



Mecanismos genético-proteicos en la carcinogénesis experimental de glándulas salivales submandibular y parótida

Genetic-protein mechanisms in experimental carcinogenesis of submandibular and parotid salivary glands

Brunotto Mabel¹, Zarate Ana María¹

¹Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Odontología, Departamento de Biología Bucal.

Abstract

Objective: The objective of this work was to evaluate the early alterations of the phenotype and genotype in the parotid and submandibular salivary glands during the development of experimental tumors. **Methods:** The tumor transformation was induced in the submandibular and parotid gland of male Wistar rats was performed by injection of a 0.5% solution 9,10-dimethyl 1,2-benzanthracene in acetone. The samples were analyzed at 0; 7; 30; and 150 days post treatment. Immunostaining for Bcl-2 and p53 was performed and exons of the genes were amplified by PCR for subsequent sequencing. **Results** All animals showed histopathological alterations in the times studied. At 30 and 150 days histological alterations similar to carcinomas were observed. In the DMBA glands, immunostaining was positive for p53 at 30 and 150 days; and for Bcl-2 it was positive at 7; 30 and 150 days in the submandibular glands. No immunocytochemical and genetic changes were observed in the parotid gland at the times studied. **Conclusion:** Our results allow us to conclude that the genetic and phenotypic changes of experimental tumorigenesis in the submandibular and parotid gland may be different or similar but with different degrees of expression. The latter could explain why the parotid gland, although it showed tumor-like changes, did not express genetic and immunocytochemical changes in the markers studied.

KEY WORDS: tumorigenesis, submandibular, parotid, DMBA

Resumen

Objetivo: El objetivo de este trabajo fue evaluar las alteraciones tempranas del fenotipo y genotipo en las glándulas salivales parótida y submandibular durante el desarrollo de tumores experimentales. **Métodos:** La transformación tumoral fue inducida en glándula submandibular y parótida de ratas machos Wistar se realizó por inyección de una solución al 0.5% 9,10-dimetil 1,2-benzantraceno en acetona. Las muestras fueron analizadas a los 0; 7; 30; y 150 días post tratamiento. Se realizó inmunomarcación para Bcl-2 y p53 y se amplificó por PCR exones de los genes para su posterior secuenciación. **Resultados.** Todos los animales mostraron alteraciones histopatológicas en los tiempos estudiados. A los 30 y 150 días se observaron alteraciones histológicas similares a los carcinomas. En las glándulas con DMBA la inmunomarcación fue positiva para p53 a los 30 y 150 días; y para Bcl-2 resultó positiva a los 7; 30 y 150 días en las glándulas submandibulares. No observándose cambios inmunocitoquímicos y genéticos en la glándula parótida a los tiempos estudiados. **Conclusión:** Nuestros resultados nos permiten concluir que los cambios genéticos y fenotípicos de las tumorogénesis experimental en glándula submandibular y parótida pueden ser diferentes o bien similares pero con diferente grado de expresión. Esto último podría explicar por qué la glándula parótida, si bien mostró cambios tumorogénicos, no expresó cambios genéticos e inmunocitoquímicos en los marcadores estudiados.

PALABRAS CLAVE: tumorogénesis, submandibular, parotida, DMBA

Introduction

Los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello se encuentran entre los seis primeros tipos de cánceres más comunes en el hombre y su desarrollo afecta la cavidad oral, las glándulas salivales, la faringe y la laringe¹. Los tumores de glándulas salivales son un grupo diverso de neoplasias a nivel morfológico y clínico; los cuales pueden presentar diagnósticos y terapéuticos considerablemente diferentes tanto para patólogos como para cirujanos. Estos tumores son raros, con una incidencia en el mundo Occidental de 2,5-3,0 por 100.000 por año. Alrededor del 80% de dichas lesiones son benignas, mientras que un 0.5% son malignas².

El proceso que conduce a la transformación maligna no se conoce completamente y la clasificación de los mismos se basa esencialmente en su morfo-histología³. Sin embargo, se cree que durante la génesis de carcinomas híbridos de glándulas salivales, los eventos genético-moleculares son fundamentales para inducir transformaciones desde un tumor de grado bajo histológicamente a un tumor de grado alto⁴. A pesar de ello, estos tumores debido al alto grado de diversidad morfológica que presentan los convierte en 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 la glándula submandibular es considerado, generalmente, con peor pronóstico en relación a los que afectan a las otras glándulas mayores⁵. 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 dentales⁶. Es por ello que la 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. Contrariamente los tumores parotídeos primarios son raros y representan aproximadamente del 1% al 3% de todos los tumores de cabeza y cuello, y en general en su mayoría (75% -85%) son benignos³.

Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto una serie de biomarcadores de

oncogenes y genes supresores de tumores que se intentan utilizar como indicadores de malignidad. Entre ellos, se ha observado que existe una correlación entre la expresión de proteínas como p53, Bcl-2, entre otras, y el desarrollo de lesiones neoplásicas. Las proteínas p53 y Bcl-2 se han encontrado relacionadas con el control del ciclo celular y la muerte celular programada o apoptosis^{1,7}.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las alteraciones tempranas del fenotipo y genotipo en las glándulas salivales submandibular y parótida durante el desarrollo de tumores experimentales.

Métodos

Se utilizaron ratas machos variedad Wistar (n=100), de 60 días (suministradas por el Instituto de Biología Celular de la Universidad de Córdoba) con peso aproximado de 180 g. Las mismas fueron alimentadas *ad libitum* con dieta balanceada y agua, y mantenidas con temperatura controlada de 24°C y con ciclos de luz / oscuridad de 12:12 h.

Los animales fueron separados en dos grupos para el estudio de cada glándula (submandibular / parótida): a) experimental (n=25), que tratado con inyección de DMBA, 50 µl, en cada glándula submandibular/parótida; y b) control (n=25), tratado con 50 µl de solución de acetona. El protocolo para el uso de animales fue realizado bajo los lineamientos de NIH, los cuales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética en Investigación CIEIS- Provincia de Córdoba.

Inducción del tumor por DMBA

Todos los animales fueron anestesiados con una solución de 1.28mg Xilazina / 8mg Ketamina / 100g de peso corporal (Bayer, Argentina y Ketalar, Parker Davis, respectivamente). Una pequeña incisión fue realizada en la superficie ventral del cuello y las glándulas fueron expuestas.

Las glándulas expuestas de los animales pertenecientes al grupo experimental fueron inyectadas con 0.5 % de 9, 10- dimethyl 1, 2 benzantraceno (DMBA) (SIGMA ALDRICH, USA) disuelto en acetona y en el grupo control se utilizó una solución de cloruro de sodio 0.9%. El punto de inyección fue establecido de acuerdo al siguiente diagrama (Fig. 1):

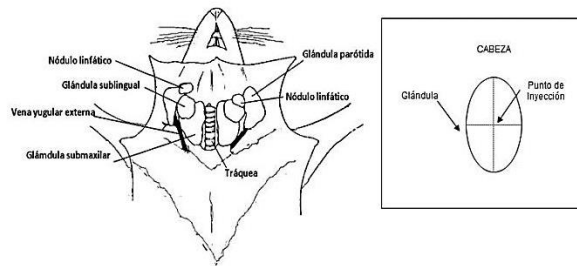


Figura 1. Diagrama del punto de inyección en las glándulas estudiadas

La incisión fue cerrada cuidadosamente con hilo de sutura. Los animales fueron pesados antes de la aplicación del tratamiento y antes de la disección de la glándula. Las glándulas fueron removidas completamente a los 7; 20; 30 y 150 días post tratamiento; se midió el volumen tumoral en g y mm, respectivamente, utilizando escala de precisión y calibre. Posteriormente, la glándula derecha fue destinada para los estudios histopatológicos y la glándula izquierda fue guardada a -20°C para los estudios bioquímico-moleculares. La descripción de los cambios histopatológicos, en el grupo tratado con DMBA, fue realizada de acuerdo a la clasificación histológica internacional de tumores World Health Organization (WHO)⁸.

Estudios histopatológicos

Las muestras de las glándulas extraídas se fijaron en formol 10% tamponado con acetil piridina clohídrico, pH 7. Se procesaron según la técnica de inclusión en parafina y se les aplicó la coloración de Hematoxilina / Eosina y Ácido periódico Schiff (PAS) /Hematoxilina. Los cortes fueron observados con microscopio Olympus BX50, capturados con cámara de video SONY y software Image-ProPlus, 1999.

Inmunocitoquímica

Se realizó en los cortes histológicos de glándula, en cada uno de los tiempos propuestos para estudio, por la técnica de la inmunoperoxidasa/complejo avidina-biotina y por inmunomarcación con oro coloidal incrementado con plata. Las secciones fueron desparafinadas con xilol, deshidratadas con grados crecientes de

alcohol y lavadas con agua destilada. Se utilizaron anticuerpos monoclonales p53 (DAKO, USA) y Bcl-2 (SIGMA, USA). Las tinciones inespecíficas fueron bloqueadas con suero bovino fetal al 5% en PBS 1:10 durante 40 min. Después de los lavados con PBS, el anticuerpo monoclonal específico (1:100) se incubó durante 9-12 hs. a 4°C en cámara húmeda. Luego se lavó 3 veces en PBS y se incubó con inmunoglobulina anti-ratón (1:50) biotilada o con partículas de 10 nm de oro coloidal. 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). Para la inmunomarcación con oro coloidal se le realizó incremento con plata de acuerdo al protocolo BioCell, U.K.

Las preparaciones se colorearon con hematoxilina y eosina. Finalmente, las muestras coloreadas se deshidrataron y se montaron con Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania). Estudios controles se realizaron siguiendo el mismo protocolo, pero omitiendo el anticuerpo monoclonal primario. En cada tiempo se contaron núcleos positivos a p53/núcleos en 50 mm^2 y partículas de oro-plata de Bcl-2/100 células en 50 mm^2 . Se consideró inmunomarcación negativa a p53 y Bcl-2 cuando se el número de núcleos o puntos oro-plata en el área establecida era $<10\%$. Los valores se expresaron en porcentaje y correspondieron a tres experimentos independientes con 8 secciones en cada uno. El conteo fue realizado en secciones observadas a 200x de aumento al microscopio óptico⁹.

Estudios genéticos

Aislamiento de ADN

A partir de secciones de 10-20 mg de glándula (con características macroscópicas tumorogénicas) se realizó la extracción del ADN. Las secciones de órgano se incubaron en buffer de lisis con proteinasa K durante 1 h a 65°C . El homogenato se centrifugó 5' a 14000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se adicionó 1 volumen de cloroformo: isoamílico (24:1); se centrifugó 5' a 10.000 rpm y se recuperó fase acuosa. Se le agregó 0.8-1 volumen de isopropanol que precipitó el ADN y se colocó a -20°C durante 5'. Luego se centrifugó 10' a 10.000 rpm. Se descartó el

sobrenadante y se lavó con alcohol 70% (por centrifugación 5') y se resuspendió en 100 µl de buffer TE 1x. El ADN utilizado para la amplificación tuvo un índice de pureza de $\frac{260}{280} \geq 1.70$.

Los cebadores (*primers*) se diseñaron para amplificar las regiones 6891 a 7627 del gen TP53 localizados en el cromosoma 10 (número de acceso NW_047334) y 237 a 812 del gen bcl-2 y el cromosoma 13 (número de acceso NW_047390) del genoma de la rata (*Rattus norvegicus*, var. Wistar) en *Genbank*. (Tabla 1). La reacción fue realizada a un volumen final de 50 µl. Para la amplificación se utilizó una condición inicial de 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 1 min, 62°C por 2 min y 72°C por 2 min; y una extensión final a 72°C por 10 min. Se utilizaron aproximadamente 10 ng de DNA problema. Los productos de PCR fueron fraccionados en geles de agarosa 0.8% en TBE (Tris-borato EDTA) y teñidos con Bromuro de Etidio. Se utilizó un marcador de ADN Ladder de 0.5 a 12.2 bp (Cien Marker- Promega USA).

Secuenciación de los productos de amplificación

Los productos de amplificación por PCR de los genes p53 y bcl-2 fueron clonados en un sistema vector T de acuerdo al protocolo Qiagen, CA o purificados por columna y secuenciados en MacroGen INC (Seúl, Corea).

Tabla 1: cebadores utilizados para la amplificación de los genes TP53 y bcl-2 de rata.

Gen	Secuencia cebador (primer)	Tamaño producto
P53 sense	5'-TCATCTCCCTGCCAGATAGTCCACC-3'	736 pb
P53 antisense	5'-GCTAAAGAGGAACCCCAAATCTAGACAGAG-3'	
Bcl-2 sense	5'-CGGGAGCCGGGACGCGAAGTG-3'	575 pb
Bcl-2 antisense	5'-GAGCATCCCCGCTTGAGATCAAAGCC-3'	

Análisis Estadísticos

El análisis de los resultados de la inmunomarcación de p53 y Bcl-2 en los tiempos estudiados fue analizada con un Modelo Lineal Generalizado anidado bajo distribución Poisson, valores $p < 0.05$ fueron considerados significativos⁵.

Resultados

En general, todas las ratas machos con glándulas submandibulares o parótidas inyectadas con solución de DMBA desarrollaron tumores en la región del cuello y presentaron cambios macroscópicos e histopatológicos significativos a tiempos tempranos. No se observó formación de tumores en los animales inyectados con solución fisiológica a todos los tiempos estudiados.

Características macroscópicas e Histopatología

Glándula Submandibular

El 100% de los animales, a los 150 días post inyección, presentaron masas nodulares induradas de coloración superficial gris-blanca rodeada por tejido fibroso. Los tumores más grandes, en algunos casos, llegaron a medir 9 cm. de diámetro y pesar 40 g. Macroscópicamente, a los 7; 20 y 30 días post inyección, todos los animales mostraron sangrado profuso (hiperemia) en la zona quirúrgica, además de hipertrofia de los nodos linfáticos circundantes a las glándulas.

Las glándulas submandibulares de los animales controles mostraron acinos basófilos sin material secretor en el lumen de los conductos estriados, los túbulos convolucionados granulares y en los conductos excretores (Fig. 2). Las glándulas submandibulares de los animales inyectados con DMBA mostraron un compromiso del 40-50% de la estructura glandular a tiempos tempranos (30 días) y de un 100% (150 días) a tiempos largos; ambos asociados a la tumorigénesis. Se observó que a los 7 días una proliferación epitelial en el estroma glandular. Las células epiteliales estaban dispuestas como cordones y nidos o formaciones de perlas. A los 30 días, estructuras semejantes a conductos, algunos de ellos con diferenciación epidermoide, presentando infiltración de células leucocitarias, zonas hemorrágicas y tejido fibroso.

A los 150 días se observó el desarrollo de diferentes tipos de carcinomas (Fig. 2).

Glándula parótida

En las glándulas parótidas del grupo experimental del tiempo 7 días postinducción con DMBA, con H/E, se observaron, en el 90% de los cortes estudiados, cambios histológicos leves: sectores aislados con vacuolas en el citoplasma de las células acinares y también en células de los conductos. Conductos intralobulillares con duplicación de capas celulares. A los 30 días postinducción, en el 90% de las muestras estudiadas, presentaron crecimiento tumoral de tipo quístico, con islotes de células epiteliales atípicas que se encontraron infiltrando el tejido conjuntivo próximo a la glándula. También fue posible observar acúmulos de numerosos conductos intralobulillares de diámetro pequeño sin aparente presencia de acinos con núcleos que presentaron diferentes grados de cromasia. (Fig. 3). Se observó además una zona con gran eosinofilia citoplasmática, sin tinción nuclear y con conservación de los límites celulares, lo que hace suponer la existencia de necrosis por coagulación (Fig. 3).

Inmunocitoquímica

En las glándulas submandibulares inyectadas con DMBA, la inmunomarcación fue positiva a la proteína p53 en el citoplasma de células ductales normales (7 días) y en núcleos de células neoplásicas (30 y 150 días) (Fig. 2). La marcación citoplasmática de Bcl-2 fue positiva a los 7; 30 y 150 días post-inyección de DMBA (Fig. 2). Además, se observó un incremento estadísticamente significativo a los 150 días ($p=0.0015$) en relación a los otros tiempos estudiados (Tabla 2). Contrariamente en la glándula parótida ninguna de las dos proteínas inmunomarcó positivamente (Fig. 3).

Análisis genéticos de glándula

Gen p53

Se amplificó la región 6891 a 7627, codificante-exón (6900... 6973, 7236...7257) y no codificante-intrón (6974... 7235), del gen TP53 localizado en el cromosoma 10 del genoma de la rata. En ambas

glándulas, en los tiempos estudiados no se encontraron mutaciones en la región seleccionada de este gen (Fig. 2 y 3).

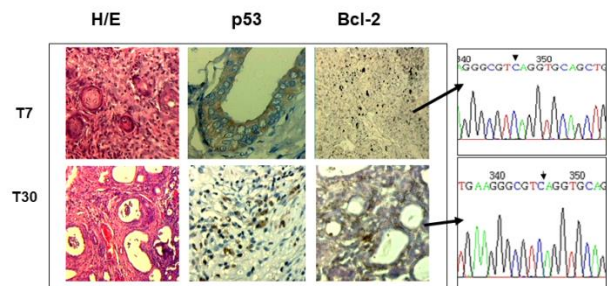


Figura 2. Glándula submandibular. T7: tiempo 7 días post inyección con solución de DMBA; T30: tiempo 30 días post inyección con solución de DMBA. H/E: tinción hematoxilina/eosina. A la izquierda de la imagen se muestran las secuencias genéticas y las flechas indican los cambios de bases observados a los tiempos 7 y 30 días post inyección con DMBA.

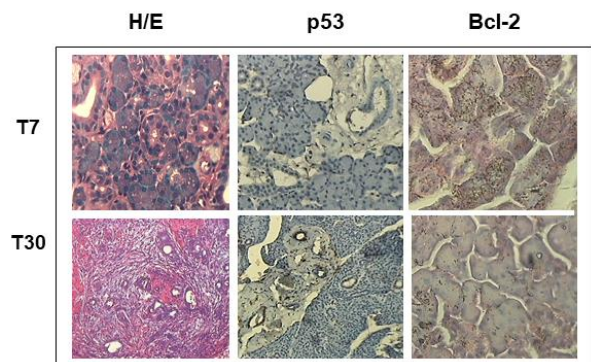


Figura 3. Glándula parótida. T7: tiempo 7 días post inyección con solución de DMBA; T30: tiempo 30 días post inyección con solución de DMBA. H/E: tinción hematoxilina/eosina.

Gen bcl-2

Se amplificó la región codificante-exón 237... 812, localizada en el cromosoma 13 del genoma de la rata (Fig. 2 y 3). A nivel de glándula submandibular a los 7 y 30 días post inyección con DMBA se localizó un cambio de base, tanto en las secuencias *sentido* como en las *antisentido*, CACCG → CAACG. Esta mutación con sentido erróneo (*missense mutation, transversional*) corresponde a un cambio de un aminoácido en la proteína (treonina → asparagina). Los productos de amplificación de los controles de ambos genes estudiados en glándula no presentaron mutaciones.

Contrariamente la glándula parótida no mostró ninguna modificación genética.

Tabla 2: Valor medio (mediana) del porcentaje de inmunomarcación en glándula a los diferentes tiempos estudiados en animales tratados DMBA. T7, T30 y T150: tiempos 7, 30 y 150 días post inyección con solución de DMBA.

Proteína inmunomarcada	Control (%)	DMBA (%)	
		T7	T30
P53	0	0	11
Bcl-2	0	13	32 ^(*)

(*) Diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos estudiados ($p \leq 0.05$)

Discusión

Los tumores obtenidos experimentalmente en este trabajo resultaron ser similares a carcinomas, coincidiendo con datos relevados en la literatura científica^{3,8}. Los resultados del presente trabajo indican que el carcinógeno DMBA indujo la formación de tumores en las glándula estudiadas. La forma de acción del carcinógeno DMBA, un hidrocarburo policíclico aromático, es bien conocida. Este actúa a través de receptores aril hidrocarburo (*AhR*) activando al citocromo P450. Este citocromo 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 P450 a 3,4-diol-1,2-epoxi, que es capaz de unirse covalentemente al ADN y causar una mutación^{10,11}.

A los siete días del tratamiento con DMBA se presentaron cambios histológicos comprometiéndose un 40-50% de la estructura glandular, que podrían corresponder a cambios tempranos relacionados con la tumorigénesis, ya que recuerdan a las características de un carcinoma epidermoide de bajo grado, principalmente en la glándula submandibular⁸. En los tiempos 30 y 150 días post tratamiento con DMBA también se observaron alteraciones histopatológicas con tendencia a la malignidad como desorganización del parénquima glandular, zonas hemorrágicas y estructuras semejantes a conductos⁵.

En la glándula submandibular se observó, a los 7 días pos inyección con DMBA, inmunoreactividad

citoplasmática a la p53, en células normales de los conductos; lo cual podría deberse a un anormal acumulación de esta o a un defecto en el transporte hacia el núcleo celular o a la síntesis *di novo* de esta proteína como respuesta al carcinógeno aplicado de la misma. Estudios realizados en células humanas de cánceres de mama, colon y neuroblastoma mostraron inmunomarcación positiva a p53 en el citoplasma de las mismas¹². En los tiempos 30 y 150 la inmunomarcación fue positiva en el núcleo, aunque el porcentaje de inmunomarcación no varió entre los dos tiempos. Los resultados mencionados indicarían la aparición de cambios moleculares tempranos en regiones de la glándula histológicamente normales.

En ninguno de los tiempos estudiados se observó, en glándula, mutaciones de la región amplificada de p53 a nivel de ADN. Es conocido que distintos sitios anatómicos en cabeza y cuello presentan diferentes mutaciones de p53 y que existe una discordancia en el 40 % de los casos entre inmunocitoquímica y secuencia de genes¹³.

La inmunomarcación positiva de Bcl-2, en glándula submandibular, en todos los tiempos estudiados indicaría una disminución de los mecanismos apoptóticos y, en consecuencia, una supervivencia anormal de la célula. Además, también, se observó un incremento significativo estadísticamente de la inmunomarcación en glándula. El aumento de la expresión de Bcl-2 ha sido demostrado en varios tumores humanos tales como neuroblastomas, linfomas, melanomas, cáncer de mama, meningiomas, carcinomas gastrointestinales. En algunos de estos cánceres la sobre expresión de Bcl-2 resultó indicadora de mal pronóstico^{14,15}.

En concordancia con las evidencias a nivel morfo-fisiológico e inmunocitoquímico, se encontró una mutación a todos los tiempos estudiados en la región amplificada de bcl-2, que correspondió a un cambio de aminoácido (Treonina por Aparagina) en la proteína, que algunos estudios muestran que este tipo de mutación afecta la función normal de la proteína¹⁶.

Muchos de los cánceres de cabeza y cuello presentan mutaciones p53 sin sentido. Este hecho permite ventajas selectivas sobre la pérdida de la función del tipo salvaje, incrementando la capacidad de transformar células y la incidencia de p53 mutada en la progresión de fenotipos no invasivos a invasivos. Estudios recientes en

carcinogénesis sobre la interacción entre estas dos proteínas reguladoras de la apoptosis, p53 y Bcl-2, han demostrado una significativa correlación inversa entre ellas¹⁷.

Las modificaciones morfo-funcionales de la glándula submandibular en la carcinogénesis experimental se correspondieron con cambios a nivel inmunocitoquímico y genético en la glándula en los diferentes períodos estudiados. Sin embargo, en glándula parótida se observaron cambios celulares-histológicos que no se correspondieron con marcaciones inmunocitoquímicas de las proteínas estudiadas. No obstante, estudios previos realizados por nosotros mostraron cambios genéticos e inmunocitoquímicos para una proteína relacionada a la apoptosis como es FAS¹¹.

Nuestros resultados nos permiten concluir que los cambios genéticos y fenotípicos de las tumorogénesis experimental en glándula submandibular y parótida pueden ser diferentes o bien similares pero con diferente grado de expresión. Esto último podría explicar por qué la glándula parótida, si bien mostró cambios tumorogénicos, no expresó cambios genéticos e inmunocitoquímicos en los marcadores estudiados. Aunque no está totalmente claro si los fenotipos de glándula descriptos arriba en tiempos tempranos se encuentran ligados a la malignidad, estos resultados tienden a mejorar el conocimiento de los primeros pasos de la carcinogénesis, principalmente en las glándulas submandibulares, contribuyendo al desarrollo de metodologías preventivas a nivel de salud poblacional.

Todos los autores declaran que no existen conflictos potenciales de interés con respecto a la autoría y / o publicación de este artículo.

All authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article

References

- Brunotto M, Zarate AM, Bono A, Barra JL, Berra S. Risk genes in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of last 5 years. *Oral Oncology*. 2014; 50:178-188.
- Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M, Licitra L. Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010; 74(2):134-48. doi: 10.1016/j.critrevonc.2009.10.004.
- Seethala RR. Salivary Gland Tumors: Current Concepts and Controversies. *Surg Pathol Clin*. 2017; 10(1):155-176. doi: 10.1016/j.path.2016.11.004.
- Seethala RR, Griffith CC. Molecular Pathology: Predictive, Prognostic, and Diagnostic Markers in Salivary Gland Tumors. *Surg Pathol Clin*. 2016; 9(3):339-52. doi: 10.1016/j.path.2016.04.002.
- Brunotto M, Malberti A, Zárate A, Barra JL, Calderón O, Piñas E, Plavnik L, Crosa M. Early alterations of phenotype and genotype in rat Submandibular Gland oncogenesis *Acta Odont Lact* 2006, 19 (1): 13-21.
- Brunotto M, Zarate AM, Barra JL, Malberti A. Graph models for phenotype and genotype association between oral mucosa and submandibular gland tumorogenesis in rat. *J Oral Pathol Med*. 2009; 38(5):463-9.
- Kaiser AM, Attardi LD. Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. *Cell Death Differ*. 2018; 25(1):93-103. doi: 10.1038/cdd.2017.171.
- Skalova A, Michal M, Simpson RH. Newly described salivary gland tumors. *Mod Pathol*. 2017; 30(s1):S27-S43. doi: 10.1038/modpathol.2016.167.
- González Segura I, Secchi DG, Carrica A, Barelo R, Arbelo D, Dericia J, Brunotto M, Zarate AM. Exfoliative cytology as a tool for monitoring premalignant and malignant lesions based on combined stains and morphometry techniques. *J Oral Pathol Med*. 2015 44(3):178-84.
- Ide F, Suka N, Kitada M, Sakashita H, Kusama K, Ishikawa T. Skin and salivary gland carcinogenicity of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene is equivalent in the presence or absence of aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Lett* 2004; 214:35-41.
- Zarate AM, Brunotto M, Malberti A, Reyna Calderón O. Apoptosis Mediada por Ceramidas en la Carcinogénesis Inducida de Glándula Parótida. *Acta Odont Venezolana*.2011; 49 (2):1-16.
- Lian S, Clarke MF. Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2779-2783.
- Meek DW. The p53 response to DNA damage. Review. *DNA repair* 2004; 3:1049-1056.
- Muzio LL, Mignogna MD, Pannone G, Rubini C, Grassi R, Nocini PF, Ferrari F, Serpico R, Favia G, De Rosa G, Maiorano E. Expression of bcl-2 in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of 90 cases with clinico-pathological. correlations. *Oncology reports* 2001; 10:285-291
- Solomon MC, Vidyasagar MS, Fernandes D, Guddattu V, Mathew M, Shergill AK, Carnelio S, Chandrashekar C. The prognostic implication of the expression of EGFR, p53, cyclin D1, Bcl-2 and p16 in primary locally advanced oral squamous cell carcinoma cases: a tissue microarray study. *Med Oncol*. 2016; 33(12):138.

16. Sawada M, Nakashima S, Banno Y, Yamakawa H, Takenaka K, Shinoda J, Nishimura Y, Sakai N, Nozawa Y. Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells. *Oncogene*. 2000; 19(31):3508-20.
17. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22: 9030–904.

Corresponding to/Correspondencia a:

Dr. Ana María Zarate

Universidad Nacional de Córdoba,

Facultad de Odontología, Departamento de Biología Bucal

Haya de La Torre s/n Ciudad Universitaria, CP 5000,

Córdoba, Argentina.

Tel.: +54 351 4333032.

E-mail/Correo electrónico: azgelfo@hotmail.com