



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“EFECTO DE DIETAS ENRIQUECIDAS EN ÁCIDOS GRASOS
 ω -3 y ω -6 EN LA TUMORIGÉNESIS EXPERIMENTAL DE
GLÁNDULAS SUBMANDIBULARES MURINAS”**

TESISTA:

OD. MARIA EUGENIA SCHERMA

DIRECTOR:

PROF. DRA. MABEL BRUNOTTO

CÓRDOBA, 2016



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

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Odontología

**EFFECTO DE DIETAS ENRIQUECIDAS EN ÁCIDOS GRASOS ω -3 y
 ω -6 EN LA TUMORIGÉNESIS EXPERIMENTAL DE GLÁNDULAS
SUBMANDIBULARES MURINAS**

Odontóloga: MARIA EUGENIA SCHERMA

DIRECTORA: Prof. Dra. MABEL BRUNOTTO
CODIRECTORA: Prof. Dra. MARIA EUGENIA PASQUALINI

Año 2016

COMISION DE TESIS:

Dra Ana Finkelberg: Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra Raquel Gallará: Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba

Dra Nelia Geréz: Profesora Emérita. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

TRIBUNAL DE TESIS:

Dra Ana Finkelberg: Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra Nelia Geréz: Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

Dra. Silvia Friedman. Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires

LUGAR DE TRABAJO:

Departamento de Biología Bucal-Facultad de Odontología.

Instituto de Biología Celular-Facultad de Ciencias Médicas.

Universidad Nacional de Córdoba.

DEDICATORIA

A ROCÍO Y CRISTÓBAL

A MI MADRE

A LA MEMORIA DE MI PADRE

AGRADECIMIENTOS:

A Dios.

A mi amada madre por su amor incondicional, su sostén y contención todos estos años, por incentivar me con su ejemplo a superarme cada día, por su alegría, sus palabras, su aliento y fe en mí.

A mis hijos Rocío y Cristóbal por su comprensión y apoyo, por ser mis grandes motores en todo lo que emprendo.

A mis hermanos Cecilia, Carolina y Guillermo, pilares en mi vida.

A mi Directora Mabel Brunotto por su enorme aporte en mi formación en Investigación, enseñándome la mejor manera de efectuar el Método Científico. Por su extraordinaria dedicación, constante motivación a la superación de las dificultades, generosidad, bondad y calidad humana en todo.

A mi Codirectora María Eugenia Pascualini por su inmenso aporte en mi formación en Investigación Aplicada, por tantas enseñanzas en diferentes trabajos de experimentación. Por su permanente acompañamiento, capacidad de entrega, brindándome toda su experiencia y disposición, por su bondad y buen humor.

A la Comisión Evaluadora Dras Ana Finkelberg, Raquel Gallará y Nelia Geréz por el trato respetuoso y óptimos aportes, muy especialmente a Ana Finkelberg.

A Dra Silvia Friedman, miembro del Tribunal (externo) por su cooperación.

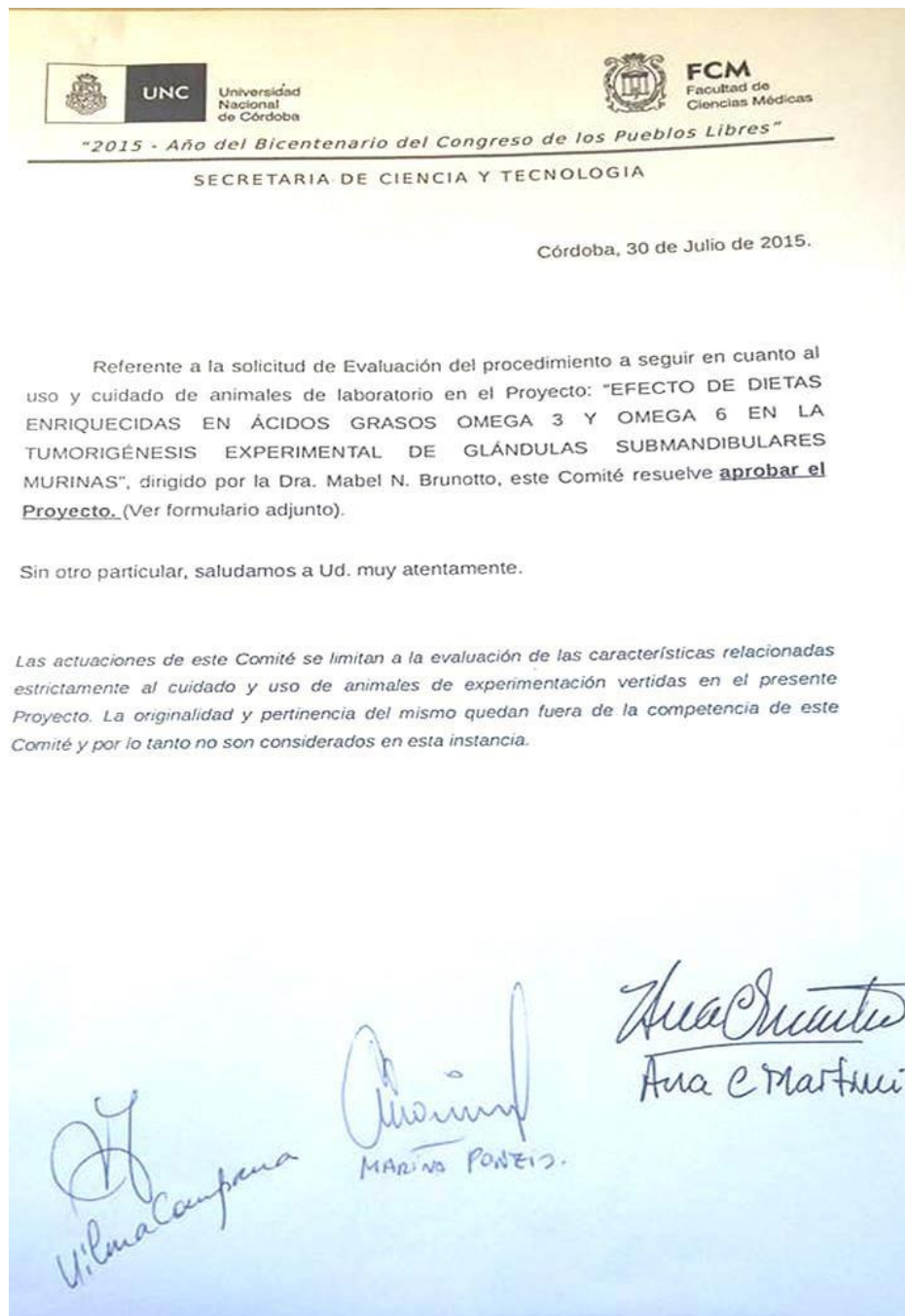
A la Dra Mirta Valentich por su confianza y autorización para efectuar este trabajo en el Instituto de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Médicas; y compañeros: Gastón Reossi por ayudarme en trabajo de Cromatografía de gas, Gina Madzzudulli por su ayuda en la realización de inmunocitoquímica, Renata Silva por facilitarme animales de experimentación, a Isabel Garay, Andrea Comba, Patricia Quiroga, Jeanette Zambrana, Ricardo Mattos.

A mi compañera de la Cátedra "A" de Biología Celular Ana Zárate de Gelfo por su noble colaboración en las presentaciones de los avances.

A la Diseñadora Romina Cicerello, por su gran trabajo y cariño en la presentación final.

A Liliana Dajruch y Sofía Arach de Escuela de Graduados, por su eficiente labor.

CERTIFICADO COMITÉ DE ETICA



INDICE

ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	11
INTRODUCCION Y MARCO	
TEÓRICO.....	13
Biología Celular del Cáncer.....	14
Factores epigenéticos.....	20
Factores dietarios.....	22
Metabolismo de los lípidos dietarios.....	23
Ácidos grasos.....	24
Clasificación de los ácidos grasos poliinsaturados.....	28
Eicosanoides.....	29
Ácidos grasos y eicosanoides: relación con factores de transcripción.....	31
Proteína supresora TP53.....	31
Ki67.....	35
Cáncer de cabeza y cuello.....	36
Tumores de Glándulas Salivares Mayores.....	37
HIPOTESIS.....	42
OBJETIVOS.....	43
MATERIAL Y	
MÉTODOS.....	45
Animales y Dieta.....	46
Inducción de tumor.....	49
Determinación de ácidos grasos de membrana de células tumorales por GLC.....	49
Determinación de Peroxidación Lipídica Enzimática (LOXs y COXs) por HPLC.....	50
Análisis histológico.....	50

Inmunomarcación.....50
Apoptosis TUNEL.....51
Análisis Estadístico.....52

RESULTADOS53

DISCUSION.....66

CONCLUSIONES79

BIBLIOGRAFIA-.....81

ANEXO99

ABREVIATURAS

AGPIs: Ácidos grasos polinsaturados

AA: Ácido araquidónico

AL: Ácido Linoleico

ALA: Ácido alfa-linolénico

EPA: Ácido Eicosapentaenoico

DHA: Ácido Docosahexaenoico

DGLA: Ácido Dihomogamalinoleico

EICOSANOIDES

PG: Prostaglandinas

PGE3: Prostaglandina E3

PGE2: Prostaglandina E2

HETE: Hidroxieicosatetraenoico

HODE: Hidroxioctadecaenoico

HHT: Acido hidroxieptadecatrienoico

OTRAS

GSM: Glándula submandibular

DMBA: Dimetil benzantraceno

AGEs: Ácidos grasos esenciales

AGMIs: Ácidos grasos monoinsaturados

PRB: proteína retinoblastoma

ROS: Especies reactivas de oxígeno

MDA: Malondialdehído

COX: ciclooxigenasa

LOX: lipoxigenasa

HPV. Virus del papiloma humano

HPAs: Hidrocarburos policíclicos aromáticos

RESUMEN

Introducción: Los tumores de glándulas salivales son un grupo diverso de neoplasias a nivel morfológico y clínico con una incidencia en el mundo Occidental de 2,5-3,0 por 100.000 por año. Existen un gran número de estudios sobre ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) y cánceres sin embargo es muy escasa la literatura científica en relación a los cánceres de cabeza y cuello y AGPIs, particularmente en los cánceres que se producen en glándulas submandibulares (GSM). Por lo cual resulta interesante corroborar que los mecanismos ya descritos en otros cánceres presentan procesos similares en SMG.

Objetivo: Evaluar el impacto de las dietas enriquecidas con ácidos grasos de las familias ω -3 y ω -6 sobre la regulación del ciclo celular y de la apoptosis mediados por las alteraciones lipídicas de las membranas celulares evaluada por la expresión de biomarcadores como TP53 y Ki-67 y por el número de células apoptóticas en la tumorigénesis inducida con DMBA en glándulas submandibulares murinas.

Métodos: Estudio experimental en 71 (n=34 DMBA; n= 37 controles) ratones BALB/c, alimentados con dietas enriquecidas con aceite de maíz, rico en ω -6 y ω -3; cártamo, rico en ω -6 o; Chía, rico en ω -3. A los 90 días del destete los ratones fueron inyectados subcutáneamente, una sola vez, a la altura de las glándulas submandibulares con 50 μ l de 0.5 % de dimetilbenzatranceno (DMBA); posteriormente a los 180 días del destete las glándulas submandibulares fueron removidas completamente. Se realizaron descripciones macroscópicas y posteriormente, las glándulas fueron seccionadas en partes, las cuales se destinaron para estudios bioquímicos de lípidos (HPLC y cromatografía de gas), estudios histopatológicos (hematoxilina/eosina) e inmunocitoquímicos para TP53, Ki-67 y apoptosis por técnica del TUNEL.

Resultados: Del total de animales inoculados con DMBA el 75,4% generó cambios tumorigénicos a los 3 y 4 meses post inyección. Los niveles de ácidos grasos saturados no presentaron variaciones significativas entre las dietas en cada grupo; con excepción del 18:0, que incrementó significativamente en los animales inyectados con DMBA en la dieta Chía, en tanto que los ácidos grasos 14:0 y 16:0 variaron significativamente entre los control y DMBA en la dieta cártamo.

En los animales tratados con DMBA dieta cártamo y maíz se incrementó el Ácido Araquidónico, mientras que en los animales tratados o no con DMBA y alimentados con Chía se incrementaron significativamente EPA y ALA. Todos los eicosanoides medidos variaron significativamente entre los animales tratados con DMBA y sus respectivos controles. En los animales inyectados con DMBA se observó inmunomarcación positiva de Ki-67 en el siguiente orden decreciente: Cártamo, Maíz y Chía, en tanto que apoptosis solo se observó en los animales controles alimentados con Chía o Cártamo. TP53 se observó solamente en los animales tratados con DMBA y alimentados con Maíz.

Conclusiones: Estrategias preventivas y de detección temprana como el diagnóstico histológico, determinación de alteraciones bioquímicas-genéticas y el reconocimiento de factores de riesgo como los dietarios, podrían representar la posibilidad de cambiar un mal pronóstico. En el caso de los tumores de las glándulas submandibulares, que presentan, en general, alto grado de malignidad y alta tasa de mortalidad, y que, generalmente, es diagnosticado en estadios tardíos; resultaría altamente beneficioso para la población determinar delineamientos nutricionales, principalmente en el consumo de ácidos grasos, que actúen como preventivos de este tipo de cáncer.

SUMMARY

Introduction: The salivary gland tumors are a diverse morphological and clinical group of neoplasms with an incidence in the Western world 2.5-3.0 per 100,000 per year. There are a large number of studies on PUFAs and cancers but there is very scarce scientific literature in relation to cancers of the head and neck and PUFAs, particularly in cancers of submandibular gland (SMG). Therefore it is interesting to corroborate these mechanisms in SMG.

Objective: To evaluate the impact of diets enriched with fatty acids of the ω -3 and ω -6 families on cell cycle regulation and apoptosis in relation alteration of lipid of cell membranes evaluated by the expression of biomarkers such as TP53 and Ki-67 and the number of apoptotic cells induced tumorigenesis in DMBA in murine submandibular glands.

Methods: Experimental study 71 (n = 34 DMBA; n = 37 controls) BALB / c mice fed diets enriched with corn oil, rich in ω -3 and -6; safflower oil rich in ω -6 or; Chia :, rich in ω -3. After 90 days of weaning the mice they were injected subcutaneously, once, at the height of the submandibulares glands with 50 μ l with 0.5% DMBA; and 180 days later weaning the submandibular glands were removed completely. Macroscopic descriptions were made and subsequently, the glands were sectioned into parts, which were destined for biochemical studies of lipids (HPLC and chromatography), histopathology (hematoxylin / eosin) and immunocytochemical TP53, Ki-67, and apoptosis by TUNNEL technique.

Results: Of the total number of animals inoculated with DMBA 75.4% generated tumorigenic changes at 3 and 4 months post injection. The values of saturated fatty acids showed no significant variations between diets in each group; except 18: 0, which increased significantly in those injected with DMBA in Chia diet animals, while the fatty acids 14: 0 and 16: 0 varied significantly between control and DMBA in safflower diet. In animals treated with DMBA diet safflower and corn the arachidonic acid increased, whereas animals treated or not with DMBA and fed chia they increased significantly EPA and ALA. All measured eicosanoids varied significantly among the guests treated with DMBA and their respective controls. In animals injected with DMBA positive immunostaining for Ki-67 it was observed in the following descending order: safflower, corn and Chia, while

apoptosis was only observed in the control animals fed chia or safflower. P53 was observed only in animals treated with DMBA and corn fed.

Conclusions: together prevention, early detection strategies like that the histological diagnosis, the determination of biochemical-genetic alterations and recognition of risk factors such as dietary could represent the possibility of changing a poor prognosis in the tumors of submandibular glands, which have generally high degree of malignancy and high mortality rate and, is diagnosed in late stages; It is why it would be highly beneficial to determine nutritional delineations population, mainly in the consumption of fatty acids, which act as prevention of this type of cancer.

INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CÁNCER

En el contexto de la Biología Celular del Cáncer, se acepta que uno de los ejes del proceso neoplásico es que las células cancerígenas dejan de cumplir las reglas básicas del comportamiento social celular por las cuales mantienen su homeostasis los organismos multicelulares (Hanahan and Wienberg, 2011)(Fig.1).

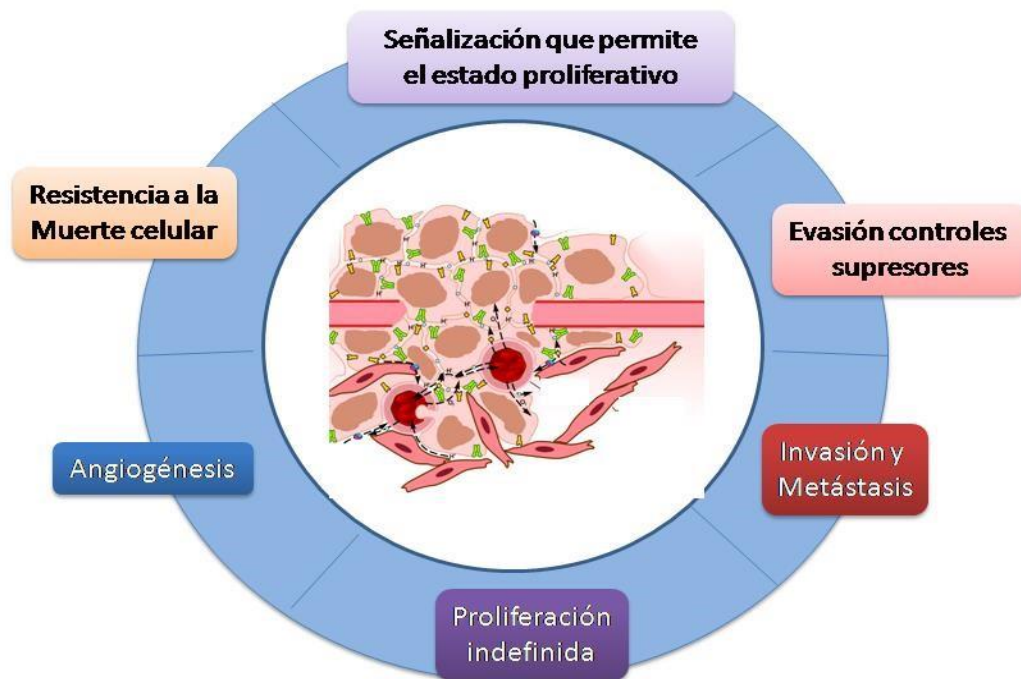


Figura 1: Esquema representativo de los puntos claves del proceso neoplásico en los cuales las células cancerígenas dejan de cumplir las reglas básicas del comportamiento social celular y mantienen su homeostasis los organismos multicelulares según *Hanahan and Wienberg, 2011*.

Se piensa que el cáncer se origina por una sola célula que ha experimentado una mutación somática inicial la cual se transmite a sus descendientes (cambios heredables). A su vez la progenie de estas células acumula mutaciones adicionales a través del tiempo, que conjuntamente con ventajas en la competencia celular y la selección natural en desmedro de la población de células somáticas normales, determinan una población numerosa de células cancerosas. Estos cambios pueden ser mutaciones (alteraciones en la secuencia del ADN) o también cambios epigenéticos (modificaciones persistentes en el patrón de expresión de

genes sin cambios en la secuencia del ADN), que le da a la célula una ventaja selectiva sobre sus células vecinas (Weinberg, 2007).

Además, por su inestabilidad genética, las células cancerígenas acumulan perturbaciones genéticas o epigenéticas a una tasa elevada. La inestabilidad genética es el resultado de mutaciones que interfieren sobre la replicación precisa del genoma y en consecuencia aumentan la tasa de alteraciones, disminuye la eficacia de reparación del ADN o aumentan los cortes y reordenamientos en los cromosomas que producen cariotipos anormales e inestables (Kaelin, 2013).

Así entonces, la acumulación de estas modificaciones lleva a defectos en el control normal tanto de la división celular, la diferenciación y la apoptosis contribuyendo al desarrollo y progresión del cáncer. Durante la transformación neoplásica las células cancerígenas adquieren características y capacidades funcionales que le permiten crecer, proliferar e invadir y colonizar territorios ocupados normalmente por otras células (Alberts et al, 2006) (Fig. 2).

Una de las características más importantes de las células cancerígenas es su capacidad de proliferar de manera descontrolada, debido a una desregulación en la inducción y producción de señales que promueven el crecimiento de la célula y la división celular. Sumado a esto, la célula cancerígena es capaz de evadir las señales que limitan e inhiben la proliferación celular. Además, a diferencia de las células normales, las células cancerígenas tienen menos probabilidades de autodestruirse por apoptosis u otros tipos de muerte celular, permitiendo de esta forma una mayor sobrevivencia celular que las convierte en células inmortales con un potencial de proliferación celular ilimitado. En relación a esto, en los últimos estudios se establecieron nuevas características distintivas de la célula cancerígena. Entre ellas la capacidad de reprogramación del metabolismo energético así como la capacidad de evadir la detección y destrucción de estas células por parte del sistema inmune; cualidades que permiten la formación y progresión de los tumores.

Por otra parte, es importante destacar que en algunos casos de formación de tumores se observó que la inflamación juega un rol fundamental en estadios incipientes y avanzados de la progresión neoplásica, capaz de promover y potenciar su desarrollo. (Alberts et al, 2006; Hanahan and Weinberg, 2011).

En los tejidos normales, los tumores requieren una adecuada irrigación sanguínea que le provea de oxígeno y nutrientes, ante lo cual las células tumorales adquieren la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso denominado *angiogénesis*. La inducción de la angiogénesis permanece activa de manera continua en los tumores lo que favorece y ayuda su crecimiento sostenido. Además se conoce que este proceso de neoformación vascular contribuye a la progresión neoplásica en fases microscópicas premalignas y no solamente en estados avanzados como había sido antes demostrado (Brunotto et al., 2006).

Durante la progresión tumoral, cuando esta avanza hacia un grado patológico de mayor malignidad, se produce la invasión de otros tejidos y la formación de tumores secundarios en otras partes del cuerpo, proceso denominado *metástasis* y evento principal del cáncer. Esta es una característica esencial de la célula cancerígena, que se ve favorecida por alteraciones de la forma celular y la pérdida de contacto y adhesión con sus células vecinas y con la matriz extracelular. Este proceso de invasión y metástasis se produce a través de una secuencia discreta de etapas que la célula cancerígena debe afrontar. En primer lugar las células de un tumor benigno localizado adquieren la capacidad de emigrar y abandonar el tumor de origen atravesando la lámina basal del tejido. A posteriori éstas deben ingresar a los vasos sanguíneos y linfáticos más cercanos, movilizarse a través del sistema circulatorio, y extravasar los vasos hacia el parénquima de tejidos distantes, para formar focos metastásicos. El éxito de la colonización, en esta última etapa, depende de la adaptación de las células al microambiente del tejido, ya que solo unas pocas células cancerosas que alcanzan el torrente circulatorio pueden sobrevivir y originar un tumor en otro sitio. (Alberts et al, 2006; Hanahan and Weinberg, 2011).

Comprender la biología de las células cancerosas y los mecanismos que determinan el crecimiento y la diseminación del tumor es fundamental para el tratamiento y prevención del cáncer.

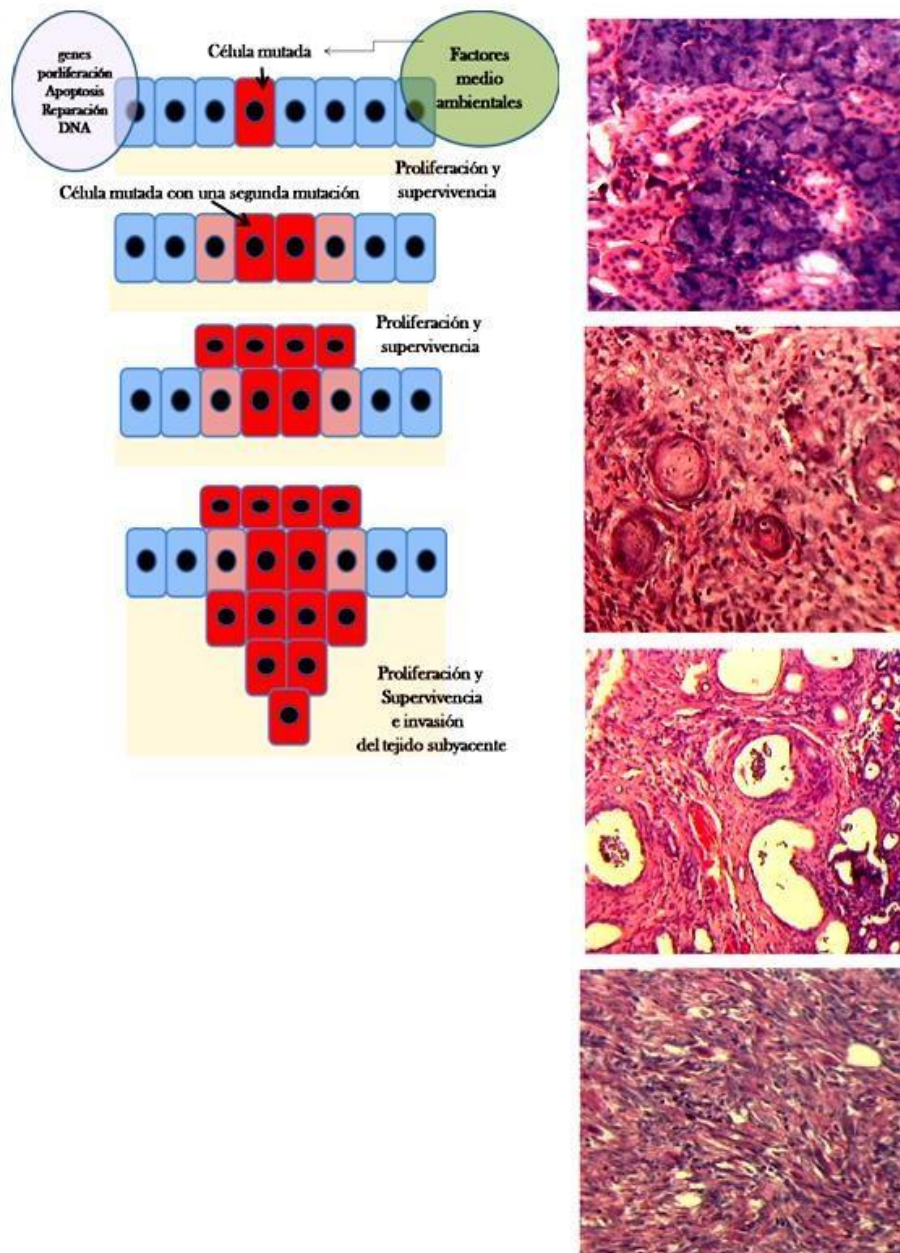


Figura 2.Izq. Esquema de representación de tumorigénesis en el tejido epitelial-la zona amarilla representa al tejido conectivo o conjuntivo, la parte superior representa el exterior celular. La primera mutación puede deberse a factores externos y afecta genes relacionados al ciclo celular. La segunda mutación le da una ventaja adaptativa a la célula y pueden adquirir características malignas (modificado de Alberts et al., 2006; *Der.* Carcinogénesis de glándula submandibular de *Rattus norvegicus*- Wistar pos inyección con DMBA. **A.** Glándula normal; **B.** 7 días pos inyección con DMBA se observa una proliferación epitelial en el estroma glandular. Las células epiteliales están dispuestas como cordones y nidos o formaciones de perlas. **C:** 150 días se observa una desorganización del estroma glandular típico de los carcinomas (Brunotto et al., 2006)

La progresión tumoral involucra una acumulación de alteraciones celulares que surgen en el ambiente extracelular, en los cuales están implicados múltiples mecanismos de regulación que controlan el comportamiento celular. Estas perturbaciones afectan los procesos celulares normales desencadenando el inicio y desarrollo del cáncer.

Se ha estudiado que las mutaciones somáticas en el cáncer se producen en genes específicos cuya alteración frecuentemente contribuye al proceso cancerígeno. Dentro de estos genes los denominados “Proto-oncogenes”, pueden mutar y ser sobre-expresados o sobreactivarse, convirtiéndose en “Oncogenes”. A su vez, existen genes que pierden su función debido a una mutación, estos son llamados “Genes supresores de tumores” y un tercer grupo cuyo cambio conduce a una marcada inestabilidad genética se conocen como “Genes de mantenimiento del ADN” (Hanahan and Weinberg, 2011).

Podemos decir entonces que el cáncer se origina por procesos de mutación, competición y selección natural que ocurren en una secuencia de etapas conocidas como iniciación, promoción y progresión en una población de células somáticas. (Gorsky et al., 2004) Durante la transformación neoplásica, las células cancerígenas adquieren la capacidad de proliferar de manera descontrolada, invadir y colonizar nuevos tejidos.

En este proceso multifactorial se producen diversas alteraciones genéticas (Omori, Fukuda and Sakashita; 2012), en genes como TP53, y otros como STAT 3 (transductor de señal) (Curry et al., 2014)

Durante la carcinogénesis se sobre-estimulan o reprimen la expresión de algunos proto-oncogenes, moléculas responsables del control del ciclo celular y de la muerte celular programada. Cuando se acumula un número crítico de mutaciones (usualmente entre 5 a 6) las células salen de su patrón de crecimiento normal y puede iniciarse un tumor (Harada et al., 2007; Hanahan and Weinberg; 2011). En casi todos los casos examinados, la formación del tumor es generado a partir de una sola célula, por lo cual se dice que es *monoclonal*.

Los alelos mutados de los *proto-oncogenes* son llamados *oncogenes* y corresponden a alelos dominantes. Los *genes supresores de tumores*, codificados por alelos recesivos, son los relacionados a la inhibición del ciclo celular. Las oncoproteínas, codificadas por estos genes, actúan regulando el ciclo celular en diferentes niveles, como: a) factores de crecimiento; b) receptores de los factores de crecimiento; c) transductores de señales intracelulares; d) factores de transcripción nuclear (Alberts et al., 2006).

Probablemente la carcinogénesis en cavidad bucal, comienza con la transformación de un número limitado de queratinocitos normales. Esta transformación se puede expresar a través de cambios citogenéticos y procesos epigenéticos que modifican la progresión del ciclo celular, los mecanismos de reparación del ADN, la diferenciación celular y la apoptosis, que puede ser causada por mutación al azar, por la exposición a una variedad de factores biológicos, carcinógenos o errores en el proceso de reparación del ADN, lo que resulta en una queratinización inestable generando, así un campo de pre-cancerización y conduciendo a cambios neoplásicos malignos; que pueden ser heredadas en las subsecuentes generaciones celulares. Posteriormente, las presiones de selección en el microambiente de la mucosa oral pueden actuar sobre la población celular heterogénea, lo que permite perpetuar estas células con esa alteración genética con mejores herramientas y ventajas de la adaptabilidad, de supervivencia y proliferación por encima de sus células vecinas normales (Feller et al.2013; Merlo et., 2006),

Este proceso requiere múltiples elementos esenciales: un potencial de replicación, la autosuficiencia en las señales de crecimiento ilimitado, la falta de sensibilidad a las señales anti-proliferación, la capacidad para evadir, la apoptosis, aumento de la angiogénesis, invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000). La evidencia reciente apoya que los signos biofísicos y bioquímicos asociados al tumor en la matriz extracelular influyen en las características esenciales del cáncer y, por lo tanto, son fundamentales para la malignidad (Pickup et al., 2014). Para un abordaje eficaz en el tratamiento del cáncer, se debe considerar a esta patología como una enfermedad que implica interacciones complejas entre una comunidad de células heterotípicas, caracterizada por la presencia temporal del tejido canceroso original, del tejido recién formado y de las células que lo rodean. El microambiente tumoral incluye fibroblastos asociados con el cáncer, células inmunes y otras células de soporte. Cambios oncogénicos en los perfiles de expresión de genes contribuyen a alteraciones micro ambiental tales como la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la sobreproducción de citoquinas y la transición entre epitelio y mesenquimal. Estos son algunos de los elementos más críticos del microambiente tumoral, que contribuyen a la proliferación, invasión y metástasis (Rivera & Venegas. 2014).

El cáncer oral es una enfermedad en el cual el tabaco y el alcohol son los mayores factores de riesgo con efecto sinérgico y presente en el 90% de los casos (Koontongkaew, 2013, Kim et al., 2016; Choudhari et al., 2014; Galbiatti et al., 2013; Saman, 2012; Lee and Herceg, 2014; Reidy et al., 2011); otros factores que también son importantes son la infección con el Virus del Papiloma Humano (Dalianis, 2014) y la candidiasis oral (Mohd Bakri et al., 2010).

Factores epigenéticos en la carcinogénesis

A través de consensos internacionales promovidos por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) de la Organización mundial de la salud (OMS) en una de sus reuniones se establecieron que los carcinógenos cumplen con 10 características claves (Smith et al., 2015). Estas pueden resumirse en:

- 1- Ser compuestos electrofílicos y metabólicamente activos.
- 2- Producir un daño genotóxico al ADN (rotura de la doble cadena, desenrollamiento de la cadena de ADN, etc.) mutaciones genéticas, cambios citogenéticos (aberraciones cromosómicas, micro núcleos).
- 3- Alterar los mecanismos de reparación del ADN o causar inestabilidad genómica.
- 4- Inducir alteraciones epigenéticas,
- 5- Inducir estrés oxidativo mediante especies reactivas de oxígeno (ROS), daño oxidativo de macromoléculas como ADN, lípidos, etc.
- 6- Inducir inflamación crónica, elevación de glóbulos blancos, alterar la actividad mieloperoxidasa, modificar la producción de citoquinas o quimioquinas.
- 7- Afectar mecanismos de inmunosupresión como por ejemplo disminuir la inmunovigilancia.
- 8- Modular los eventos relacionados a ligandos/receptores.
- 9- Causar la inmortalización, inhibir la senescencia y la transformación celular.
- 10- Alterar la proliferación celular, la muerte celular o el suministro de nutrientes, disminuir la apoptosis, cambiar los factores de crecimiento, energéticos y las vías de señalización

Una de las características de un carcinógeno es la de producir alteraciones epigenéticas, dentro de los compuestos que reúnen esta característica se pueden mencionar: alcohol, tabaco, lípidos dietarios, entre otros (Gorsky et al., .2004).

La epigenética se define como los cambios que ocurren a nivel de la expresión génica sin que el ADN modifique su estructura molecular. La regulación epigenética permitiría la adaptación al medio ambiente por generar una diversidad de fenotipos con capacidad de adecuación a su entorno (Lee & Herceg, 2014)

Se reconocen tres mecanismos epigenéticos:

i) metilación del ADN, ii) modificaciones de la histona, y iii) interferencia de los ARNs pequeños. El proceso epigenético incluye eventos biológicos-moleculares como la impronta del genoma (proceso biológico por el cual un gen o dominio genómico se encuentra marcado bioquímicamente indicando su origen parental), el silenciamiento genético, la inactivación del cromosoma X, reprogramación de la transferencia nuclear y la carcinogénesis (Tang & Ho 2007; Niemann et al., 2008; Suter et al., 2004) (Fig. 3).

Se cree que los mecanismos epigenéticos median las interacciones gen / medio ambiente y constituyen una interfase entre el genoma y el medio. Los cambios en el epigenoma pueden deberse a componentes de medio ambiente, forma de estilo de vida de las personas y/o señales endógenas en el organismo; interviniendo en la desregulación de diferentes procesos celulares como los que se suceden en la carcinogénesis. La ventaja de los cambios epigenéticos en relación con los genéticos, es que estos son reversibles y, en general, se adquieren de forma gradual en el tiempo. Estudios recientes muestran que factores dietarios pueden impactar sobre el epigenoma (Herceg and Vaissiere, 2011; Hercerg, 2007).

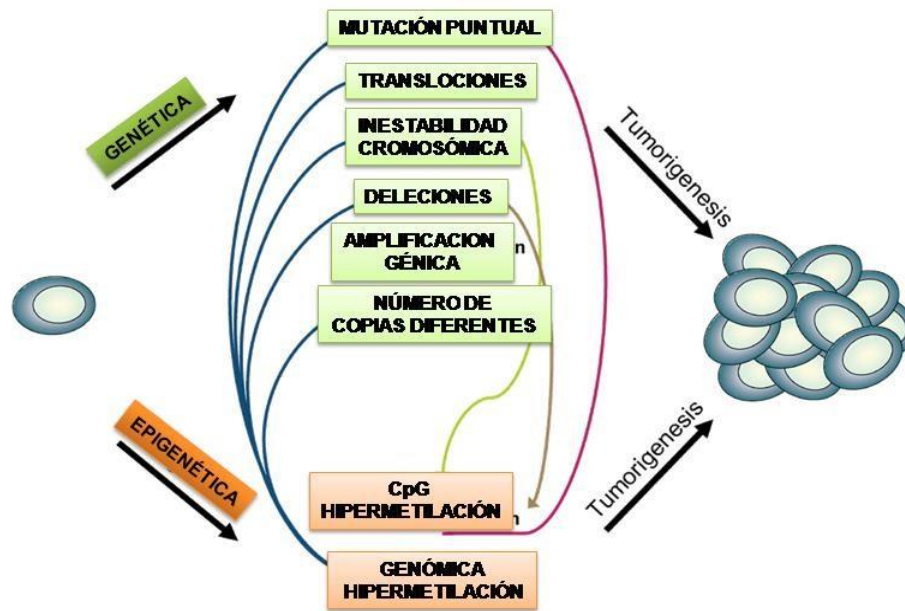


Figura 3. Eventos genéticos y epigenéticos que conducen a la tumorigénesis basado en un mecanismo de patogénesis de cáncer humano. Los datos fueron obtenidos a partir de modelos de cáncer en ratón o cánceres humanos hereditarios demostrando que los cambios genéticos o epigenéticos por si solos pueden iniciar la formación de un tumor. En general un 90-95% de los cánceres presentan cambios genéticos y epigenéticos, que pueden interaccionar (flechas), es decir que eventos epigenéticos pueden originar cambios genéticos y viceversa. Figura extraída y modificada de *Brena RM & Costello JF. Genome-epigenome interactions in cáncer. Human Molecular Genetics. 2007; 16:96-105.*

Factores Dietarios

Se conoce que los hábitos dietarios y nutricionales juegan un rol relevante en el desarrollo de diferentes tipos de neoplasias. Particularmente, se ha establecido que una dieta rica en frutas, vegetales, carotenoides y otras vitaminas han sido asociadas con una reducción de riesgo de cáncer como los cánceres de cabeza y cuello. Entre los macronutrientes consumidos en la dieta los lípidos pueden incorporarse como grasas sólidas o como aceites. La Organización Mundial de la Salud recomienda como límite diario de consumo de lípidos un 15 a 30% del total de consumo energético diario y en relación a las grasas saturados un consumo no mayor a 10% diario del consumo energético (WHO, 2007).

Metabolismo de los lípidos dietarios y sus derivados

Los lípidos que se consumen en la dieta pueden incorporarse como grasas sólidas o como aceites. Los lípidos con una alta proporción de ácidos grasos saturados son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente, en tanto los compuestos con grandes cantidades de ácidos grasos insaturados suelen ser líquidos. Para comprender las funciones de los lípidos como moduladores del proceso carcinogénico, es importante exponer algunas generalidades acerca del metabolismo lipídico.

En el metabolismo lipídico están involucrados lípidos exógenos obtenidos a través de la dieta y lípidos endógenos sintetizados *de novo* en el cuerpo. Los ácidos grasos son moléculas lineales formadas por una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro siendo los componentes fundamentales de casi todos los lípidos. La proporción de estos compuestos en estado libre es reducida, ya que la mayor parte de los ácidos grasos establecen uniones de tipo éster con un grupo alcohol, para formar triacilgliceroles y fosfolípidos, entre otros lípidos.

Los ácidos grasos exógenos requieren que su transporte a través de las membranas de las diferentes células de los tejidos se produzca a través de mecanismos específicos que permitan una distribución rápida y controlada. De este modo su incorporación a las células puede ser regulada acorde a las necesidades metabólicas y evitar posibles efectos dañinos debido al exceso en la acumulación de ácidos grasos.

En las células, tanto los ácidos grasos endógenos como los exógenos son activados en primer lugar a acil coenzima A y luego, tras sucesivos pasos, son incorporados a los fosfolípidos de membrana. La síntesis *de novo* de ácidos grasos comienza en el citosol con acetil-CoA originado a partir de la decarboxilación oxidativa del piruvato, β -oxidación de ácidos grasos o degradación de carbohidratos y proteínas. La síntesis de Ácidos Grasos Saturados (AGs) es llevada a cabo por adición sucesiva de fragmentos de 2 carbonos (acil-CoA) al extremo carboxilo del acilo en crecimiento. Así, la síntesis del AG saturado 16:0 - PA (ácido palmítico) comienza en el citosol y es catalizada por la enzima ácido graso sintasa. Luego la elongación y de saturación de la cadena ocurre en la membrana del

retículo endoplásmico liso. De este modo, el 16:0 es elongado para formar 18:0 - SA, (ácido esteárico). Además, la introducción de un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 de la cadena carbonada por actividad de la enzima Δ -9 desaturasa transforma el 16:0 en 16:1-PA- ω -7 (ácido palmitoleico) y el 18:0 en 18:1-OA- ω -9, (ácido oleico). Los ácidos grasos que no poseen dobles ligaduras en sus cadenas carbonadas se denominan “saturados”, mientras que aquellos que sí poseen dobles enlaces son ácidos grasos “insaturados”, siendo monoinsaturados (AGMIs) aquellos con una ligadura y poliinsaturados (AGPIs) aquellos con dos o más dobles ligaduras (Calderand Budge, 2004) (Fig- 4).

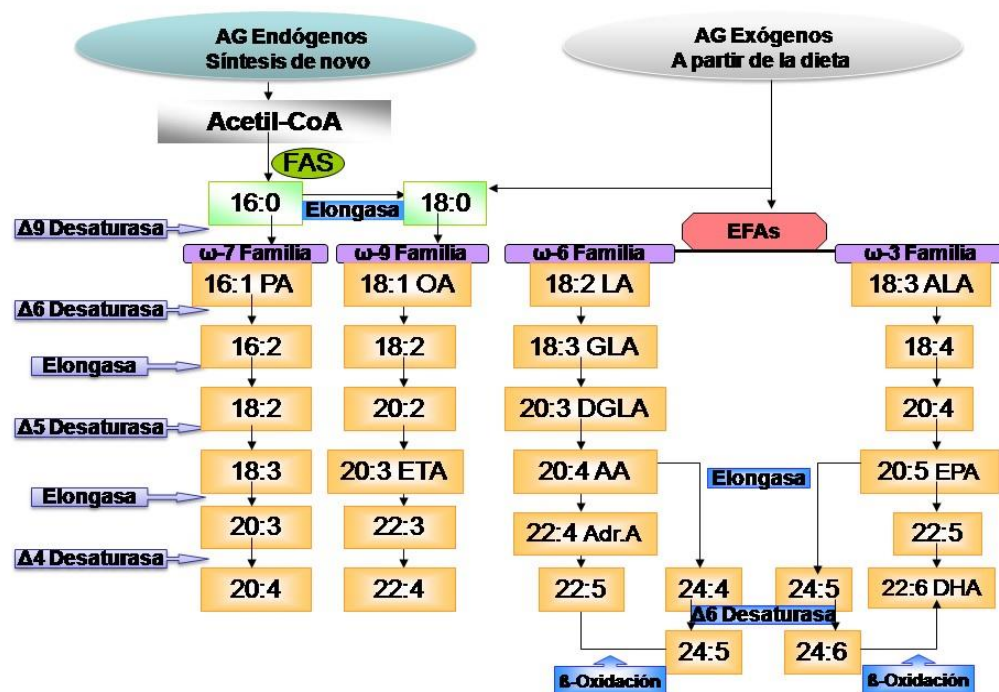


Figura 4 .Biosíntesis de ácidos grasos (AG) saturados e insaturados exógenos (incorporados por la dieta) endógeno (de novo). Los AG endógenos requieren de acetil-CoA y de la acil sintetasa que a partir del AG 16:0 (primero) y por elongación produce el AG 18:0. Los AG poliinsaturados son incorporados de modo exógeno por la dieta e incluye a los AG esenciales (EFAs) que no pueden ser sintetizados de novo como las familias de los ω -6 y ω -3. Las enzimas implicadas en estas vías son: Δ 9, Δ 6, Δ 5 y Δ 4 desaturases y elongasas.Figura extraída y modificada de Comba et al., 2011.

Ácidos Grasos

Los ácidos grasos que son proporcionados por el aporte de los lípidos dietarios, son incorporados a las membranas celulares, modificando propiedades fisicoquímicas y

generando la producción de diversas moléculas bioactivas. Dentro los lípidos, los AGPIs son moléculas esenciales de las membranas plasmáticas y son los componentes principales de todas las células membranas. Por lo tanto, los AGPIs *per se* dará a la membrana propiedades como la fluidez / viscosidad, ya su vez modulan la dinámica y la biofísica de las propiedades de las biomembranas (Hopcnhayn-Rich et al., 1966; Navarro & Eynard, 2013).

Varios trabajos de investigación han mostrado que los lípidos dietarios modulan la producción de diversas moléculas bioactivas como los eicosanoides (Andreatta et al., 2012; Marshall et al., 2007). La proporción relativa de los ácidos grasos insaturados que se encuentra en las membranas celulares y el tipo celular, son los principales factores que regulan tanto la clase como la cantidad de estos compuestos (eicosanoides y otros) que serán generados, a partir de ácidos grasos de fosfolípidos, por activación enzimática de fosfolipasas (Aballay et al., 2012; Chiou et al., 2001) El ácido araquidónico (AA, 20:4, n-6) es el AGPI más abundante de las membranas celulares. Así, la mayor parte de los eicosanoides procede de éste a través de diversas vías enzimáticas pero, otros eicosanoides como la prostaglandina G3 (PGE3) deriva del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5, n-3). La vía de las ciclooxigenasas (COXs) genera eicosanoides de la serie-2 como prostaglandinas (PGs) y otros (Cremonezzi et al., 2004). Por otro lado, la vía de las lipoxigenasas (LOXs) produce ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs) entre otros (Cremonezzi et al., 2001) Otros metabolitos bioactivos, como el ácido 13(S)-hidroxioctadecadienoico (13-HODE) se generan a partir del ácido linoleico (LA, 18:2, ω -6) a través de la vía 15LOX (Vara-Messler et al., 2012).

Los eicosanoides se originan a partir de las familias de AGPIs ω -3 y ω -6, pero la competencia por sistemas comunes enzimáticos entre éstos ácidos grasos, produce variaciones en la producción de estos biolípidos, cuyos efectos en el desarrollo tumoral aún no se conocen totalmente. Es sabido que los compuestos activos que se generan en el metabolismo de estas dos familias de lípidos, tienen actividad pro o anti-inflamatoria cuyos efectos incidirán sobre las células en las diferentes etapas del proceso carcinogénico (Pelucchi et al., 2006).

Estas moléculas bioactivas derivadas de lípidos que fueran descritas más arriba, pueden también producir mutaciones en el ADN, produciendo cambios en la expresión de diversas

moléculas que regulan el ciclo celular e influyen también en la actividad de factores de transcripción, en la expresión de genes, en las vías de transducción de señales impactando en los procesos de apoptosis y proliferación celular implicadas en el desarrollo del cáncer (Eynard & Navarro, 2013).

Los ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados como AA, DHA, EPA son moléculas altamente flexibles en comparación con las zonas más rígidas de la bicapa causadas por grandes cantidades de ácidos grasos monoinsaturados y saturados. El enriquecimiento relativo de colesterol promueve la segregación lateral de las proteínas y la incorporación de ciertos lípidos de la bicapa, formando así micro-dominios más permanentes agrupados conocidos como "balsas lipídicas". Estos pueden impedir el movimiento de grandes complejos de proteínas en la membrana, cuya estructura es altamente modificada por AGPIs de la dieta (Rivera, 2012; Rivera et al., 2015).

Cuando los AGPIs son liberados de las membranas fosfolipídicas por las actividades de varias fosfolipasas luego son sustratos de dos principales vías enzimáticas: los ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LOX), que conducen a la amplia variedad de prostaglandinas, eicosanoides, endocannabinoides, lipoxinas, nitrolípidos, neuroprotectinas, maresinas, resolvinas, ácidos hidroxieicosatetraenoico (HETE), nitrolípidos y hepoxilinas, entre otros (Pasqualini et al., 2005).

Sin embargo, la mayoría de estas moléculas son de vida media muy efímera, por lo cual se produce el equilibrio homeostático de los tejidos. Estas moléculas son de producción local cuando es necesario y luego se destruyen de forma casi instantánea, desencadenan intensa actividad en concentraciones muy bajas (incluso a valores de nM). Por otra parte, la mayoría de los eicosanoides derivados del mismo sustrato, como el AA, muestran un comportamiento agonístico/ antagonista, siendo su equilibrio una función clave como controladores celulares homeostáticos.

La conocida actividad beneficiosa de los AGPIs ω -3 y sus derivados con respecto a ω -6 se debe principalmente a que los primeros exhiben actividades anti-inflamatorias y anti-neoplásicas que se observaron en varias enfermedades crónicas que tienen en común ser tejidos sometidos a procesos inflamatorios crónicos, dando lugar al desarrollo de diferentes síndromes como el síndrome metabólico, la obesidad, el tipo 2, diabetes, dislipidemias, accidente cerebro vascular (ACV), enfermedad coronaria, litiasis, la disfunción endotelial,

aterosclerosis, hipertensión y cáncer (García et al., 2015). Estas enfermedades complejas e interrelacionadas han llevado a proponer que los anti-inflamatorios endógenos derivados de AGPIs, principalmente de la familia ω -3 tienen la capacidad de regular y prevenir procesos inflamatorios y consecuentemente modular el desarrollo de enfermedad crónicas como las mencionadas anteriormente.

Un amplio número de datos epidemiológicos y experimentales han demostrado que el consumo de ácidos grasos dietarios saturados e insaturados modulan el proceso carcinogénico habiéndose descrito compuestos iniciadores, promotores e inhibidores, estudiando sus efectos preventivos o desórdenes en el desarrollo de esta enfermedad (Chen et al., 2008; De Stefani et al., 2008; Andreatta et al., 2012).

En muchas células cancerosas, el metabolismo de los AGPIs es claramente anormal, ya que hay una pérdida parcial o completa de las enzimas Δ -6-y Δ -5 desaturasas, que catalizan los pasos de desaturación inicial en las rutas implicadas en la síntesis de AGPIs, de cadena más larga cuya disponibilidad queda disminuida progresivamente. Además, las células cancerosas exhiben bajos niveles de peroxidación y un aumento de estrategias de anti-peroxidación (Pidgeon et al., 2007).

Clasificación de los ácidos grasos poliinsaturados

Los AGPIs pueden clasificarse en al menos cuatro familias, dependiendo del ácido graso precursor a partir del cual son sintetizados:

- a) serie ω -7 deriva del PA,(ácido palmítico),
- b) serie ω -9 deriva del OA,(ácido oleico),
- c) serie ω -6 deriva del ácido linoleico (18:2-LA- ω -6),
- d) serie ω -3 del ácido α -linolénico (18:3-ALA- ω -3).

En los mamíferos, los ácidos grasos LA y ALA son llamados “Ácidos Grasos Esenciales” (AGEs) requeridos para la supervivencia y no pueden ser sintetizados *de novo*, deben ser incorporados con la dieta. Como anteriormente se explicó las células de mamíferos metabolizan a los AGEs por sucesivas reacciones de elongación y desaturación en las cuales están implicadas el mismo conjunto de enzimas, las elongasas y las enzimas Δ -5 y Δ -6 desaturasas que metabolizan las diferentes familias de ácidos grasos (ω -7, ω -9, ω -6 y ω -3) (Das, 2006).

Para su síntesis las moléculas de AGPIs compiten, por lo tanto, unos con otros por las mismas enzimas las cuales tienen una preferencia jerárquica entre los ácidos grasos en el siguiente orden, ω -3 > ω -6 > ω -9 > ω -7. Esta preferencia por los AGPIs de 20 carbonos con mayor grado de insaturación tiene grandes implicancias para los hábitos dietarios y el metabolismo. Por lo tanto, si en condiciones de alimentación comunes a nuestras culturas alimentarias los derivados de ω -9 se forman en pequeñas cantidades, el incremento del ácido graso 20:3 ω -9, un metabolito del OA, sugiere una deficiencia en ácidos grasos esenciales ω -3 y ω -6 (Navarro and Eynard, 2013; Eynard, 1996).

Existen controversias en relación a los últimos pasos de la síntesis de ácidos grasos, en particular sobre la elongación y desaturación del ácido araquidónico (AA-20:4- ω -6) y el ácido eicosapentanoico (EPA-20:5- ω -3). Ha sido aceptado desde hace tiempo que el AA y el EPA son primero elongados y luego desaturados por una enzima denominada Δ -4 desaturasa formando el ácido graso 22:5- ω -6 y el ácido docosaexanoico (22:6-DHA- ω -3) respectivamente.

Eicosanoides

Varios trabajos de investigación han mostrado que los lípidos dietarios modulan la producción de diversas moléculas bioactivas (Pasqualini et al, 2003; 2005; 2008) en particular los AGEs, generan esta serie de metabolitos conocidos en general como eicosanoides (Fig. 5).

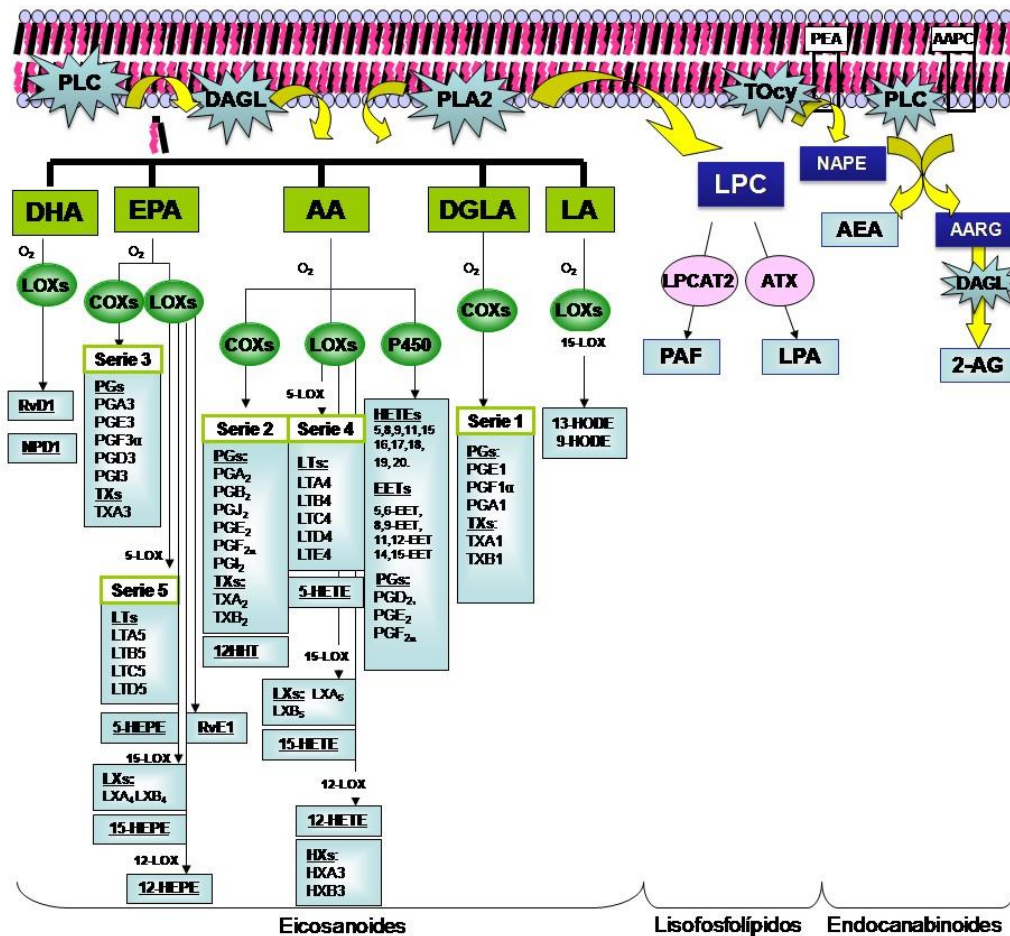


Figura 5.

Biosíntesis de derivados lipídicos. La figura muestra la biosíntesis y de algunos de sus derivados como eicosanoides, lisofosfolípidos y endocannabinoides. A posterior de la activación de fosfolipasa C (PLC) se libera diacilglicerol (DGA) desde la membrana fosfolípida. La actividad de las DGA lipasa y la fosfolipasa A2 (PLA2) produce la liberación de ácidos grasos (AG) desde los fosfolípidos de la membrana, de modo similar al ácido docosahexaenoico (DHA) y del eicosapentaenoico (EPA): AA: ácido araquidónico, DGLA: dihomo-gamma-linoleico y LA: linoleico. Estos AG insaturados pueden ser sustratos de lipoxigenasas (LOXs), ciclooxigenasas (COXs) y citocromo P-450 (CYP-450) produciendo resolvinas (Rvs), neuroprotectinas (NPs), prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs), hidroxieicosatetraenoicos (HETEs), hidroxieicosapentaenoicos (HEPEs), lipoxinas (LXs) y hepoxilinas

(HXs). Por otra vía, el PLA2 está implicado en la producción de lisofosfolípidos. La actividad de esta enzima produce la 1-O-alkil-lisofosfatidil colina (LPC). Esta molécula es metabolizada por LPC acetiltransferasa-2 dando el factor de activación plaquetaria (PAF) y por la enzima autoxina (ATX) se obtiene el ácido lisofosfatídico (LPA). La síntesis de endocannabinoides se produce a partir del fosfatidiletanolamina (PEA) por catálisis de la transacilasa (TRCY) que lo transforma en N-acil-fosfatidil etanolamina (NAPE). Estas moléculas son sustratos del PLC y por PLD, produciendo la liberación de araquidoniletanolamida (anandamida: AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG), considerados dos de los principales endocannabinoides endógenos. Figura extraída y modificada de Comba et al., 2011.

La proporción relativa de los ácidos grasos insaturados que se encuentra en las membranas celulares y el tipo celular, son los principales factores que regulan tanto la clase como la cantidad de estos compuestos (eicosanoides y otros) que serán generados, a partir de ácidos grasos de fosfolípidos, por activación enzimática de fosfolipasas (Comba et al., 2010; Bongiovanni et al., 2005)

El ácido araquidónico (AA, 20:4, ω -6) es el AGPI más abundante de las membranas celulares y generador de eicosanoides.

Así, la mayor parte de los eicosanoides procede de éste a través de diversas vías enzimáticas. La vía de las ciclooxigenasas (COXs) genera eicosanoides de la serie-2 como prostaglandinas (PGs) y otros (Espada et al., 2007). Por otro lado, la vía de las lipoxigenasas (LOXs) produce ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) entre otros (Funk, 2001)

Otros metabolitos bioactivos, como el ácido 13(S)-hidroxioctadecadienoico (13(S) HODE) se generan a partir del ácido linoleico (LA, 18:2, n-6) a través de la vía 15-LOX (Bongiovanni et al., 2005). Otros derivados oxigenados como la PGE₃ derivan del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5, ω -3) por la vía COX-2. Los eicosanoides se originan a partir de las familias de AGPIs ω -3 y ω -6, pero la competencia por sistemas comunes enzimáticos entre éstos ácidos grasos, produce variaciones en la producción de estos biolípidos, cuyos efectos en el desarrollo tumoral aún no se conocen totalmente (Panel et al., 2006).

Es sabido que los compuestos activos que se generan en el metabolismo de estas dos familias de lípidos, tienen actividad pro o anti-inflamatoria cuyos efectos incidirán sobre las células en las diferentes etapas del proceso carcinogénico (Wang et al., 2007). Estas moléculas bio-activas derivadas de lípidos que fueron descritas más arriba, pueden también

producir mutaciones en el ADN, generando cambios en la expresión de diversas moléculas que regulan el ciclo celular e influyen también en la actividad de factores de transcripción, en la expresión de genes, en las vías de transducción de señales impactando en los procesos de apoptosis y proliferación celular implicadas en el desarrollo del cáncer (Pidgeon et al., 2007)

Ácidos Grasos y Eicosanoides: Relación con Factores de Transcripción en la Carcinogénesis de Glándulas Salivares

Estas moléculas bio-activas derivadas de lípidos que fueron descritas más arriba, pueden también producir mutaciones en el ADN, produciendo cambios en la expresión de diversas moléculas que regulan el ciclo celular e influyen también en la actividad de factores de transcripción, en la expresión de genes, en las vías de transducción de señales impactando en los procesos de apoptosis y proliferación celular implicadas en el desarrollo del cáncer (Bongiovanni et al., 2005)

Ha sido demostrado que la actividad de los ácidos grasos poliinsaturados indujeron la acumulación, activación y re-localización celular de múltiples y diversas vías de señalización celular en cáncer de mama y de cabeza y cuello como las de TP53-y otras como p21WAF1/CIP1 (Espada et al., 2007; Funk, 2001).

Proteína supresora tumoral TP53

Entre los genes supresores de tumores se puede mencionar a la proteína TP53. El tipo salvaje de la proteína TP53 es un potente inhibidor de la progresión del ciclo celular, regula el crecimiento y la apoptosis de células cuyo ADN ha sido dañado por agentes del medio ambiente. Al respecto, se sabe que la proteína TP53 es esencial para regular el ciclo celular y es capaz de detener el ciclo en la etapa G1 de las células. Este gen se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 humano, y codifica para fosfoproteínas, elementos claves en el control del ciclo celular (Todd and Wong, 1997).

La forma activa de la proteína TP53 es un tetrámero de unidades idénticas. La importancia de la proteína TP53 es la elevada incidencia de su mutación encontrándose esta forma en el

50% de los cánceres estudiados. Esta mutación estructural produce una inactivación de su tipo salvaje, ya que interrumpe su normal funcionamiento y puede contribuir a la malignidad de los tumores (Deshpande and Wong, 2008; Todd and Wong, 1997).

En la década de los '80 se demostró mediante técnica de marcación que la proteína TP53 se localiza preferentemente en el citoplasma en la mayoría de las células normales, mientras que en las células transformadas o con un rápido crecimiento la inmunomarcación de la misma se incrementa en el núcleo celular. La proteína TP53 se encuentra estrechamente asociada a la proteína MDM2, que actúa como regulador negativo de la TP53. La MDM2 es una ubiquitina ligasa E3, la cual junto con la proteína p300, "co-activador transcripcional", degradan a la TP53 por ubiquitinación y procesos dependientes de proteosomas (Benetiz, 2000).

Por otra parte, la proteína TP53 es esencial para el punto de control que detiene en G1 las células con ADN dañado. (Fig 6).

El gen supresor de tumores TP53 tiene un rol clave en las respuestas al estrés celular, con el fin de preservar la estabilidad del genoma. Esta función la cumple a través de mecanismos transcripcionales y no transcripcionales que regulan procesos como la apoptosis, la autofagia, la progresión del ciclo celular, la senescencia, reparación del DNA y el metabolismo celular. Universalmente es reconocido como un marcador de los cánceres humanos cuando se encuentra mutado (Zárate et al., 2013, Brunotto et al., 2006 y 2009; Li et al., 2012; Liu et al., 2004).

La proteína TP53 es un factor de transcripción que promueve la síntesis de proteínas como la p21, que inhibe el crecimiento celular o induce la muerte por apoptosis. Este factor de transcripción responde a estímulos genotóxicos y transcribe genes de unión específica a secuencias de ADN que detienen el ciclo celular. En el caso particular de la proteína TP53, si la misma se encuentra mutada no produce la detención del ciclo celular, generando un acumulo de células anormal (Chapkin et al., 2007).

Trabajos clínicos y experimentales realizados en pacientes con tumores malignos de glándulas salivares demostraron que el índice de proliferación celular, la mutación de oncogenes y la sobre-expresión de las proteínas supresoras de tumores como la TP53 y p21 fueron identificados como marcadores de génesis de tumores de las glándulas

salivales, siendo la expresión de TP53 un evento temprano en la tumorigénesis de estas glándulas (Menendez et al., 2004, Brunotto et al., 2009).

Se ha demostrado que los lípidos y sus derivados pueden regular factores de transcripción incidiendo en la carcinogénesis. Así en un estudio epidemiológico realizado en una población australiana se ha observado una asociación inversa entre las concentraciones de ácidos grasos ω -3 en el suero de personas sanas, principalmente del EPA y DHA, y la inmunomarcación de TP53 en la epidermis completa y en la capa basal de la misma. Estos resultados apoyan otras investigaciones que demuestran que los ácidos grasos de cadenas largas podrían modificar los eventos tempranos de carcinogénesis a nivel de piel (Jaehne et al., 2005).

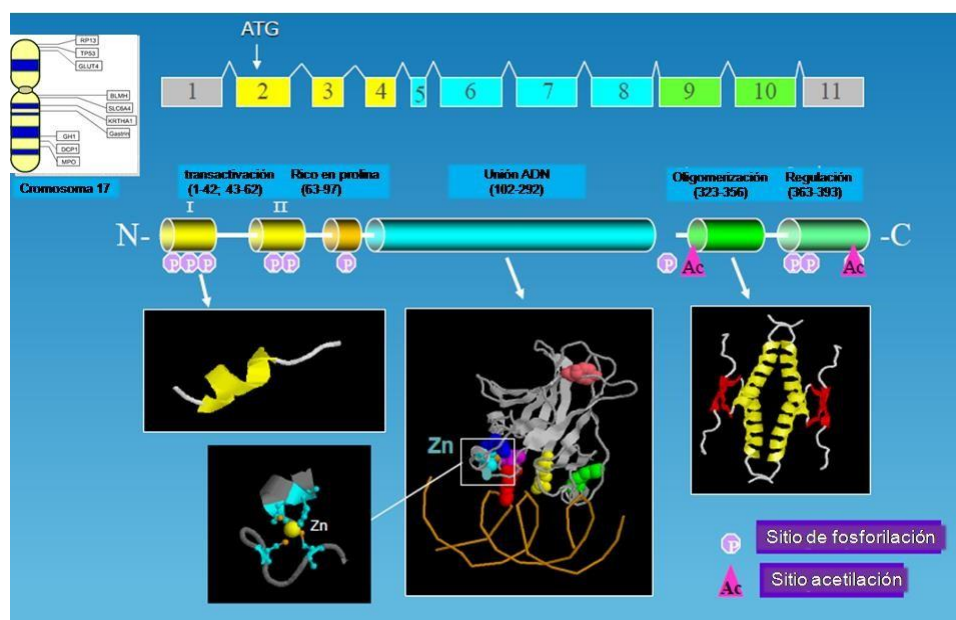


Figura 6. Representación esquemática y 3D de la proteína TP53 humana y su localización en el cromosoma 17 (arriba izq.). Figura extraída y modificada del sitio de la IARC-agencia internacional para la investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud: http://p53.fr/TP53_publications/publications.html

Se conoce que la proteína TP53 ha sido postulada como candidata a mediar parte de la regulación de la carcinogénesis y que los ácidos grasos además podrían modular la actividad de este supresor de tumores, pero los mecanismos subyacentes entre TP53 y metabolismo lipídico no está definido (Wang et al., 2007).

Trabajos clínicos y experimentales realizados en pacientes con tumores malignos de glándulas salivares demostraron que el índice de proliferación celular, la mutación de

oncogenes y la sobreexpresión de los receptores vinculados al crecimiento celular como la TP53 y 2/neu fueron identificados como marcadores de génesis de tumores de las glándulas salivales, siendo la expresión de TP53 un evento temprano en la tumorigénesis de estas glándulas (Pidgeon et al., 2007).

Desde hace mucho tiempo se ha observado que un aumento de ROS en las células cancerosas actuarían a nivel del ADN generando mutaciones de purinas, pirimidinas y de productos de oxidación de la desoxirribosa como 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (Choudhari et al., 2014).

Como anteriormente se ha explicado la proteína TP53 está involucrada en procesos de inhibición del ciclo celular y de apoptosis celular. La producción de ROS generaría estrés celular y esta proteína podría responder de tres modos diferentes (Haliwerr, 2007).

En presencia de un daño medio o bajo, la proteína TP53 normal presentaría niveles bajos de concentración y conduciría a la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes, produciendo una reparación del ADN dañado. En presencia de un alto nivel de daño, generado por la presencia por ejemplo de ROS, la proteína TP53 normal, conduciría a la senescencia o muerte celular (apoptosis), eliminando de este modo a la/s célula/s dañada/s. En una situación similar a las descritas previamente, pero en presencia de una proteína TP53 mutada, no podría ocurrir el proceso apoptótico por lo cual las células dañadas (mutadas) podrían generar un tumor por la falta de inhibición del ciclo celular (Halliwell, 2007).

La proteína estimuladora del ciclo celular Ki 67

El antígeno para la proteína Ki-67 fue originalmente identificado a principios de 1980 como anticuerpo monoclonal de ratón contra un antígeno nuclear de una línea celular de linfoma de Hodgkin. El nombre Ki-67 proviene del nombre de la Universidad de Kiel, Alemania, en donde trabajaban Gerdes y sus colaboradores, en tanto que el número 67 se refiere al número de clon en un plato de 96 pocillos (Gerdes et al., 1983) El antígeno Ki-67 es una proteína que se encuentra en el núcleo y que se expresa en las diferentes etapas del ciclo celular, como son la fase G1, S, G2 y mitosis; no así en las células en reposo (G0). La detección del antígeno Ki-67 se asocia estrictamente con el ciclo celular y se confina al núcleo, lo que sugiere un papel importante en el mantenimiento o regulación del ciclo de división celular (Fig.7).

La proteína se encuentra principalmente en el área nuclear y en la región fibrilar densa del nucléolo durante la interfase. Mientras que al inicio del proceso mitótico, esta proteína se asocia a la periferia del cromosoma condensado. La proteína Ki67 se expresa en diferentes momentos del ciclo celular, especialmente en G1, S, G2 y M, presentando un pico máximo en la mitosis (Yerushalmi et al., 2010). Durante la interfase Ki67 es detectado dentro del núcleo, en cambio, en la mitosis la mayoría de estas proteínas son re-localizadas en la superficie de los cromosomas, como más arriba se mencionó. Ki67 es rápidamente degradado cuando la célula entra a un estado no proliferativo o durante procesos de reparación de ADN (Colozza et al, 2005, Verheijen et al, 1089; Yerushalmiet al., 2010)

En investigaciones sobre lesiones malignas de cavidad oral, glándulas salivares, faringe y laringe estudiaron la actividad proliferativa con diferentes métodos como índice de AgNORs, MIB-1 y expresión inmunocitoquímica de Ki67, demostrando que estos marcadores son válidos para definir tratamientos y determinar pronósticos(Pich et al., 2010; Vieira et al., 2008).

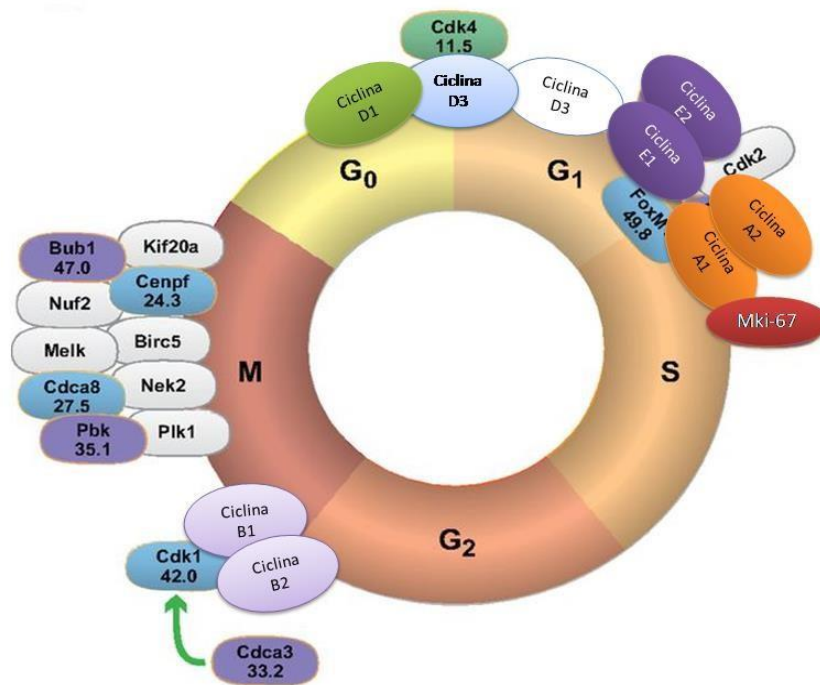


Figura 7. Ki-67 (Mki67) en el ciclo celular. Representación de las diferentes moléculas que participan de la regulación del ciclo celular, en cada una de sus fases (G₂, M, S, G₁, G₀). Figura extraída y modificada de: Krautkramer KA, Linnemann AK, Fontaine DA, Whillock AL, Harris TW, Schleis GJ, Truchan NA, Marty-Santos L, Lavine JA, Cleaver O, Kimple ME, Davis DB. Tcf19 is a novel islet factor necessary for proliferation and survival in the INS-1 β cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305(5):E600-10.

CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Epidemiología

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; se estima que las muertes por cáncer en los últimos 10 años han sido de un 15% en países desarrollados y de un 30% en países en vías de desarrollo. Anualmente 11 millones de personas son diagnosticadas con algún tipo de cáncer y cerca de 7 millones de pacientes mueren por esta patología.

En Argentina, también el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares, con tasas comparables a las de Canadá y los EE.UU, y además varía sustancialmente entre distantes regiones de nuestro país (Bosetti et al., 2005). Las tasas de cáncer han aumentado debido al incremento de la población, a un mejor diagnóstico precoz y a una mayor exposición a factores de riesgo (WHO, 2013).

Es conocido que el 95% de los cánceres más comunes están causados por factores ambientales y, de ellos, más de la tercera parte están ligados a factores nutricionales como una de las causas principales (WHO, 2007 y 2013).

La frecuencia, distribución geográfica y el comportamiento de los diferentes tipos de cánceres se relacionan con sexo, edad, etnia, la predisposición genética y la exposición a productos carcinógenos como colorantes, benceno, alquitrán, tabaco, alcohol, etc. (Blas and Kurup, 2010).

Los cánceres de cabeza y cuello incluyen a los cánceres que se desarrollan en paladar, glándulas salivales y fosas nasales. A nivel mundial, el cáncer bucal representa entre el 2 al 5 % del total de los cánceres de todo el organismo, constituyéndose en uno de los diez más frecuentes (Blas and Kurup, 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha informado recientemente un aumento en la incidencia del cáncer en todo el organismo, incluyendo el que se desarrolla en cavidad bucal, con el consecuente aumento en las tasas de morbi-mortalidad (Piemonte et al., 2010)

En estudios realizados sobre cáncer bucal en la Provincia de Córdoba, se observó que uno de los sitios más frecuentes de aparición de esta patología fueron las glándulas salivales mayores (23,7%) (WHO, 2006). La morbilidad y mortalidad que produce es elevada, presentando una tasa de supervivencia en aproximadamente sólo el 50 % de los casos, de acuerdo a la localización y al tamaño del tumor y a la presencia de metástasis (Morelatto and López de Blanc, 2006).

Dentro de los tumores que se presentan en las glándulas salivales mayores, los que se desarrollan en glándula parótida, se transforman en malignos en un 25%, en tanto que aquellos que se desarrollan en las glándulas submandibulares la tasa de malignización es del 50%; resultando estos últimos más agresivos y con peor pronóstico de sobrevida (Gorsky et al., 2004).

Tumores de Glándulas Salivares

Las glándulas salivales mayores, Parótida, Submandibular y Sublingual, y menores cooperan funcionalmente para producir la saliva de la cavidad oral, líquido complejo formado por una gran variedad de componentes orgánicos e inorgánicos, que actúa en el

mantenimiento de la mucosa oro-esofageal, la reparación de la misma y la homeostasis del medio ambiente bucal (Fig. 8).

Las glándulas salivales mayores comparten un modelo común de desarrollo embrionario en roedores. La glándula submandibular se genera a través de un proceso de morfogénesis branquial, seguido de un proceso de crecimiento y diferenciación durante el período pre y postnatal, regulado por hormonas, componentes de la matriz extracelular y el sistema nervioso autónomo (Holmberg and Hoffman, 2014). Las Glándulas Submandibulares participan en la secreción de un fluido rico en proteínas que contribuye al mantenimiento de la salud bucal; estas glándulas incrementan su volumen de grasa y tejidos conectivos con el transcurrir del tiempo de vida del organismo (Saito et al., 2015).

En relación a la composición lipídica en glándulas salivares de ratas adultas se ha determinado que a medida que se avanza en la edad del animal el contenido de lípidos totales aumenta, especialmente, en las glándulas salivares mayores (parótida, submandibular y sublingual); siendo que parótida y submandibular tienen un mayor contenido de fosfolípidos en relación a las glándulas sublinguales. Sin embargo, a medida que el animal envejece, el contenido de fosfolípidos tiende a disminuir en las tres glándulas salivares mayores. Los lípidos más predominantes son la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. Los ácidos grasos como palmítico, esteárico, linoleico y araquidónico son los mayores componentes lipídicos de los fosfolípidos de la membrana observados en las glándulas salivares mayores de ratas. Con el envejecimiento del animal el contenido de linoleico se incrementa y el de araquidónico disminuye (Tomita et al., 2007).

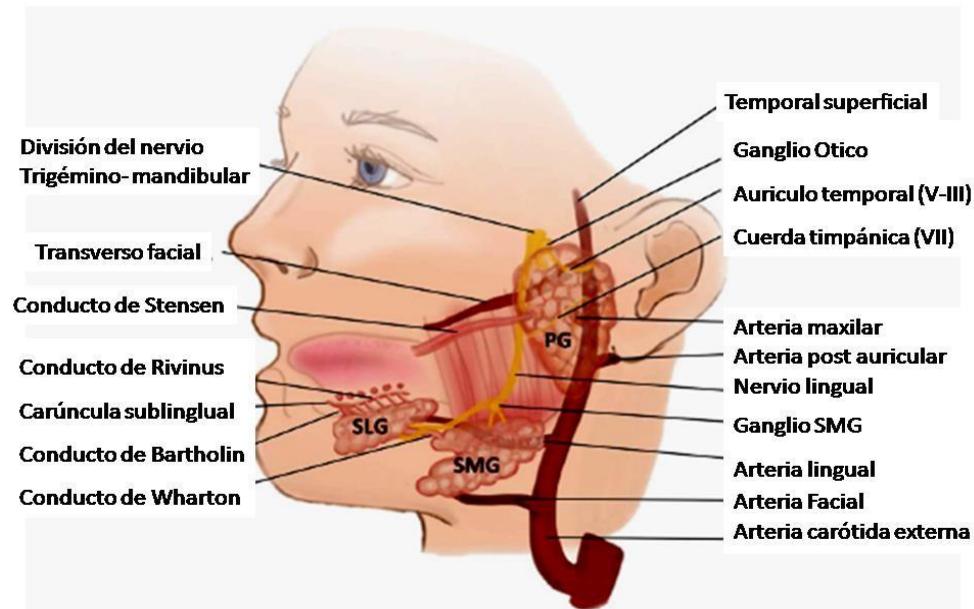


Figura 8. Anatomía de las glándulas salivares mayores en el hombre. SLG: glándula sublingual; SMG: glándula submandibular; PG: glándula parótida. Figura extraída y modificada de *Holmberg KV and Hoffman MP. Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary glands. Monogr Oral Sci. 2014 ; 24: 1–13.*

Los tumores de glándulas salivales son un grupo diverso de neoplasias a nivel morfológico y clínico; los cuales pueden presentar diagnósticos y terapéuticas considerablemente diferentes tanto para patólogos como para cirujanos. La distribución epidemiológica de estos cánceres en el mundo ha demostrado variaciones geográficas en su incidencia (Fonseca et al., 2012; Vasconcelos et al., 2015; Wang et al., 2015) (Fig. 9).

Actualmente la OMS reconoce un total de 13 tipos benignos y 24 tipos malignos de tumores de glándulas salivales, originándose la mayoría en las glándulas parótidas, submandibulares y sublinguales. Debido al alto grado de diversidad morfológica que presentan estos tumores, serían uno de los tipos de cánceres de cabeza y cuello más interesantes para estudiar. Entre los cánceres que se presentan en las glándulas salivales mayores, el grado de malignidad que afecta a las glándulas submandibulares es considerado, generalmente, con peor pronóstico en relación a los que afectan a las otras glándulas mayores (Speight and Barrett, 2009). Muchos pacientes que sufren este tipo de neoplasias, luego de la extirpación quirúrgica de una o de las dos glándulas submandibulares presentan en consecuencia manifestaciones clínicas como reducción del flujo salival, alteración de la microflora cariogénica e incremento de la incidencia de caries dentales. Es por ello que la prevención o detección precoz de cambios malignos en las

células de individuos expuestos a factores de riesgo es fundamental para prevenir consecuencias psico-fisiológicas en los mismos (Nagpal et al., 2003; Nagao et al., 2002).

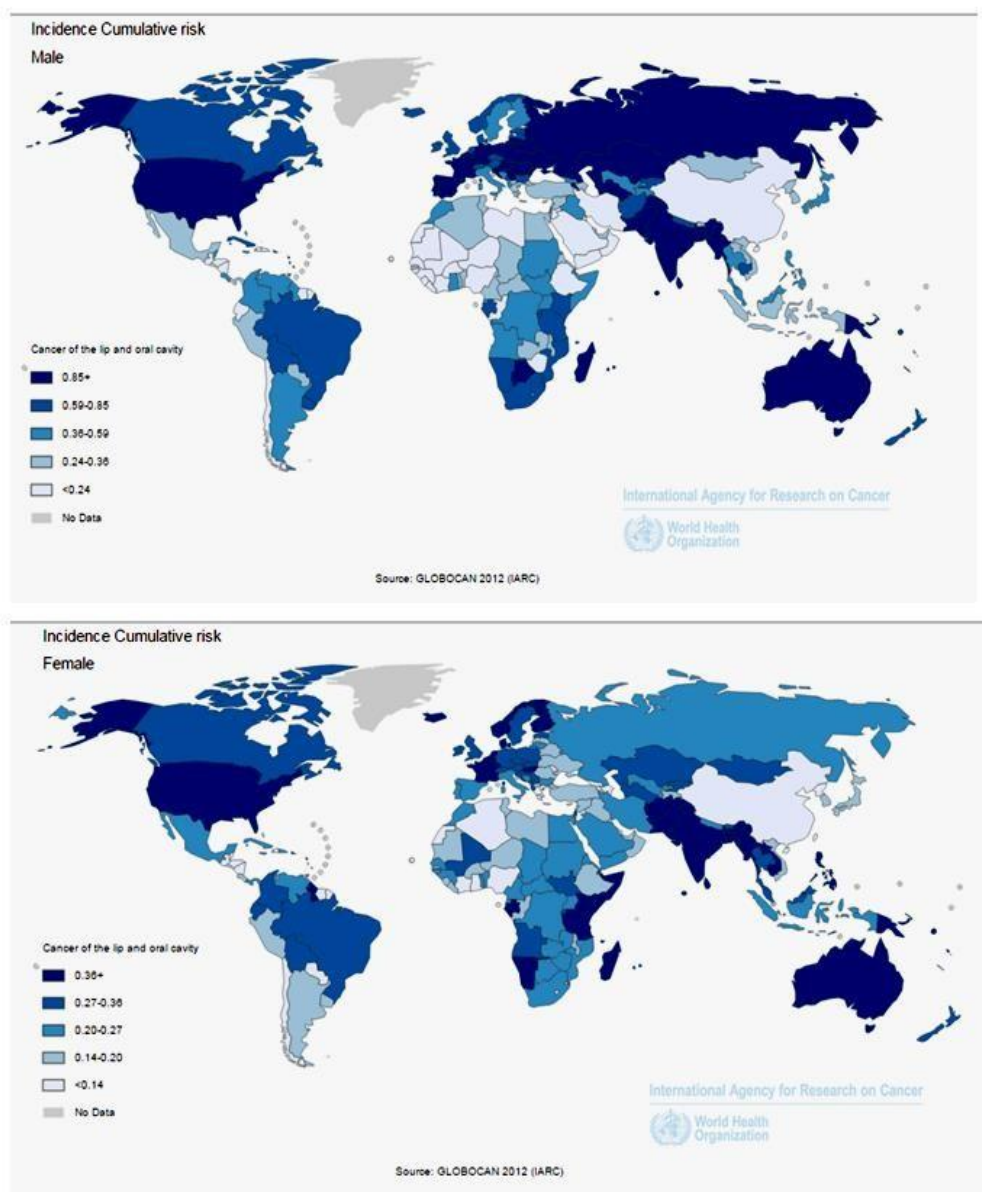


Figura 9. Tasa de incidencia de riesgo acumulado (x1000), de cáncer de cabeza y cuello en el mundo para sexo masculino (superior) y femenino (inferior). Figura extraída *GLOBOCAN 2012 (IARC)*. Disponible en sitio web: <http://globocan.iarc.fr/>

Dado que la progresión tumoral está caracterizada por un balance entre los procesos de proliferación celular y apoptosis, ambos regulados por la expresión de un grupo de oncogenes y genes supresores de tumores, investigadores estiman importante encontrar patrones de proliferación y apoptosis asociados a cánceres orales primarios (Brunotto et al., 2014; 2013). En este marco es importante definir, en la carcinogénesis de glándula submandibular, los patrones de modificación morfológica y fisiológica tanto a nivel de mucosa oral como de glándulas salivales.

A nivel experimental uno de los modelos de inducción de carcinogénesis es la utilización de 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), aplicado en el agua de bebida de los animales, de forma tópica sobre piel de los animales o bien inyectado en el órgano en donde se quiere estudiar el proceso de malignización. La forma de acción del carcinógeno DMBA, un hidrocarburo policíclico aromático, es bien conocida. Este actúa a través de receptores aril hidrocarburo (AhR) activando el citocromo p450. Esta enzima (p450) oxida al DMBA y lo convierte en 3,4 epoxi seguido de hidrólisis por mEH que lo aproxima a la forma 3,4 diol. Este metabolito es nuevamente oxidado por el citocromo P450 a 3,4 diol-1,2-epoxi, que es capaz de unirse covalentemente al ADN y causar una mutación. Se ha observado que la nicotina presenta una vía metabólica similar a la del DMBA (Brunotto et al., 2006; Walle et al., 2006).

Por todos los antecedentes expuestos, es probable que en los modelos a utilizar en la presente investigación, la variación lipídica de las membranas que se induzca a través del agregado exógeno de AGPIs ω -6 y ω -3, genere variaciones en la actividad de enzimas LOXs y COXs y en sus productos lipoxigenados, y que los mismos modifiquen el desarrollo tumoral expresado diferencialmente por biomarcadores como TP53 y Ki-67 en tumores de glándulas salivales.

Estos estudios permitirán ampliar el conocimiento sobre el papel, de los AGs en dicho proceso y evidencian la importancia del metabolismo del AA en la regulación del desarrollo y crecimiento tumoral. Entender los mecanismos de señalización regulados por AGs y sus derivados bioactivos es un punto crítico para determinar su participación en la proliferación celular y apoptosis, así como su impacto en la modulación, progresión o regresión del proceso carcinogénico.

Existen un gran número de estudios sobre AGPIs y cánceres como los de mama, páncreas, colon, etc. Sin embargo es muy escasa la literatura científica en relación a los cánceres de cabeza y cuello y AGPIs, particularmente en los cánceres que se producen en glándulas submandibulares. Por lo cual resulta interesante corroborar que los mecanismos ya descritos en otros cánceres presentan procesos similares en glándulas submandibulares, recordando que es un cáncer muy agresivo, con mal pronóstico y, que en general, es diagnosticado en estadios tardíos; es por ello que resultaría altamente beneficioso para la población determinar delineamientos dietarios que permitan prevenir este tipo de cáncer.

Los estudios moleculares sobre el papel de los lípidos en relación a factores de transcripción que inciden en la proliferación de células tumorales, permitirá diseñar en un futuro nuevas estrategias preventivas, terapias génicas y drogas para prevenir la aparición del cáncer y/o inhibir su desarrollo.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La dieta enriquecida con ácidos grasos ω -3 y ω -6, modificaría la regulación del ciclo celular y la apoptosis por alteraciones en la composición lipídica de la membrana celular, expresada diferencialmente por biomarcadores como TP53 y Ki-67, y por el número de células apoptóticas en la tumorigénesis, inducida con DMBA en glándulas submandibulares murinas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es evaluar el impacto de las dietas enriquecidas con ácidos grasos de las familias ω -3 y ω -6 sobre la regulación del ciclo celular y la apoptosis mediados por las alteraciones lipídicas de las membranas celulares evaluada por la expresión de biomarcadores como TP53 y Ki-67 y por el número de células apoptóticas en la tumorigénesis inducida con DMBA en glándulas submandibulares murinas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Inducir tumores experimentales en animales BALB/c utilizando como agente carcinogénico el DMBA en ratones alimentados con dietas enriquecidas con diferentes proporciones de ácidos grasos insaturados (ω -3 y ω -6).
- b. Evaluar los cambios celulares de las glándulas inyectadas con DMBA mediante técnicas histológicas de rutina.
- c. Analizar el perfil de ácidos grasos de las membranas de células tumorales de los huéspedes alimentados con dietas enriquecidas con AGPIs, ω -3 y ω -6 en distintos estadios del desarrollo tumoral en huéspedes controles e inyectados con DMBA.
- d. Determinar la expresión diferencial de los biomarcadores TP53 y Ki67 en la tumorigénesis inducida en las glándulas submandibulares de huéspedes controles e inyectados con DMBA alimentados con dietas enriquecidas con AGPIs, ω -3 y ω -6.
- e. Determinar el número de células apoptóticas en la tumorigénesis inducida en las glándulas submandibulares de huéspedes controles e inyectados con DMBA sometidos a dietas enriquecidas con AGPIs, ω -3 y ω -6.
- f. Determinar la relación de los AGPIs, ω -3 y ω -6 y sus derivados eicosanoides- 13 (S) HODE y 12 (S) HETE, 15 (S) HETE. 5 (S) HETE y 12 (S) HHT-y la expresión de los biomarcadores TP53 y Ki-67y de apoptosis en la tumorigénesis de huéspedes controles e inyectados con DMBA alimentados con dietas enriquecidas con AGPIs, ω -3 y ω -6.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y Dieta

Se utilizaron 71 ratones de la cepa BALB/c (machos y hembras, n=34 DMBA; n=37 controles) endocriados (consanguinidad) cuya característica principal es la isogeneidad o igualdad genética, lo cual facilita el intercambio de células del sistema inmune o células tumorales y permite la amplia susceptibilidad a los carcinógenos, por lo tanto nos permite minimizar las diferencias probables que sugieran entre los distintos sexos. (http://www.informatics.jax.org/external/festing/search_form.cgi) suministrados por el Instituto de Biología Celular de la Universidad Nacional de Córdoba, que se dividieron del siguiente modo:

- Maíz, n=24 (14 controles y 10 DMBA);
- Chía, n=25 (13 controles y 12 DMBA);
- Cártamo, n=22 (10 controles y 12 DMBA);

El protocolo para el uso de animales fue realizado bajo los lineamientos de la guía de cuidado y usos de cuidado de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud, los cuales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba-Argentina.

Los animales, después del destete, fueron aleatoriamente alojados en grupos de a cuatro en cajas de policarbonato. Los mismos fueron alimentadas *ad libitum* con dieta y agua a demanda, y mantenidos con temperatura controlada de 23/24C° y con ciclos de luz / oscuridad de 12:12 h.

Todas las dietas estuvieron compuestas por una base semi-sintética que contenía: caseína 17%, sucrosa 33%, fécula de maíz 38%, fibras 2%, mezcla de sales 3,5% y mezcla de vitaminas 0,5%. Esta dieta base fue suplementada con:

1. Dieta Maíz: 6% de aceite de *Zea mays*, rico en ω -6 y ω -3;
2. Dieta Cártamo: 6% de aceite de *Carthamus tinctorius*, rico en ω -6 o;
3. Dieta Chía: 6% de aceite de *Salvia hispanica*, rica en ω -3.

Se realizó un seguimiento diario de los animales y se registró el consumo de dieta, midiendo el peso de los mismos periódicamente. Los AGPIs ω -3 fueron provistos a través de aceite de semilla de la chía de Nutraceutica Sturla S.R.L. (Argentina), mientras que la

fuelle de AGPIs ω -6 fue a partir de aceite obtenido de la semilla de maíz de Arcor S.A. (Argentina). El aceite de Cártamo fue donado por la empresa Argentina Bunge SA (Santa Fe, Argentina).

El protocolo de experimentación se muestra en la Fig.10:

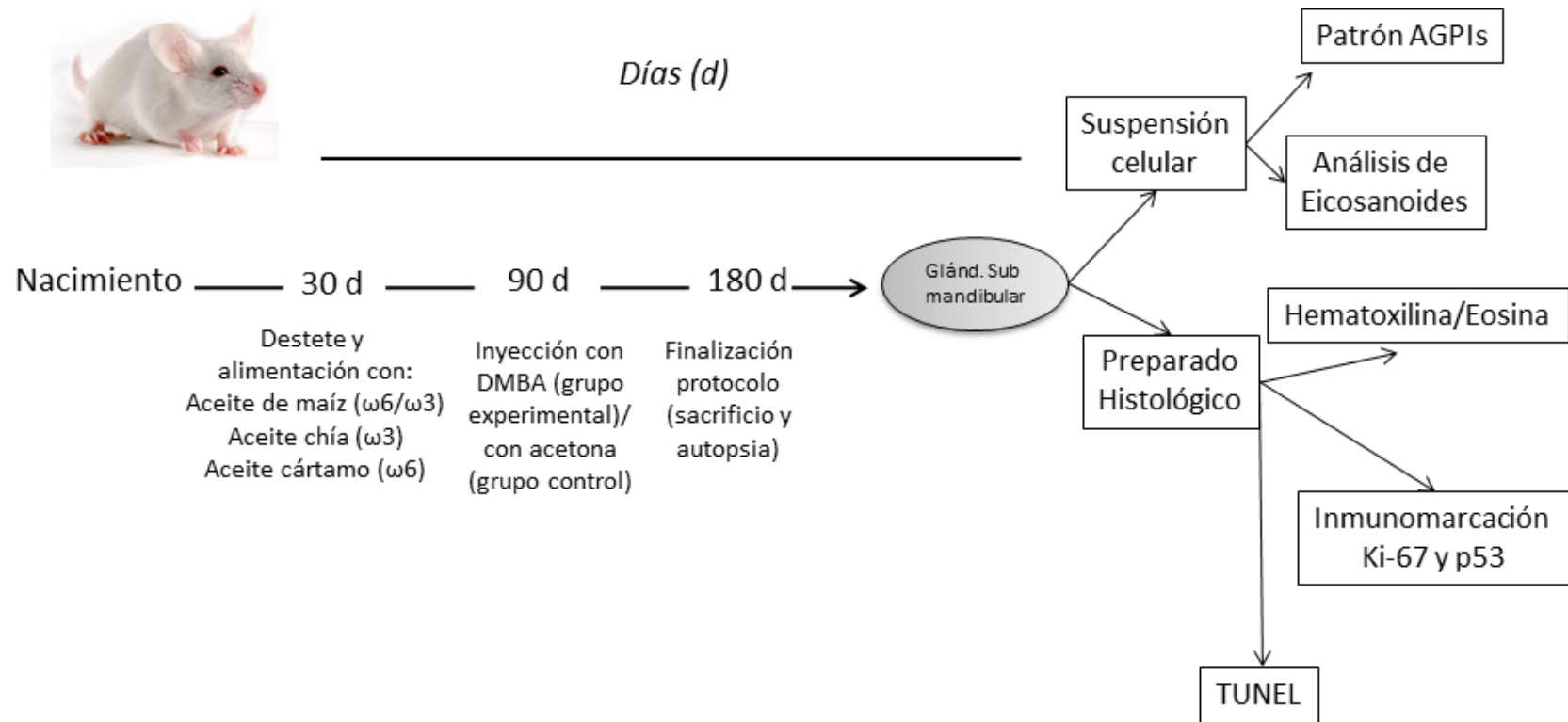


Figura 10. Esquema del protocolo de experimentación .AGIPs: ácidos grasos poliinsaturados

Inducción de tumor

Todos los animales fueron anestesiados mediante inhalación con Isoflurano.

Los animales experimentales (grupo DMBA) fueron inyectados subcutáneamente, una sola vez, a la altura de las glándulas submandibulares- con 50 μ l de 0.5 % de DMBA (SIGMA ALDRICH, USA) disuelto en acetona a los 90 días a partir del destete. Mientras que los animales del grupo control fueron inyectados bajo el mismo procedimiento pero con 50 μ l del vehículo (acetona).

Las glándulas submandibulares fueron removidas completamente a los 90 días post inyección (180 días posteriores al nacimiento). Se realizaron descripciones macroscópicas y posteriormente, las glándulas fueron seccionadas en partes, las cuales se destinaron para estudios bioquímicos de lípidos, estudios histopatológicos e inmunocitoquímicos.

Determinación de perfiles de ácidos grasos de membranas de células tumorales y no tumorales

El perfil de ácidos grasos de membranas de las células se realizó siguiendo la metodología propuesta por Calderón& Eynard, 2000.

Suspensiones de 6×10^7 células se homogeneizaron en buffer hipotónico en frío (50 mM de manitol + 5 mM Hepes) y se resuspendieron luego con CaCl_2 1M. Sus membranas fueron separadas en ultra-centrífuga a 35000 rpm durante 30 min. La extracción y partición de lípidos totales de membranas se realizó con soluciones de cloroformo:metanol (1:2 v/v) y cloroformo: metanol:agua (3:48:47 v/v) (Jaehne et al., 2005)

La saponificación de los lípidos extraídos se llevó a cabo con una solución de KOH 10 % (p/v) en metanol 50 % (v/v). Posteriormente se realizó la esterificación empleando una solución de HCl 3 % (v/v) en metanol. Finalmente, los ésteres metílicos de AG se identificaron y cuantificaron, comparando sus tiempos de retención relativos con estándares comerciales (Un-Chek.Prep, MN, USA) por GLC mediante Cromatógrafo de gas (Perkin Elmer precisely, Clarus 500 GC, Connecticut, USA).

Determinación de Peroxidación Lipídica Enzimática (LA, LOXs y COXs) por HPLC

La actividad enzimática se determinó mediante el análisis por cromatografía líquida de Alta Performance (HPLC) en un cromatógrafo Beckman System Gold provisto de bomba binaria y detector UV, de acuerdo a técnicas empleadas en nuestro laboratorio (García et al 2015).

Se evaluó la producción de los siguientes metabolitos derivados enzimáticamente del AA: 12(S)-HHT producidos por la vía COX, el cual es generado normalmente en cantidades equimolares con el malondialdehído (MDA), cuya producción y determinación constituye un valioso parámetro para medir peroxidación lipídica), 12-(S)-HETE, 15-(S)-HETE y 5-(S)-HETE por la vía de las LOXs y metabolitos derivados del ácido linoleico, el 13-(S)-HODE.

Los eicosanoides fueron identificados comparando sus tiempos de retención relativos y espectros UV con estándares comerciales (BIOMOL Research Laboratory Inc. USA). Los mismos se cuantificaron mediante una curva de calibración con cada uno de los estándares comerciales y se expresó como ng/ 7×10^6 células/ml (Pasqualini et al., 2003; Espada et al., 2007; Comba et al., 2010).

Análisis Histológicos

Las glándulas fueron fijadas en formol al 10%, tamponado con acetil piridina clorhídrico pH 7. Se procesaron de acuerdo a la técnica de rutina para inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina. Las secciones se examinaron con microscopio para su descripción morfológica siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (Barnes et al., 2005).

Inmunohistoquímica

La inmunomarcación del tejido neoplásico y normal de las glándulas submandibulares se realizó en secciones tisulares de 4- μm previamente fijados e incluidos en parafina. Se utilizó la técnica peroxidasa-antiperoxidasa y avidina-biotina. Las secciones fueron desparafinadas con xilol, deshidratadas con grados crecientes de alcohol y lavadas con agua destilada. Las muestras fueron lavadas con Tris-buffer salino y calor durante 15

minutos a 100 °C en buffer citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) para recuperación de antígenos. Las tinciones inespecíficas fueron bloqueadas con suero bovino fetal al 5% en PBS durante 40 min. Después de los lavados con PBS, los preparados se incubaron durante 9-12 h a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo monoclonal específico (1:100). Luego se lavó 3 veces en PBS y se incubó con inmunoglobulina anti-igg de ratón (1:50) biotinilada. Para la inmunoperoxidasa se lavó nuevamente y se le adicionó el complejo avidina-biotina-peroxidasa y la marcación se reveló con tetrahidroclorato de diaminobenzidina (DAKO, USA). El control negativo se realizó por reemplazo del anticuerpo primario con buffer fosfato salino. El control positivo fueron las muestras de carcinoma de mama de ratón. Finalmente las preparaciones se colorearon con hematoxilina de Harris, deshidratadas y se montaron con Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania). Estudios controles se realizaron siguiendo el mismo protocolo, pero omitiendo el anticuerpo monoclonal primario.

Se utilizaron los anticuerpos:

- a. *Anti-Ki67* (Dako, USA), considerando positivo cuando se observó en las muestras inmunomarcadas en núcleo.
- b. *Anti-TP53* (Dako, USA) considerando positivo cuando se observó en las muestras inmunomarcadas en núcleo.

La inmunomarcación se consideró *negativa* cuando se observaron de 0–5% de células positivas, y *positiva* con $\geq 5\%$ células inmunomarcadas. El análisis de las muestras se realizó por un solo examinador a simple ciego. La inmunomarcación de los núcleos positivos a TP53 o Ki-67 se contabilizó en un área de $5.10^{-3} \mu\text{m}^2$ para cada experimento. Los valores representan el valor de la mediana de 3 muestras independientes divididas en 5 secciones cada una. Las secciones se analizaron por microscopía óptica a una magnificación de 400x (Gorna et al., 2004; Brunotto et al., 2006; Busamia et al., 2011).

Apoptosis

La degradación del ADN fue evaluada utilizando la técnica del TUNEL siguiendo el protocolo establecido para el reactivo Dead End Colorimetric Tunel System (Promega, Argentina) sobre secciones de tejidos de GSM embebidas en parafina. El número de núcleos apoptóticos se contó para cada experimento y se expresaron en relación al número total de núcleos en un área de $5.10^{-3} \mu\text{m}^2$. Los valores representan el valor de la

mediana de 3 muestras independientes divididas en 5 secciones cada una. Las secciones se analizaron por microscopía óptica a una magnificación de 400x.

Análisis Estadístico

Los datos de inmunomarcación, AGPIs y eicosanoides fueron descriptos mediante sus valores medios (media/mediana) y error estándar.

Las variaciones en los lípidos y sus derivados fueron analizados mediante prueba de Kruskal Wallis (ANOVA no paramétrico) y comparaciones de a pares a posteriori para significancia entre ácidos grasos saturados e insaturados e inmunomarcación de TP53 y Ki67 y número de núcleos apoptóticos identificados con la técnica TUNEL. Además para evaluar la significancia de los eicosanoides se utilizó un modelo lineal generalizado con componente aleatorio gamma y función de enlace canónica (la medición de AGPIs y eicosanoides fue considerada variable dependiente en tanto que tipo de aceite adicionado a la dieta y tratamiento o no con DMBA fueron variables independientes (García et al., 2015). En todos los casos se fijó un p-valor<0.05 para significación estadística. Se utilizó el software libre R (www.r-project.org).

RESULTADOS

Inducción de tumores

Del total de animales inoculados con DMBA el 73,5% (25/34) generó cambios evidentes relacionados a procesos tumorigénicos como displasias, alteraciones del estroma glandular, etc., en un período de tiempo entre 3 y 4 meses post inyección. Los animales tratados con DMBA exhibieron una congestión significativa en la región glandular. En algunos casos se observaron hipertrofia glandular y de la cadena ganglionar subyacente a la glándula; y a nivel microscópico se observó desorganización del estroma glandular, siendo más evidente en los animales alimentados con Maíz y Cártamo (Fig. 12 y 13, tinción con H/E). En tanto en los animales controles no se observaron ninguna alteración macroscópica o histológica similar a displasias y/o neoplasias (Fig. 12 a 14, tinción con H/E).

Peso y sobrevivida de los animales

El peso promedio de los animales al momento del destete y a los 30 días se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Pesos en gramos (g) de los animales en cada grupo y dieta al momento del destete y a los 30 d

Grupo	Dieta	Momento	Peso (g)		
			Media	D.E.	Mediana
Control	Cártamo	Destete	11,83	0,29	12,00
		30 días	13,90	0,10	13,90
	Chía	Destete	13,20	1,10	14,00
		30 días	18,33	2,89	20,00
	Maíz	Destete	13,50	0,50	13,50
		30 días	17,00	0,35	17,00
DMBA	Cártamo	Destete	18,50	0,50	18,50
		30 días	18,50	0,50	18,50
	Chía	Destete	12,75	1,26	13,00
		30 días	19,07	0,40	19,00
	Maíz	Destete	12,00	2,16	12,50
		30 días	21,26	0,96	21,51

Respecto a la sobrevivida, del número inicial de animales en cada dieta, sobrevivieron el 100% en los grupos alimentados con chía y maíz hasta el momento del sacrificio y autopsia. Mientras que en los animales alimentados con dieta cártamo se registraron 3 muertes en los controles y 3 muertes en los tratados con DMBA.

Perfil de Ácidos Grasos en membranas celulares

En la Tabla 1 se muestran los niveles de ácidos grasos saturados, donde se observa que en general no hubo diferencias significativas entre grupos para las distintas dietas; con excepción del 18:0, donde se observó una disminución significativa de este ácido graso saturado en las membranas de las GSM de los animales inyectados con DMBA en la dieta chíá.

Los ácidos grasos 14:0 y 16:0 variaron significativamente entre los grupos control y DMBA, solo en la dieta cártamo (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos de membranas de las células de GSM de ratones. Ca: aceite cártamo; Ch: aceite chíá; M: aceite maíz. (*) Prueba de Kruskal Wallis. Letra negrita e *italica* indica diferencias significativas para un p-valor $\leq 0,05$. El valor p dieta indica la diferencias significativas entre las dietas administradas a los animales en cada tratamiento; p grupo indica diferencia entre los valores de cada ácido graso entre controles y DMBA. Cada valor representa la media \pm desvío estándar (DE) y la mediana de 5 experimentos separados.

Ácidos grasos Saturados	Control					DMBA				P grupo(*)
	Dieta	Media	DE	Mediana	P dieta (*)	Media	DE	Mediana	P dieta(*)	
14:0 (Ac. mirístico)	Ca	1.85	0.46	2.11	0.4506	0.07	0.04	0.07	0.2571	0.0357
	Ch	1.33	0.64	1.23		0.65	0.82	0.65		0.6000
	M	0.77	1.33	0.001		0.04	0.02	0.03		0.6000
16:0 (Ac. Palmítico)	Ca	23.75	1.80	23.22	0.2786	2.07	0.86	2.00	0.1365	0.0357
	Ch	28.03	1.22	28.15		15.55	19.02	15.55		0.8000
	M	27.53	7.63	24.16		1.03	0.05	1.01		0.1000
18:0 (Ac. esteárico)	Ca	9.49	0.89	9.12	0.2786	7.04	9.35	0.32	0.0210	0.7857
	Ch	18.02	9.58	13.23		14.97	2.78	14.97		0.9999
	M	13.17	5.12	15.38		0.003	0.003	0.01		0.1000
24:0 (Ac. lignocérico)	Ca	0.71	1.23	0.001	0.5714	0.05	0.08	0.00	0.3889	0.7143
	Ch	0.001	0.0001	0.001		0.22	0.31	0.22		0.9999
	M	1.32	1.14	1.96		0.001	0.0001	0.0001		0.1000

En la Tabla 2 se muestran los niveles medidos de Ácidos Grasos Insaturados presentes en las membranas de las GSM de los animales controles o inyectados con DMBA y alimentados con los tres tipos de aceites.

En los animales tratados con DMBA se observó un incremento altamente significativo de AA en aquellos alimentados con dieta cártamo (58,74) y maíz (61,37) en relación a los alimentados con dieta chía (1,17) (Tabla 2).

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos insaturados de las membranas de las células de GMS de ratones. Ca: aceite cártamo; Ch: aceite chía; M: aceite maíz. (*) Prueba Kruskal Wallis. El super índice y la letra negrita e itálica indican diferencias significativas para un p-valor $\leq 0,05$. El valor $p^{dieta (*)}$ indica las diferencias significativas entre las dietas administradas a los animales controles y a los tratados con DMBA; $p^{grupo (*)}$ indica diferencia entre los valores de cada ácido graso entre controles y DMBA en cada dieta suministrada. Cada valor representa la media \pm desvío estándar (DE) y la mediana de 5 experimentos separados.

Ácidos grasos Insaturados		Control					DMBA				P grupo (*)
		Dieta	Media	DE	Mediana	$p^{dieta (*)}$	Media	DE	Mediana	$p^{dieta (*)}$	
ω -7	PA 16:1	Ca	5.04	0.86	5.2	0.375	0.03	0.07	0.002	<i>0.0218</i>	<i>0.0357</i>
		Ch	8.1	4.27	9.02		1.81	2.3	1.81 ^a		0.3000
		M	3.2	3.12	1.87		0.00	0.00	0.00		0.1000
ω -9	OA18:1	Ca	19.98	1.71	19.68	0.7214	13.39	8.65	17.99	0.9167	0.2500
		Ch	14.63	8.95	18.49		12.05	8.42	12.05		0.6000
		M	19.52	1.61	18.88		11.83	0.19	11.8		0.1000
	24:1	Ca	0.0006	0.0006	0.001	0.9999	1.25	1.12	1.74	0.1373	0.1429
		Ch	0.001	0.000	0.001		0.00	0.00	0.00		0.1000
		M	0.0007	0.0006	0.001		0.19	0.11	0.12		0.1000
ω -6	LA 18:2	Ca	19.65	2.96	20.86	0.0857	14.59	13.49	11.09	0.9167	0.7857
		Ch	9.81	4.36	7.87		17.83	4.00	17.83		0.2000
		M	17.2	2.62	18.13		17.22	0.4	17		0.7000
	GLA 18:3	Ca	0.001	0.000	0.001	0.6786	0.09	0.11	0.04	0.3393	0.6964
		Ch	0.4	0.69	0.001		25.69	36.34	25.69		0.6000
		M	0.08	0.07	0.11		0.00	0.00	0.00		0.1000
	AA 20:4	Ca	0.0006	0.0006	0.001	0.9999	58.74	6.96	57.99	<i>0.0595</i>	<i>0.0357</i>
		Ch	0.001	0.000	0.001		1.17	1.17	1.17		0.1000
		M	0.0007	0.0005	0.001		61.37	3.08	61.08		0.1000
ω -3	ALA 18:3	Ca	0.001	0	0.001	<i>0.0143</i>	0.08	0.13	0.05	0.096	0.6964
		Ch	6.8	1.58	5.96 ^a		3.3	3.82	3.3		0.6000
		M	0.03	0.03	0.02		0.02	0.01	0.02		0.9999
	EPA 20:5	Ca	0.0003	0.0005	0	<i>0.0054</i>	0.12	0.17	0.07 ^a	<i>0.0198</i>	0.1425
		Ch	0.82	0.39	0.7 ^a		0.79	0.29	0.79		0.9999
		M	0.08	0.13	0.001		0.36	0.08	0.35		0.1000
	DPA 22:5	Ca	0.0003	0.0005	0.0001	0.0714	5.45	10.82	0.95	0.3429	<i>0.0357</i>
		Ch	0.7	0.7	0.71		0.5	0.71	0.5		0.6000
		M	0.14	0.25	0.001		0.08	0.07	0.1		0.9999
	DHA 22:6	Ca	0.1	0.18	0.00	0.4107	2.46	2.27	1.76	0.3889	0.7142
		Ch	1.48	1.29	2.04		1.00	1.41	1.00		0.6000
		M	0.54	0.93	0.001		4.03	0.06	4.01		0.1000

El perfil de ácidos grasos de las membranas de células tumorales de los animales alimentados con dietas enriquecidas con AGPIs, ω -3 y ω -6 en distintos estadios del desarrollo tumoral fue evaluado por medio del Índice de insaturación y por la relación entre ω -6 / ω -3.

En los animales inyectados con DMBA y alimentados con dieta Chía se observó un Índice de Insaturación significativamente menor (2,08; $p=0,027$) con respecto a las otras dos dietas (Tabla 3).

Por otra parte las dietas Cártamo (15,27; $p=0,0357$) y Maíz (88,63; $p=0,0025$) mostraron un mayor índice de insaturación con respecto a sus correspondientes controles para cada dieta (Tabla 3).

En la Fig. 11 se observa la relación entre ω -6 / ω -3, si bien no hubo diferencias significativas, por la elevada dispersión en los niveles de los ácidos grasos medidos, se observó que esta relación tuvo una tendencia a disminuir en los animales alimentados con aceite de Chía tanto en los controles (8,97) como tratados los tratados con DMBA (2,40).

Tabla 3. Porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados e Índice de Insaturación de las membranas celulares de GSM de ratones. Ca: aceite cártamo; Ch: aceite chía; M: aceite maíz. (*) Prueba Kruskal Wallis. El super índice y la letra negrita e itálica indican diferencias significativas para un p -valor $\leq 0,05$. El valor p^{dieta} indica la diferencias significativas entre las dietas administradas a los animales en cada tratamiento; p^{grupo} indica diferencia entre los valores de cada ácido graso entre controles y DMBA. Cada valor representa la media \pm desvío estándar (DE) y la mediana de 5 experimentos separados.

Dieta	Control				DMBA				$P^{(grupo)}$
	Ác.grasos saturados	Ác.grasos insaturados	Indice Insat.	$P^{(dieta)}$	Ác.grasos saturados	Ác.grasos insaturados	Indice Insat.	$P^{(dieta)}$	
Ca	47,38	62,99	1,33	0,500	9,22	140,80	15,27	<i>0,027</i>	<i>0,0357</i>
Ch	43,59	97,83	2,24		30,98	64,43	2,08 ^a		0,1000
M	36,5	86,87	2,38		1,07	95,12	88,63		<i>0,0025</i>

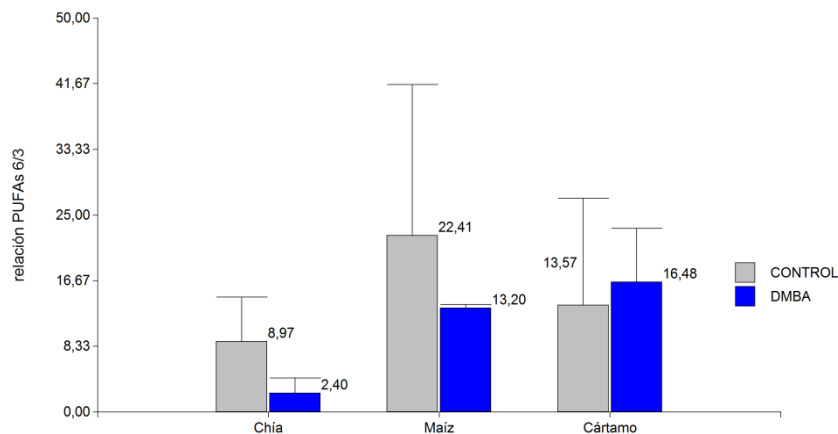


Figura 11. Relación entre AGPIs $\omega 6/\omega 3$ presentes en las membranas celulares de las GMS de ratones tratados o no con DMBA y alimentados con aceite de Chía, Maíz y Cártamo. Cada valor representa la media \pm desvío estándar (DE) de 5 experimentos separados

Eicosanoides

A nivel de los eicosanoides observamos que el 12 (S)-HHT disminuyó su porcentaje significativamente en relación a los controles en los animales inyectados con DMBA y alimentados con las tres dietas, igual comportamiento se observó en el eicosanoide 5 (S)-HETE, con excepción de la dieta chía en donde no se modificó su valor medio entre los controles y los tratados con DMBA (Tabla 4).

En tanto que 13 (S)-HODE y 15 (S)-HETE disminuyeron significativamente en las dietas Chía y maíz. Por otra parte se observó un incremento significativo, de estos dos eicosanoides, en la dieta maíz en relación a los controles (Tabla 4).

El 12 (S)-HETE se observó incrementado significativamente en las animales alimentados con Cártamo y maíz (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de Eicosanoides de GSM de ratones alimentados con las diferentes dietas y tratados o no con DMBA. (*)P-valor estimado mediante modelo generalizado con componente aleatorio gama. Ca: aceite cártamo; Ch: aceite chía; M: aceite maíz. Un p-valor ≤ 0.05 indica significación estadística. Cada valor representa la media \pm desvío estándar (DE) y la mediana de 5 experimentos independientes.

Eicosanoide	Dieta	Control			DMBA			P grupo(*)
		Media	DE	Mediana	Media	DE	Mediana	
12 (S) HHT	Ca	0.48	0.61	0.28	0.00	0.00	0.00	0.0001
	Ch	0.42	0.14	0.44	0.00	0.00	0.00	
	M	0.28	0.44	0.00	1.52	2.63	0.00	
13(S) HODE	Ca	0.69	1.26	0.09	0.00	0.00	0.00	0.0001
	Ch	1.53	1.11	1.78	0.31	0.44	0.31	
	M	0.21	0.34	0.00	1.22	1.19	1.29	
15 (S) HETE	Ca	0.69	1.02	0.30	0.00	0.00	0.00	0.005
	Ch	0.91	1.14	0.54	0.11	0.16	0.11	
	M	1.22	1.81	0.17	0.50	0.61	0.33	
12 (S) HETE	Ca	0.10	0.18	0.02	1.02	0.10	1.02	0.0001
	Ch	0.34	0.29	0.29	0.00	0.00	0.00	
	M	0.51	0.40	0.48	0.60	0.61	0.58	
5 (S) HETE	Ca	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.0001
	Ch	0.04	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	
	M	0.17	0.16	0.19	0.75	1.30	0.00	

Inmunomarcación

Cuando se evaluó la expresión de los inmunomarcadores se observó que TP53 sólo se expresó en los animales inyectados con DMBA y alimentados con dieta maíz (Fig. 12), en tanto que Ki67 se expresó en los animales inyectados con DMBA y alimentados con las tres dietas, pero con mayor valor medio significativamente en las membranas celulares de las GSM de los animales alimentados con aceite de cártamo (Fig. 12 a 14; Tabla 5).

Tabla 5. Valores de medios (mediana) de inmunomarcación de núcleos por cada $5.10^{-3} \mu\text{m}^2$ de área. (*)Prueba Kruskal Wallis, un $p\text{-valor} \leq 0.05$ indica significación estadística. Ca: aceite cártamo; Ch: aceite chía; M: aceite maíz. El valor p^{dieta} indica la diferencias significativas entre las dietas administradas a los animales en cada tratamiento; p^{grupo} indica diferencia entre los valores de cada ácido graso entre controles y DMBA. Cada valor representa la media \pm desvío estándar (DE) y la mediana de 5 experimentos separados.

Inmunomarcador	Dieta	Control		DMBA	
		Mediana	$P^{\text{dieta} (*)}$	Mediana	$P^{\text{dieta} (*)}$
TP53	Ca	0.00	0.9999	0.00	0.0001
	Ch	0.00		0.00	
	M	0.00		6.00*	
Ki-67	Ca	0.00	0.9999	14.00**	0.0001
	Ch	0.00		2.50	
	M	0.00		6.00*	

Apoptosis

Contrariamente a lo observado con los biomarcadores TP53 y Ki-67, solo se observaron células apoptóticas en las muestras de GSM de los animales controles. Siendo mayor el número de apoptosis en los huéspedes alimentados con Chía, seguidos en orden decreciente por los alimentados con aceite de Cártamo y Maíz (Fig 15).

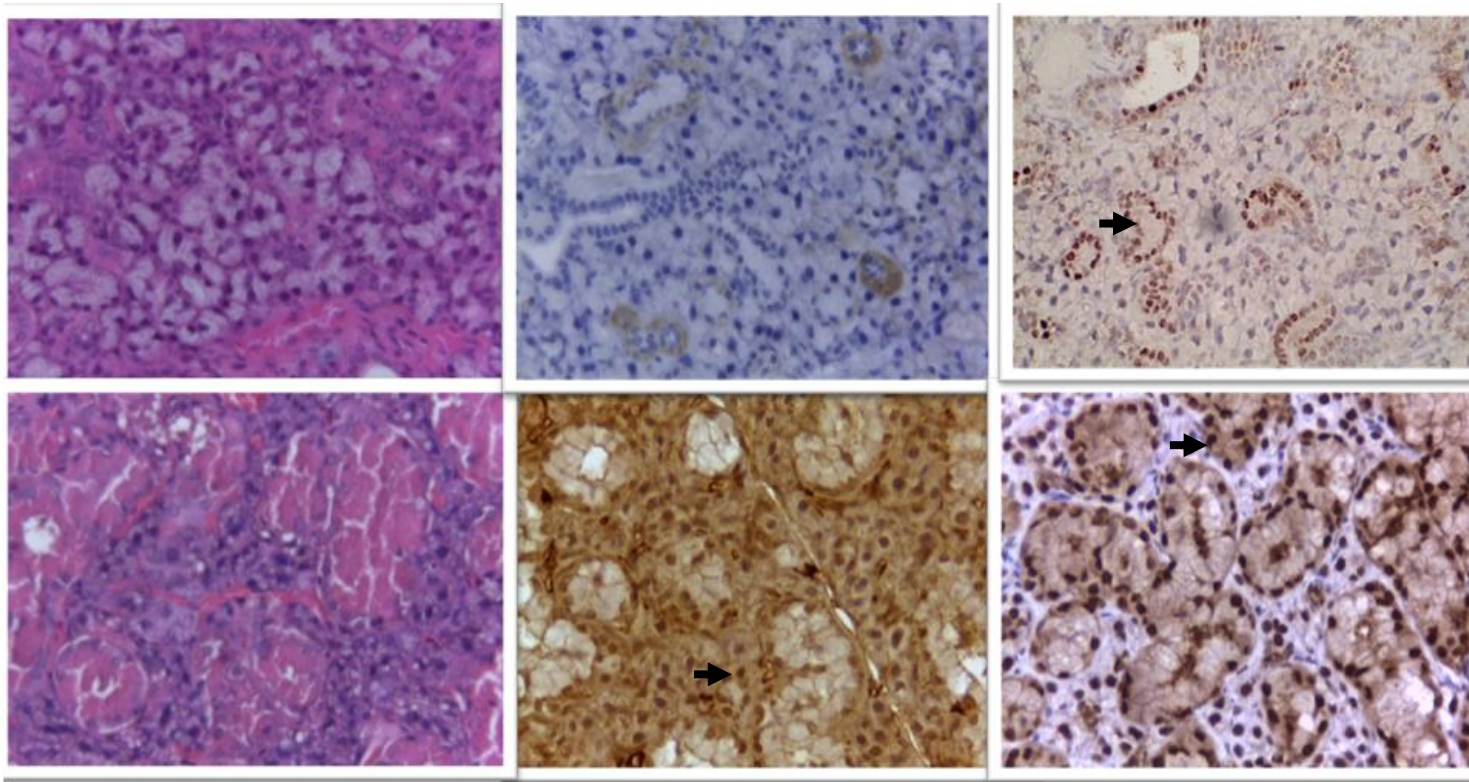


Figura 12. Glándula submandibular de ratón alimentado con aceite de maíz, x40. *Superior:* controles, *Inferior:* DMBA. **De- izq. a der. :** H/E, inmunomarcación con p53, inmunomarcación Ki-67. *Flecha negra:* núcleo inmunomarcado. La inmunomarcación fue considerado negativo cuando se observaron 0-5% células positivas. El análisis de las muestras fue realizado por un examinador a ciego. La inmunomarcación positiva fue contabilizada para cada experimento como el total del número de núcleos positivos en un área de $5 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$. Las secciones fueron analizadas por microscopía óptica a una magnificación de 400 X

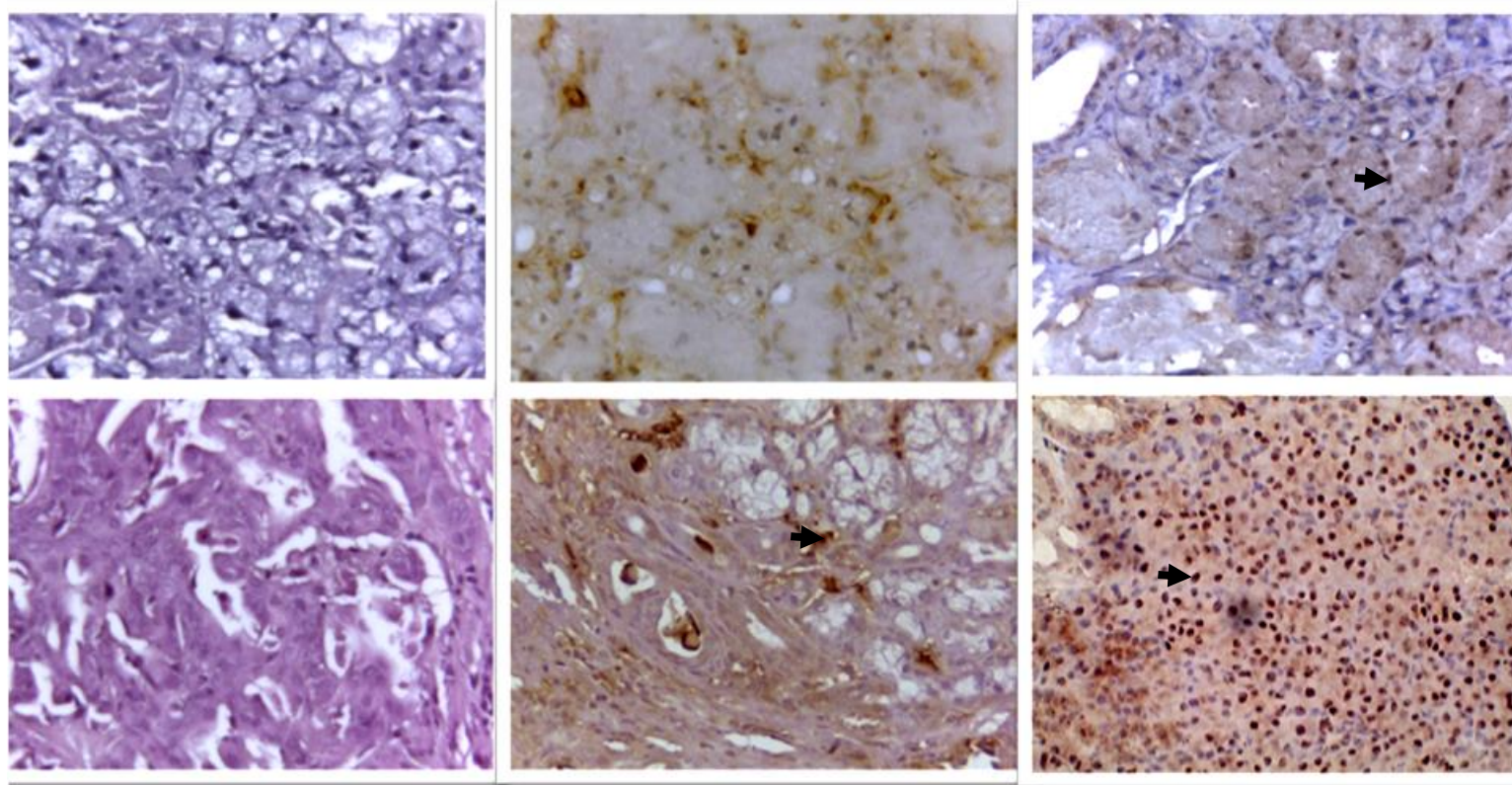


Figura 13. Glándula submandibular de ratón alimentado con aceite de cártamo, x40. *Superior:* controles, *Inferior:* DMBA. **De- izq. a der. :** H/E, inmunomarcación con p53, inmunomarcación Ki-67. *Flecha negra:* núcleo inmunomarcado. La inmunomarcación fue considerado negativo cuando se observaron 0-5% células positivas. El análisis de las muestras fue realizado por un eximandor a ciego. La inmunomarcación positiva fue contabilizada para cada experimento como el total del número de núcleos positivos en un área de 5.10^{-3} mm^2 . Las secciones fueron analizadas por microscopía óptica a una magnificación de 400 X

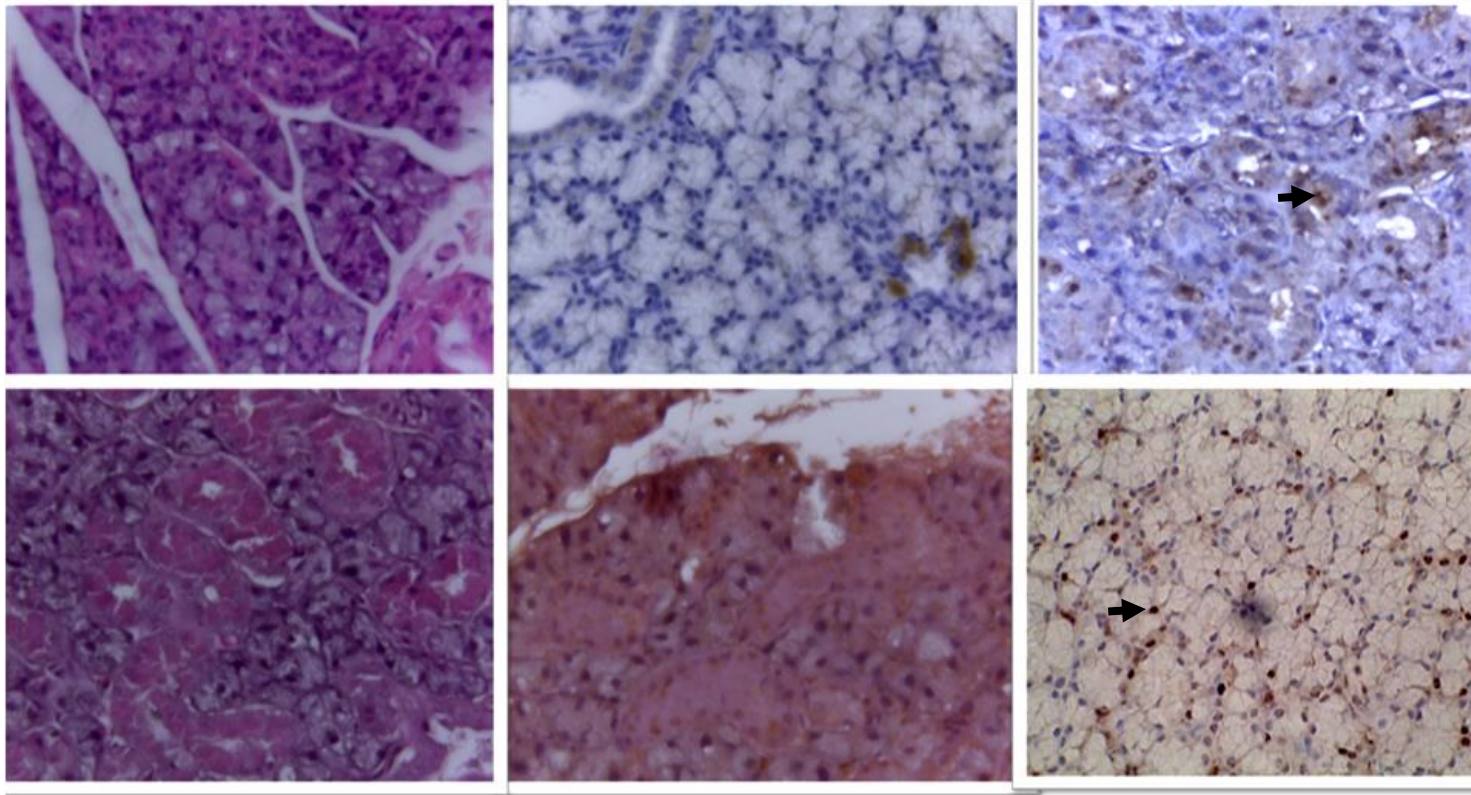


Figura 14. Glándula submandibular de ratón alimentado con aceite de chía, x40. *Superior:* controles, *Inferior:* DMBA. **De- izq. a der. :** H/E, inmunomarcación con p53, inmunomarcación Ki-67. *Flecha negra:* núcleo inmunomarcado. La inmunomarcación fue considerado negativo cuando se observaron 0-5% células positivas. El análisis de las muestras fue realizado por un eximandor a ciego. La inmunomarcación positiva fue contabilizada para cada experimento como el total del número de núcleos positivos en un área de $5 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$. Las secciones fueron analizadas por microscopía óptica a una magnificación de 400 X

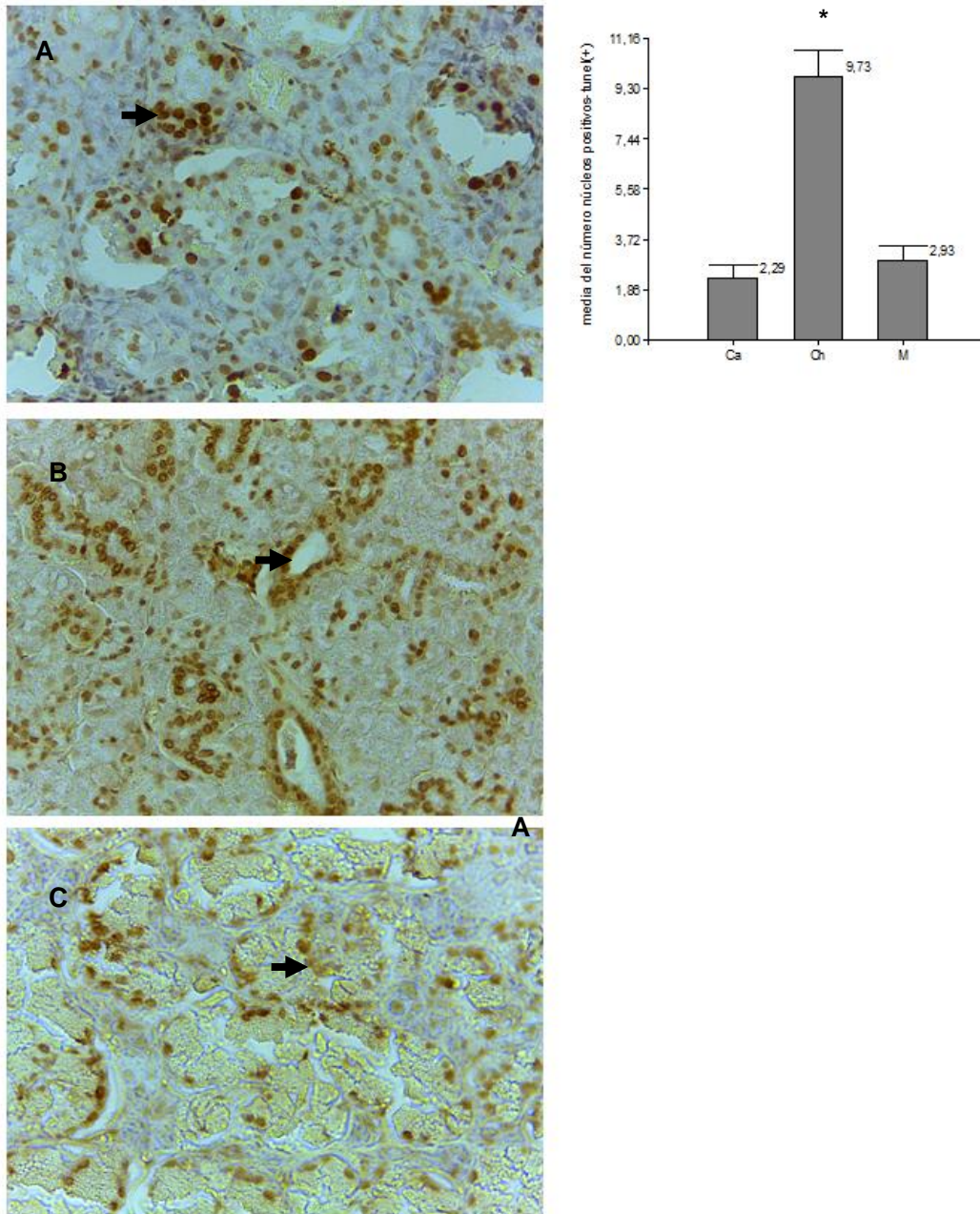


Figura 15. Valores de medios (mediana) de inmunomarcación de núcleos por cada $5.10^{-3} \mu\text{m}^2$ de área en las muestras controles. (*)Prueba Kruskal Wallis, p-valor=0.0001. **A)**Ca: aceite cártamo; **B)**Ch: aceite chía;**C)** M: aceite maíz. *Flecha negra:* núcleo apoptótico. La inmunomarcación fue considerado negativo cuando se observaron 0-5% células positivas. El análisis de las muestras fue realizado por un examinador a ciego. La inmunomarcación positiva fue contabilizada para cada experimento como el total del número de núcleos positivos en un área de 5.10^{-3}mm^2 . Las secciones fueron analizadas por microscopía óptica a una magnificación de 400 X

DISCUSIÓN

El cáncer es una patología compleja, y la incidencia y sobrevida, de los pacientes que padecen esta enfermedad, están estrechamente relacionadas a los determinantes sociales de la salud. En países con bajos ingresos económicos, en general, la población es más vulnerable a desarrollar enfermedades por estar más expuestos a factores de riesgo como agentes infecciosos, hábitos de fumar, de beber alcohol, una dieta no saludable y un deficiente sistema de salud pública (WHO, 2013; González Segura et al, 2015).

En nuestro estudio un alto porcentaje de los animales inyectados con DMBA en las GSM generaron cambios displásicos similares a los tumorigénicos iniciales que concuerdan con los observados por el accionar de este hidrocarburo policíclico aromático en diferentes modelos experimentales de inducción de cáncer (Brunotto et al., 2006). Estas observaciones son coincidentes con las realizadas por nosotros en un estudio previo de carcinogénesis inducida por DMBA en glándulas submandibulares de ratas Wistar; en las cuales observamos, a tiempos tempranos, alteraciones similares a las descritas para carcinomas de bajo grado en glándula submandibular (Brunotto et al., 2006; 2009). Como anteriormente se mencionó, es conocido que el accionar del DMBA presenta una vía metabólica similar a la observada en el metabolismo de la nicotina (Brunotto et al., 2006; Walle et al., 2006)

Respecto a la evaluación del perfil lipídico de las membranas celulares de las glándulas de los animales alimentados con los tres diferentes tratamientos dietarios e inyectados con DMBA, en este trabajo de investigación se observó una disminución significativa en los ácidos grasos saturados como 14:0, 16:0 y en general, dependiendo del tratamiento dietario, en ácidos grasos monoinsaturados 16:1, 18:1 y poliinsaturados como 18:2 ω -6 y 18:3 ω -3. Este hecho concuerda con estudios anteriores de nuestro laboratorio en donde se ha demostrado que las diferentes dietas generan cambios en el perfil lipídico de las membranas celulares de todos los tejidos incluidas los de GSM (Vara-Messler et al., 2015; Comba et al., 2010), y con experimentos realizados en otros laboratorios empleando hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) como el benzo[a]pireno (B[a]P), utilizado como inductor en un modelo para producir cambios carcinogénicos.

Estas variaciones observadas por nosotros pueden deberse al accionar de los HPAs, dado que se conoce que estos compuestos producen metabolitos electrofílicos reactivos y especies reactivas de oxígeno (ROS) que generan mutaciones y pueden ser iniciadores de tumores porque afectan procesos como la proliferación y la

comunicación celular e inducen apoptosis, porque el receptor Aril hidrocarbonado (AhR) y el grupo B[a]P producen remodelación de microdominios de las membranas celulares por una alcalinización intracelular y por regulación de la biosíntesis de lípidos (Tekpli et al, 2010). El incremento de lípidos totales, específicamente en el tejido adiposo, se ha asociado con la peroxidación lipídica, que se inicia a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, y por los cuales se generan ROS. Se conoce que un aumento de ROS en las células cancerosas actuarían a nivel del DNA generando mutaciones de purinas, pirimidinas y de productos de oxidación de la desoxirribosa como 8-hidroxi-2-deoxiguanosina. Los ROS, producidos por los procesos metabólicos celulares, participan en las diferentes etapas de la carcinogénesis (Choudhari et al., 2014).

Por otra parte, en concordancia con nuestros resultados, un estudio experimental realizado en glándulas submandibulares de ratas, mostró que la composición de fosfolípidos y triglicéricos se modificó en los animales tratados con AGPIs ω -3 aumentando los niveles de los mismos en las membranas celulares de estas glándulas (Delporte et al., 2007). Se conoce que las modificaciones de los niveles de AGPIs C22:5 ω -3 y C22:6 ω -3, pueden estar relacionadas con el incremento de la actividad Δ 9-desaturasa (Delporte et al., 2007).

Al valorar el contenido de AGPIs entre los tratamientos dietarios y sus derivados se observó que en los animales alimentados con dieta Chía, controles o con DMBA, mostraron un incremento significativo del porcentaje de ALA y EPA en las membranas celulares de las glándulas submandibulares. Este hecho es coincidente con estudios anteriores de nuestro laboratorio en donde se ha demostrado que el aceite de Chía, rico en ω -3, incrementa los porcentajes de los ácidos grasos de esta familia como ALA y EPA (Vara-Messler et al., 2015; Comba et al., 2010; Espada et al., 2007). Nuestras observaciones pueden explicarse porque la incorporación de los ácidos grasos α -linolenico (ALA, C18:3 ω -3), eicosapentaenoico (EPA, C20:5 ω -3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6 ω -3), pueden generar alteraciones significativas en la expresión de proteínas que modifican el microambiente y las interacciones entre las células (Whelan & Rust 2006; Aydin and Dogan 2010; Comba et al., 2011).

Además, en concordancia con nuestras observaciones un estudio realizado con aceite de soja y de pescado en relación al crecimiento de tumores en glándulas salivares de ratones machos BALB/c inyectados con DMBA mostró un diámetro y volumen del

tumor desarrollado en la glándula significativamente mayor en los animales alimentados con aceite de soja, rico en ω -6 en relación a los alimentados con aceite de pescado rico en AGPIs ω -3 (Actis et al., 2005). Se conoce que las diferentes concentraciones de GLA y ALA mostraron una actividad antitumoral de AGPIs ω -3, cuyo accionar estaría focalizado en alterar las propiedades biofísicas de las membranas plasmáticas de las células malignas. Los efectos de AGPIs ω -3 sobre las células cancerosas depende del tipo y concentración de éstas (Comba et al., 2011). Estudios epidemiológicos han sugerido que los AGPIs ricos en ω -3, pueden tener un rol en la inhibición de la carcinogénesis.

Por otra parte los animales alimentados con dieta cártamo y dieta maíz presentaron un porcentaje significativamente elevado en membranas celulares de GSM en los animales inyectados con DMBA, no observándose igual comportamiento en los animales controles alimentados con las mismas dietas. Estos hallazgos podrían explicarse por qué el DMBA podría estar accionando sobre la expresión génica de las enzimas Δ 6 y Δ 5 desaturasas lo cual conduciría a un aumento de este AGPIs. Estos resultados coinciden con otros estudios donde se investigó la modulación de la expresión génica c-erbB 1/ EGFR y c-erbB2/neu en tumorigénesis mamaria inducida por DMBA en ratas Sprague Dawley alimentadas con dieta enriquecida en aceite de maíz (rico en ω -6), en los cuales se corroboró un incremento de la expresión génica de genes pro-carcinogénicos respecto a los alimentados con una dieta enriquecida con aceite de oliva, baja en estos AGPIs (Moral et al., 2003). Además en trabajos previos de nuestro laboratorio, empleando dietas enriquecidas en AGPIs ω -6 se demostró un incremento de AA en las membranas de células tumorales en relación a dietas enriquecidas con ω -3 y ω -9 (Comba et al., 2010, Vara-Messler et al., 2015).

En general, los AGPIs ω -3 compiten con las AGPIs ω -6 por las enzimas COXs y las LOXs, promoviendo la reducción de los derivados eicosanoides del AA que presentan un comportamiento pro-inflamatorio. Por ejemplo, en estudios con aceite de pescado, rico en AGPIs ω -3 y sus derivados EPA y DHA, se ha observado que se inhibe la actividad de COX-2 y que está asociado a una menor incidencia de cánceres como el de próstata, mama y colon (Negi et al., 2013). En la bibliografía se ha descrito que la 5-LOX presenta una sobre expresión en cánceres como el de próstata, pancreático, colon, vejiga, testicular y esofageal. Particularmente en el cáncer de colon una sobre-expresión de la 5-LOX se asoció negativamente al pronóstico clínico; mientras que el

cáncer de páncreas esta enzima tiene un rol importante en la mediación del estrés oxidativo y la sobrevida celular inducida por la matriz extracelular. Además inhibidores de la vía de la 5-LOX, utilizados en diversas células cancerosas, presentaron una actividad antiproliferativa y proapoptótica (Sun et al., 2006).

La biodisponibilidad de los ácidos grasos en un individuo está influenciada por la presencia de otros ácidos grasos y desde hace unos años varias investigaciones se han focalizado en la aparente diferencia en relación al ácido linoleico (18:2 ω -6) y ALA en el tejido adiposo. En relación a ALA, éste parece no acumularse con la misma extensión que 18:2 ω -6, aun cuando ambos se consuman en cantidades equivalentes con la dieta. Los tejidos humanos muestran una acumulación diferencial de 18:2 ω -6 y ALA. Los factores que controlan la conversión de ALA a EPA y DHA pueden resultar importantes para determinar las cantidades adecuadas de ALA, EPA y DHA en las células, permitiendo que las mismas funcionen normalmente. Algunas investigaciones en ratas alimentadas con AGPIs muestran que se obtienen cantidades suficientes de ALA si se consumen elevados niveles de AGPI ω -3 con la dieta. El tejido adiposo normalmente no contiene AGPIs ω -6 y ω -3, sin embargo la acumulación de ALA en tejido adiposo incrementa de modo lineal en respuesta a un incremento del contenido de ALA en la dieta. Cuando se incrementa en la dieta cantidades de ALA de 2,5 al 25% se corresponde con una acumulación, en tejido adiposo, del 1,9 a 12,1% de ALA. Este hecho es de particular interés ya que el tejido adiposo es una importante reserva de ALA, pudiendo estar biodisponible cuando el cuerpo lo necesite (Talahalli et al., 2010). En general las células cancerosas sintetizan de novo grandes cantidades de ácidos grasos y colesterol con la finalidad de adquirir ventajas en el crecimiento, la sobrevida y la resistencia a fármacos. La base de estas alteraciones lipogénicas incluye una sobre expresión de enzimas relacionadas a las vías metabólicas de lípidos y la desregulación de la enzima 5-AMP-proteína cinasa activa; y es conocido que algunas líneas celulares tumorales son deficientes en Δ 5, Δ 6 desaturasas; siendo relevante en la transformación maligna, como se ha observado en gliomas en donde se demostró la acumulación de lípidos 18:1 y 18:2-AGPIs (Comba et al., 2011; Griffin and Shockcor, 2004).

Es conocido que los eicosanoides, incluyendo las prostaglandinas y leucotrienos, son biolípido biológicamente activos y que se los ha relacionado a procesos patológicos como la inflamación y el cáncer (Wang and DuBois, 2010).

El AA juega un rol importante en los procesos inflamatorios y particularmente en los asociados con enfermedades como el cáncer por ser sustrato de enzimas relacionadas a la producción de eicosanoides con acción pro-inflamatoria y pro-carcinogénica. Investigaciones han demostrado que animales con tumores mamarios inducidos por DMBA y alimentados con aceite de maíz presentaron una elevada incidencia de neoplasias sugiriendo que un alto contenido de AGPI ω -6 estimula el desarrollo de estas (Solanas et al., 2001).

Entre las vías metabólicas del AA, la vía 5-lipoxigenasa (5-LOX) produce un potente leucotrieno pro-inflamatorio como es el leucotrieno B₄ (LTB₄) que está relacionado a la promoción de la carcinogénesis oral. Asimismo algunos estudios mostraron que la composición de la dieta puede inhibir la vía 5-LOX, siendo ventajosa esta estrategia por no ser tóxica y por su permanencia en el tiempo.

De acuerdo a nuestros resultados descriptos anteriormente observamos un elevado porcentaje de AA en los animales inyectados con DMBA y alimentados con cártamo y maíz respecto a los controles alimentados con las mismas dietas. Sin embargo, los eicosanoides derivados del AA no aumentaron proporcionalmente.

Esto podría deberse a una alteración aberrante de la actividad de las enzimas LOXs y COXs por la acción del DMBA como se observó en un estudio experimental de inducción de cáncer oral en hámster, en donde los autores demostraron que la enzima 5-LOX se sobre-expresó durante la carcinogénesis oral y los niveles de LTB₄ se incrementaron en los tejidos tumorales en relación a los controles. Se ha reconocido como factor importante en la carcinogénesis el metabolismo aberrante del AA; en los cuales se ha observado una sobreexpresión de COX-2 en lesiones pre-malignas y malignas en cavidad bucal de pacientes con cánceres orales, corroborado por estudios experimentales de inducción de cáncer con 4-nitroquinolina-1-oxidasa en ratas y con DMBA en hámster, en los cuales la aplicación de inhibidores de la COX-2 demoran el crecimiento de las células tumorales (Tuncer et al., 2015).

Durante la carcinogénesis el equilibrio dinámico de las vías LOXs puede ser alterado y desviado hacia la enzima 15-LOX, con actividad anticarcinogénica o hacia las enzimas 5-, 8- y 12-LOX pro-carcinogénicas. La vía 5-LOX se ha estudiado en los procesos inflamatorios y se conoce que conduce a la formación de varios grupos de metabolitos como LTA₄H (del inglés leukotriene A₄ hydrolase), dependiente de la biosíntesis de LTB₄ (del inglés leukotriene B₄), la enzima leucotrieno C₄ sintetasa (LTC₄S, del

inglés leukotriene C4 synthase) dependiente de la biosíntesis de cisteín-leucotrienos como LTC₄, LTD₄ y LTE₄, 5-Lox, 5-lipoxygenase, el ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5 (S) HETE) y el 5-oxoETEs (Sun et al., 2006).

Por otra parte, el 12(S) HETE, como se menciona más arriba, se encuentra incrementado en las dietas cártamo y maíz (ricas en ω -6). Este eicosanoide ha sido demostrado que incrementa la proliferación celular por el aumento de la actividad mitótica. Coincidentemente en las mismas muestras hemos observado inmunomarcación positiva con Ki-67 aumentada en los huéspedes alimentados con cártamo en relación a los alimentados con maíz y chía. Esto concuerda con resultados de otras investigaciones, donde se ha estudiado al antígeno Ki-67 como biomarcador de proliferación celular de tumores de cabeza y cuello como los carcinomas de células escamosas indiferenciados y moderadamente diferenciados de mucosa oral (Vieira et al., 2008) o en carcinomas mucoepidermoides, adenocísticos, de células acinares y de conductos salivares, entre otros (Nagao et al., 2012). Además observamos que en los animales inyectados con DMBA y alimentados con dieta cártamo se incrementó el eicosanoide 12 (S) HETE y conjuntamente se observó inmunomarcación positiva de Ki-67 y negativa de TP53. Un estudio reciente realizado en pacientes con cáncer de próstata demostró que el aceite de pescado reduce la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular. Los investigadores observaron una correlación positiva entre los cambios séricos de 15(S)-HETE con la inmunomarcación de Ki67, dejando hipotetizado que el 15(S)-HETE está ligado a la proliferación celular (Galet et al., 2014).

En tanto que en los animales inyectados con DMBA, el 15 (S) HETE y 13 (S) HODE disminuyeron significativamente en las dietas Chía y Cártamo, mientras que en la dieta maíz se observó un incremento significativo, de estos dos eicosanoides.

La menor cantidad de 15(S)-HETE en las membranas celulares de los ratones alimentados con Chía e inyectados con DMBA concuerda con el menor porcentaje observado de AA en los animales alimentados con la misma dieta. Contrariamente en los animales tratados con DMBA y alimentados con maíz y Cártamo observamos una elevada cantidad de AA precursor de este eicosanoide, que solo incrementó los valores de 15(S)-HETE en los ratones alimentados con dieta maíz. Este comportamiento diferencial podría explicarse porque hay una menor actividad de la 15 LOX-1 en relación a la 12 LOX, la cual podría estar produciéndose proporcionalmente una

cantidad de 12 (S)-HETE en relación a la cantidad de 15(S)-HETE, como se visualiza en la relación que se observa en la Tabla 4.

Esto coincide con experimentos realizados para evaluar el cambio de composición de ácidos grasos en la carcinogénesis de mama en ratas inducido por DMBA y bajo tratamiento dietario con alto contenido de AGPIs ω -6, los investigadores observaron que una dieta alta en AGPIs ω -6 estimula el crecimiento maligno del tumor, principalmente causado por un alto contenido de AA y una menor fracción de LA en relación a todos los fosfolípidos, particularmente el fosfatidiletanolamina (Escrich et al., 2001).

Un aspecto importante a considerar es la relación entre las AGPIs ω -6 y ω -3, en nuestro estudio observamos que el menor valor de esta relación se observó en los animales alimentados con aceite de Chía, tanto en los del grupo control como los tratados con DMBA. En general, las poblaciones occidentales la relación de AGPIs ω -6 / ω -3 varía entre 10:1 a 20–25:1, mientras que en poblaciones como la japonesa esta relación de 4:1. En estudios in vivo como in vitro en animales se ha demostrado que el balance entre los AGPIs ω -6 y ω -3 tiene un impacto en el desarrollo de cánceres como el de próstata (Kobayashi et al., 2006).

En estudios de alimentación en humanos con pescado o aceite de pescado, el EPA y DHA reemplaza parcialmente a las AGPIs ω -6, especialmente al AA, probablemente en las membranas de todas las células. Como anteriormente se ha descrito, el AA son los principales productores de los eicosanoides 12 (S) HETE y 15 (S) HETE. En las dietas occidentales la cantidad de ω -6 es mayor que en otras y por lo tanto la cantidad de eicosanoides que se obtienen a partir de la vía metabólica de AA, están en mayores cantidades que los producidos por la vía de las AGPIs ω -3. Se conoce que LA y ALA no son compuestos inter-convertibles entre sí y que compiten por la Δ 6-desaturasa, enzima que participa en el alargamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los AGPIs (Simopoulos, 2002). Además, la actividad de las desaturasas Δ 6- y Δ 5- son el principal factor que controlan la conversión del LA de la dieta a AA (Bialek et al., 2014).

La producción de mediadores lipídicos involucrados en la señalización, tales como la del 13 (S)-HODE provenientes del metabolismo del LA, en el cual la 15-Lipoxigenasa-1 (15-LOX-1) tiene un rol en contrarrestar los procesos inflamatorios y permitir la diferenciación de las células normales. Nuevas investigaciones sugieren su rol supresor de tumores, como por ejemplo en el cáncer de colon, dado que la 15-LOX-1 promueve

varios eventos anti-tumorigénicos como diferenciación celular y apoptosis y, además, inhibe la inflamación crónica, la angiogénesis y la metástasis. En este cáncer se ha observado que elevados niveles de 13(S) HODE pueden reducir los pólipos colorectales (Tuncer et al., 2015).

Nuestros resultados muestran que los animales alimentados con dieta maíz presentaron inmunomarcación positiva de TP53, proteína involucrada en procesos de detención del ciclo celular o apoptosis. Y además, los mismos animales, tratados con DMBA presentaron inmunomarcación positiva de Ki-67, indicador reconocido de proliferación celular. Conjuntamente con estos resultados en la misma dieta se incrementaron los eicosanoides 15 (S) HETE y 13 (S) HODE. Se tiene conocimiento que, en general, el incremento de 15 (S) HETE está relacionado a la proliferación celular (Knab et al., 2014). Estudios sobre líneas celulares de tumores en próstata mostraron que la tasa de crecimiento, el volumen final de los tumores y los niveles del antígeno prostático en suero se redujo en grupos de animales alimentados con ω -3 en relación a los que se les suministró ω -6. Consecuentemente en este mismo estudio se observó una disminución de la proliferación celular detectada por inmunomarcación de Ki-67 (Kobayashi et al., 2006).

Si bien observamos marcación positiva a Ki-67 en todos los animales tratados con DMBA y alimentados con las diferentes dietas, fue notorio que en los alimentados con dieta Chía el número de células inmunomarcadas fue significativamente menor a los alimentados con dieta maíz y cártamo. Sabiendo que la enzima 15-LOX-1 es una enzima altamente inducible y regulada en las células normales y, que como se mencionó, tiene un rol clave en la producción de mediadores de señalización lipídicos como el 13 (S) HODE a partir del LA. Se ha demostrado que la 15-LOX-1 contribuye especialmente a resolver procesos como la inflamación y la diferenciación de las células normales. En pólipos colorectales y cánceres en humano se ha observado que esta enzima está desregulada, sugiriendo que la 15-LOX-1 promueve eventos antitumorogénicos (Sun et al., 2011). En un estudio experimental en carcinogénesis inducida de mama en ratas con DMBA demostró que la alimentación con aceite de pescado (rico en ω -3) suprime la proliferación celular y consecuentemente desregula la expresión de las proteínas Ki-67, Her-2/neu y c-Myc, todas ellas marcadoras de proliferación celular. Por otra parte en ese mismo estudio no se observó un comportamiento similar de la expresión de estas proteínas cuando los animales fueron

alimentados con aceite de maíz, sugiriendo que las AGPIs ω -6 tienen un efecto promotor de la carcinogénesis de tejido mamario en ratas tratadas con DMBA (Manna et al., 2010).

En los ratones alimentados con dieta Chía y tratados con DMBA no se observó inmunomarcación positiva de TP53 (Fig 14). En coincidencia con nuestros resultados un estudio observacional en población australiana sobre cáncer de piel mostró una asociación inversa entre las concentraciones de ω -3 (principalmente EPA y DHA) y la inmunoreactividad de TP53 (van del Pols et al., 2011).

En relación al número de células apoptóticas se observó que fue diferente significativamente en las GMS de huéspedes alimentados con dieta Chía, Cártamo y Maíz en orden decreciente y no inyectados con DMBA (Fig. 15). Esto concuerda con estudios realizados por nosotros anteriormente, en los cuales hemos observado que animales alimentados con Chía incrementaron el número de apoptosis y disminuyeron el número de células en mitosis.

En un estudio experimental, en ratones BALB/C (nu/nu) alimentados con dietas enriquecidas en ω -6 ácido linoleico (LA) y ω -3 ácido estearidónico (SDA) e inoculados con células provenientes de cáncer de próstata, se valoró el crecimiento tumoral por inmunomarcación con Ki-67 y la apoptosis por la actividad de la enzima caspasa 3, observándose un incremento del índice de proliferación en los animales alimentados con ω -6 en comparación con los alimentados con ω -3. En el mismo estudio se observó un incremento de 2,7 veces de la proporción ω -6/ ω -3, además del aumento de la actividad de las enzimas Δ -6-desaturasa y Δ -9 desaturasa en los tumores de los animales alimentados con LA; mientras que en los animales alimentados con SDA la proporción de ω -6/ ω -3 disminuyó 4,2 veces y también se redujo la actividad de la Δ -5-desaturasa.

Se ha sugerido que el consumo de AGPIs ω -3 hace más lento el crecimiento del cáncer de próstata porque altera la relación ω -6/ ω -3, promueve la apoptosis e inhibe la proliferación en el tumor por competencia directa de los AGPIs ω -6 por la actividad enzimática de la enzima 5-LO-1 y la COX-2 (Kelavkar et al., 2009). En tanto otra investigación también demostró que DHA, 22:6 induce la apoptosis en cultivos celulares primarios de leucemia linfocítica crónica en comparación con el ácido oleico 18:1, ω -9 (Guièze et al., 2015).

La modulación dietaria del epigenoma está relacionada a los procesos metabólicos. Las reacciones de metilación catalizadas por la enzima metiltransferasas dependen de un conjunto de donadores de metilos S-adenosilmetionina (SAM del inglés S-adenosylmethionine) en el cuerpo humano. El metil-tetrafolato es un grupo donante de metilos y convierte a la homocisteína en metionina. Luego esta metionina activa a SAM por medio de la metionina adenosiltransferasa, adicionándole un grupo citosina metilado. Esta adición del grupo metilo es conocido como el metabolismo de un carbono y es un proceso complejo que puede ser afectado por varios de los factores dietarios entre los que se pueden mencionar el folato, la metionina y varias vitaminas del grupo B (B2, B6 y B12). Por esto los factores consumidos en la dieta relacionados al grupo metilo pueden participar en los cambios epigenéticos.

Se conoce que la hipometilación global del ADN y en particular la que ocurre en las secuencias repetitivas del ADN (regiones subteloméricas y pericéntricas) está asociada a algunos cánceres humanos. Sin embargo el mecanismo por el cual se produce la pérdida de metilación del ADN aún hoy es desconocido. Probablemente la pérdida de metil-citosina pueda contribuir a la inestabilidad cromosómica, a la regulación de la longitud del telómero, la represión de elementos transposones y a la activación de los oncogenes. En la actualidad la mayoría de los estudios sobre modulación del epigenoma a través de la dieta se ha focalizado en los cambios de la metilación del ADN (Lee and Herceg, 2014).

Intentando explicar las bases para el efecto protector de las AGPIs ω -3 varias investigaciones han sugerido que el DHA presenta un rol importante en el metabolismo de un carbono, influenciando la metilación global y además se cree que tiene un efecto protector en los cánceres (Kulkarni et al., 2011; Spencer et al., 2009). Se ha sugerido que cambios en los niveles de metilación del ADN induce un desbalance de folato y Vit B12, modulado por los AGPIs ω -3.

Otros estudios realizados evaluaron el efecto de los AGPIs en cáncer de colon desarrollado experimentalmente en ratas; sugiriendo un nuevo rol protector del aceite de pescado en el cáncer de colon relacionado a mecanismos que desregulan los micro ARNs asociados a la inducción de carcinogénesis (Davidson et al., 2009; Xiao et al., 2012).

Estrategias preventivas y de detección temprana como el diagnóstico histológico, determinación de alteraciones bioquímicas-genéticas y el reconocimiento de factores de

riesgo como los dietarios, podrían representar la posibilidad de cambiar un mal pronóstico en el caso de los tumores de las glándulas submandibulares; dado que éstos presentan, en general, alto grado de malignidad y alta tasa de mortalidad, y que, generalmente, es diagnosticado en estadios tardíos. Resultaría altamente beneficioso para la población determinar delineamientos nutricionales, principalmente en el consumo de ácidos grasos, que actúen como preventivos de este tipo de cáncer.

En resumen en la Fig.16 se muestran las relaciones observadas entre dieta y procesos involucrados en **la tumorigénesis de GSM en animales inyectados con DMBA**

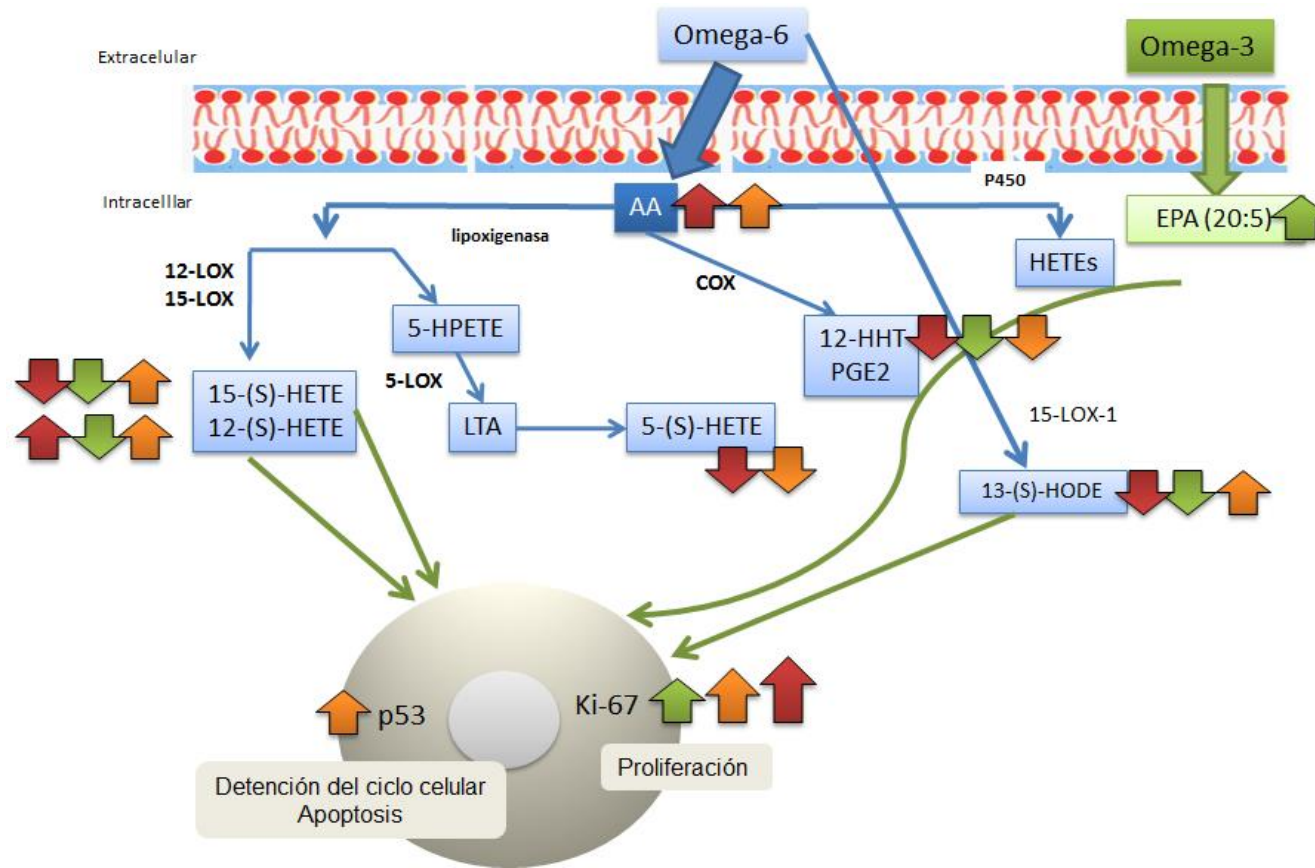


Figura 16. Expresión de las células de GSM de ratón alimentado con dieta cártamo, chíá y maíz e inyectados con DMBA. Las flechas indican los % de ω -3 y ω -6, Eicosanoides e Inmunomarcación que aumentó o bajo en relación al control. *Flecha verde:* dieta Chíá; *Flecha Naranja:* dieta maíz; *Flecha Roja:* dieta cártamo. Los animales alimentados con dieta Chíá registraron un incremento de ALA y EPA en las membranas celulares de las GSM en relación a las dietas maíz y cártamo. El AA aumentó muy significativamente en los animales tratados con dieta cártamo y maíz. El 12(S)-HETE aumentó en dieta cártamo y maíz; 15(S)-HETE y 13(S)-HODE en dieta maíz. La inmunomarcación fue positiva a TP53 en la dieta maíz e inmunomarcación positiva de Ki-67 de modo creciente en las dietas chíá, maíz y cártamo, respectivamente. El inmunomarcador de proliferación celular Ki-67 aumentó correlativamente con el aumento de AA en las membranas de las GSM de los ratones tratados con DMBA y alimentados con dieta maíz y cártamo. Ki-67 presentó la mayor inmunomarcación positiva en las muestras de animales bajo tratamiento de dieta cártamo, coincidiendo con un incremento del eicosanoide 12(S)-HETE.

CONCLUSION

Nuestros resultados nos permiten concluir que:

- La dieta enriquecida con aceite de Chia (*Salvia hispanica*) rica en ácidos grasos poliinsaturados ω -3 produce cambios en el perfil de ácidos grasos de la membrana, disminuyendo la acción carcinogénica del DMBA respecto a una dieta rica en ácidos grasos ω -6. Este efecto se observó en tejido de glándulas salivares submandibulares de animales alimentados con dieta Chía, a través de la menor expresión de la proteína Ki-67 la cual aumenta la división mitótica. Esta dieta produjo una disminución en la actividad de la 12- lipoxigenasa y en consecuencia de la generación del eicosanoide 12 (S)- HETE, de conocida actividad pro-carcinogénica. Este efecto beneficioso de los ω -3 también se observó a través del aumento en la apoptosis observada en células provenientes de las glándulas de ratones alimentados con dieta Chía.
- La disminución del valor de la relación ω -6/ ω -3 en las membranas celulares podría prevenir la actividad de carcinógenos, con efectos similares al utilizado en esta experimentación, reduciendo sus efectos en los diferentes tejidos. Esto se lograría incrementando la ingesta dietaria de ω -3 por ejemplo por el consumo de aceite de Chía, u otros alimentos ricos en estos ácidos grasos.

BIBLIOGRAFIA

- Aballay LR, Díaz MP, Francisca MT and Muñoz SE. (2012) Cancer incidence and pattern of arsenic concentration in drinking water wells in Córdoba, Argentina, *Int J Environ Health Res*; 22: 220-231
- Actis AB, Cremonuzzi DC, King IB, Joekes S, Eynard AR, Valentich MA. (2005) Effects of soy oil on murine salivary tumorigenesis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*; 72 187–194
- Alberts B, Johnson, A, Lewis, J, Roberts, K, Walter, AP. (2007) *Molecular Biology of the cell*, Cancer pp. 1205-1268. Fifth Edition. Garland Science Taylor and Francis Group. New York, Usa.
- Ambros V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*; 350–5
- Andreatta MM, Eynard AR and Navarro A. (2012) Alcohol, diet and their interaction in colorectal and urinary tract tumors. In: Ronald Ross Watson, Victor R. Preedy ed. *Alcohol, Nutrition, and Health Consequences*, Humana Press, Springer,; 33: 429- 437
- Aydin R, Dogan I (2010) Fatty acid profile and cholesterol content of egg yolk from chickens fed diets supplemented with purslane (*Portulaca oleracea L.*). *J Sci Food Agric*. 15;90(10):1759-63
- Balansenthil S, Rao KS, Nagini S. (2002) Garlic induced apoptosis during 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Oncol*; 38:431-436).
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. (2005) World Health Organization classification of tumours. In: *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press; p. 254–8.
- Bartel DP *MicroRNAs: (2004) Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function*. *Cell*; 116: 281–97.
- Benetiz, J. (2000) Bases genéticas del cáncer hereditario. Implicaciones diagnósticas. *Oncología*; 23 (1):17-8.
- Bialek A, Stawarska A, Tokarz Aj, Czuba K, Konarska A, Mazurkiewicz M, Stanimirova I. (2014) Enrichment of maternal diet with conjugated linoleic acids influences desaturases activity and fatty acids profile in livers and hepatic microsomes of the offspring with 7,12- dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors. *Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research*,; 71:747-761

- Blas E and Kurup AS. (2010) Equity, social determinants and public health programmes.WHO. WHO Library Cataloguing in Publication Data http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241563970_eng.pdf
- Bochkov VN, Oskolkova OV, Birukov KG, Levonen AL, Binder CJ and Stöckl J. (2010) Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids Antioxidants & Redox Signaling. 12 (8):1011-1043
- Bongiovanni GA., Eynard AR., Calderon RO.(2005) Altered lipid profile and changes in uroplakin properties of rat urothelial plasma membrane with diets of different lipid composition. Mol Cell Biochem; 271: 69-75,
- Bosetti C., Malvezzi, M., Chatenoud, L., Negri, E., Levi, F., La Vecchia, C. (2005) Trends in cancer mortality in the Americas, 1970–2000. *Annals of Oncology* 16, 489–511)
- Brena RM & Costello JF.(2007) Genome-epigenome interactions in cáncer. Human Molecular Genetics.; 16:96-105
- Brocklehurst P, Kujan O, O'Malley LA, Ogden G, Shepherd S and Glenny AM (2013) Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. Cochrane Database Syst Rev; 11: Cd004150
- Brunotto M, Malberti A, Zárate A, Barra JL, Calderón O, Piñas E, Plavnik L, Crosa M. (2006) Early alterations of phenotype and genotype in rat Submandibular Gland oncogenesis Acta Odont Lact, 19 (1): 13-21;
- Brunotto M, Zarate AM, Barra JL, Malberti A (2009) Graph models for phenotype and genotype association between oral mucosa and submandibular gland tumorigenesis in rat. J Oral Pathol Med.; 38(5):463-9.
- Brunotto M, Zarate AM, Bono A, Barra JL, Berra S. (2014) Risk genes in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of last 5 years. Oral Oncology.;50:178-188.
- Busamia B, Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Brunotto M, Gil-Montoya JA, Bravo M, Gobbi C, Finkelberg A. (2011) Cell apoptosis and proliferation in salivary glands of Sjögren's syndrome.J Oral Pathol Med.; 40: 721–725.
- Calder, P.C., Budge, G.C. (2004) Fatty acids. In A. Nicolaou & G. Kokotos (Eds.), Bioactive lipids. pp. 1–36. The Oil Press. EnglandWorld Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 2007 DISPONIBLE EN: http://www.dietandcancerreport.org/cancer_resource_center/downloads/Second_Expert_Report_full.pdf.

- Calderón RO, Eynard AR. (2000) Fatty acids specifically related to the anisotropic properties of plasma membrane from rat urothelium. *Bochim Biophys Acta*; 1483:174-184.
- Carlson GW. (2000) The salivary glands: Embryology, anatomy, and surgical applications. *Surgical Clinics of North America*; 80:261–273
- Chapkin RS., McMurray DN., Lupton JR. (2007) Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. *Curr Opin Gastroenterol*..23:48-54.
- Chen HS, Su LT, Lin SZ, Sung FC, Ko MC, Li CY. (2012) Increased risk of urinary tract calculi among patients with diabetes mellitus .A population-based cohort study. *Urology*; 79: 86-92; De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL, Deneo-Pellegrini H, Acosta G, Mendilaharsu M. Dietary patterns and risk of bladder cancer: a factor analysis in Uruguay. *Cancer Causes Control*.2008; 19: 1243–1249;
- Chiou, H.Y., Chiou, S.T., Hsu, Y.H., Chou, Y.L., Tseng, C.H., Wei, M.L., et al. (2001) Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. *Am. J. Epidemiol*; 153: 411–418.
- Choudhari SK, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A and Tekade S. (2014) Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncol*; 50: 10-18.
- Colozza M, Azambua E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. (2005) Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* ; 16: 1723-39.
- Comba A, Lin YH, Eynard AR, Valentich MA, Fernández-Zapico ME, Pasqualini ME (2011) Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors. *Cancer Metastasis*; 30:325-42.
- Comba A., Maestri M.D., Berra M.A., Garcia CP., Das UN., Eynard A.R., Pasqualini M.E. (2010) Effect of ω -3 and ω -9 fatty acid rich oils lipoygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipids on Health and Disease*.; 9: 112-121.
- Cremonuzzi DC, Díaz MP, Valentich MA, Eynard AR. (2004) Neoplastic and preneoplastic lesions induced by melamine in rat urothelium are modulated by dietary polyunsaturated fatty acids. *Food Chem Toxicol*.; 42:1999-2007

- Cremonezzi DC, Silva RA, Díaz MP, Valentich MA, Eynard AR. (2001) Dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA) differentially modulates melamine-induced preneoplastic urothelial proliferation and apoptosis in mice. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*; 151:159-164.
- Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E and Tuluc M. (2014) Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol*; 41: 217-234.).
- Dalianis T. (2014) Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review). *Int J Oncol*; 44: 1799-1805.
- Das, U.N. (2006). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal*, 4, 420–439.
- Davidson L.A., Wang N., Shah M.S., Lupton J.R., Ivanov I., Chapkin R.S. (2009) N-3 polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon, *Carcinogenesis* 30 2077–2084
- De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL, Deneo-Pellegrini H, Correa P, Acosta G, Mendilaharsu M. (2008) Exploratory factor analysis of squamous cell carcinoma of the esophagus in Uruguay. *Nutr Cancer*; 60(2):188-95
- Delporte C, Malaisse WJ, Jurysta C, Portois L, Sener A, Carpentier YA. (2007) Altered fatty acid pattern of phospholipids and triglycerides in the submandibular gland of ω 3-depleted rats. *Eur J Oral Sci*; 115: 103–110
- Deshpande and David T Wong.(2008)Molecular Mechanisms of Head and Neck Cancer.*Expert Rev Anticancer Ther*.May ; 8(5): 799–809
- Erdem NF, Carlson ER, Gerard DA and Ichiki AT (2007) Characterization of 3 oral squamous cell carcinoma cell lines with different invasion and/or metastatic potentials.*J Oral Maxillofac Surg*; 65: 1725-1733.
- Escrich E, Solanas M, Soler M, Ruiz de Villa MC, Sanchez JA, Segura R. (2001) Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors.*J Nutr Biochem*;12(9):536-549.
- Espada C.E., Berra M.E., Martinez M.J., Eynard AR., Pasqualini ME. (2007) Effect of Chia oil (*Salvia Hispánica*) rich in omega-3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prost Leuk Essent Fatty Acids.*; 77: 21-28.

- Eynard A.R (1996) Role of dietary polyunsaturated fatty acid (PUFA) on tumorigenesis.*The Cancer Journal* 9, 142-144.)
- Eynard AR, Navarro A. (2013) Cross talk among dietary polyunsaturated fatty acids (PUFAs), urolithiasis, chronic inflammation and urinary tract tumor (UTT) risk. *Nutrition.*; 29:930-8.
- Feller LL, Khammissa RR, Kramer BB and Lemmer JJ (2013) Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell Int*
- Fonseca FP, Carvalho Mde V, de Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG, Vargas PA. (2012) Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population.*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* ;114(2):230-9.
- Fukuda M, Ohmori Y and Sakashita H. (2012) The Role of Tumor Microenvironment in Oral Cancer. In: Biswas S, editors. *Tumor Microenvironment and Myelomonocytic Cells*. InTech;
- Funk, C.D (2001) Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in eicosanoid biology .*Science.*; 294: 1871-1875.
- Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CD, Pavarino ÉC, Goloni-Bertollo EM. (2013) Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol.*;79:239-47.
- Galet C, Gollapudi K, Stepanian S, Byrd B, Henning SM, Grogan T, Elashoff D, Heber D, Said J, Cohen P, Aronson WJ. (2014) Effect of a Low-fat Fish Oil Diet on Pro-inflammatory Eicosanoids and Cell Cycle Progression Score in Men Undergoing Radical Prostatectomy *Cancer Prev Res (Phila).*; 7(1): 97–104.
- Garcia CP, Lamarque AL, Comba A, Berra MA, Silva RA, Labuckas DO, Das UN, Eynard AR, Pasqualini ME. (2015) Synergistic anti-tumor effects of melatonin and PUFAs from walnuts in a murine mammary adenocarcinoma model.*Nutrition*; 31(4):570-7.
- Gasco M, Crook T. (2003).The p53 network in head and neck cancer. *Review Oral Oncology* 39:222-31.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*; 31: 13–20.)
- Gonzalez-Segura I, Secchi DG, Carrica A, Barelo R, Arbelo D, Dericia J, Brunotto M, Zarate AM. (2015) Exfoliative cytology as a tool for monitoring premalignant

- and malignant lesions based on combined stains and morphometry techniques. *J Oral Pathol Med.*; 44(3):178-84.
- Górna A, Kaczmarek E, Nieruchalska E, Jarmowska-Jurczyszyn D, Majewski P. (2004) Quantitative evaluation of immuno- and histochemical reaction intensity by spatial visualization techniques. *Proceedings Annales Acad Medicae Bialostocensis*; 49:198-201.
- Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. (2004) Carcinoma of the tongue: A case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*; 98:546-52.
- Griffin JL, Shockcor JP. (2015) Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* ;4:551-61.
- Guièze R, Gyan E, Tournilhac O, Halty C, Veyrat-Masson R, Akil S, Marc Berger, Hérault O, Callanan M, Ba JO (2015) Docosahexaenoic acid induces apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Hematology Reports*; 7:6043.
- Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M, Licitra L. (2010) Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* ; 74(2):134-48).
- Halliwell B. (2007) Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. *Biochem. J.*; 401: 1–11
- Hanahan D and Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*; 100: 57-70
- Hanahan D. and Weinberg R.A. (2011) Hallmark of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hanke, M.; Hoefig, K.; Merz, H.; Feller, A. C.; Kausch, I.; Jocham, D.; Warnecke, J. M.; Sczakiel, G. A (2010) robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.*;28(6):655-61
- Harada, K., Hiraoka, S., Kato, J., Horii, J., Fujita, H., Sakaguchi, K., Shiratori, Y. (2007) Genetic and epigenetic alterations of Ras signalling pathway in colorectal neoplasia: analysis based on tumour clinicopathological features. *Br J Cancer* 97,
- Hausler, S. F.; Keller, A.; Chandran, P. A.; Ziegler, K.; Zipp, K.; Heuer, S.; Krockenberger, M.; Engel, J. B.; Honig, A.; Scheffler, M.; Dietl, J.; Wischhusen, J. (2010) Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br. J. Cancer.*,103, 693-700

- Herceg Z. (2007) Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors, *Mutagenesis* 22 91–103.
- Herceg Z., Vaissiere T. (2011) Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome, *Epigenetics* 6 804–819
- Ho T, Li G, Lu J, Zhao C, Wei Q, Sturgis EM. (2007) X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) single-nucleotide polymorphisms and the risk of salivary gland carcinomas. *Cancer*. 15;110(2):318-25.
- Holland-Frei.(2003) *Cancer Medicine*.6th edition.Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors.Hamilton (ON): BC Decker;.
- Holmberg KV, Hoffman MP.(2014) Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary glands. *Monogr Oral Sci.*; 24: 1–13.
- Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Fuchs A, Bergoglio R, Tello EE, Nicolli H et al. (1966) Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina. *Epidemiology*; 7: 117-124
- Hu, Z.; Chen, X.; Zhao, Y.; Tian, T.; Jin, G.; Shu, Y.; Chen, Y.; Xu, L.; Zen, K.; Zhang, C.; Shen, H. (2010) Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, , 28, 1721-1726
- Ide F, Suka N, Kitada M, Sakashita H, Kusama K, Ishikawa T. (2004). Skin and salivary gland carcinogenicity of 7, 12-dymethylben[a]anthracene is equivalent in the presence or absence of aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Letters* 214:35-41.
- Jacob RF, Weber RS, King GE (1996) Whole salivary flow rates following submandibular gland resection. *Head Neck*; 18:242-247;
- Jaehne M, Roeser K,Jaekel T, Schepers JD,Albert N, Loning T. (2005) Clinical and Immunohistologic typing of salivary Duch carcinoma. *Cancer.*; 103: 2536-2533.
- Kaelin W.G. Jr., McKnight S.L. (2013) Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell* 153, 56-69).
- Kelavkar UP, Hutzley J, McHugh K, Allen KGD, Parwani A. (2009) Prostate Tumor Growth Can Be Modulated by Dietarily Targeting the 15-Lipoxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 Enzymes. *Neoplasia*; 11: 692–699
- Kim S, Guo J, O'Sullivan MG, Gallaher DD, Turesky RJ. (2016) Comparative DNA adduct formation and induction of colonic aberrant crypt foci in mice exposed to

2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline, and azoxymethane.

- Knab LM, Grippo PJ, Bentrem DJ. (2014) Involvement of eicosanoids in the pathogenesis of pancreatic cancer: the roles of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *World J Gastroenterol*; 20(31): 10729-10739.
- Knox SM, Lombaert IMA, Reed X, Vitale-Cross L, Gutkind JS, Hoffman MP. (2010) Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. *Science*.; 329:1645–1647
- Kobayashi N, James Barnard R, Henning SM, Elashoff D, Reddy ST, Cohen P, Leung P, Hong-Gonzalez J, Freedland SJ, Said J, Gui D, Seeram NP, Popoviciu LM, Bagga D, Heber D, Glaspy JA, Aronson WJ. (2006) Effect of Altering Dietary ω -6/ ω -3 Fatty Acid Ratios on Prostate Cancer Membrane Composition, Cyclooxygenase-2, and Prostaglandin E2 *Clin Cancer Res.*; 12(15): 4662–4670.).
- Koontongkaew S. (2013) The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*; 4: 6683.
- Kotowski U, Heiduschka G, Brunner M, Erovic BM, (2012) Martinek H and Thurnher D Arsenic trioxide enhances the cytotoxic effect of cisplatin in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Lett*; 3: 1326-1330.
- Krautkramer KA, Linnemann AK, Fontaine DA, Whillock AL, Harris TW, Schleis GJ, Truchan NA, Marty-Santos L, Lavine JA, Cleaver O, Kimple ME, Davis DB. (2013) Tcf19 is a novel islet factor necessary for proliferation and survival in the INS-1 β -cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* ;305(5):E600-10.
- Kulkarni A, Dangat K., Kale A., Sable P., Chavan-Gautam P., Joshi S. (2011) Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placenta global DNA methylation patterns in Wistar rats, *PLoS ONE* 6 e17706;
- Kürstenberger G., Krieg P., Müller –Decker K., Habenicht AJ. (2006) What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis?. *Int J Cancer*.119::2247-2254
- Lee HS, Herceg Z. (2014) The epigenome and cancer prevention: A complex story of dietary supplementation *Cancer Letters* 342 275–284

- Lehmann B. (1997) HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin. *J Invest Dermatol*; 108: 78-82.
- LF.A Reidy J, McHugh E and Stassen LF. (2011) A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon*; 9: 278-283
- Li T, Kon N, Jiang L, et al. (2012) Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell*;149:1269–1283. 2.
- Liu G, Parant JM, Lang G, et al. (2004) Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat Genet*;36: 63–68
- Loria D, Barrios E, and Zanetti R. (2009) Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. *Rev Panam Salud Publica.*; 25(6):530–9.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*; 435: 834–8
- MacFarlane LA and Murphy PR. (2010)MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer.*Current Genomics*, , 11,537-561
- Manna S, Janarthan M, Ghosh B, Rana B, Rana A, Chatterjee M. (2010) Fish oil regulates cell proliferation, protect DNA damages and decrease HER-2/neu and c-Myc protein expression in rat mammary carcinogenesis *Clinical Nutrition* 29: 531–537
- Marshall G, Ferreccio C, Yuan Y, Bates MN, Steinmaus C, Selvin S, et al. (2007) Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J Natl Cancer Inst.*; 99: 920–928.
- Meek DW.The p53 response to DNA damage.Review.(2004). *DNA repair*, 3:1049-56.
- Menendez JA, Mehmi I, Atlas E, Colomer R, Lupu R. (2004) Novel signaling molecules implicated in tumor-associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: Role of exogenous dietary fatty acids, p53-p21WAF1 /CIP1, ERK1/2 MAPK, p27KIP1, BRCA1, and NF-kappaB. *Int J Oncol.*; 24:591-608.
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ and Maley CC. (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*; 6: 924-935).
- Michael, A.; Bajracharya, S. D.; Yuen, P. S.; Zhou, H.; Star, R. A.; Illei, G. G.; Alevizos, I. (2010) Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis.*; 16:34-38

- Mohd Bakri M, Mohd Hussaini H, Rachel Holmes A, David Cannon R, Mary Rich A. (2010) Revisiting the association between candidal infection and carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. *J Oral Microbiol.* doi: 10.3402/jom.v2i0.5780.
- Moral R, Solanas M, García G, Colomer R, Escrich E. (2003) Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol Rep.* ;10(5):1417-24)
- Morelato RA, López de Blanc (2006) SA. Oral cancer mortality in the province of Cordoba, Argentine Republic in the period 1975-2000. A comparative study with other populations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*; 11(3):E230-5.
- Nagao T, Sato E, Inoue R, Oshiro H, Takahashi RH, Nagai T, Yoshida M, Suzuki F, Obikane H, Yamashina M, Matsubayashi J. (2012) Immunohistochemical Analysis of Salivary Gland Tumors: Application for Surgical Pathology Practice *Acta Histochem. Cytochem.* 45 (5): 269–282,.
- Nagao T, Sugano I, Ishida Y et al (2002) Hybrid carcinomas of the salivary glands: report of nine cases with a clinicopathologic, immunohistochemical, and p53 gene alteration analysis. *Mod Pathol*; 15:741-749).
- Nagpal JK, Das BR. (2003) Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Review. Oral Oncology*; 39:213-221;
- Navarro A., Eynard A.R. (2013) Crosstalk among dietary polyunsaturated fatty acids, urolithiasis, chronic inflammation, and urinary tract tumor risk. *Nutrition* 29, 930-938.)
- Negi AK, Shevali Kansal & Archana Bhatnagar & Navneet Agnihotri. (2013) Alteration in apoptosis and cell cycle by celecoxib and/or fish oil in 7,12-dimethyl benzene (α) anthracene-induced mammary carcinogenesis *Tumor Biol.* 34:3753–3764.
- Niemann I, Bolund L, Sunde L. (2008) Twin pregnancies with diploid hydatidiform mole and co-existing normal fetus may originate from one oocyte. *Hum Reprod.* ;23(9):2031-5.
- Panel V, Boëlle PY, Ayala-Sanmartin J, Jouniaux AM, Hamelin R, Masliah J, Trugnan G, Fléjou JF, (2006) Wendum DC Cytoplasmic phospholipase A2 expression in human colon adenocarcinoma is correlated with cyclooxygenase-2 expression and contributes to prostaglandin E2 production. *Cancer Lett.*; 243:255-63..

- Pasqualini M.E et al (2008) Dietary manipulation of precursor PUFAs modulates eicosanoid and endocannabinoid synthesis: a potential tool to control tumor development. *Current Nutrition and Food Science*; 3: 1-15.
- Pasqualini M.E. et al. (2005) Dietary lipids modulate eicosanoid release and apoptosis of cells of a murine lung alveolar carcinoma. *Prost Leuk Essent Fatty Acids.*; 72: 235-240.
- Pasqualini ME et al. (2003) Association between e-cadherin expression by human colon, bladder and breast cancer cells and the 13-HODE: possible role of their metastatic potential *Prostagl Leuk Essential Fatty Acids .* ; 68: 9-16,.
- Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. (2006) Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*; 3: 327-340.).
- Petersen PE Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncol* 2009; 45: 454-460.
- Pich A, Chiusa L, Navone R: (2010) Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol* 2004, 15:1319-1329; Yerushalmi R, Ravdin PM, Hayer MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential *Lancet Oncol*; 11: 174–83
- Pickup MW, Mouw JK and Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*; 15: 1243-1253.
- Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, Honn KV. (2007) Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev.*; 26(3-4):503-24
- Piemonte ED, Lazos JP, Brunotto M (2010) Relationship between chronic trauma of the oral mucosa, oral potentially malignant disorders and oral cancer. *J Oral Pathol Med.*; 39(7):513-7. Blas E, Sivasankara Kurup A. 2010 Equity, social determinants and public health programmes.
- Poulsen HE, Prieme H, Loft S. (1998) Role of oxidative DNA damage in cancer. *Eur J Cancer Prev.* 7(1):9-16.
- Proctor GB, Carpenter GH. (2007) Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical.*; 133:3–18.
- Ram H, Sarkar J, Kumar H, Konwar R, Bhatt ML, Mohammad (2011) S. Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis. *J Maxillofac Oral Surg.* 10(2):132-7).

- Rautava J, Syrjänen S. (2012) Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol*; 6 Suppl 1: S3-15
- Reidy JT, McHugh EE, Stassen LF. (2011) A review of the role of alcohol in the pathogenesis of oral cancer and the link between alcohol-containing mouthrinses and oral cancer. *J Ir Dent Assoc*; 57(4): 200-2
- Rivera C (2012) 4NQO carcinogenesis: A model of oral squamous cell carcinoma. *Int J Morphol*; 30: 309-314.
- Rivera C and Venegas B. (2014) Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*; 8: 7-11.
- Rivera C (2015) The challenge of the state of susceptibility to oral cancer. *J Oral Res*; 4: 8-9
- Rivera C. (2015) Opportunities for biomarkers with potential clinical use in oral cancer. *Medwave*; 15: e6186.
- Rodríguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R, La Vecchia C. (2004) Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol*, 40: 207-13.
- Saito Y, Yamada A, Suzuki D, Tanaka J, Nagahama R, Kurosawa T, Maki K, Mishima K, Shirota T, Kamijo R (2015) Association of aging with gene expression profiling in mouse submandibular glands. *Genomics Data* 5 115–119
- Saman DM. (2012) A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update. *Head Neck Oncol*. 13; 4:1.
- Scully C, Bagan J. (2009) Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*. ; 45(4-5): 301-8.
- Secchi DG, Aballay LR, Galíndez MF, Piccini D, Lanfranchi H, Brunotto M. (2015) Red meat, micronutrients and oral squamous cell carcinoma of Argentine adult patients. *Nutr Hosp*; 32(3): 1214-1221
- Shureiqi L., Jiang W., Zuo X., Wu Y., Stimmel JB., Leesnitzer LM., Morris JS., Fan HZ., Fischer SM., Lippman SM. (2003) The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19; 100: 9968-9973
- Simopoulos AP. (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 56 365–379.
- Smith MT, Guyton KZ, Gibbons CF, Fritz JM, Portier CJ, Rusyn I, DeMarini DM, Caldwell JC, Kavlock RJ, Lambert P, Hecht SS, Bucher JR, Stewart BW, Baan

- R, Coglianò VJ, Straif K.(2015) Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. *Environ Health Perspect* DOI: 10.1289/ehp.1509912
- Solanas M, Moral R, Escrich E. (2001) The stimulating effect of a high-fat n-6 polyunsaturated diet on rat DMBA-induced mammary tumors is not related to changes in *c-Ha-ras1* mRNA tumor expression. *Nutrition Research* 21:1261–1273).
- Speight, A.W. (2009) Barrett / *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 47:587–593
- Spencer L., Mann C., Metcalfe M., Webb M., Pollard C., Spencer D., Berry D., Steward W., Dennison A., (2009) The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential, *Eur. J. Cancer* 45:2077–2086
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G and Banks L (1998) Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature* 393:229–234.
- Sun IL, Zuo X, Shureiqi I. (2011) 15-Lipoxygenase-1 as a tumor suppressor gene in colon cancer: is the verdict in? *Cancer Metastasis Rev.* ; 30:481-91.
- Sun Z, Sood S, Li N, Ramji D, Yang P, Newman RA, Yang CS, Chen X. (2006) Involvement of the 5-lipoxygenase/leukotriene A4 hydrolase pathway in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch, and inhibition of carcinogenesis by its inhibitors *Carcinogenesis*; 27(9):1902–1908,).
- Supic G, Jagodic M, Magic Z. (2013) Epigenetics: a new link between nutrition and cancer. *Nutr Cancer*. 65(6):781-92.
- Suter CM, Martin DI, Ward RL. (2004) Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet*;36(5):497-501
- Talahalli RR, • Vallikannan B, Sambaiah K, • Lokesh BR. (2010) Lower Efficacy in the Utilization of Dietary ALA as Compared to Preformed EPA + DHA on Long Chain n-3 PUFA Levels in Rats. *Lipids* 45:799–808
- Tekpli X, Rissel M, Huc L, Catheline D, Sergent O, Rioux V, Legrand P, Holme JA, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D. (2010) Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15;243(1):68-76

- Todd R, Donoff RB and Wong DTW. (1997) The Molecular Biology of Oral Carcinogenesis: Toward a Tumour Progression Model (Special Contribution). *J. Oral Maxillofac. Surg.*; 56: 613-623
- Tomita Y., Miyake N., Yamanaka S. (2007) Phospholipid Profiles in the Salivary Glands of Rats of Different Ages. *J. Oleo Sci.*; 56:369-375.
- Tuncer S, Banerjee S. (2015) Eicosanoid pathway in colorectal cancer: Recent updates. *World J Gastroenterol* 7; 21(41): 11748-11766).
- van der Pols JC, Xu C, Boyle GM, Hughes MC, Carr SJ, Parsons PG, Green AC. (2011) Serum Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids and Cutaneous p53 Expression in an Australian Population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 20(3); 530–6.
- Vara-Messler M, Cremonezzi DC, Soria EA, Eynard AR. (2012) Nutritional chemoprevention of urinary tract tumors (UTT) induced by lithogenic agents: Risk for UTT in children exposed to melamine-contaminated milk formulae. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*; 30: 174- 187.
- Vara-Messler M, Pasqualini ME, Comba A, Silva R, Buccellati C, Trenti A, Trevisi L, Eynard AR, Sala A, Bolego C, Valentich MA (2015) Increased dietary levels of α -linoleic acid inhibit mammary tumor growth and metastasis. *Eur J Nutr.* Nov 18
- Vasconcelos AC, Wagner VP, Meurer L, Vargas PA, de Souza LB, Fonseca FP, Squarize CH, Castilho RM, Martins MD. (2015) Immunoprofile of c-MET/PI3K signaling in human salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* ;120(2):238-47.
- Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, et al (1989) Ki67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci*; 92 (pt 4): 531–40.
- Vieira FLD, Vieira BJ, Guimaraes MAM Aarestrup FM. (2008) Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading *BMC Oral Health*, 8:25).
- Viet CT and Schmidt BL. (2012) Biologic mechanisms of oral cancer pain and implications for clinical therapy. *J Dent Res*; 91: 447-453.)
- Vitale-Cross L, Czerninski R, Amornphimoltham P, Patel V, Molinolo AA and Gutkind JS (2009) Chemical carcinogenesis models for evaluating molecular-

- targeted prevention and treatment of oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*; 2: 419-422.
- Walle T, Walle UK, Sedmera D, Klausner M. (2006) Benzo[a]-pyrene-induced oral carcinogenesis and chemoprevention studies in bioengineered human tissue. *Drug Metab Dispos*; 34: 346–50).
- Wang D and. DuBois RN.(2010) Ecosanoids and cancer.*Nature Reviews Cancer*; 10:181-193
- Wang MT., Honn KV., Nie D (2007) Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.*; 26:525-534.
- Wang XD, Meng LJ, Hou TT, Huang SH. (2015) Tumours of the salivary glands in northeastern China: a retrospective study of 2508 patients.*Br J Oral Maxillofac Surg.* ; 53(2):132-7.
- Weinberg R.A. (2007) *The Biology of Cancer*. Garland Science Taylor & Francis Group. New York, USA11
- Whelan J, Rust C. (2006) Innovative dietary sources of n-3 fatty acids.*Annu Rev Nutr*;26:75-103.
- WHO (2013) Health Statistics.. Disponible en:http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2013_Full.pdf
- WHO (2007) Library Cataloguing in Publication data http://whqlibdoc.who.int/publications_eng.pdf /9789241563970/2010Cancer control : knowledge into action : WHO guide for effective programmes. ISBN 92 4 154711 1.. WHO Press, World Health Organization, Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland.<http://www.who.int/cancer/modules/en/index.html>
- WHO.(2006) World health statistics. Geneva, Switzerland: WHO Press, World Health Organization, <http://www.who.int/healthinfo/statistics> 2006
- World Cancer Research Fund (WCRF), American Institute for Cancer Research (AICR). (2007) Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. p 517. Washington DC
- Xiao W, Bao Z-X, Zhang C-Y, Zhang X-Y, Shi L-J, et al. (2012) Upregulation of miR-31 Is Negatively Associated with Recurrent/Newly Formed Oral. Leukoplakia. *PLoS ONE.*; 7(6): e38648

- Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA (2010) Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*;11(2):174-83. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70262-1.
- Zarate AM, Brezzo MM, Secchi DG, Barra JL, Brunotto M. (2013) Malignancy Risk Models for Oral Lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*, Sep 1; 18(5):e759-65.
- Zhang L, Poh CF, Williams M, Laronde DM, Berean K, Gardner PJ, Jiang H, Wu L, Lee JJ and Rosin MP (2012) Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*; 5: 1081-1089.
- Zhao M, Sano D, Pickering CR, Jasser SA, Henderson YC, Clayman GL, Sturgis EM, Ow TJ, Lotan R, Carey TE, Sacks PG, Grandis JR, Sidransky D, Heldin NE and Myers JN (2011) Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. *Clin Cancer Res*; 17: 7248-7264.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

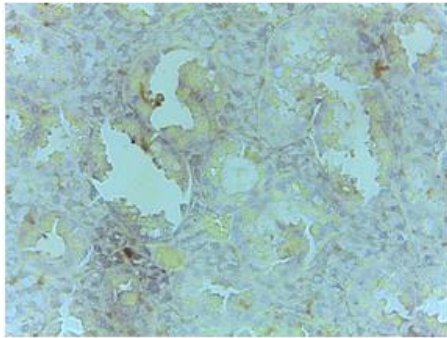
CONGRESOS /JORNADAS CIENTÍFICAS

- Scherma ME, Silva RA, Madzzuduli G, Brunotto M, Pasqualini ME. Regulación de TP53 por PUFAs ω -6 y ω -3 en glándulas salivares inoculadas con DMBA XLVII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Noviembre Rosario. **2014**-Publicado Libro de Resúmenes

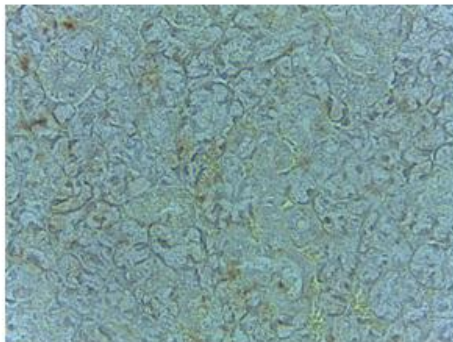
- Scherma ME, Brunotto M, Silva RA, Pasqualini ME. Los ácidos grasos poliinsaturados modifican lípidos y eicosanoides en glándulas submandibulares murinas XLIV Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Octubre Tucumán. **2011**-Publicado Libro de Resúmenes

ANEXO I
CONTROLES DE TÉCNICA -

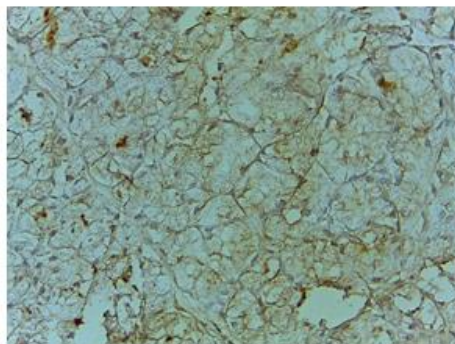
APOPTOSIS-TUNEL



CONTROL NEGATIVO
CÁRTAMO

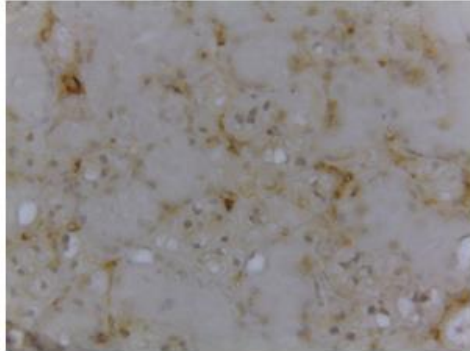


CONTROL NEGATIVO
CHIA

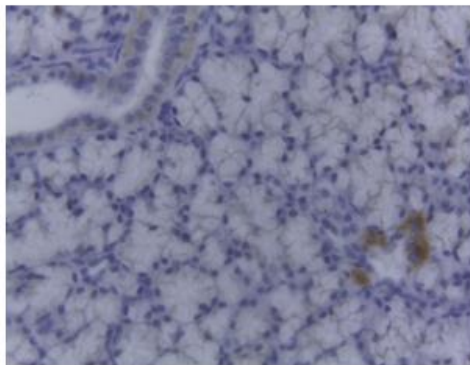


CONTROL NEGATIVO
MAIZ

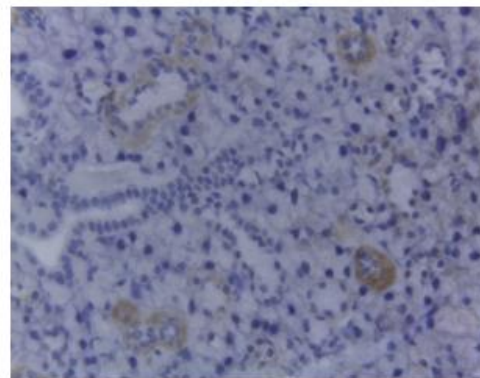
INMUNOMARCACIÓN Ki-67



**CONTROL NEGATIVO
CÁRTAMO**

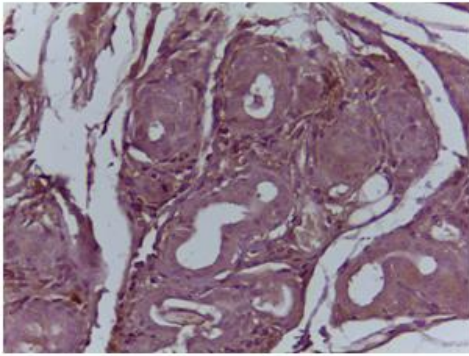


**CONTROL NEGATIVO
CHIA**

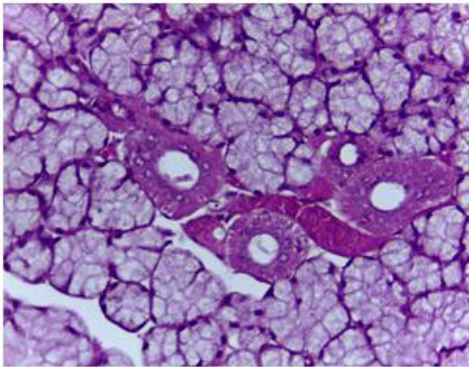


**CONTROL NEGATIVO
MAIZ**

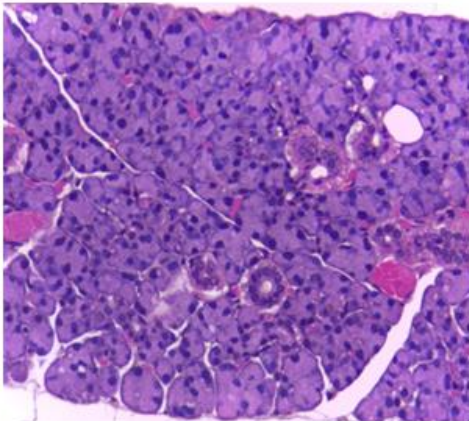
INMUNOMARCACIÓN TP53



**CONTROL NEGATIVO
CÁRTAMO**



**CONTROL NEGATIVO
CHIA**



**CONTROL NEGATIVO
MAIZ**

