 3 micras de espesor sin teñir a los cuales se les realizó disección a punto crítico con CO<sub>2</sub> y posterior metalización con partículas de 12 a 20 nanómetros de oro.

Con las 30 muestras de tumor y glándula residual del lado izquierdo, se realizaron inmunomarcaciones para:

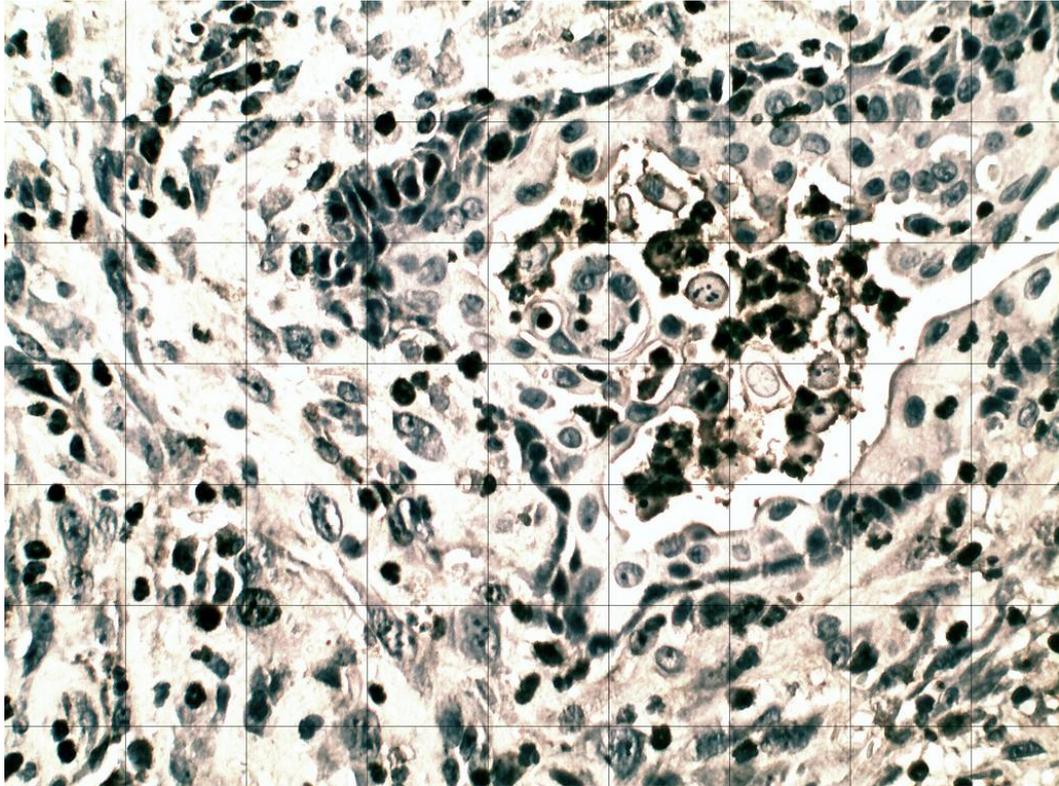
- ✓ P53(n=8). A tal fin se utilizó anticuerpo monoclonal p53 protein, marca Dako, código M7001, dilución 1/200, incubación 60 min. Se realizó previo pretratamiento en microondas con citrato pH6. Se utilizó como sistema de detección CystoScan HRP detection system, de Cell Marque, código 951D-30, incubando 15 minutos con HRP streptavidin label y 15 min con polyvalent bitinylated link, según instrucciones del fabricante. Se reveló con DAB substrate kit, incubando 5 min y siguiendo instrucciones del fabricante. Se contracoloró con hematoxilina.
- ✓ Bcl2 (n=8) se utilizó anticuerpo monoclonal de BCL2 (SP66), marca Cell Marque código 226R-26, dilución 1/200, incubación 60 min. Se realizó previo pretratamiento en microondas con Trilogy, de Cell Marque, cod 920P-07. Se utilizó como sistema de detección CystoScan HRP detection system, de Cell Marque, código 951D-30, incubando 15 minutos con HRP streptavidin label y 15 min con polyvalent bitinylated link, según instrucciones del fabricante. Se reveló con DAB substrate kit, incubando 5 min y siguiendo instrucciones del fabricante. Se contracoloró con hematoxilina. A los estudios controles se les realizará el mismo protocolo. Se contaron los núcleos inmuno marcados con una grilla de 63 campos de 50  $\mu\text{m}^2$  (Figura 12).



**FIGURA 12. Microfotografía de la inmunomarcación para Bcl2 con la grilla de 63 campos de  $50\mu\text{m}^2$  (20x).**

Para cada grupo (P53 y Bcl-2) contaron núcleos positivos de a 50  $\text{mm}^2$ . Se considerará inmunomarcación negativa a p53 y Bcl-2 cuando el número del núcleo en el área establecida fuese menos a 10%. El conteo fue observado con el sistema Image Pro Plus 4 en el departamento de Microscopía del Area de Biología Oral (ABO) y en la Cátedra Ade Biología Celularde la Facultad de Odontología de la UNC, con un microscopio óptico.

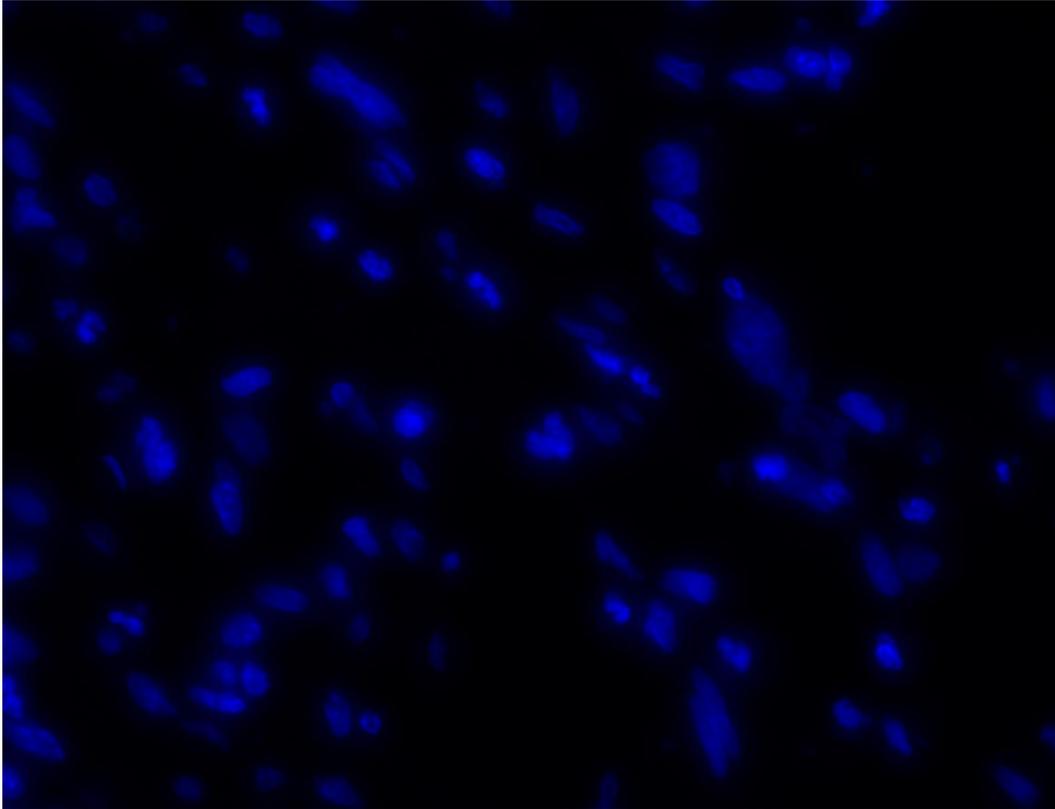
- ✓ Ki67 (n=8) utilizando anticuerpo monoclonal Ki-67 (SP6), marca CellMarque, código 275R-16, dilución 1/200, incubación 60 min. Se realizó previo pretratamiento en microondas con citrato pH6. Se utilizó como sistema de detección CystoScan HRP detection system, de Cell Marque, código 951D-30, incubando 15 minutos con HRP streptavidin label y 15 min con polyvalent bitinylated link, según instrucciones del fabricante. Se reveló con DAB substrate kit, incubando 5 min y siguiendo instrucciones del fabricante. Se contracoloré con hematoxilina. La evaluación cualitativa de la marcación se realizará en términos de intensidad de coloración. Se contaron los núcleos inmuno marcados con una grilla de 63 campos de  $50\mu\text{m}^2$  (Figura 13).



**FIGURA 13. Microfotografía de la inmunomarcación para Ki 67 con la grilla de 63 campos de 50µm<sup>2</sup> (20x).**

- ✓ Tinción con DAPI, que liga fluoresceína al núcleo, los cambios, como condensación y marginación de la cromatina que ocurren durante apoptosis fueron identificados por microscopia fluorescente, detectando este proceso en células aisladas y tejidos. Para ello se fijo el tejido (n=6) en Paraformadehído (PFA) 4% por 24 hs luego se lavo con PBS y se sumergieron en sacarosa al 30% (sacarosa disuelta en PBS) para luego sumergirlo en OCT (mezcla comercial de alcohol polivinílico, polietilenglicol y excipientes) y llevarlo a -80°C para que se forme el taco de donde se obtendrán mediante un criostato los cortes seriados de 8 micras de espesor. A estos preparados se les colocó buffer de bloqueo (BB) formado con albúmina de suero bovino (BSA) 10% (10g/100ml) y Triton 0,3% (0,3ml/100ml) previo a delimitar los tejidos con DakoPen (para que el líquido quede sobre el tejido y no se rebalse) y bloquear con 50ml de BB por corte. Incubar 24hs a 4°C en cámara húmeda. Luego se lavar 2 veces con PBS en la cajita, durante 10', se incubar con 10ml de DAPI por 10' en cámara húmeda, Se lavar 10' con PBS y secar bien el vidrio. Se coloca 5ml de FluorSafe (líquido de montaje) sobre el tejido y se colocó el cubreobjetos, asegurándose de no dejar burbujas. Se dejó secar por 24hs en

una superficie plana para llevarlo al microscopio. Se observa con microscopio de fluorescencia LEICA DMi8 (Figura 14).



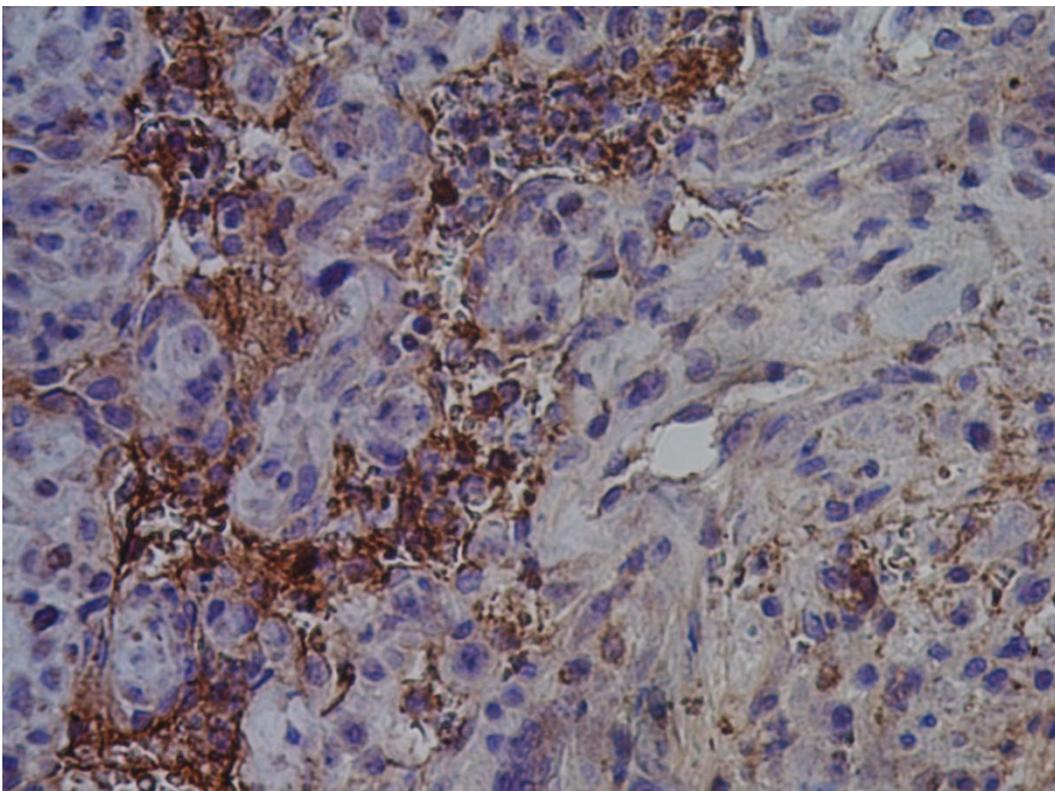
**FIGURA 14. Microfotografía técnica DAPI para tinción nuclear 63X.**

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

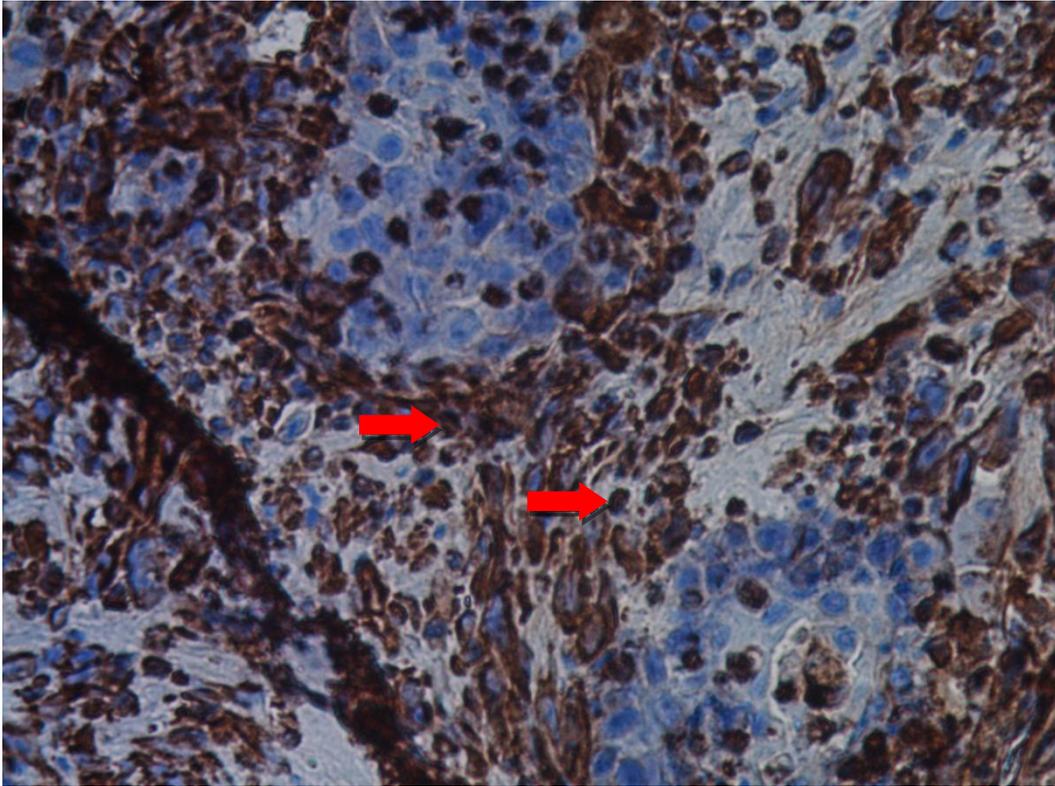
Para los resultados histomorfométricos se utilizó la Prueba de Wilcoxon, para muestras independientes. Las inmunomarcación de p53, Bcl-2, Ki 67 y las muestras coloreadas con DAPI fueron analizadas con Pruebas de la mediana para dos muestras, valores de  $p < 0,05$  serán considerados significativos.

## **RESULTADOS**

En todos los casos estudiados se observó que el DMBA producía en las glándulas submandibulares de rata el mismo tipo de tumor: carcinoma de células mioepiteliales. En el estudio histopatológico se observó una gran heterogeneidad morfológica, coexistiendo frecuentemente varios tipos celulares (fusiformes, epitelioides, gigantes acidófilas, etc.) y distintos patrones arquitecturales (multinodular, nidos y cordones). Las células se disponían en el seno de un estroma hialinizado y se apreciaban zonas de necrosis. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, la expresión en las células tumorales de citoqueratinas (Figura 15) y vimentina (Figura 16) confirmaron la diferenciación mioepitelial (Figura 17 y 18).



**FIGURA 15.** Microfotografía que permite observar marcación positiva para Citoqueratinas AE1/AE3 40x.



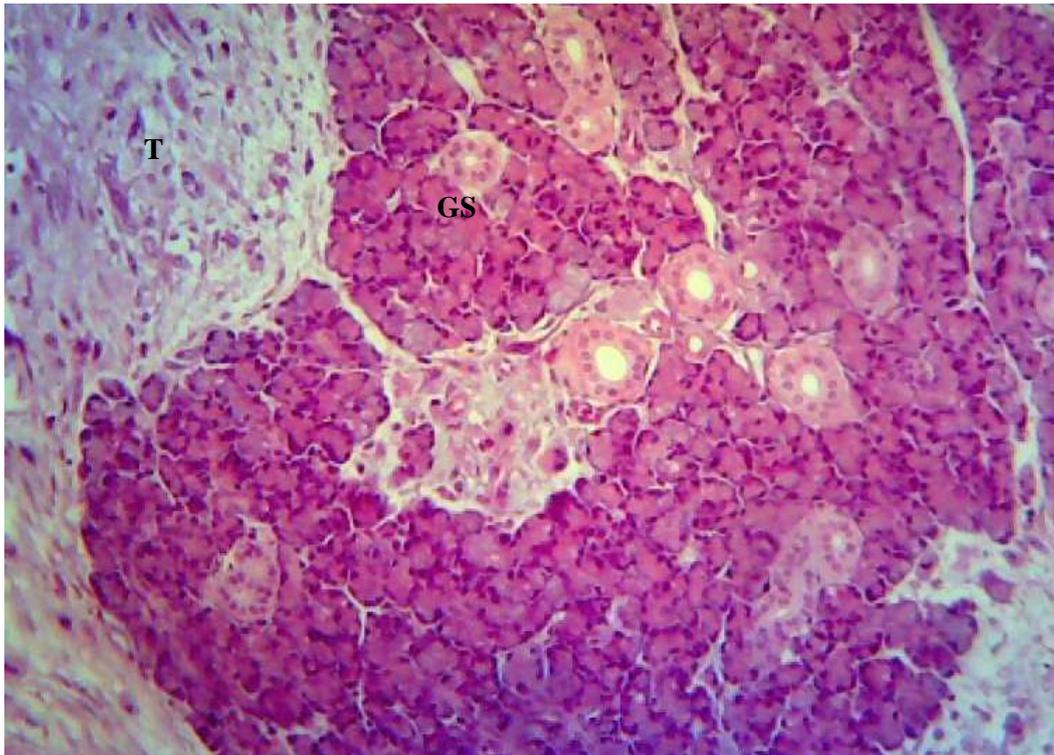
**FIGURA 16. Microfotografía que permite observar marcacion positiva Vimentina 40x.**

## **ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO**

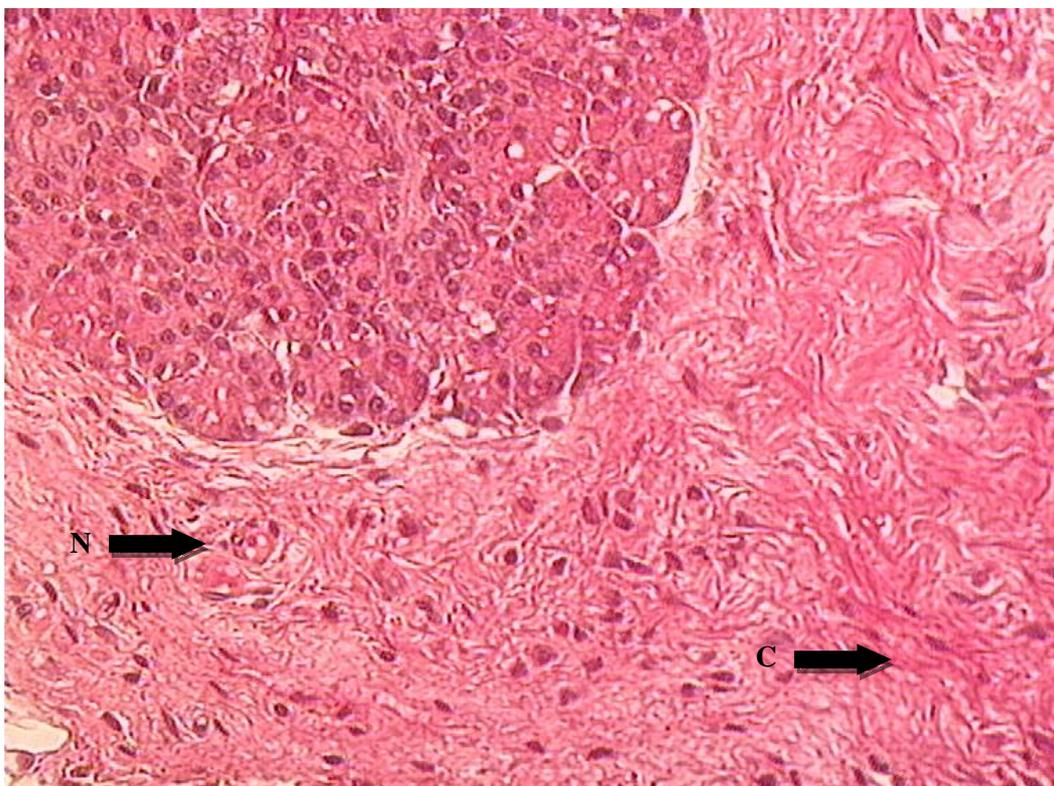
**Grupo Control:** Las neoplasias no irradiadas se caracterizan por observarse restos de glándula residual rodeados de células fusadas distribuídas en nidos o cordones (Figura 17 y 18). Estos tumores están constituidos entonces, por células neoplasicas gigantes y otras más pequeñas en su mayor parte fusadas y otras epitelioides. Las células gigantes tienen nucleos pleomorficos, muchas son multinucleadas y presentan nucleolos prominentes. El citoplasma es eosinofilo. En algunas áreas se observan frecuentes mitosis. (Figura 19).

Las células fusadas tienen escaso citoplasma eosinofilo, en otro sector hay una clara transición entre células fusadas y gigantes. El aspecto es sarcomatoide. En general se distribuyen una al lado de la otra, pero tienen áreas infiltrativas de los tejidos vecinos. Tienen una vascularización irregular. En otras zonas se pueden observar fenómenos necróticos.

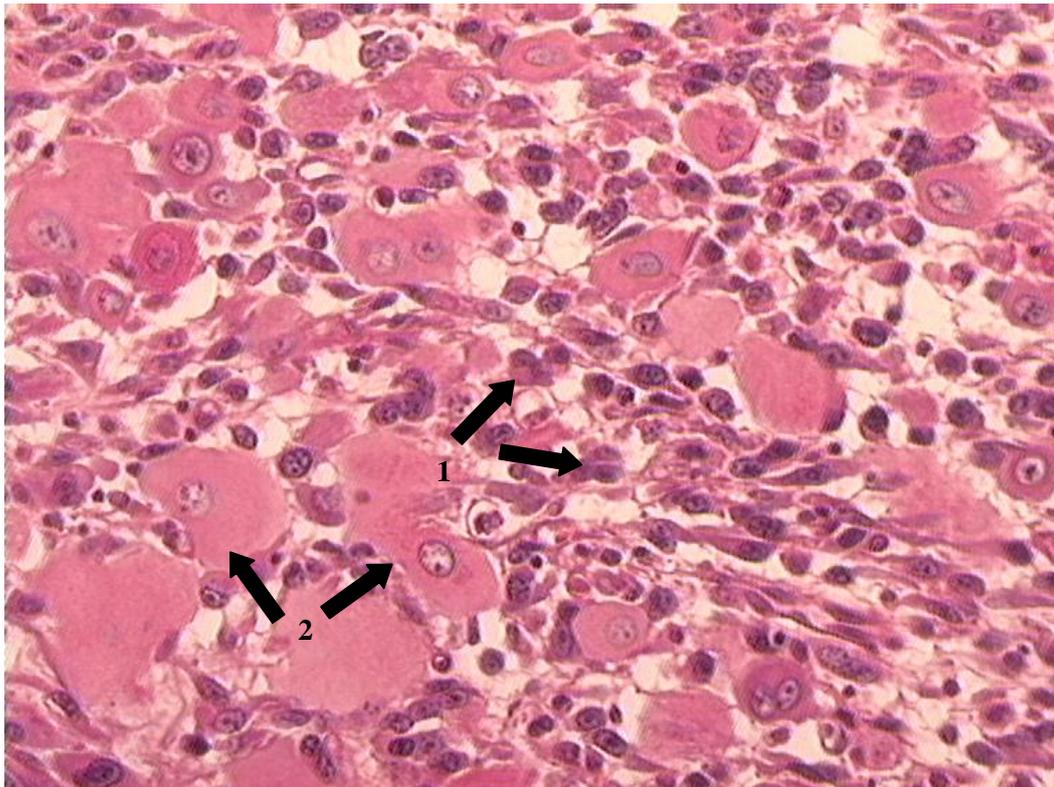
Muy poco frecuentes fueron las imágenes de cariólisis, sobretudo en áreas próximas a la necrosis. Se visualiza infiltración neoplásica fundamentalmente hacia los tejidos vecinos. (Figura 20).



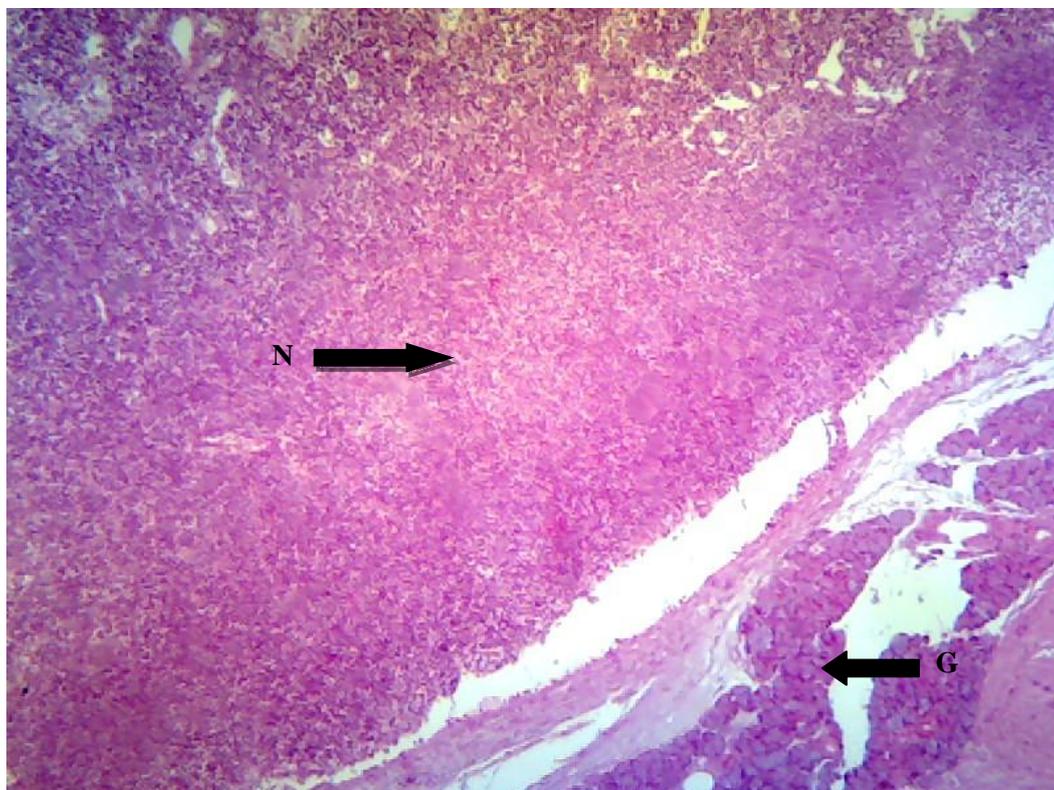
**FIGURA 17.** Microfotografía que permite observar glándula salival residual(GS) rodeada por el tumor(T) (H/E 10x).



**FIGURA 18.** Microfotografía en la que observamos los distintos fomas de ordenamiento celular del tumor nidos (N), cordones de células fusadas (C) rodeando glándula salival residual (H/E 20x).



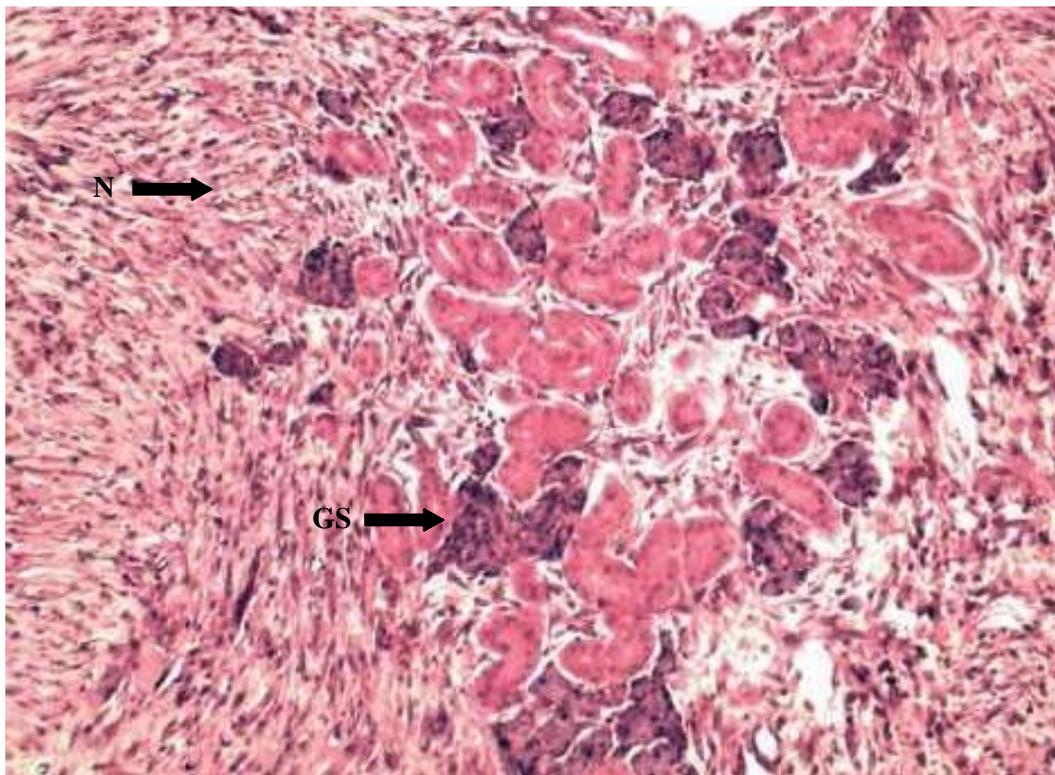
**FIGURA 19.** Microfotografía donde podemos observar los distintos celulares del tumor: 1- Células epiteloideas, 2- Células gigantes acidófilas con pleomorfismo nuclear (H/E 40)



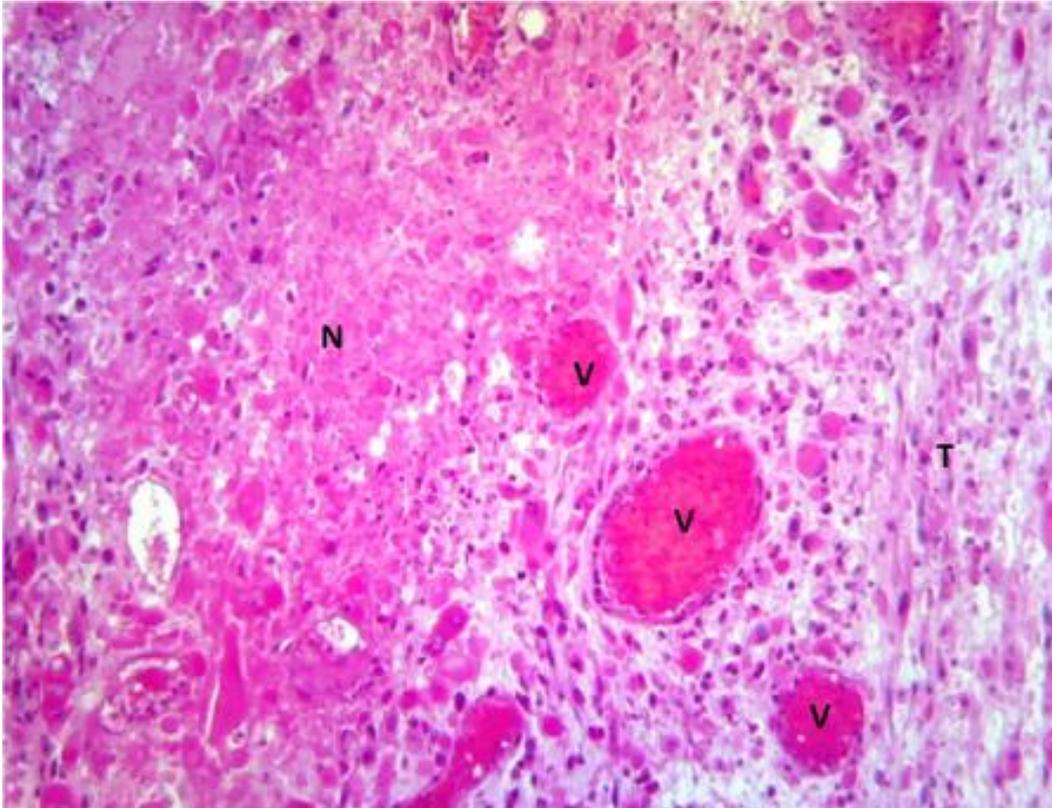
**FIGURA 20.** Microfotografía donde podemos observar la necrosis(N) y glandula residual (G).

**Grupo Experimental:** Las neoplasias si bien en general son semejantes a las anteriores, el pleomorfismo citológico es mucho mayor.

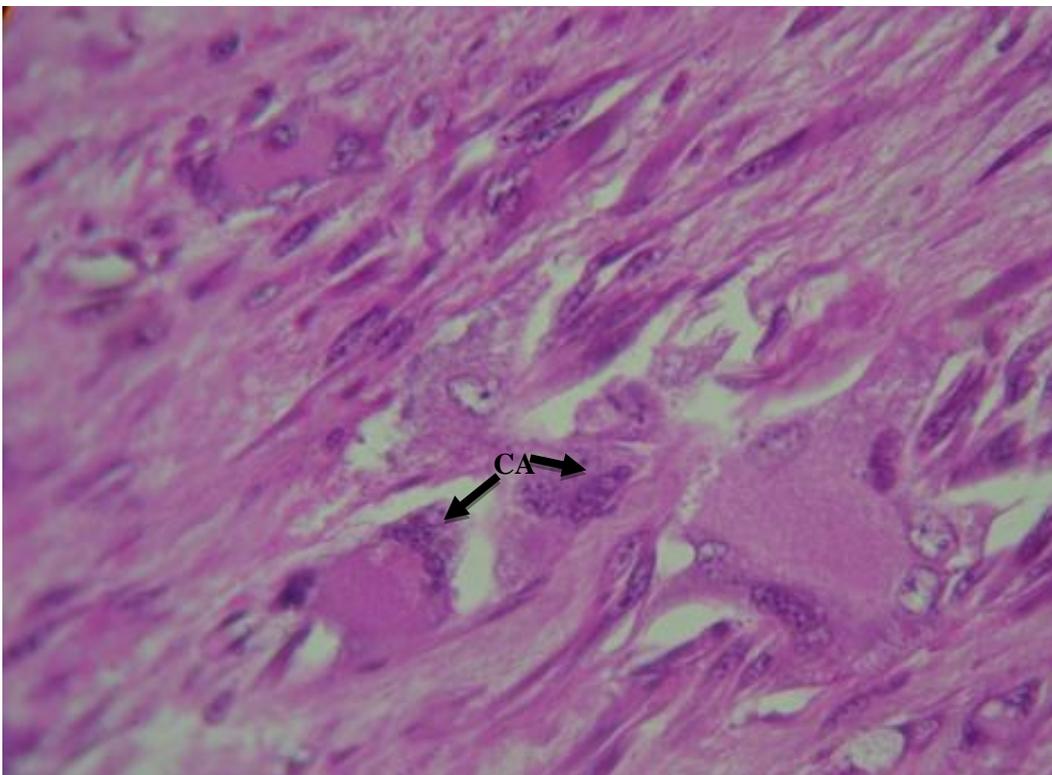
Cuando los tumores fueron irradiados con RLBP de He –Ne, en amplias áreas predominan células pequeñas o fusadas, además podemos ver claramente como se disocia el tejido glandular normal. Entre los conductos glandulares se expresan las neoplasias (pareciesen nacer en este sector de la glándula). (Figura 21). En otros campos se observan amplias zonas de necrosis por coagulación junto con vasos congestivos y células tumorales (Figura 22). En este grupo además de las zonas de necrosis, observamos células tumorales ahusadas con presencias de gránulos cromatínicos condensados llamados cuerpos apoptóticos (Figura 23 y 24), que no se observaban en el grupo control, y células epitelioides con cariólisis, estallido nuclear asociadas con necrosis (Figura 24 y 25). El crecimiento es francamente expansivo e infiltrativo. Si bien no observamos infiltración vascular ni linfática en las areas estudiadas. Lo que predomina es la microtrombosis.



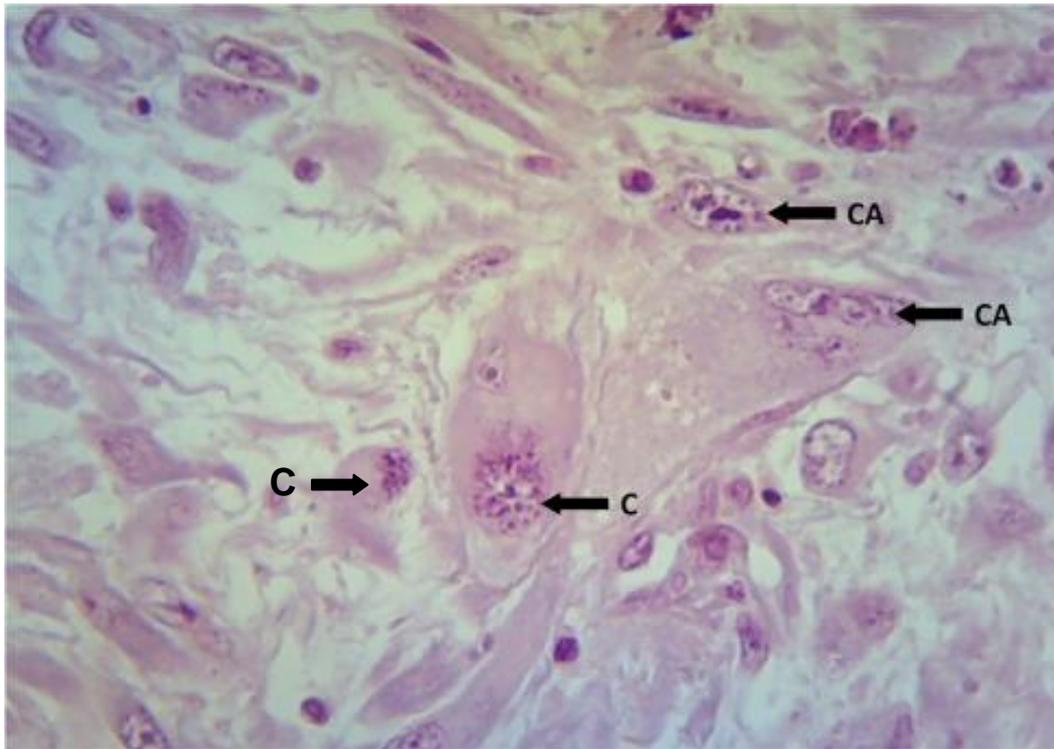
**FIGURA 21.** Microfotografía en la que observamos glandula salival residual (GS), principalmente de conductos infiltrada con nidos y cordones de células fusadas infiltrantes(N) (H/E 20x).



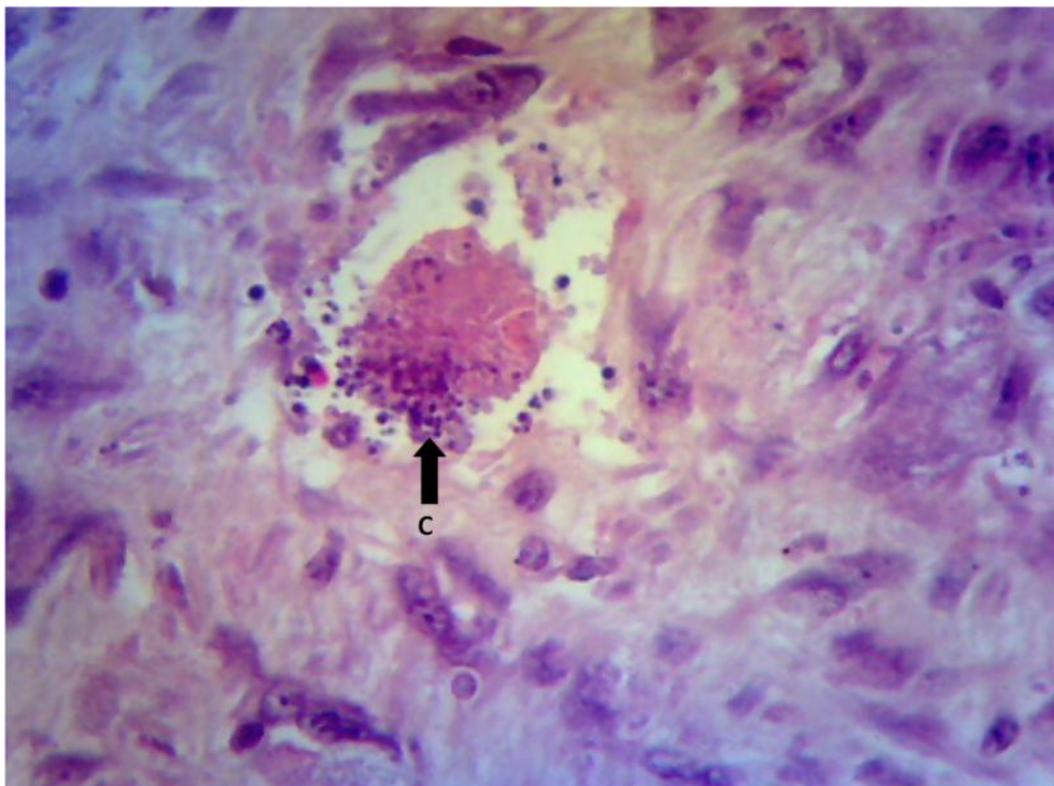
**FIGURA 22.** Microfotografía que permite observar zonas de necrosis (N) y microtrombosis (V) rodeados de células tumorales (T). (H/E 10x).



**FIGURA 23.** Microfotografía en la que se observa células fusadas con el núcleo lleno de cuerpos apoptóticos (CA) periféricos. (H/E 40x).



**FIGURA 24.** Microfotografía en la que observamos células tumorales fusadas con cuerpos apoptóticos nucleares (CA) y células epiteloideas con cariólisis nuclear (C). (H/E 40x).



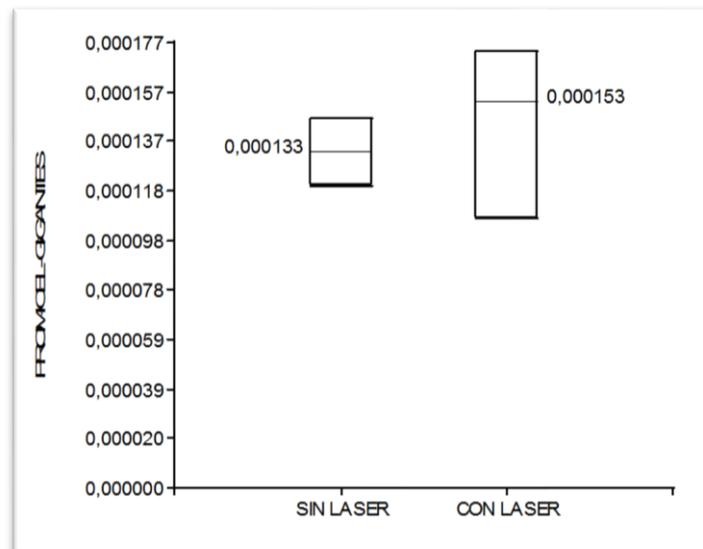
**FIGURA 25.** Microfotografía donde observamos cariólisis nuclear (C) con liberación del contenido cromatínico, indicando zona de necrosis. (H/E 40x).

## **ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO:**

Con las mismas preparaciones utilizadas para el estudio anatomopatológico se realizaron las siguientes mediciones:

1. Cantidad de células gigantes tumorales que presentaron las siguientes características: células redondeadas, acidófilas de citoplasma homogéneo y de gran tamaño

Con los resultados obtenidos se realizó para el análisis estadístico la prueba paramétrica de Wilcoxon para muestras independientes, observándose que a pesar de que en los grupos con láser había un promedio mayor de células, esto no resultó estadísticamente significativo. Esto nos indica que en ambos grupos hubo un crecimiento tumoral pero que en el caso experimental el tratamiento con RLBP no modificó en este aspecto la conducta del tumor (Gráfico 1).



**Gráfico 1. Promedio de células gigantes tumorales Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.**

2. Cantidad de células pequeñas apoptóticas: son células ahusadas o redondeadas que presentaban núcleos con cromatina condensada periféricamente. Con los resultados obtenidos se realizó el estudio estadístico de las medias, desviación estándar y mediana de ambos grupos estudiados: control y experimental observándose en todos los casos valores mayores en el grupo experimental y siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0061$ ), lo que está indicando que las RLBP indujeron de manera altamente significativa a la apoptosis de las células tumorales (Cuadro 4).

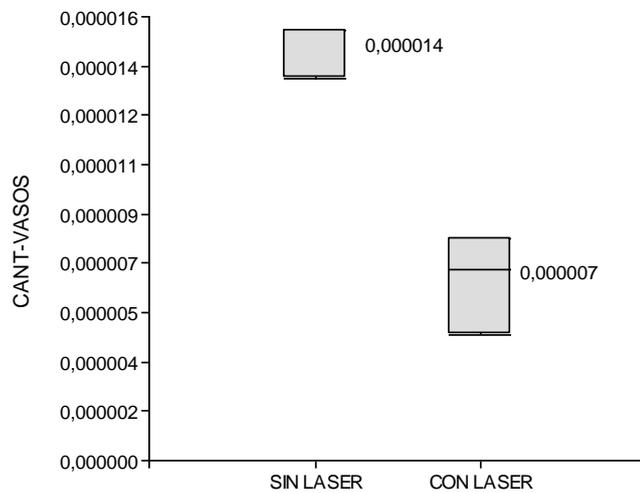
N LASER	NCONTROL	Media LASER	Media CON	DELASER	DE CON	Mediana LASER	Mediana CONT	p(2 colas)
4 6campos por imagen	7 6campos por imagen	21,75	5,71	4,03	2,87	22,00	4,00	0,0061

**CUADRO 4. Células Apoptóticas.**

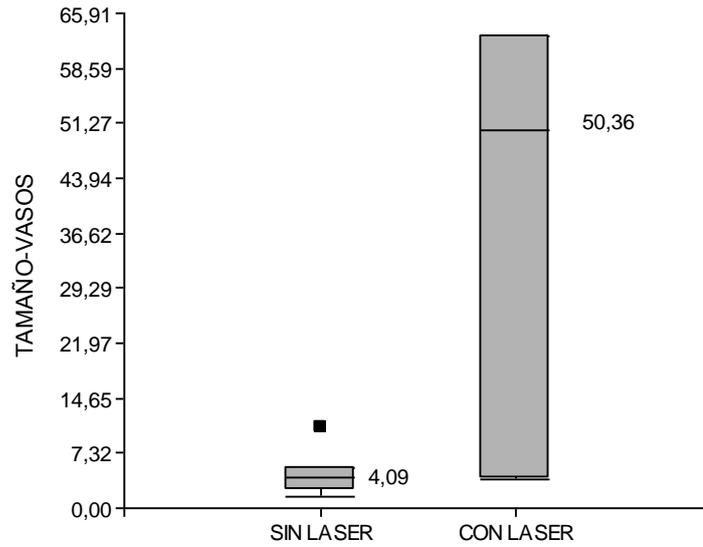
3. Diámetros y cantidad de vasos sanguíneos por campos.

Los resultados obtenidos sobre la cantidad de vasos sanguíneos por campo estudiado que fueron 6 por imagen(3 para cada grupo )nos indicó que había mayor cantidad de vasos sanguíneos en el grupo control que en el experimental, aunque no existían diferencias estadísticamente significativa (Gráfico 2 y Cuadro 5).

Con respecto al tamaño vascular hubo entre los dos grupos diferencias, indicando estas una mayor vasodilatación en el grupo experimental lo cual sería coherente con el efecto vasodilatador y vaso congestivo de las RLBP, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Gráfico 3 y Cuadro 5).



**Gráfico 2. Cantidad de vasos sanguíneos. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.**



**Gráfico3. Tamaño de vasos sanguíneos. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.**

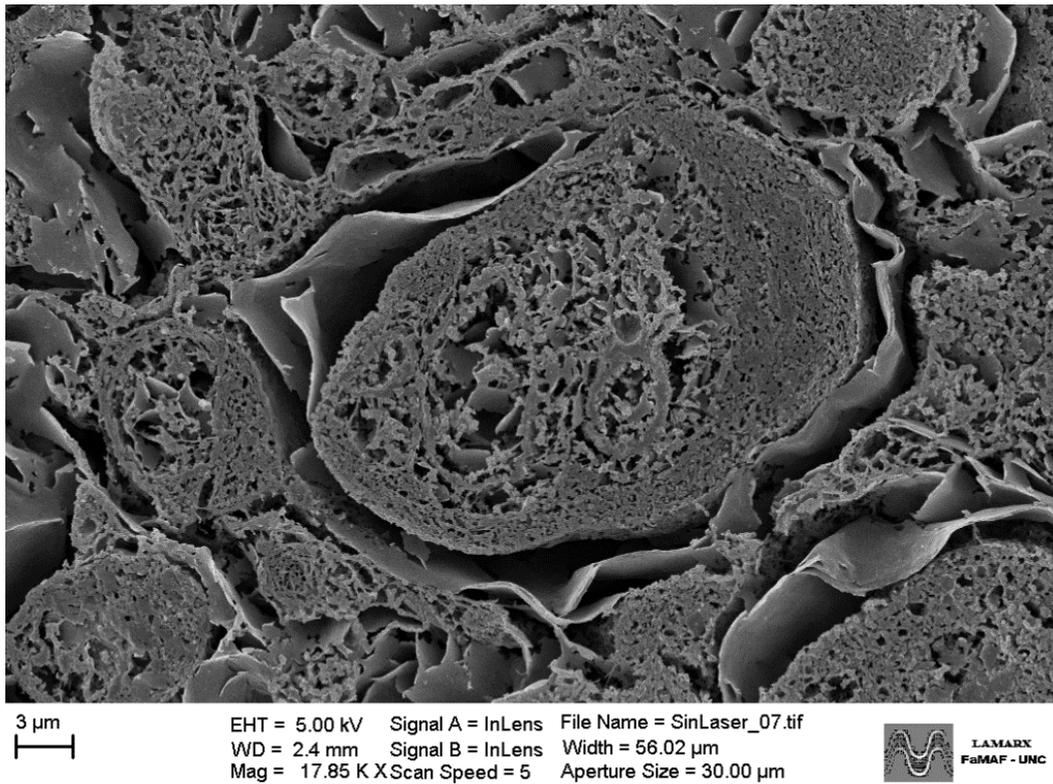
Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	p(2 colas)
CANT-VASOS	CON LASER	SIN LASER	3seobservaron 6 campos por imagen	3se observaron 6 campos por imagen	0,000006	0,000014	0,000002	0,000001	0,1000
TAMAÑO-VASOS	CON LASER	SIN LASER	3seobservaron 6 campos por imagen	5se observaron 6 campos por imagen	38,99	4,79	31,13	3,62	0,2500

**CUADRO 5. Cantidad de vasos sanguíneos y tamaño de vasos sanguíneos.**

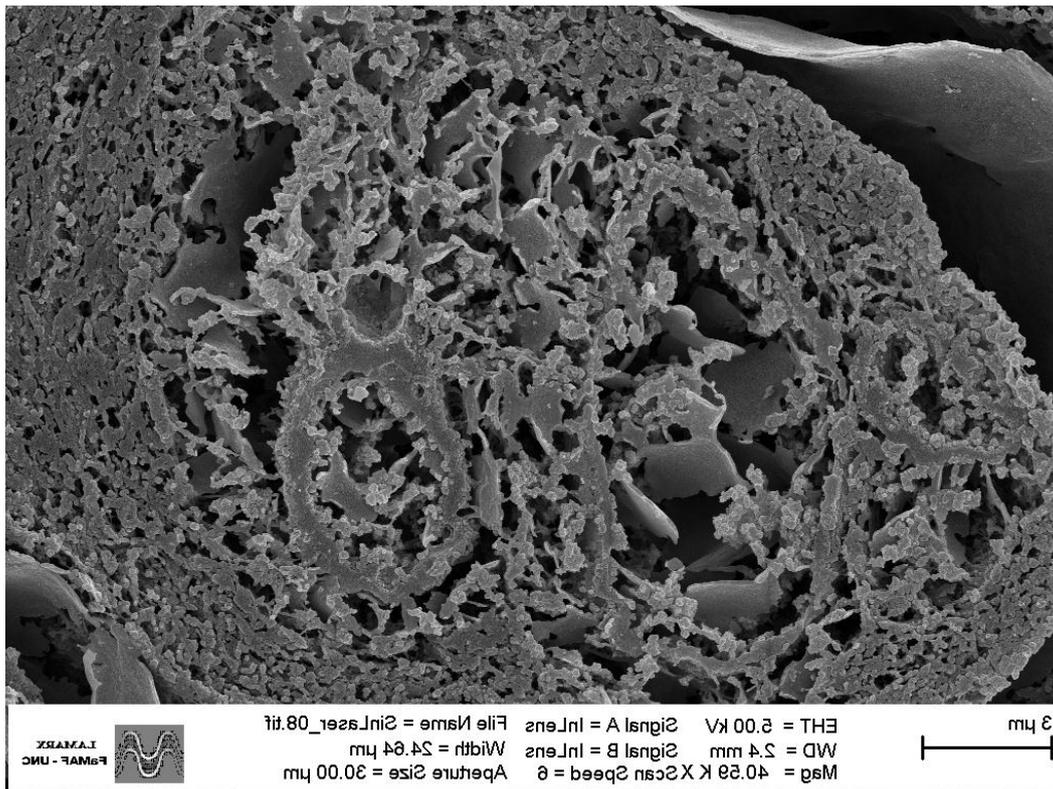
**ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO:**

Los mismos cortes histológicos obtenidos para el estudio histopatológico se procesaron con la técnica explicada en materiales y métodos para ser estudiados con ScanningElectronMicroscope Sigma Zeiss. Field Emission (FE-SEM) en el laboratorio LAMARX de la Facultad de Matemática Astronomía y Física de la UNC.

En los grupos controles se observaron células tumorales ahusadas con núcleos en división celular tanto a menor como a mayor aumento (Figura 26 y 27).

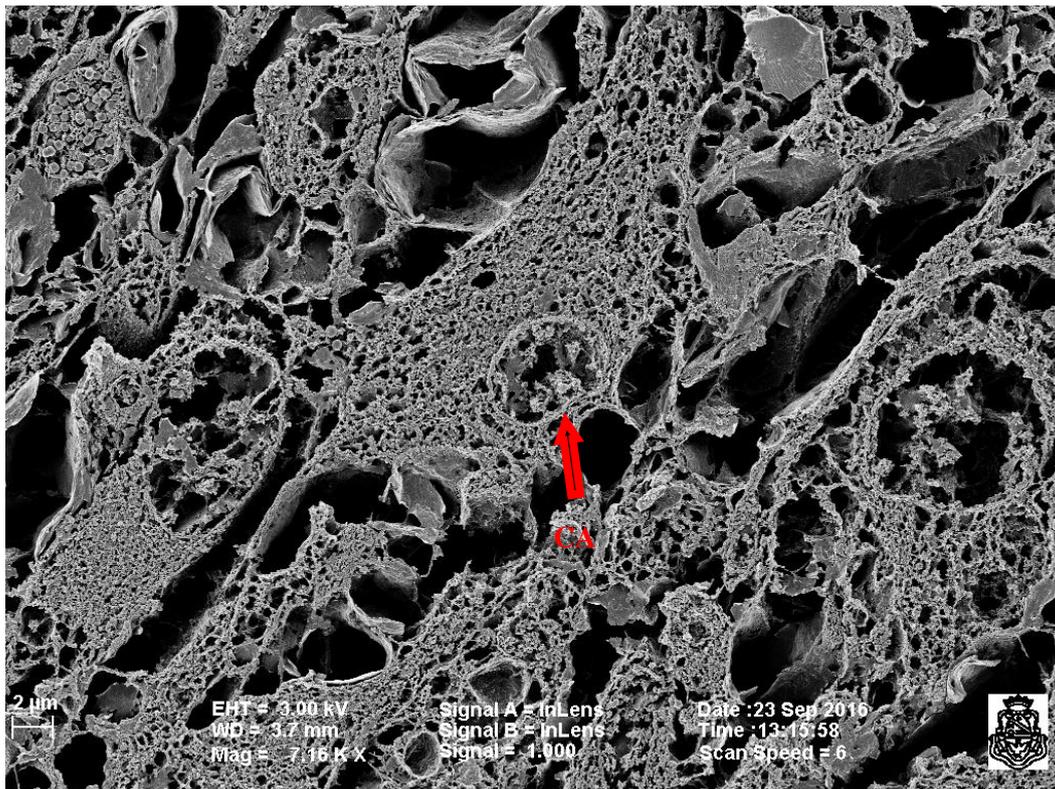


**FIGURA 26. Microfotografía electrónica de barrido a menor aumento donde observamos una célula tumoral fusada con núcleos en división celular.**

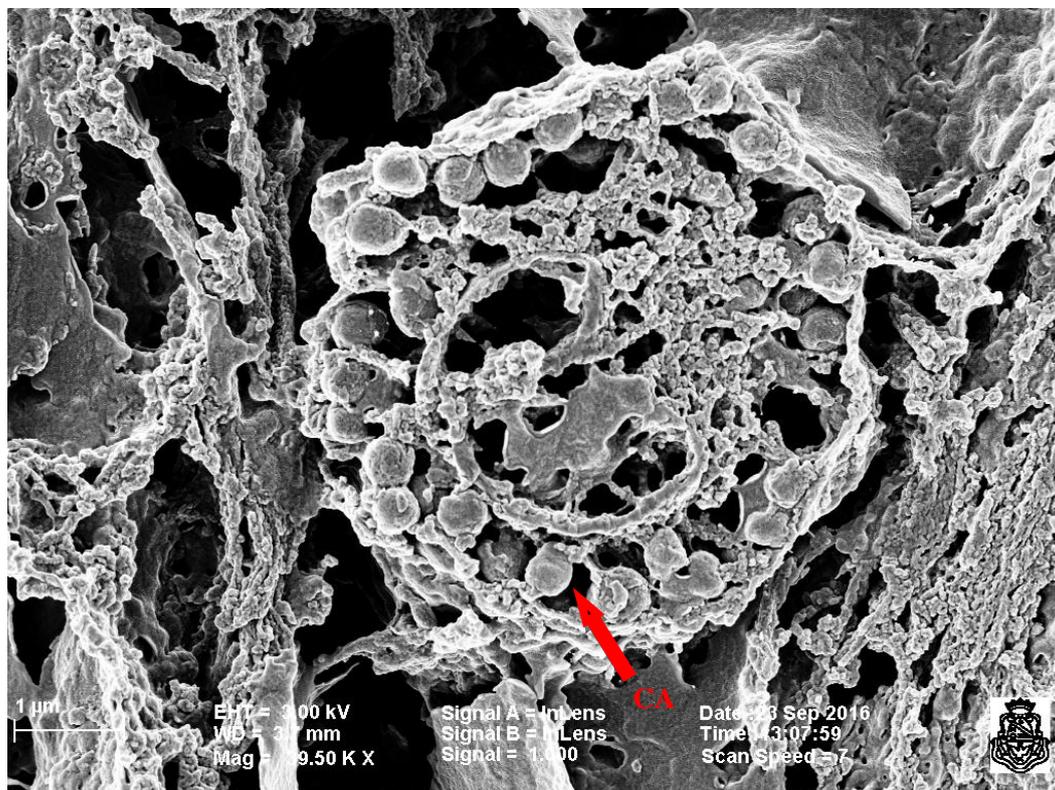


**FIGURA 27. Microfotografía electrónica de barrido a mayor aumento donde observamos una célula tumoral fusada con núcleos en división celular.**

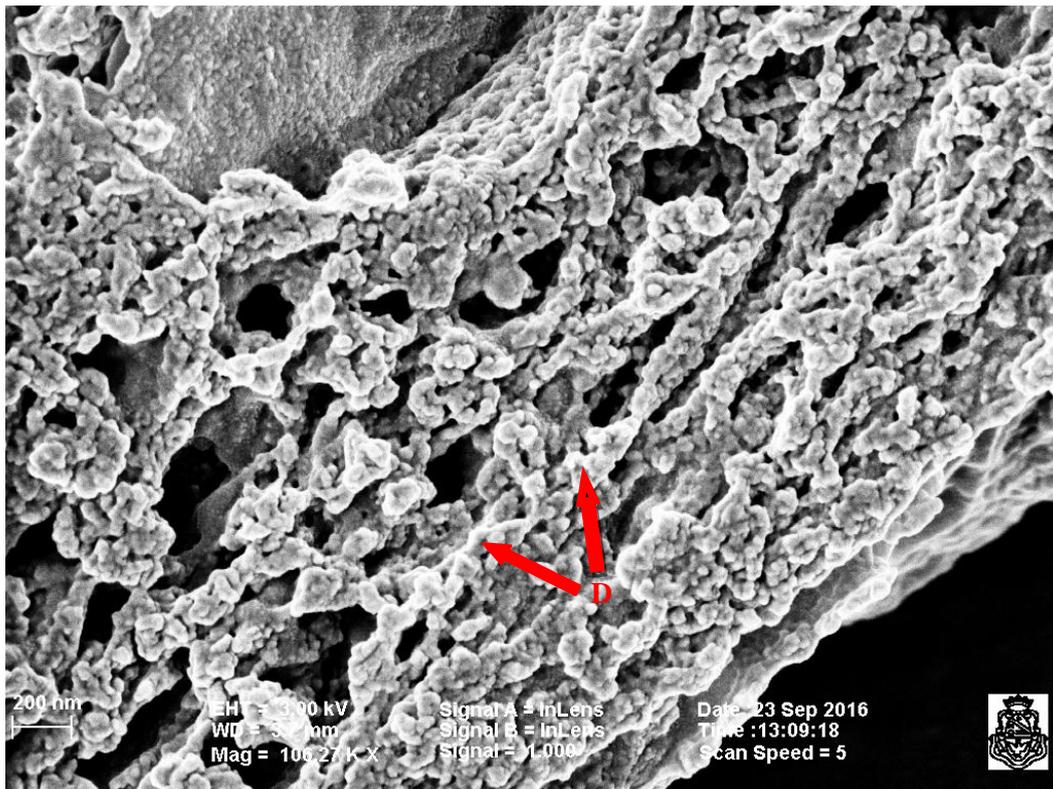
En los grupos experimentales se observaron células tumorales con núcleos con condensaciones esféricas de cromatina dispuesta en forma periférica, típica de células apoptóticas, tanto a menor como a mayor aumento (Figura 28 y 29). En el citoplasma podemos observar desorganización del Retículo Endoplasmático granular o rugoso con desprendimiento de los ribosomas (Figura 30).



**FIGURA 28.** Microfotografía electrónica de barrido donde observamos células tumorales fusadas con cuerpos cromáticos esféricos periféricos, cuerpos apoptóticos (CA).



**FIGURA 29.** Microfotografía electrónica de barrido a mayor aumento, donde resalta la presencia de cuerpos apoptóticos (CA) en las células tumorales.

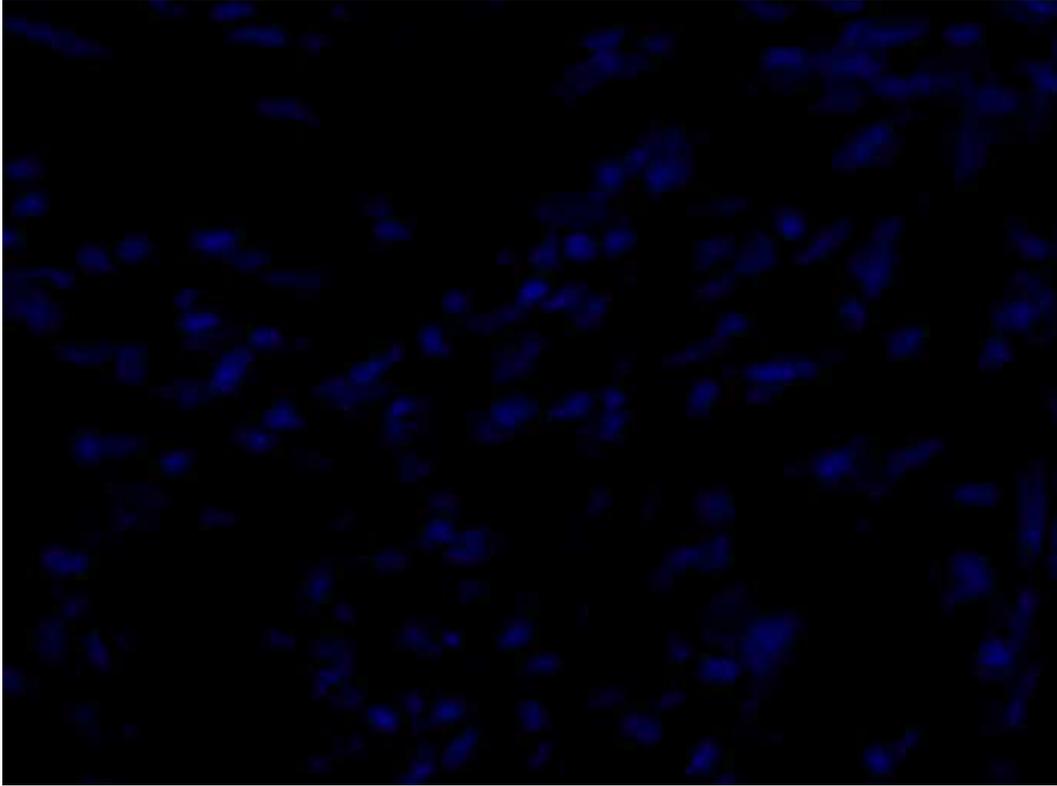


**FIGURA 30.** Microfotografía electrónica de barrido donde se observa el comienzo de la desagregación ribosómica en el retículo endoplásmico granular o rugoso (D).

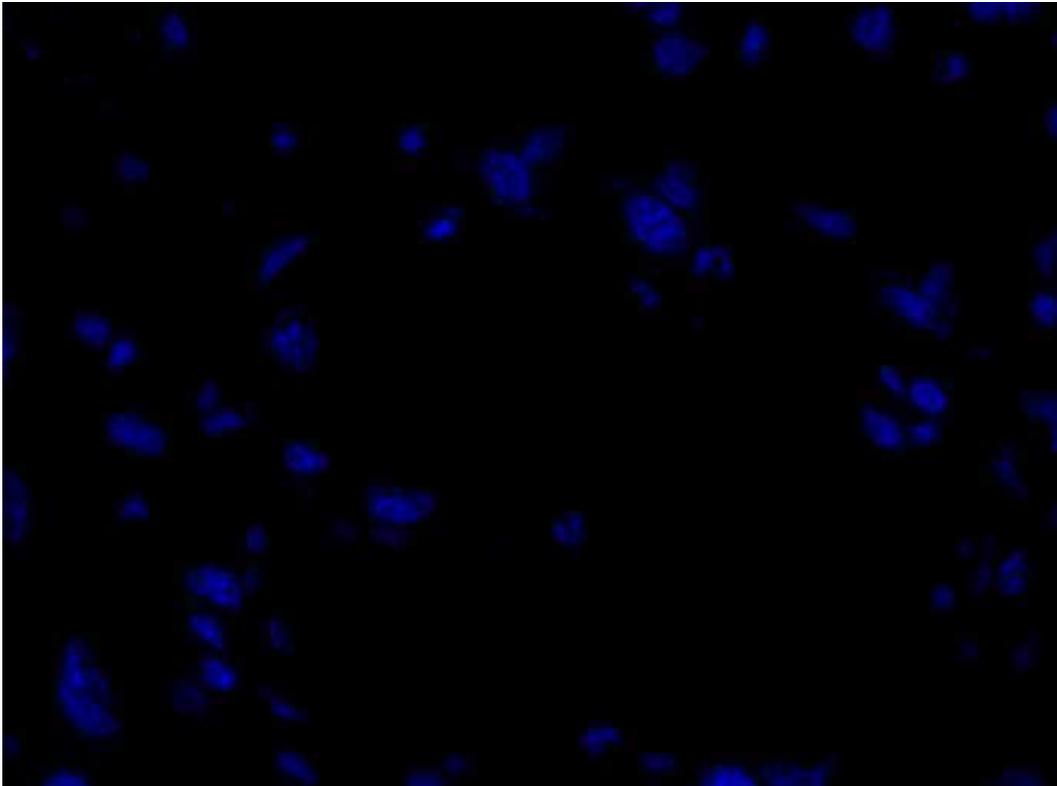
### **COLORACIÓN DAPI**

La coloración con DAPI liga la fluoresceína al núcleo, y permite cuantificar, entre otras situaciones la condensación y marginación de la cromatina que ocurren durante apoptosis cuando la visualizamos por microscopia fluorescente.

El estudio microscópico indicó que había menor marcación en el grupo control en relación con el experimental. Este resultado se vio corroborado por el análisis estadístico de Prueba de la mediana para dos muestras en donde se observa una p de 0,043 lo que indica diferencias estadísticamente significativa (cuadro 6) (Figura 31 y 32).



**FIGURA 31. CONROL.** Microfotografía técnica DAPI para tinción nuclear 63X.



**FIGURA 32. PROBLEMA.** Microfotografía técnica DAPI para tinción nuclear 63X.

## Coloración con DAPI

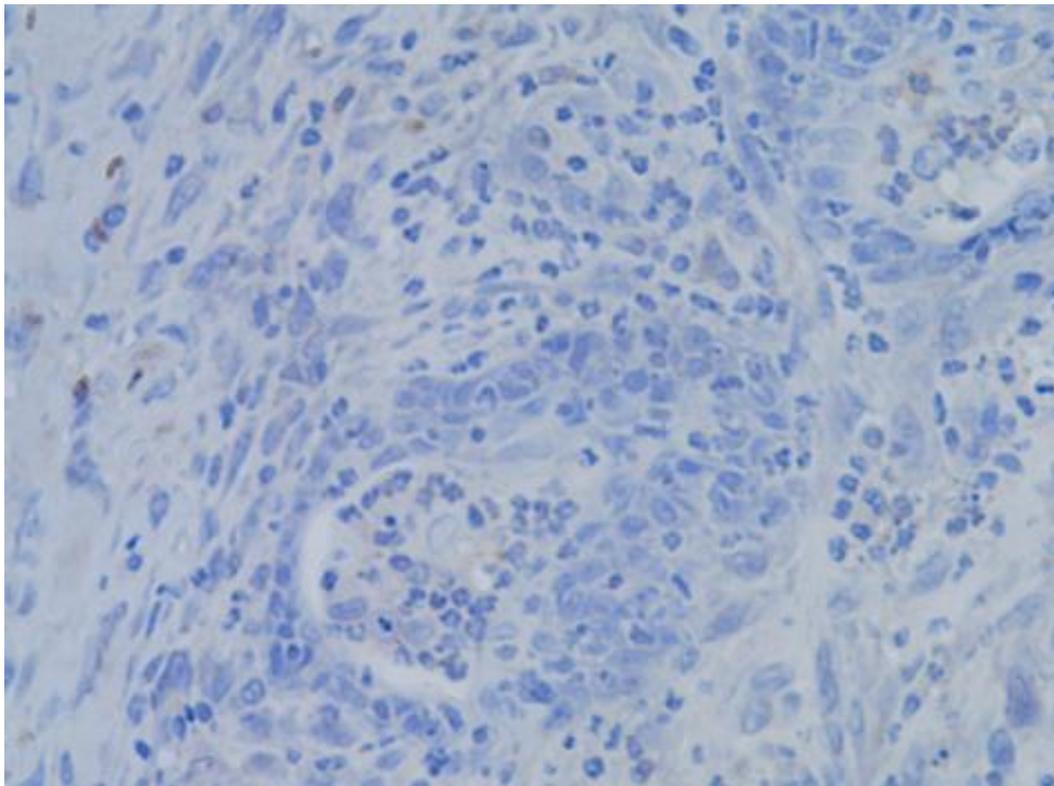
Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	Mediana(1)	Mediana(2)	p(2 colas)
DAPI	control	laser	20	20	0,0005	0,0008	0,0002	0,0005	0,0006	0,008	0,0436

**Cuadro 6. Análisis estadístico de la coloración DAPI.**

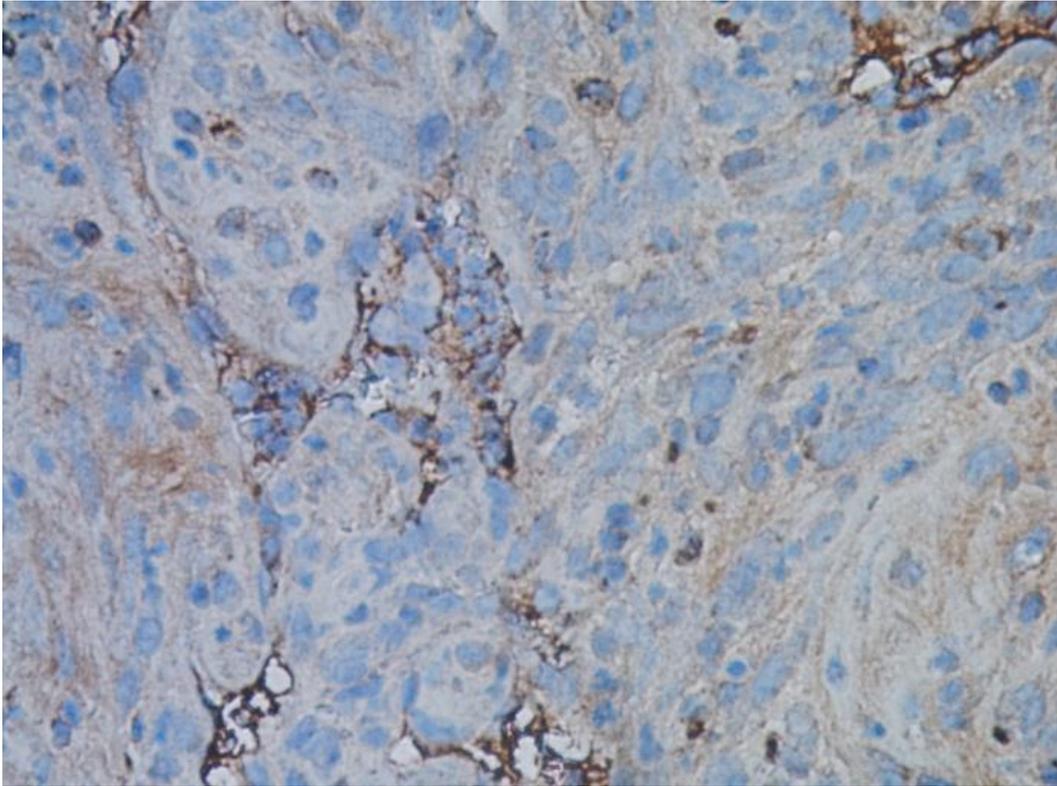
## ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

### P53

El resultado del estudio inmuno histoquímico del biomarcador P53 resulto en una inmunomarcación negativa, en ambos grupos, indicándonos que por alguna razón las diferentes formas de esta proteína no se expresaba en ninguno de los dos grupos (Figura 33 y 34).



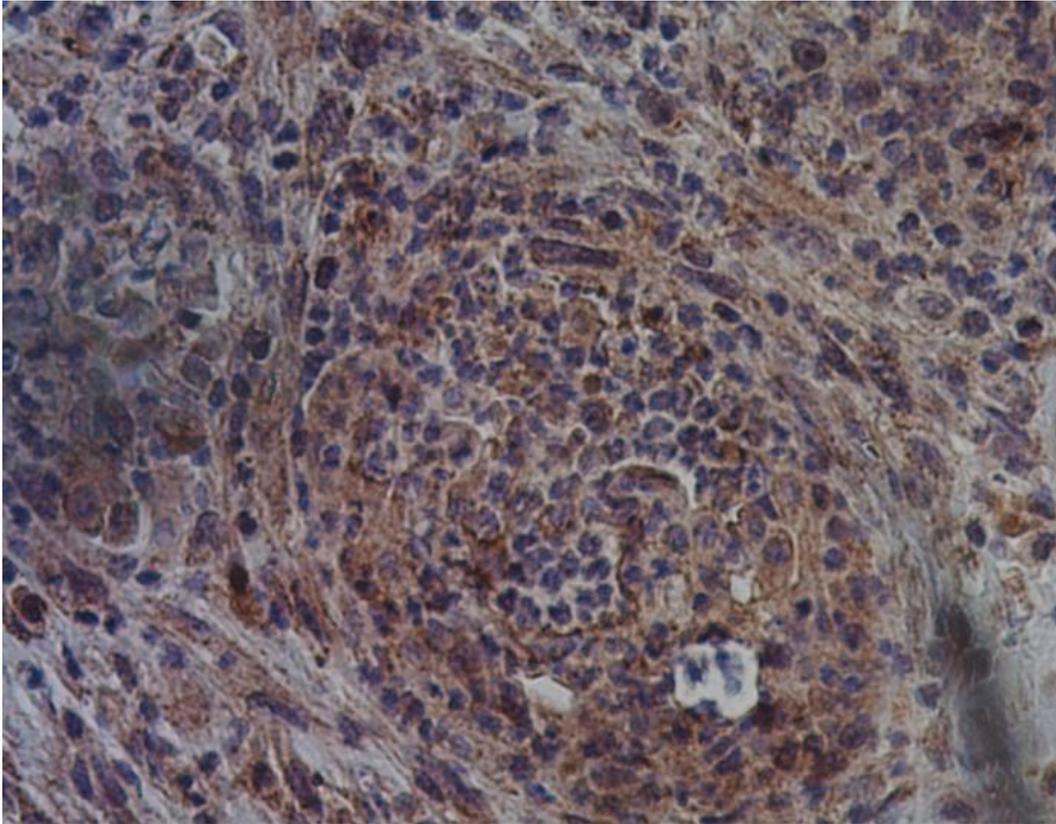
**FIGURA 33. Control. No se observan células marcadas. Negativo.**



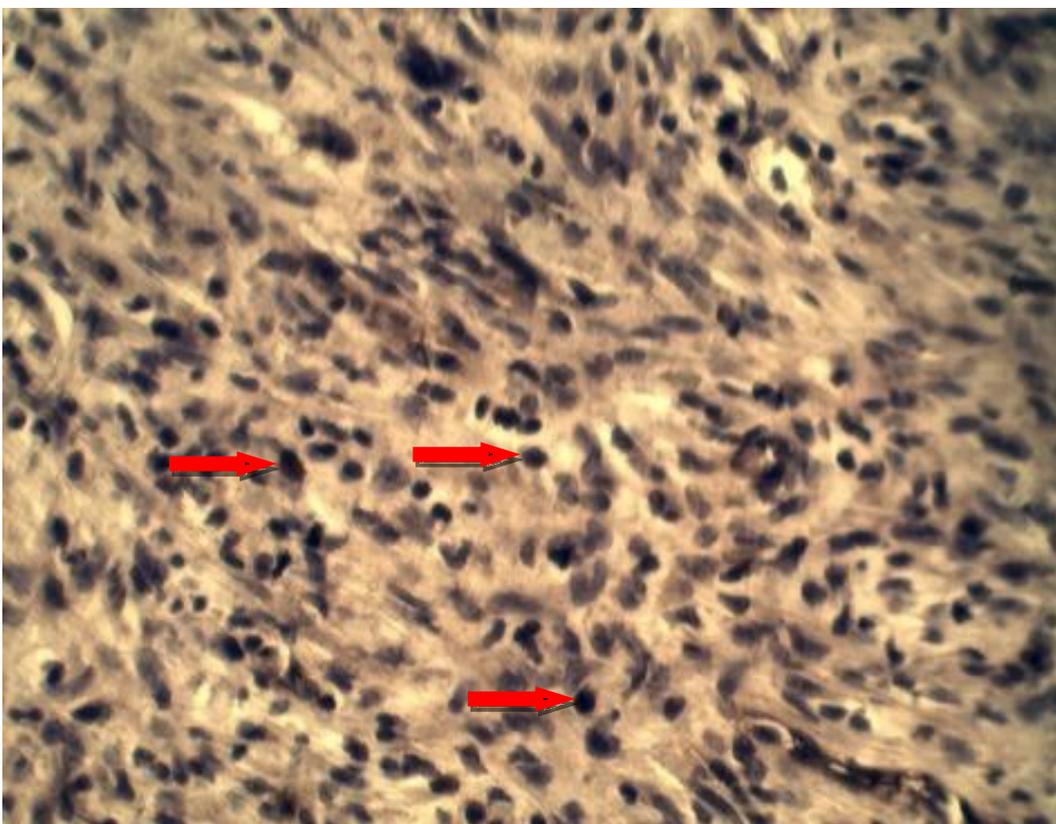
**FIGURA 34. Problema. No se observan células marcadas. Negativo.**

### **Bcl2**

El estudio inmunohistoquímico de este biomarcador indicó que en los casos controles no se observó la expresión de este marcador (Figura 35), por el contrario la inmunomarcación fue positiva en los casos experimentales (Figura 36). El análisis estadístico de la Prueba de la mediana para dos muestras nos mostró valores de la mediana de 0,00 para el grupo control y una inmuno marcación positiva en el experimental (87) lo cual produjo una diferencia estadísticamente significativa para una  $p= 0 < \alpha 0,05$  (0,050)(Cuadro 7).



**FIGURA 35. Control. No se observan células marcadas. Negativo**



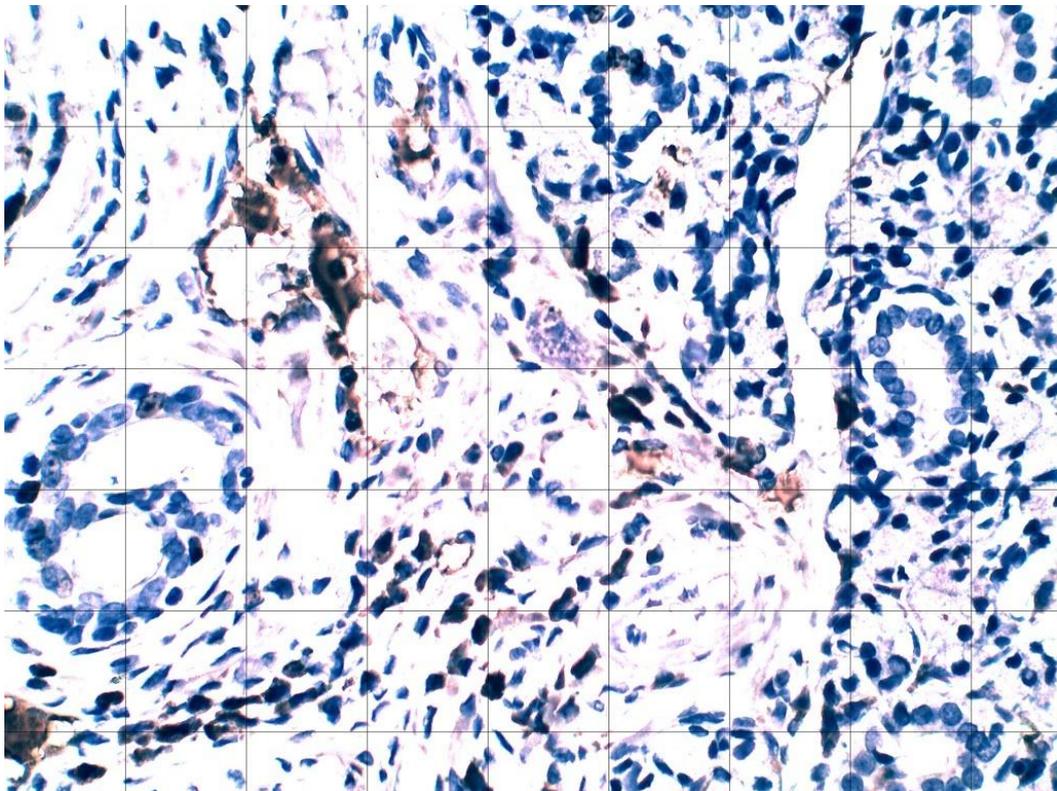
**FIGURA 36. Problema. Se observan células marcadas. Positivo**

**Prueba de la mediana para dos muestras**

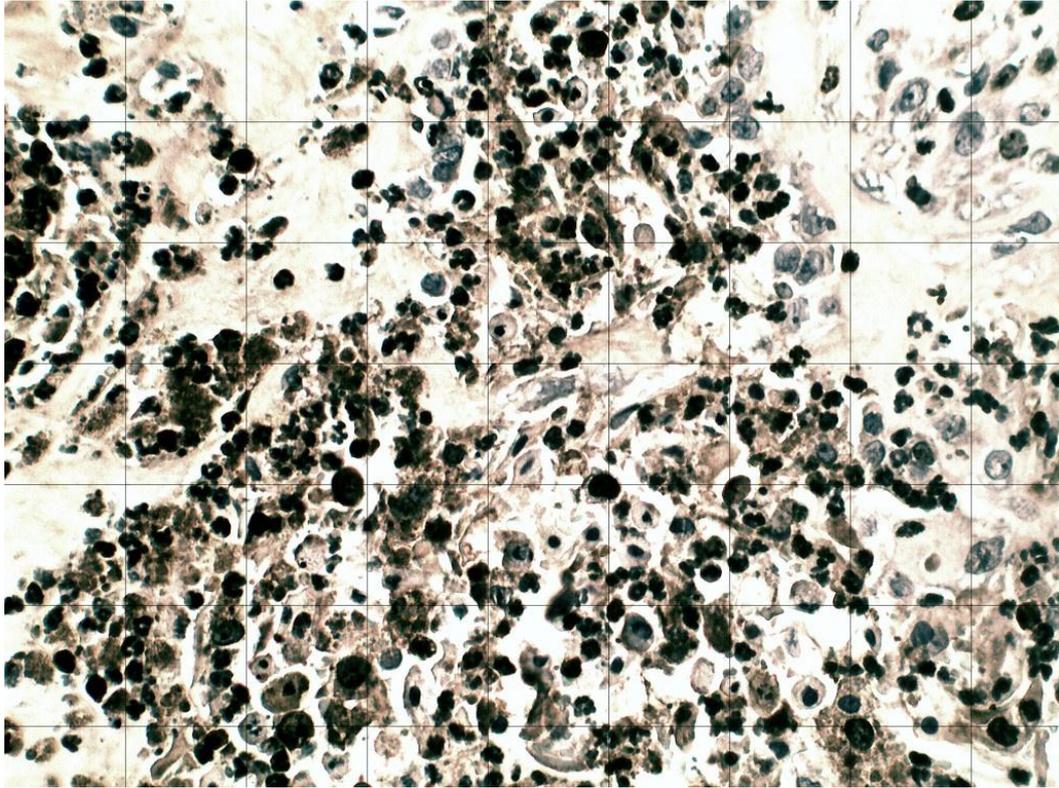
Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Mediana(1)	Mediana(2)	p(2 colas)
bcl2	control	laser	3 se replicó 10 campos por imagen	3 se replicó 10 campos por imagen	0,00	87,00	0,0500

**CUADR 7. Análisis estadístico de Prueba de la mediana para dos muestras para Bcl2.****Ki 67**

El estudio inmunohistoquímico para Ki67 mostró una inmunomarcación negativa en el grupo control mientras que en el experimental fue positiva resultando en una diferencia estadísticamente significativa para una  $p=0 < 0,05$  (0,05). (Cuadro 8) (Figura 37 y 38).



**FIGURA 37. Control. Microfotografía 40X inmunomarcación con KI 67. Intensidad de la marcación nula.**



**FIGURA 38. Problema. Microfotografía 40X inmunomarcación con KI 67 positivo. Se observa gran intensidad de marcación**

Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Mediana(1)	Mediana(2)	p(2 colas)
ki67	control	laser	3	3	0,00	106,00	0,0500

**CUADRO 8. Análisis estadístico Prueba de la mediana para dos muestras para Ki67.**

## DISCUSIÓN

Las neoplasias de glándulas salivales son una de las causantes de la destrucción glandular. Si bien son de baja frecuencia entre los tumores de cabeza y cuello (1%) son los de más alto índice de mortalidad y morbilidad (Mehanna et al 2010). Los tumores de las glándulas salivales representan un grupo heterogéneo morfológica y clínicamente de neoplasias. Estos tumores constituyen 2.5-3.0 por 100,000 incidencias por año en el mundo occidental, donde más del 80% son lesiones benignas, mientras tanto el 0.5% es maligno. Comparativamente entre las tres principales glándulas salivales, el desarrollo de tumores de glándulas submandibulares tiene el peor pronóstico.

Según algunas investigaciones, DMBA indujo diferentes tipos de tumores con alteraciones tempranas de fenotipos en la oncogénesis en glándulas submandibulares de ratas. En este trabajo observamos que los carcinomas que se desarrollaban por efecto del DMBA estaban siempre asociados a células mioepiteliales. Al igual que lo informado por otros autores (Ogawa et al, 2003; Mantesso et al, 2003; Massimo et al, 2014). Estos hallazgos se corroboraron con estudios histopatológicos e inmunomarcaciones con vimentina y citoqueratinas.

Estas respuestas diferentes parecen estar relacionadas con la forma en que cada tipo de tejido responde a los agentes cancerígenos, así como a la multicausalidad de la formación de tumores (Brunotto et al, 2006). Yuzo Ogaway col. (2000) sugieren que son necesarias al menos dos mutaciones genéticas para la inducción de carcinomas de células mioepiteliales (MEC) en glándula submandibular de rata.

En el grupo experimental observamos un aspecto similar al control pero las células predominantes fueron las ahusadas, y las epiteloideas que presentaban cariólisis, estallido nuclear y presencia de cuerpos apoptóticos; también observamos vasos congestivos y zonas de necrosis. Los hallazgos histopatológicos en este trabajo confirman los resultados de Carcinoma MEC de glándula submaxilar. Estos resultados coinciden con los de Bascones Encinas y col. (2014) que mostraron una proliferación neoplásica de límites infiltrantes, que crece formando nidos y cordones, constituida por células de citoplasmas amplios y morfología plasmocitoide y epiteloide. Los núcleos son atípicos con moderado pleomorfismo y nucléolo prominente. Las células se disponen en el seno de un estroma hialinizado. Sin embargo no observa apoptosis, zonas de necrosis por coagulación ni vasos congestivos, como en este trabajo, posiblemente porque no se utilizaron RLBP, infiriendo entonces que ellas son la causa de estas características histopatológicas.

Bascones Encinas (2014) propone en cuanto al tratamiento, la cirugía con amplios márgenes de seguridad como el más efectivo en el manejo de los carcinomas mioepiteliales (Bascones Encinas et al, 2014). Bell R.B. y col. (2005) y Yang S. y col. (2010) afirman que en general el tratamiento de tumores de glándulas salivales es quirúrgico debiendo realizarse la recesión de alguna de ellas. La radioterapia constituye una importante alternativa terapéutica en circunstancias en que los márgenes quirúrgicos son positivos, cuando el grado de malignidad es elevado, cuando hay compromiso de algún nervio o se detectan ganglios positivos y también cuando puede producirse siembra del tumor durante la cirugía por ruptura de la cápsula. Pero ambos tratamientos producen efectos indeseados asociados (xerostomía, estomatitis, etc.) (Bell et al, 2005; Yang et al, 2010). En nuestra experiencia la utilización de RLBP tuvieron efectos que sugieren que estas radiaciones frenaron el crecimiento desenfrenado de las células tumorales y estimularon la muerte celular programada. Esto es coincidente con los trabajos de Plavnik y col. (2003) estudiando el efecto bioestimulante de las radiaciones LASER de baja potencia de He-Ne sobre glándulas salivales normales de cobayos en los que observaron que, se indujo a procesos apoptóticos del epitelio secretor (Loevvschall & Arenhotd Bindslev, 1994). Estos resultados también coinciden con los de Volker Hans Schartinger y col. (2012) que establecieron en estudios in vitro que las RLBP con diodos producían una disminución de la proliferación tanto en líneas de células epiteliales no-neoplásica como en neoplásicas bronquiales. Se verificó además un efecto proapoptótico significativo sólo en células de carcinomas (Schartinger et al, 2012). Fang Wang y col. (2005) confirmaron estos datos midiendo la dinámica de actividad de Caspasa 3 en células vivas y durante la apoptosis inducida por las RLBP.

Sin embargo algunos autores sugieren que independientemente de la densidad de energía aportada, las RLBP producirían un estimulación de las células (Barbosa Pinheiro et al, 2002). Los resultados controvertidos se deben específicamente a que los efectos de la terapia con láser de baja intensidad en la proliferación celular están influenciados por el tiempo de exposición que determina en parte la densidad de energía depositada, así como por el tipo de tejido y su capacidad de absorción. La estimulación o inhibición de las funciones fotorreceptoras, que forman parte de la cadena de respiración celular, determina la magnitud de la proliferación celular. Es por ello que cobra importancia en el análisis del efecto de las RLBP sobre el cáncer el modelo en el cual se evalúe su efecto ya sea In Vivo o In Vitro. La mayoría de los estudios sobre la acción del RLBP sobre células tumorales que indican aumento de la proliferación celular se realizan sobre cultivos celulares (Schartinger et al, 2012). Sin

embargo Plavnik y col. (2011) en un estudio preliminar sobre el efecto de RLBP sobre tumores inducidos con un carcinógeno químico el DMBA en glándulas submandibulares de rata, observaron, que estas radiaciones producían inhibición del crecimiento de células tumorales. Estos datos evidencian que los resultados in vitro de los efectos de las RLBP sobre líneas celulares aisladas, no pueden ser extrapolados en forma directa ya que dejan de lado los procesos biológicos complejos involucrados en el desarrollo del cáncer, por lo que refuerza la necesidad del desarrollo en modelos experimentales in vivo.

Existe controversia en cuanto a si los estudios morfológicos con microscopía óptica de luz sobre apoptosis son suficientes para un diagnóstico certero. Algunos autores piensan que el estudio con microscopía electrónica de transmisión (gold standard) y además los análisis bioquímicos y de biomarcadores son los más confiables. Otros consideran que aunque los cambios bioquímicos explican en parte algunos de los cambios morfológicos en la apoptosis, es importante tener en cuenta que los análisis de la fragmentación del ADN o la activación de caspasas no deben usarse para definir exclusivamente la apoptosis, ya que ésta puede ocurrir sin fragmentación del ADN oligonucleosómico y puede ser caspasa independiente (Galluzzi et al, 2018). Si bien muchos ensayos y experimentos bioquímicos se han utilizado para detectar la apoptosis, el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD) ha propuesto que la clasificación de las modalidades de muerte celular dependa exclusivamente de criterios morfológicos porque no existe una equivalencia clara entre los cambios ultraestructurales y características de muerte celular bioquímica (Kroemer et al, 2005). Con la finalidad de apoyar el diagnóstico histopatológico en nuestro trabajo realizamos estudios de los cortes obtenidos para microscopía óptica con microscopio electrónico de barrido (SEM). En nuestras observaciones encontramos en los grupos controles células tumorales ahusadas con núcleos en división celular tanto a menor como a mayor aumento, mientras que en los grupos experimentales se observaron células tumorales con núcleos con condensaciones esféricas de cromatina dispuesta en forma periférica dentro de la membrana nuclear, típica de células apoptóticas y desintegración de los orgánulos especialmente el Retículo Endoplásmico Rugoso, con compactación de las vesículas. Existen en la bibliografía consultada escasas referencias sobre el uso de este tipo de microscopía en cortes tisulares, en este sentido nuestro estudio aporta sólidos datos que respaldan el estudio histopatológico con microscopía óptica.

Otra forma para corroborar y evitar la incapacidad para cuantificar las células vivas, necróticas y apoptóticas, al mismo tiempo, y la detección no específica es decir, falsos positivos, fue utilizar una técnica ampliamente difundida para el estudio de núcleos de células apoptóticas con tinción de DAPI (Cummings et al, 2004; Dehua et al, 2014; Afsar et al, 2016). Esta es una tinción fluorescente que se une fuertemente a las regiones ricas en A-T en el ADN. DAPI pasa ineficientemente a través de una membrana celular intacta y, por lo tanto, es óptima en la tinción de las células muertas de forma preferencial (Wallberg et al, 2016). Este estudio permitió observar un aumento de núcleos teñidos con esta coloración en los grupos experimentales en relación a los grupos controles.

Las observaciones de ciertas entidades tumorales informaron de diversas características histomorfológicas pero también numerosos tipos, variantes y patrones histológicos similares con otros crecimientos tumorales, pueden estos representar un reto diagnóstico considerable. En general, el diagnóstico se realiza según la clasificación de la OMS. Aunque esta clasificación es compleja, tiene ventajas con respecto a los aspectos pronósticos y procedimientos terapéuticos, debido a que el comportamiento biológico de cada tipo de tumor es diferente (Barnes et al, 2005; Al-Rawi et al, 2010; Fonseca et al, 2012).

Aunque la tinción con hematoxilina-eosina (H/E) sigue siendo el método estándar utilizado para el diagnóstico de tumores de las glándulas salivales, la Inmunohistoquímica (IMQ) puede mejorar la precisión de tal análisis, aunque su función puede ser limitada. Esta técnica puede ser una herramienta útil para investigar características como la naturaleza y el estado de diferenciación celular, proliferación celular, y expresión de proteínas del tumor, para facilitar un diagnóstico diferencial o efectuar un pronóstico (Vera-Sempere & Vera-Sirera, 2011; Seethala, 2011). También nos permite establecer junto con el grado de proliferación celular, cuando un tratamiento detiene, inhibe o disminuye el proceso de crecimiento desenfrenado.

Para corroborar el efecto apoptótico de las RLBP sobre las células tumorales en este trabajo, estudiamos la expresión de p53 y Bcl2 para observar o no la disrupción del balance apoptótico-antiapoptótico de estas proteínas.

La expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 es un factor controvertido en cuanto a su posible influencia pronóstica y para la confirmación diagnóstica. El p53 es un gen «supresor» con la peculiaridad de que algunas mutaciones actúan de manera dominante produciendo la formación de tetrámeros inactivos. La proteína normal se expresa en pequeñas cantidades, suficientes para el control de ciclo celular, por lo

que, en condiciones normales, esta proteína no es observable mediante técnicas inmunohistoquímicas (Li et al, 2017; Mai et al, 2017).

En recientes trabajos, la proteína codificada por el gen supresor p53 ha sido relacionada con los tumores de cabeza y cuello. Diversos autores apoyan la existencia de mutaciones de pérdida de función (por tanto, recesivas) en dicho gen que provocan la inactivación de la proteína. Esto podría deberse a que dicha inactivación afecta al proceso de feed-back negativo de control de la expresión de esta proteína que, de esta forma, se sobreexpresa y acumula en el núcleo convirtiéndose así en una proteína que no es normalmente detectable en la célula mediante técnicas inmunohistoquímicas (Dent, 2013). Este resultado es coincidente con lo que encontramos en nuestro estudio en el que tanto en los casos controles como en los experimentales no hubo inmunomarcación para P53.

La proteína Bcl-2 no siempre demuestra poseer actividad para promover el ciclo celular o proliferación. Por el contrario la sobreexpresión de este gen prevenía significativamente la inducción de apoptosis en respuesta a diferentes estímulos (Muller & Vousden, 2014). En coincidencia nuestros resultados sobre Bcl2 indican una marcada respuesta en los casos problemas con diferencias significativas en relación a los controles ( $p > 0.05$ ), lo que nos permite inferir acerca de una estimulación por RLBP a la expresión de la familia de Bcl2 proapoptótica que permeabilizan la membrana mitocondrial, liberándose citocromos y activando a caspasas de tipo 3. La transfección de tumores con genes que inhiben a la proteína Bcl-2 facilita la inducción de la muerte programada lo que sugiere que algunos tumores controlan la actividad de Bcl-2 (Ashkenazi, 2015). Nosotros no observamos en nuestro estudio esta característica inhibitoria de actividad de Bcl2 por parte de MEC. Una expresión elevada de Bcl-2 se halla asociada a un mal pronóstico en distintos tipos de cáncer (colon, próstata y neuroblastoma maligno). Nuestros hallazgos en MEC irradiados con RLBP son discrepantes ya que observamos un aumento de Bcl2 en MEC que presentaban aumentadas figuras apoptóticas en las células cancerosas lo que nos está hablando de un intento de freno a la proliferación descontrolada.

Una significativa correlación inversa se ha demostrado en la interacción entre estas dos proteínas. Brunotto y col. (2005) postulan que mutaciones silenciosas observadas de p53 podrían originar una forma "inactiva" de p53. Esta proteína "inactiva", mediante alteraciones génicas de la Bcl-2 induciría la pérdida de la sensibilidad de la Bcl-2 a la regulación ejercida (represión) por p53. Finalmente este hecho resulta en el desequilibrio del balance p53/Bcl-2 desencadenando la pérdida del control del

crecimiento celular. En nuestros resultados no podemos determinar un desequilibrio entre ambas proteínas ni si esa forma “inactiva” produjo alteraciones génicas en Bcl-2 ya que nosotros observamos aumento estadísticamente significativo de Bcl-2 entre el grupo control y el experimental pero acompañado de un aumento de células apoptótica, lo que reafirmaría en cierto sentido que la familia de Bcl-2 activada por el tumor sería la 2.

Existe un grado de controversia con respecto a la influencia pronóstica de Ki 67 aunque es un marcador inmunohistoquímico de proliferación celular. En este trabajo observamos niveles significativamente altos de Ki 67 en el grupo experimental en relación con el control, el cual coincide con otros estudios que han reconocido su valor como factor predictivo (Menezes HL et al, 2010; Vacchi-Suzzi M et al, 2010), demostrando su utilidad para medir la respuesta a un determinado tratamiento adyuvante. Estos trabajos observaron que aquellos tumores que marcaban altos niveles de Ki 67 post presentaban una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia. Nosotros observamos una respuesta similar con respecto a la utilización de RLBP.

También es importante destacar que los niveles elevados de Ki 67 en nuestro trabajo podría deberse a las RLBP provocan vasodilatación y congestión vascular. Esto se debe a su afinidad por la sangre por las longitudes de onda correspondiente al color rojo provocando los fenómenos expresados anteriormente. En este contexto podemos decir que la vasodilatación, produce la expresión en las membranas plasmáticas endoteliales de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y de Moléculas de Adhesión Intercelular 1 (ICAM1) las cuales tienen una afinidad por este biomarcador y por ende una correlación positiva con la expresión aumentada de Ki67.

## CONCLUSIONES

Considerando los resultados encontrados en este estudio se propone que:

1. En todos los casos estudiados la inducción de tumores con DMBA en glándulas submandibulares de rata condujeron al desarrollo de tumores malignos epiteliales-células mioepiteliales.
2. Las RLBP produjeron sobre las células tumorales modificaciones histopatológicas e histomorfométricas que indicaron un freno al ciclo celular de las células tumorales.
3. Los estudios con microscopía electrónica de barrido corroboraron nivel nuclear de las células tumorales la presencia de acúmulos cromatínicos esferoidales

- dispuestos periféricamente en el núcleo y a nivel citoplasmático la desorganización de REr con pérdida de ribosomas, características típicas de células apoptóticas.
4. La coloración con DAPI indicó un aumento significativo en los núcleos de células tumorales de los GE en relación a los GC asociado con las modificaciones apoptóticas a ese nivel observadas en los GE.
  5. En todos los casos estudiados la inmunomarcación con P53 dió negativa tanto en los grupos controles como en los experimentales probablemente porque las mutaciones genéticas carcinogénicas las p53 mutadas no se marcan inmunohistoquímicamente.
  6. La inmunomarcación con Bcl2 se producirían por el efecto de las RLBP sobre las mitocondrias permeabilizan sus membranas induciendo la liberación de citocromos c que aumentan la expresión génica de la familia de Bcl2 de efecto proapoptótico.
  7. La inmunomarcación Ki 67 manifiesta diferencias significativas entre los grupos de GE y los del GC que asociado a los otros resultados más que indicar un aumento de proliferación refiere a un factor pronóstico positivo por el uso de RLBP.
  8. Los hallazgos presentados nos permiten postular que el efecto de las RLBP sobre tumores de glándulas submandibulares de ratas, inducidos con DMBA, es el de modificar el ciclo celular de la célula tumoral aumentando el proceso apoptotico en ellas.

Estudios más complejos creemos que son necesarios para corroborar el efecto proapoptótico de las RLBP. Sin embargo este trabajo indica y en cierta manera propone de manera clara que este tipo de radiaciones deberían ensayarse con mayor profundidad en el tratamiento de tumores malignos de glándulas salivales.

**BIBLIOGRAFIA**

- Actis AB. **A hypothesis to relate salivary tumors with mammary and prostate neoplasias.**(2005). *Bioinformation*;1(1):12-13.
- Afsar T; Trembley JH; Salomon CE; Razak S; Khan MR; Ahmed K. **Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of *Acacia hydaspica*: Involvement of multiple signal transduction pathways.** (2016). *Sci Rep.* Mar 15;6:23077.
- Al-Rawi NH; Omer H; Al Kawas S. **Immunohistochemical analysis of P(53) and bcl-2 in benign and malignant salivary glands tumors.**(2010). *J Oral Pathol Med.* Jan;39(1):48-55.
- Americo MG; Marques YM; El Abras Ankha MD; do Prado RF; Carvalho YR. **Correlation of intratumoral lymphatic microvessel density; vascular endothelial growth factor C and cell proliferation in salivary gland tumors.** (2016). *Medical Molecular Morphology*, 50(1):17-24].
- Ashkenazi A. **Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions.**(2015). *J Clin Invest.*125(2):487-489.
- Barbosa Pinheiro Antonio Luiz; Carneiro do Nascimento Silene; de Barros Vieira Alessandro Leonardo; Barros Rolim Aluizio; Soriano da Silva Pedro; Pinheiro Aldo Brugnera Jr., **Does LLLT Stimulate Laryngeal Carcinoma Cells? An In Vitro Study.** (2002). *Braz Dent J* 13(2): 109-112.
- Barnes L; Everso JW; Reichart P; Sidrasnky D (Eds): **World Health Organization classification of tumours.**(2005). *Pathology and genetics of head and neck tumours.*IARC Press: Lyon. pp 209-281.
- Bascones Encinas Alejandro; Escribano Adam Natalia; delaSena Oscar; Falahata Falahat; Martín-Granizoa Rafael; Berguer Alberto. **Carcinoma mioepitelial de glándula submaxilar.Caso clínico y revisión de la literatura.**(2014). *Rev Esp Cir Oral Maxilo fac.* MAXILO-208; pp 1-6.
- Bell Bryan; Dierks Eric; Homer Louis; Potter Bryce.**Management and Outcome of Patients With Malignant Salivary Gland Tumors.**(2005). *J Oral Maxillofac Surg* 63:917-928. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.
- Benn A; Thomson W. **Saliva: An Overview.** (2014). *N Z Dent J.* Sep;110(3):92-6.

- Bethesda MD. **Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitios and conceptual framework.**(2001). Clin Pharmacol Ther. Mar;69(3):89-95.
- Brunotto M; Malberti A; Zárate AM; Barra JL; Calderón O; Piñas E; Plavnik L; Crosa M **Early phenotypic and genotypic alterations in submandibular gland oncogenesis in rats.**(2006). Acta Odontol Latinoam. 19(1):13-21.
- Brunotto M; Zárate AM; Cismondi A; Fernández Mdel C; Noher de Halac RI. **Valuation of exfoliative cytology as prediction factor in oral mucosa lesions.**(2005). Med Oral Patol Oral Cir Bucal. Jul 1;10 Suppl 2:E92-102.
- Carlinfante G; Lazzaretti M; Ferrari S; Bianchi B; Crafa P. **p53, bcl-2 and Ki-67 expression in adenoid cystic carcinoma of the palate.A clinico-pathologic study of 21 cases with long-term follow-up.**(2005). Pathol Res Pract.200(11-12):791-9.
- Cummings Brian S; Wills Lauren P; Schnellmann Rick G. **Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. Curr Protoc Pharmacol.**(2004). Sep 1; 0 12: 10.1002/0471141755.ph1208s25.
- Danial NN; Korsmeyer SJ. **Cell Death: Critical Control Points.**(2004). Cell. Jan 23;116(2):205-19.
- Dehua Wei; Qinghua Wu; Huirong Shi. **Apoptosis and p53 expression in the placental villi of females with unexplained recurrent spontaneous abortion.**(2014). Exp Ther Med. Jan; 7(1): 191-194.
- Dent P. **Non-canonical p53 signaling to promote invasion.** (2013). Cancer Biol Ther. Oct 1; 14(10): 879-880.
- DeVita Vincent T.; Hellman; Rosenberg's Steven A. **Cancer Principles and Practice of Oncology 10Edition** (2015).Part I Principles of Oncology Hallmarks of Cancer: An Organizing Principle for Cancer Medicine.pp 24-43.
- Dodds Michael W.J; Johnson Dorthea A; Yeh Chih-Ko. **Health benefits of saliva: a review.** (2005). Journal of Dentistry Volume 33, Issue 3, March, Pages 223-233.
- Dolka Izabella; Król Magdalena; Sapierynski Rafan. **Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in**

- canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study.**(2016). Research in Veterinary Science 105.
- Elmore Susan. **Apoptosis: a review of programmed cell death.**(2007). Toxicol Pathol. Jun;35(4):495-516.
- Escovich L y Novelli JL. **Tumores de las glándulas salivales. Glándulas salivales. Patología, diagnóstico y tratamiento (1ª edic.).**(2002). Ed. UNR. Rosario,. 269.
- Espinosa Maria Beatriz. **Apoptosis, muerte celular fisiológica, reseña histórica y actualidad.**(2014). Asociación de Docentes en Ciencias Biológicas de la Argentina; Revista de Educación en Biología; 17; 1; 9-2014; 153-159.
- Fonseca FP; Carvalho Mde V; de Almeida OP; Rangel AL; Takizawa MC; Bueno AG; Vargas PA. **Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population.**(2012). Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. Aug;114(2):230-9.
- Franchi A; Gallo O; Bocciolini C; Franchi L; Paglierani M; Santucci M. **Reduced E-cadherin expression correlates with unfavorable prognosis in adenoid cystic carcinoma of salivary glands of the oral cavity.** (1999). Am J Clin Pathol. Jan;111(1):43-50.
- Galluzzi L et al. **Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.**(2018). Cell Death & Differentiation. Mar;25(3):486-541.
- Galluzzi Lorenzo; Kepp Oliver; Ka-Ming Chan Francis; Kroemer Guido.**Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease.**(2017). Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease Vol. 12:103-130.
- Gasco; M; Crook T. **The p53 network in head and neck cancer.**(2003). Oral Oncology 39 222-231. Oral Oncol. Apr;39(3):222-31.
- Ghobrial IM; Witzig TE; Adjei AA.**Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy.**(2005). CA Cancer J Clin. May-Jun;55(3):178-94.
- Goldar S; Khaniani MS; Derakhshan SM; Baradaran B. **Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment.**(2015). Asian Pac J Cancer Prev. 16(6):2129-44.

- Goyal Gaurav; Mehdi Syed A.; Ganti Apar Kishor. **Salivary Gland Cancers: Biology and Systemic Therapy.**(2015). Oncology Journal, Head & Neck Cancer Oct 15,.Volume: 29 Issue: 10.
- Gruvberger-Saal SK; Cunliffe HE; Carr KM; Hedenfalk IA. **Microarrays in breast cancer research and clinical practice--the future lies ahead.**(2006). Endocr Relat Cancer. Dec;13(4):1017-31.
- Haddad Robert I; Shin Dong M. **Recent Advances in Head and Neck Cancer.**(2008). N Engl J Med; 359:1143-54. Massachusetts Medical Society.
- Hanahan Douglas; Weinberg Robert A. **Biological hallmarks of cáncer.**(2017). Holland-Frei Cancer Medicine, Ninth Edition. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-1-118-93469-2.
- Hanahan Douglas; Weinberg Robert A. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.**(2011). Cell Mar 4;144(5):646-74.
- Handra-Luca A; Lamas G; Bertrand JC; Fouret P. **MUC1; MUC2; MUC4 and MUC5 AC expression in salivary gland mucoepidermoid carcinoma: diagnostic and prognostic implications.**(2005). Am J Surg Pathol. Jul;29(7):881-9.
- Hata Minoru; Amano Ikuko; Tsuruga Eichi; Kojima Hiroshi; Sawa Yoshihiko. **Immunoelectron Microscopic Study of Podoplanin Localization in Mouse Salivary Gland Myoepithelium.**(2010). Acta Histochem Cytochem. May 1; 43(2): 77-82.
- Hengartner MO. **Apoptosis: Corraling the Corpses.**(2001) Cell. Feb 9;104(3):325-8.
- Hernández Díaz Adel; Orellana Molina Alina. **Dosimetria en Laseres de Baja Potencia.** 2012. Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN) XV, 194 p.
- Hu WP; Wang JJ; Yu CL; Lan CC; Chen GS; Yu HS. **Helium-Neon Laser Irradiation Stimulates Cell Proliferation through Photostimulatory Effects in Mitochondria.**(2007). J Invest Dermatol. Aug;127(8):2048-57. Epub 2007 Apr 19.
- Humphrey Sue; Williamson Russell. **A review of saliva: Normal composition, flow, and function.** (2001). J Prosthet Dent. Feb;85(2):162-9.

- lanez RF; Buim ME; Coutinho-Camillo CM; Schultz R; Soares FA; Lourenço SV. **Human salivary gland morphogenesis: myoepithelial cell maturation assessed by immunohistochemical markers.**(2010). *Histopathology*. Sep;57(3):410-7.
- Impola U; Uitto VJ; Hietanen J; Hakkinen L; Zhang L; Larjava H; Isaka K; Saarialho-Kere U. **Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7); 92 kD gelatinase (MMP-9); and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer.** (2004). *J Pathol*. Jan;202(1):14-22.
- Jensen S; Pedersen A; Reibel J; Nauntofte B. **Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy.**(2003). *Support Care Cancer*. Apr;11(4):207-25. Epub 2002 Nov 23.
- Jia L; Esguerra RL; Tang X; Yin H; Sakamoto K; Okada N; Takagi M. **Prognostic value of apoptosis and apoptosis-associated proteins in salivary gland adenoid cystic carcinoma.**(2004) *Pathol Int*. Apr;54(4):217-23.
- Junco J; Montaña Loza A; Aguayo Gonzalez A. **Bases moleculares del cancer.**(2006). *Revista de Investigacion clínica* Vol 58 Num 1 PP 56 70.
- Kerr R; Wyllie A; Currie A.R. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics.**(1972). *Br J Cancer*. Aug;26(4):239-57.
- Kroemer G; El-Deiry W S; Golstein P; Peter M E; Vaux D, Vandenabeele P; Zhivotovsky B; Blagosklonny M V; Malorni W; Knight R A; Piacentini M; Nagata S; Melino G .**Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.**(2005). *Cell Death and Differentiation* volume 12, pages 1463-1467.
- Kroemer G; Galluzzi L; Brenner C. **Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death.**(2007). *Physiol Rev*. Jan;87(1):99-163.
- Kumar Vinay; Abbas Abul; Aster Jon.**Robbins basic pathology, tenth edition.**(2018). Ed.Elsevier. Philadelphia Pennsylvania.Cap 2 pp. 31-56.
- LaCasse EC; Mahoney DJ; Cheung HH; Plenchette S; Baird S; Korneluk RG. **IAP-targeted therapies for cancer.** *Oncogene*.(2008). Oct 20;27(48):6252-75.

- Larsen SR; Bjørndal K; Godballe C; Kroghdal A., **Prognostic significance of Ki-67 in salivary gland carcinomas.**(2012). J Oral Pathol Med. Sep;41(8):598-602.
- Lavrik Inna N; Golks Alexander; Krammer Peter H. **Caspases: pharmacological manipulation of cell death.** (2005). J Clin Invest. Oct 1; 115(10): 2665-2672.
- Li Q; Huang P; Zheng C; Wang J; Ge M. **Prognostic significance of p53 immunohistochemical expression in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a meta-analysis.**(2017). Oncotarget. Apr 25;8(17):29458-29473.
- Lizarbe Irachetam M<sup>a</sup> Antonia. **El suicidio y la muerte celular.** (2007). Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp) Vol. 101, N<sup>o</sup>. 2, pp.
- Loevvschall H; Arenhotd Bindslev D. **Effects of low level diodo laser irradiation on human oral mucosal fibroblast in vitro.**(1994). Lasers Surg Med.;14(4):347-54.
- Logemann, Jeri A. ; Smith, Christina H. ; Pauloski, Barbara Roa ; Rademaker, Alfred W. ; Lazarus, Cathy L. ; Colangelo, Laura A. ; Mittal, Bharat ; MacCracken, Ellen ; Gaziano, Joy ; Stachowiak, Linda ; Newman, Lisa A. **Effects of xerostomia on perception and performance of swallow function.**(2001). Head and Neck.Vol. 23, No. 4. pp. 317-321.
- Mai WX; Gosa L; Daniels VW; Ta L; Tsang JE; Higgins B; Gilmore WB; Bayley NA; Harati MD; Lee JT; Yong WH; Kornblum HI; Bensinger SJ; Mischel PS; Rao PN; Clark PM; Cloughesy TF; Letai A; Nathanson DA. **Cytoplasmic p53 couples oncogene-driven glucose metabolism to apoptosis and is a therapeutic target in glioblastoma.** (2017). Nat Med. Nov;23(11):1342-1351.
- Malberti A; Plavnik LM; Brunotto M; Crosa M. **Effect o Different Low Power Laser Radiations Densities on Guinea Pig Submandibulary Gland.**(2003). Journal of Dental Research December Vol 82. Special Issue C.
- Mantesso A; Loducca S V L; Jaeger RG; Décio S P J; Araújo V C. **Analysis of epithelial-myoeptithelial carcinoma based on the establishment of a novel cell line.**(2003). Oral Oncology. 01 Jul, 39(5):453-458.
- Massimo Politi; Massimo Robiony; Avellini, Claudio; Orsaria Maria.**Epithelial-myoeptithelial carcinoma of the parotid gland Clinicopathological aspect,**

- diagnosis and surgical consideration.**(2014). *Ann Maxillofac Surg.* Jan-Jun; 4(1): 99-102.
- McShane, LM;. Hayes DF. **Publication of Tumor Marker Research Results: The Necessity for Complete and Transparent Reporting.**(2012). *J Clin Oncol.* Dec 1;30(34):4223-32.
- Mehanna H; Paleri V; West C; Nutting C. **Epidemiology, presentation, and prevention.**(2010). *BMJ.* Sep 20;341:c4684.
- Menezes HL; Jucá MJ; Gomes EG; Nunes BL; Costa HO; Matos D. **Analysis of the immunohistochemical expressions of p53; bcl-2 and ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors.**(2010). *Arq Gastroenterol.* Apr-Jun;47(2):141-7.
- Muller PA; Vousden KH. **Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities.** (2014). *Cancer Cell.* Mar 17;25(3):304-17.
- Nagao T; Gaffey TA; Olsen KD; Serizawa H; Lewis JE. **Small cell carcinoma of the major salivary glands: clinicopathologic study with emphasis on cytokeratin 20 immunoreactivity and clinical outcome.**(2004). *Am J Surg Pathol*Jun;28(6):762-70.
- Nagao T; Sato E; Inoue R; Oshiro H; H Takahashi R; Nagai T; Yoshida M; Suzuki F; Obikane H; Yamashina M; Matsubayashi J. **Immunohistochemical Analysis of Salivary Gland Tumors: Application for Surgical Pathology Practice.**(2012). *Acta Histochem Cytochem.* Oct 31;45(5):269-82.
- Nagler RM; Kerner H; Ben-Eliezer S; Minkov I; Ben-Itzhak O. **Prognostic Role of Apoptotic, Bcl-2, c-erbB-2 and p53 Tumor Markers in Salivary Gland Malignancies.**(2003). *Oncology.* 64:389-398.
- Naval J; Marzo I; Anel A. **Mecanismos celulares de muerte celular programada.** (2004). *Haematologica* (ed. esp.), volumen 89, extraordin 1, octubre.
- Nikoletopoulou V; Markaki M; Palikaras K; Tavernarakis N. **Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy.**(2013). *Biochim Biophys Acta.* Dec;1833(12):3448-3459.
- O'Brien Mauria A; Kirby Rebecca. **Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease.**(2008). *Journal of the*

- Veterinary Emergency and Critical Care Society. Volume18, Issue6, December, Pages 572-585.
- Ogawa Ikuko; Nishida Toshihiro; Miyauchi Mutsumi; Sato Sunao; Takata Takashi. **Dedifferentiated malignant myoepithelioma of the parotid gland.***Pathology*(2003).International Volume53, Issue10 October Pages 704-709.
- Ogawa Y; Wan F; Toyosawa S; Ijuhin N. **Induction of adenocarcinoma containing myoepithelial cells in rat submandibular gland by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.**(2000). *Virchows Arch. Sep*;437(3):314-24.
- Okabe M; Inagaki H; Murase T; Inoue M; Nagai N; Eimoto T. **Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland.**(2001). *Mod Pathol. Oct*;14(10):1008-14.
- Pan Y; Yuan Y; Liu G; Wei Y. **P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients.**(2017). *PLoS ONE 12*(2): e0172324.
- Pereira Lima Daniela; Garcia Diniz Diego; Saliba Moimaz Suzely Adas; Hissako Sumida Doris; Okamoto Ana Claudia. **Saliva: reflection of the body.** (2010). *International Journal of Infectious Diseases.*Volume 14, Issue 3, March, Pages e184-e188.
- Pernía Olga; Vera Olga; Ibáñez de Cáceres Inmaculada. **Biomarcadores en cáncer. Contribución de la epigenética a la medicina personalizada.**(2014). *Laboratorio Clínico*;7:73-9 Vol. 7.Núm. 2. Abril - Junio
- Plavnik LM; Crosa M; Malberti A. **Effect of low power radiation (He-Ne) upon submandibular glands.**(2003), *J Clinical Laser Med Surg*, 21: 219-225.
- Plavnik LM; Malberti A; Fontana S. **Efecto de las radiaciones laser de baja potencia (RLBP) de helio neón sobre tumores de glándulas submandibulares de ratas inducidos con DMBA.**(2011). *Cuspide Junio* N° 23 pp 21-24
- Rabinovich GA; Sotomayor CE. **Apoptosis y Enfermedad.** (1999). *Alergia e inmunología clínica*; vol. 16 p. 23 - 30 ISSN:0328-2872.
- Ramírez Agudelo María Elena; Rojas López Mauricio. **La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular.**(2010). *Iatreia*, vol. 23, núm.2, junio, pp. 166-177.

- Rosenberg R; Hoos A; Mueller J; Baier P; Stricker D; Werner M; Nekarda H; Siewert JR. **Prognostic Significance of Cytokeratin-20 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction in Lymph Nodes of Node-Negative Colorectal Cancer Patients.**(2002). J Clin Oncol. Feb 15;20(4):1049-55.
- Roy MJ; Vom A; Czabotar PE; Lessene G. **Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway.**(2014). Br J Pharmacol. Apr; 171(8): 1973-1987.
- Sanchez Catherine. **Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer.**(2013). Revista Médica Clínica Las Condes;24:553-62.
- Schartinger VH; Galvan O; Riechelmann H; Dudás J. **Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy.**(2012). Support Care Cancer. Mar;20(3):523-9.
- Seethala RR. **Histologic grading and prognostic biomarkers in salivary gland carcinomas.**(2011). Adv Anat Pathol. Jan;18(1):29-45.
- Silvestre-Donat FJ; Puente Sandoval A. **Efectos adversos del tratamiento del cáncer oral.**(2008). Av. Odontoestomatol; 24 (1): 111-121.
- Speight P; Barrett A. **Salivary gland tumours.**(2002). Oral Diseases. Volume8, Issue5 September Pages 229-240.
- Szegezdi E; Fitzgerald U; Samali A. **Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far.** (2003). Ann N Y Acad Sci. Dec;1010:186-94.
- Tadbir AA; Pardis S; Ashkavandi ZJ; Najvani AD; Ashraf MJ; Taheri A; Zadeh MA; Sardari Y. **Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors.**(2012). Asian Pac J Cancer Prev.;13(10):5155-9.
- Tian Yuejun; Ma Zhiming; Chen Zhaohui; Li Mingguo; Wu Zhiping; Hong Mei; Wang Hanzhang; Svatek Robert; Rodriguez Ronald; Wang Zhiping. **Clinicopathological and Prognostic Value of Ki-67 Expression in Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis.**(2016). PLoS One.; 11(7): e0158891.

- Vacchi Suzzi M; Alessi A; Bertarelli C; Cancellieri A; Procaccio L; Dall'Olio D; Laudadio P. **Prognostic relevance of cell proliferation in major salivary gland carcinomas.** (2005). Acta Otorhinolaryngol Ital. Jun; 25(3): 161-168.
- Vacchi-Suzzi M; Bocciolini C; Bertarelli C; Dall'Olio D. **Ki-67 proliferation rate as a prognostic marker in major salivary gland carcinomas.**(2010). Ann Otol Rhinol Laryngol Oct;119(10):677-83.
- Van Cruchten S; Van Den Broeck W.S. **Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis.**(2002). Anat Histol Embryol. Aug;31(4):214-23.
- Vaux DL; Silke JL. **Mammalian mitochondrial IAP binding proteins.**(2003). Biochem Biophys Res Commun. May 9;304(3):499-504.
- Vera-Sempere F; Vera-Sirera B. **Utilidad del anticuerpo antimitocondrial 113-1 en el diagnóstico y categorización de los tumores de glándula salival con diferenciación oncocítica.** (2011). Acta Otorrinolaringologica. Volume 62, Issue 1, Pages 1-9.
- Wallberg F; Tenev T; Meier P. **Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting.**(2016). Cold Spring Harb Protoc. Apr 1;(4):pdb.prot087387.
- Wang F; Chen TS; Xing D; Wang JJ; Wu YX. **Measuring Dynamics of Caspase-3 Activity in Living Cells Using FRET Technique During Apoptosis Induced by High Fluence Low-Power Laser Irradiation.** (2005). Lasers Surg Med. Jan;36(1):2-7.
- Yang S; Li L; Zeng M; Zhu X; Zhang J; Chen X. **Myoepithelial carcinoma of intraoral minor salivary glands: a clinicopathological study of 7 cases and review of the literature.**(2010). Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Jul;110(1):85-93.
- Zhang J; Peng B; Chen X. **Expressions of nuclear factor kappaB; inducible nitric oxide synthase; and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome.**(2005). Clin Cancer Res. Oct 15;11(20):7334-43.
- Ziegler U; Groscurth P. **Morphological features of cell death.**(2004). News Physiol Sci. Jun;19:124-8.