

Investigación

Desarrollo de lesiones displásicas y neoplásicas linguales en animales de laboratorio

Lingual development of dysplastic and neoplastic lesions in laboratory animals

AUTORES

DR. ZAVALA WALTHER DAVID

Prof. Titular Histología.Facultad Odontología. UNCuyo, Mendoza, Argentina.
Email: waltherzavala@gmail.com

DR. CAVICCHIA JUAN CARLOS

Prof. Emerito, Fac. Odontología, UNCuyo.

CO AUTOR

FOSCOLO MABEL

Tec. Ppal CONICET.

RESUMEN

Los modelos experimentales juegan un papel importante en las ciencias biomédicas en la elucidación de la patogénesis de diferentes trastornos que afectan a los organismos vivos, incluyendo los seres humanos y también son útiles para: el estudio de la base molecular involucrada en cualquier enfermedad, en el desarrollo de marcadores de diagnóstico y en la evaluación de la eficacia y la seguridad de las diferentes opciones de tratamiento, incluyendo terapias farmacológicas potenciales.

Para conseguir el desarrollo y progresión de las lesiones neoplásicas orales se necesita la presencia de factores generales y aquellos que son específicos para el medio oral, lo que lleva, en consecuencia, a este proyecto cuyo objetivo principal es el desarrollo de un modelo experimental de cáncer oral en ratas.

Materiales y métodos: se utilizó 4- (4-nitroquinolina-1-óxido) para inducir tumores en la mucosa oral en ratas de acuerdo con protocolos previamente establecidos.

Resultados: Las primeras lesiones clínicamente sospechosas se desarrollaron en los 3 meses de iniciado el experimento. Los tejidos fueron removidos en dos etapas y las muestras fijadas, procesadas y examinadas por microscopía de luz. Las muestras mostraron patrones consistentes con displasia intraepitelial y con carcinoma de células

ABSTRACT

Experimental models play an important role in biomedical sciences in elucidating the pathogenesis of different disorders that affect living organisms, including humans, and are also useful for: studying the molecular basis involved in any disease, in development of diagnostic markers and in evaluating the efficacy and safety of different treatment options, including potential drug therapies.

There are general factors and those that are specific to the oral environment, leading to the development and progression of neoplastic lesions of the oral cavity, accordingly, make this project whose main objective is to develop an experimental model of oral cancer in rats.

Materials and methods: we used 4-(4-nitroquinoline-1-oxide) to induce tumors in the oral mucosa in rats according to previously established protocols.

Results: The first clinically suspicious lesions developed at 3 months into the experiment, the tissue was removed and fixed samples, processed and examined by light microscopy. The samples showed patterns consistent with intraepithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. It hopes to develop an experimental model as a basis for further study of basic and clinical application.

Key Words: tongue-oral cancer.

Desarrollo de lesiones displásicas y neoplásicas linguales en animales de laboratorio

W. D. Zavala; J. C. Cavichia; M. Foscolo

escamosas. Se espera que este desarrollo de modelo experimental sirva como base para futuros estudios sobre mecanismos y comportamientos biológicos de los tejidos orales, así como modelo de aplicación terapéutica.

Palabras clave: cáncer oral- lengua-mucosa

INTRODUCCIÓN

Según la OMS el cáncer bucal representa del 2 al 5% del total de pacientes oncológicos y es responsable de 1% de las muertes por cáncer. Cada año se diagnostican 275.000 casos nuevos de cáncer oral en todo el mundo (1). Los principales factores de riesgo para el desarrollo de cáncer oral son: el tabaco y el alcohol. Los tratamientos empleados en la actualidad: cirugía, radioterapia y quimioterapia, solos o combinados, no han demostrado avances en el aumento de sobrevida. Se han desarrollado varios modelos, en animales de laboratorio, de carcinoma de células escamosas, incluyendo: hámsteres, ratas, y ratones, cada uno con sus ventajas y desventajas (2).

En la actualidad, la mejilla del hámster es un modelo ampliamente utilizado, creándose tumores por la aplicación de DMBA (7,12-dimethylbenzantraceno), aunque este modelo tiene la desventaja de que los tumores producidos no son iguales a su contraparte humana (3). Otra sustancia utilizada con frecuencia es el 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) introducido por Wallenius and Lekholmen 1973 (4), para inducir tumores en ratas. Este modelo ha sido utilizado tanto en ratas como en ratones para estudiar el efecto de sustancias antitumorales.

Nuestra facultad no ha desarrollado ni posee un modelo de experimentación de tumores orales en animales de laboratorio. Debido a la necesidad de investigar y desarrollar nuevas terapias tanto in vitro como in vivo, es que se planteó este trabajo persiguiendo el objetivo específico

de promover la aparición de lesiones displásicas y neoplásicas en tejidos linguales en animales de laboratorio.

Metodología.

Los animales, ratas Wistar hembras, se dividieron en dos grupos: a) grupo experimental (n=12), y b) grupo control (n=5). En el grupo experimental se utilizó 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) para inducir tumores en la mucosa oral, de acuerdo a protocolos previamente establecidos (5,8). Se siguió las guías de cuidados de animales de laboratorio sugeridas por CICUAL (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio).

La solución se incorporó al agua de bebida con una concentración de 20 ppm. Los animales del grupo experimental se sacrificaron en dos tandas.

Los animales del grupo experimental se mantuvieron bajo observación directa y control de peso semanal hasta detectar cambios en: la ingesta, en el peso o aparición de lesiones clínicamente sospechosas. Se sacrificaron en dos tandas, la primera (n=6) en la semana 20ª, y el resto de los animales (n=6) en la semana 30ª.

Los animales fueron sacrificados bajo campana de dióxido de carbono. Se extirparon las lenguas y las muestras obtenidas se dividieron en dos segmentos (anterior y posterior) y se analizaron cortes seriados de cada segmento. Para la fijación se utilizó solución de paraformaldehído 4%. El grupo control se mantuvo con agua de bebida normal

y ambos grupos tuvieron comida a libre disposición.

Las muestras fueron incluidas en parafina luego de su deshidratación en alcoholes de concentración creciente. El bloque de parafina fue cortado en secciones seriadas de 5 a 7 micras de espesor. El tejido fue coloreado con hematoxilina-eosina, según técnica habitual y los preparados coloreados se observaron en microscopio trinocular Zeiss Axiostar. En todos los casos se obtuvieron registros fotográficos con cámara Canon PowerShot A620, para su posterior análisis y estudio estadístico. Se analizaron todas las secciones y se promediaron los resultados obtenidos. Para el análisis estadístico se empleó el software: GraphPadPrism. Los resultados muestran el análisis de las muestras tomadas en la 20ª semana y a las 30ª semana respectivamente. En todos los casos se expresan valores promedio \pm error estándar. En las muestras seriadas y analizadas microscópicamente se realizó y análisis de la varianza mediante test de Anova y post test de Tukey.

Resultados

Los resultados en el grupo experimental mostraron ausencia de lesiones en el sector anterior, tanto en el examen macro como microscópico, en tanto que en el sector lingual posterior se pudo observar que en la semana 20ª un 83% las muestras obtenidas correspondían a tejido clínicamente normal, mientras que un 17 % presentaba lesiones blancas.

En la semana 30ª de iniciada la adminis-

Desarrollo de lesiones displásicas y neoplásicas linguales en animales de laboratorio

W. D. Zavala; J. C. Cavicchia; M. Foscolo

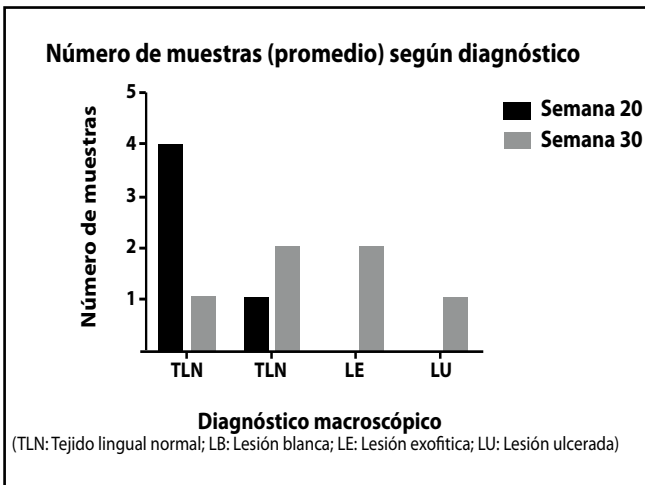


Gráfico 1

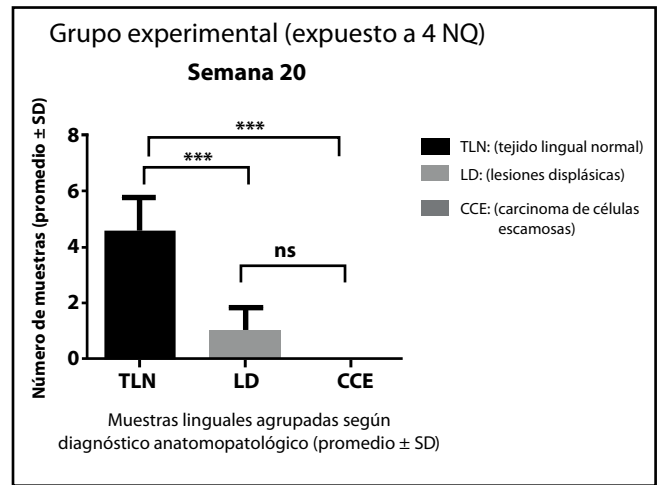


Gráfico 2

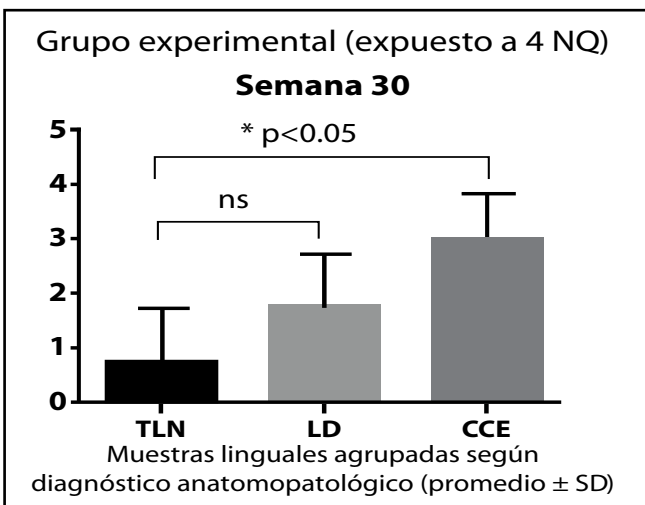


Gráfico 3

tración de 4-NQO, solo en el 16,6 % se observó tejido lingual de apariencia clínica normal, mientras que el resto (83,4 %) presentó algún tipo de lesión evidenciable desde mancha blanca, hasta grandes lesiones exofíticas o ulceradas, como la que se muestra en el gráfico 1. (Ver gráfico 1)

Microscópicamente en la semana 20ª, el 17 % se correspondió con cambios displásicos leves en el epitelio. En forma

comparativa, en la semana 30ª el 33,3 % de las muestras obtenidas presentaron lesiones displásicas, con cambios epiteliales marcados, y el 50% desarrolló cambios atípicos de diferente grado con invasión conectiva y con diagnóstico de carcinoma de células escamosas, como las que se observan en las imágenes. El análisis estadístico mostró diferencia estadísticamente significativas al comparar las medias entre los diferentes tipos de lesiones microscópicas en-

contradas en la semana 20ª ($p < 0.005$) y la semana 30ª ($p < 0.001$) (gráfico 3). (Ver gráfico 2 y 3)

Macroscópicamente se observa una lesión exofítica redondeada de tamaño intermedio (A) y una gran lesión vegetante (B), ambas en el tercio posterior de la lengua. (Ver Figura 1, semana 30ª A y B).

Examen microscópico: en A se observa tejido lingual normal (TLN); en B lesión papilomatosa vascularizada con cambios displásicos epiteliales (100X). La imagen C es ejemplo de las lesiones con cambios atípicos y diagnóstico de carcinoma lingual de células escamosas, (en D igual a mayor aumento 400X). (Ver figura 2, semana 30ª A, B, C y D).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Varios modelos de carcinoma epidermoide se han desarrollado con diferentes resultados; algunos grupos han obtenido éxito a través de la inyección transdérmica de sustancia carcinogénicas, pero con elevada mortalidad de los animales de experimentación. El desarrollo de cáncer oral resulta mucho más dificultoso que el de piel,

Desarrollo de lesiones displásicas y neoplásicas linguales en animales de laboratorio

W. D. Zavala; J. C. Cavicchia; M. Foscolo

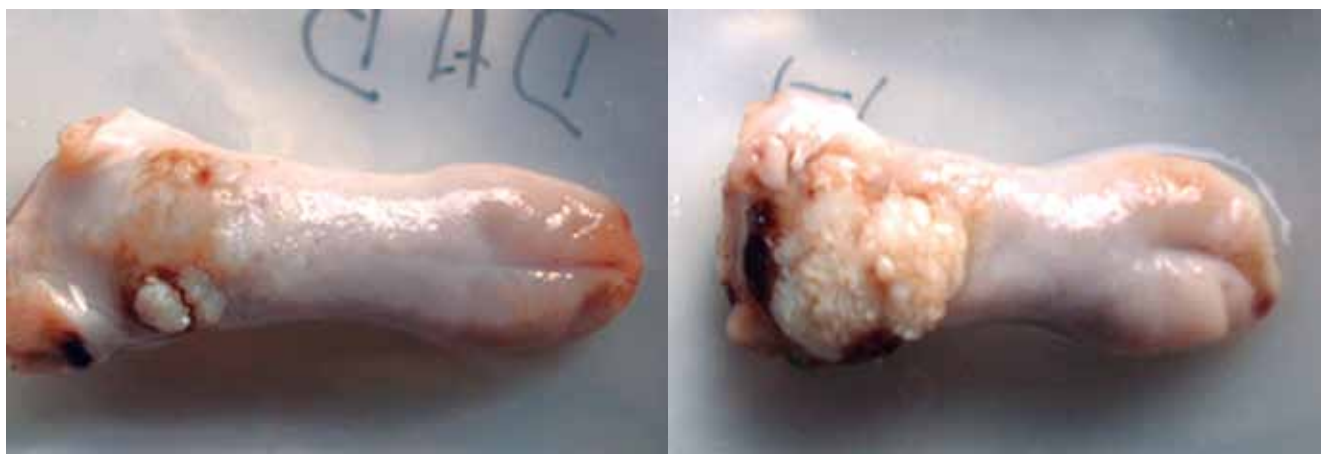


Figura 1: Semana 30ª Imagen macroscópica A y B.

probablemente debido a las características defensivas propias de la saliva y del ambiente bucal los cuales impiden su rápida progresión. (5)

Uno de los primeros modelos utilizados con éxito ha sido la aplicación de DMBA en la mejilla del hámster, sin embargo este modelo también ha recibido numerosas críticas ya que exige considerable laboriosidad y control permanente durante su desarrollo. Por otro lado el cancerígeno requiere disolución en benceno o acetona que también poseen efecto cancerígeno per se. (6)

Myers et al; (2002) consiguió con éxito desarrollar un modelo experimental murino tras la inoculación en tejido conectivo sublingual. (7)

Con respecto a la inoculación, el grupo de Cabanillas et al; (2005), refiere que los carcinomas implantados en el tejido celular subcutáneo de ratones atímicos (xeno-injerto) resultan ser modelos incapaces de reproducir la evolución de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello ya que no poseen capacidad invasora y se muestran en la mayoría de los casos encapsulados. (8) La 4NQO es un poderoso carcinogé-

tico y ha demostrado su efecto sobre epitelios estratificados especialmente en la lengua. En nuestro caso se reproduzco el modelo nitroquinolinico por considerar su evolución más fiable, aunque no se persiguió en este caso profundizar la evolución del mismo hacia estadios metastásicos. Aclaremos aquí (no referido en la metodología) que se evaluaron ganglios regionales e hígado para descartar metástasis ganglionares y hemáticas, así como esófago para evaluar la progresión en otros epitelios estratificados.

La principal desventaja de este modelo

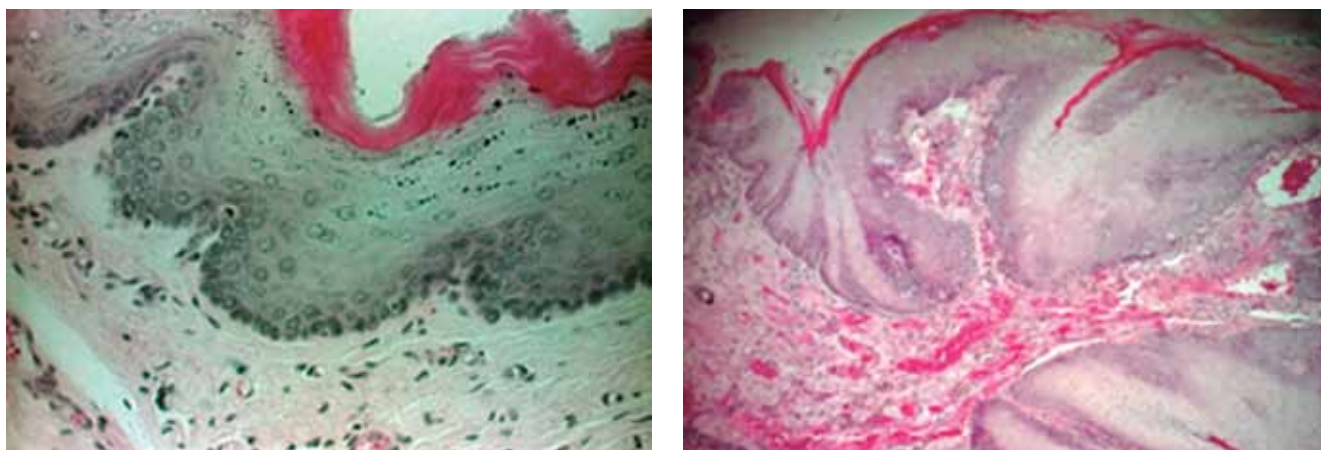


Figura 2: Semana 30ª Imagen microscópica A y B.

Desarrollo de lesiones displásicas y neoplásicas linguales en animales de laboratorio

W. D. Zavala; J. C. Cavicchia; M. Foscolo

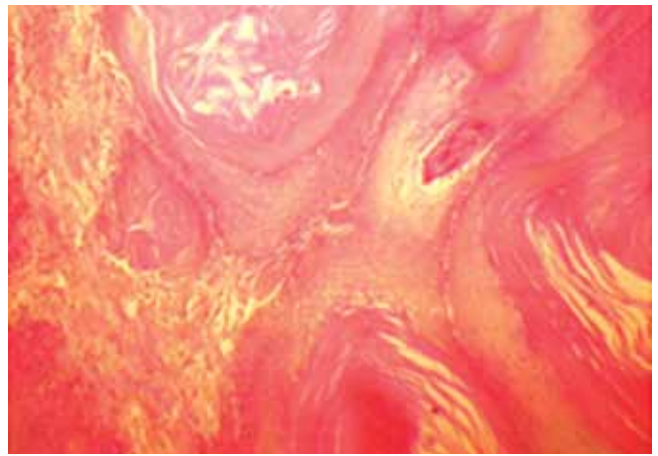
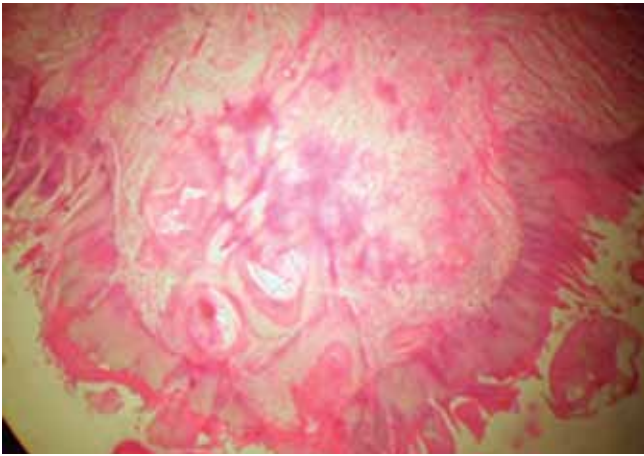


Figura 2: Semana 30ª Imagen microscópica C y D.

con respecto a otros utilizados para desarrollar tumores de mucosa bucal es que implica un largo proceso de varios pasos para llegar al desarrollo de un carcinoma epitelial invasor, pero como ventaja trascendente se puede lograr un carcinoma, en ratas, con características similares a los desarrollados por los tumores de mucosa oral humana. Haque J et al, 2007 estudió el efecto de las hormonas sexuales como factor

influyente en el desarrollo de carcinoma epidermoide en ratas, indicando que en hembras el efecto de la 4-NQO en el agua de bebida era extremadamente raro. En nuestro modelo la tasa de desarrollo de lesión tumoral fue alta aunque la cantidad de animales totales así como el grado variable de displasia no lo consideramos suficiente como para contrarrestar los hallazgos del grupo de Haque. (9)

AGRADECIMIENTOS:

Nuestro equipo agradece el aporte técnico de Laura Melina García, cuya colaboración ha permitido la realización de las preparaciones histológicas necesarias para este proyecto. Este proyecto fue financiado por la Secretaria de Ciencia Técnica y Posgrado (SECTYP), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P (2005) *Global cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin* 55(2):74–1082-Boffetta P, Hasbibe M (2006) *Alcohol and cancer*. *Lancet Oncol* 7(2):149–1563
2. SCHOOP RA, NOTEBORN MH, BAATENBURG DE JONG RJ (2009). *A mouse model for oral squamous cell carcinoma*. *J Mol Hist* 40:177–1819
3. AROMANDO RF, TRIVILLIN VA, HEBER EM, POZZI E, SCHWINT AE, ITOIZ ME (2010). *Early effect of boron neutron capture therapy mediated by boronophenylalanine (BPA-BNCT) on mast cells in premalignant tissue and tumors of the hamster cheek pouch*. *Oral Oncol*. May;46(5):355-9.
4. KANOJIA D, VAIDYA MM (2006) *4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis*. *Oral Oncol* 42(7):655–6676.
5. VERED, M.; GRINSTEIN-KOREN, O; REITER, S; ALLON, I. & DAYAN, D. (2010). *The effect of desalivation on the malignant transformation of the tongue epithelium and associated stromal myofibroblasts in a rat 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis model*. *Int. J. Exp. Pathol.*, 91:314-23.
6. NAUTA, J. M.; ROODENBURG, J. L.; NIKKELS, P. G.; WITJES, M. J. & VERMEY, A. (1995) *Comparison of epithelial dysplasia: the 4NQO rat palate model and human oral mucosa*. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 24:53-8.
7. MYERS JN, HOLSINGER FC, JASSER SA, BEKELE BN, FIDLER IJ. (2002) *An orthotopic nude mouse model of oral tongue squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*. Jan;8(1):293-8.
8. CABANILLAS R ET AL; (2005). *Modelo murino ortotópico de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello* *Acta OtorrinolaringolExp*; 56: 89-95.
9. HAQUE J, KATAKURA A, KAMIYAMA I, TAKAGI R, SHIBAHARA T, NOMAH, (2007). *Effects of sex hormones on rat tongue carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)*. *Bull Tokyo Dent Coll*. Feb; 48(1):9-17.