

## **MODELO DE CÁNCER ORAL EN ANIMALES DE LABORATORIO Y DETERMINACIÓN DE MASTOCITOS PERITUMORALES**

AUTORES: Zavala WD <sup>(1)</sup>, Cavicchia JC <sup>(2)</sup>, Foscolo M <sup>(3)</sup>.

(1)Prof. Titular Histología.Facultad Odontología. UNCuyo, Mendoza, Argentina.

(2) Prof. Emerito, Fac. Odontología, UNCuyo.

(3) Tec. Ppal CONICET.

Email: [waltherzavala@gmail.com](mailto:waltherzavala@gmail.com)

### **RESUMEN**

Introducción: El cáncer bucal representa del 2 al 5% del total de pacientes oncológicos y es responsable de 1% de las muertes por cáncer. El estudio del mismo se puede realizar tanto desde el punto de vista clínico como experimental. La carcinogénesis oral experimental inducida por el químico 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) es uno de los métodos más frecuentes en el estudio del carcinoma de células escamosas de la cavidad oral

Este trabajo tiene por objetivo desarrollar lesiones neoplásicas en lengua de ratas y estudiar los mastocitos peritumorales.

Metodología: se empleó 4NQO disuelta en agua para estimular la aparición de lesiones tumorales en cavidad oral de ratas Wistar. Se realizaron cortes seriados y tinción con hematoxilina eosina además de toluidina y safranina, para la visualización de mastocitos.

Resultados: Se logró el desarrollo de lesiones tumorales con diferentes grados de displasia en el tercio posterior de la lengua. El recuento numérico y el estudio de la morfología de los mastocitos peritumorales, indicó una creciente disminución con respecto al tejido lingual normal sin signos de activación.

La clara ventaja del modelo radica en el gran parecido al proceso fisiológico de la neoplasia en tejidos humanos. Este modelo tiene beneficios claros y es adecuado para las aplicaciones de la investigación terapéutica.

**PALABRAS CLAVES:** cáncer oral- mastocitos-lengua

## **INTRODUCCION**

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 (2). 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 (3).

En la actualidad, la mejilla del hámster es un modelo ampliamente utilizado (4), creándose tumores por la aplicación de 7,12-dimethylbenzantraceno (DMBA), aunque este modelo tiene la desventaja de que los tumores producidos no son iguales a su contraparte humana. Otra sustancia utilizada con frecuencia es 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) introducido por Wallenius and Lekholmen 1973 (5), para inducir tumores en ratas. Este modelo ha sido utilizado tanto en ratas como en ratones para estudiar el efecto de sustancias antitumorales

La facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Cuyo 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 plantea este trabajo persiguiendo este objetivo específico.

Por otro lado, el rol que cumplen las diferentes células del sistema inmune incluyendo los mastocitos o las células dendríticas plantea un interesante punto de controversia que aún no ha sido resuelto.

### **Objetivos.**

Primario: Desarrollar un modelo de cáncer oral en ratas.

Secundario: Determinar la morfología y características particulares de las células cebadas (mastocitos) en el área peritumoral de lesiones tumorales iniciales de mucosa lingual.

### **Metodología.**

Los animales, ratas Wistar hembras, se dividieron en dos grupos (n=10 grupo experimental, n=5 grupo control). Se utilizó 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) para inducir tumores en la mucosa oral en ratas de grupo experimental, 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 5 ppm. Se mantuvieron bajo observación directa y control de peso semanal hasta detectar cambios en la ingesta, peso o lesiones clínicamente sospechosas. Las lesiones sospechosas fueron extirpadas después de sacrificar los animales bajo campana de dióxido de carbono y las muestras obtenidas se fijaron en solución de paraformaldehído y procesadas para microscopia óptica. Las muestras siguieron la metodología de preparación utilizada previamente con éxito por nuestro equipo de trabajo(6). Cortes seriados de de 5 a 7 micrómetros fueron coloreados con hematoxilina-eosina, toluidina y azul alciano-safranina. En todos los casos se obtuvieron registros fotográficos para su posterior análisis y estudio estadístico. Se analizaron tres secciones peritumorales por porta y se promediaron los resultados obtenidos. Para el análisis estadístico se empleó el software: GraphPad Prism. Los resultados muestran el número de mastocitos/mm<sup>2</sup>, comparando el grupo control versus el número de mastocitos en las regiones peritumorales de las muestras tomadas en la 20<sup>a</sup> semana y a las 30<sup>a</sup> semana, respectivamente. En todos los casos expresan valores promedio  $\pm$  desviación estándar. Se realizó análisis de varianza mediante test ANOVA y post test de Tukey ("Tukey's Multiple Comparison Test") (figura 4)

### **Resultados.**

Los resultados mostraron:

Macroscópicamente: los primeros cambios se detectaron en el grupo experimental a partir del 4<sup>o</sup> mes de iniciada la administración de 4-NQO, con la aparición de lesiones blancas sospechosas sobre el dorso posterior de la lengua y algunas lesiones papilomatosas pequeñas como la que se muestra en la figura 2.

Microscópicamente se detectaron cambios displásicos leves en el epitelio, y lesiones papilomatosas de estroma conectivo muy vascularizados. En coincidencia se detectaron numerosos mastocitos en las zonas linguales estudiadas, pero no tan abundantes como los observados en las secciones de tejido lingual normal (ver análisis estadístico).

En un segundo grupo de biopsias tomadas en la 30<sup>a</sup> semana meses los cambios macroscópicos fueron visibles en forma de lesiones blancas exofíticas de gran tamaño, con predominio en la zona posterior del dorso de la lengua. Microscópicamente se observaron cambios displásicos severos, ejemplificados en las imágenes de la figura 3.

La cantidad de mastocitos peritumorales fue escasa y no se encontró un número significativo de mastocitos degranulados como indicador de activación.

### **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 sustancias carcinogénicas, pero con elevada mortalidad de los animales de experimentación.

El desarrollo de cáncer oral resulta mucho más dificultoso que el de piel, probablemente debido las características defensivas propias de la saliva y del ambiente bucal que impiden su rápida progresión. (7)

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 numerosa 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*. (8)

Myers et al (2002) consiguieron con éxito desarrollar un modelo experimental murino tras la inoculación en tejido conectivo sublingual. (9)

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. (10)

La 4NQO es un poderosos carcinogénico y ha demostrado su efecto sobre epitelios estratificados especialmente en la lengua. En nuestro caso se reprodujo el modelo nitroquinolínico por considerarse 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 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 estudio 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 (11). En nuestro modelo la tasa de desarrollo de lesión tumoral fue del 100%, 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.

El otro aspecto evaluado en este trabajo fueron los mastocitos peritumorales. Los mastocitos (MC) son derivados de la médula ósea que funcionan tanto como reguladores positivos y negativos de la respuesta inmune. Los MC se observan con frecuencia en diversos tumores y se han atribuido, alternativamente, con el rechazo o la promoción del tumor ya sea al influir directamente en la proliferación de células tumorales y la invasión sino también ayudando a tumores indirectamente por la organización de su microambiente y la modulación de la respuesta inmune a las células tumorales.

En un detallado análisis, Taverna et al; (2013), informan que la distribución periférica de los mastocitos en torno a un tumor inducido experimentalmente ha sido reconocido como jugando un papel protector contra diversos tumores. En estos tumores, se ha notificado que los mastocitos y sus productos de desgranulación (histamina, serotonina, heparina) y estar implicado en la inhibición proliferativa. Además se reporta que la incidencia de metástasis, así como la aparición de tumores se correlaciona inversamente con el nivel de histamina en el tejido y el recuento de células. (12)

Curiosamente, Henderson et al., 1981 (mencionado por Taverna) encontraron que los mastocitos inactivan selectivamente células tumorales in vitro (12). Estos hallazgos sugieren que los mastocitos pueden desempeñar un papel en la inhibición de metástasis tumorales y suprimir el crecimiento de tumores primarios

En contraste con los resultados en las neoplasias malignas inducidas experimentalmente, algunos estudios han sugerido que los mastocitos promueven la progresión tumoral. Xia Q, et al. (2011), en un estudio realizado sobre 155 pacientes con cáncer de colon concluyeron que la densidad de mastocitos en la mucosa de colon normal adyacente estaban relacionados con la progresión del cáncer de colon, lo que sugiere que los mastocitos pueden modular la progresión tumoral a través de un mecanismo de larga distancia. (13)

En nuestro caso concluimos que el número de mastocitos (en las muestras analizadas) presentó una reducción significativa en las áreas peritumorales incluso en las pequeñas lesiones papilomatosas con pedículo intensamente vascularizado. El significado de estos hallazgos no permite aclarar la cuestión debido a la gran controversia en la literatura, pero aporta un dato más sobre la posibilidad de que cada tumor esté

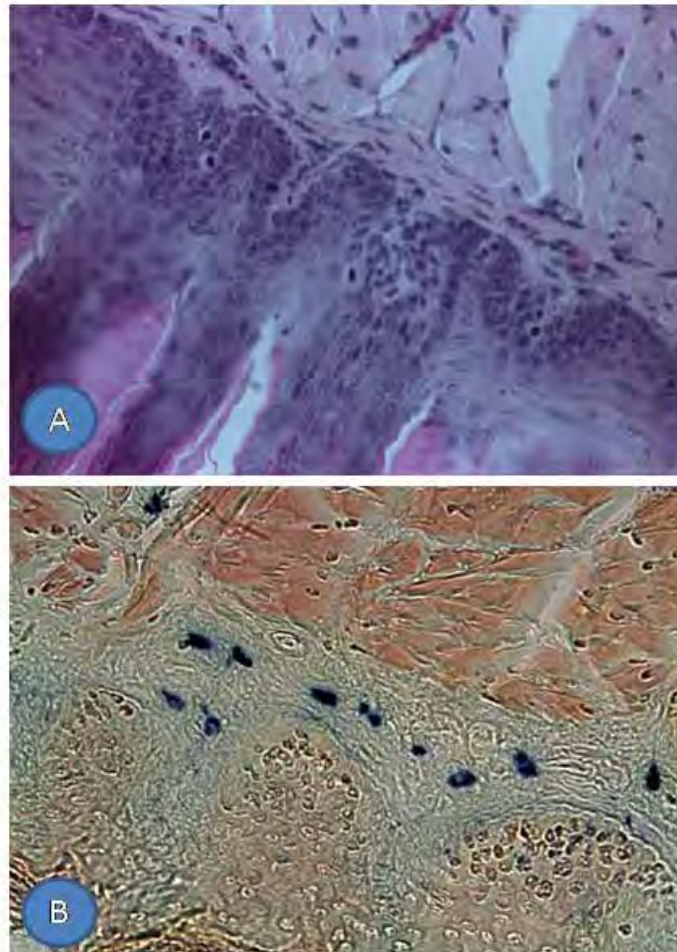
influenciado por su microambiente particular comportándose de manera diferente según su localización. Como vemos, es difícil extraer conclusiones que generalicen el papel de los mastocitos y la evolución tumoral en todos los sitios del organismo, para lo cual se requerirán más estudios que aporten datos según la ubicación particular de la neoplasia.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013 Mar 1;132(5):1133-45. doi: 10.1002/ijc.27711. Epub 2012 Jul 26.
2. Boyle P, Levin B, editors. World cancer report 2008. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. 330 pp.
3. Schoop RA, Noteborn MH, Baatenburg de Jong RJ. A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *J Mol Hist*, 2009, 40:177–1819
4. Aromando RF, Trivillin VA, Heber EM, Pozzi E, Schwint AE, Itoiz ME. 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*. 2010 May;46(5):355-9. Epub 2010 Mar 2110
5. Kanojia D, Vaidya MM. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 2006; 42(7):655–6676.
6. Zavala W, Foscolo M, Davila J, Cavicchia J. Early Development of Mast Cell System in Lingual Tissues of Intrauterine and Newborn Rats. *International Journal of Sciences*. Volume 2 - September 2013 (9)
7. Vered, M.; Grinstein-Koren, O; Reiter, S; Allon, I. & Dayan, D. 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* 2010; 91:314-23, 2010.
8. Nauta, J. M.; Roodenburg, J. L.; Nikkels, P. G.; Witjes, M. J. & Vermey, A. Comparison of epithelial dysplasia: the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int. J. Oral Maxillofac Surg* 1995, 24:53-8.
9. Myers JN, Holsinger FC, Jasser SA, Bekele BN, Fidler IJ. An orthotopic nude mouse model of oral tongue squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002 Jan;8(1):293-8.
10. Cabanillas R et al.; Modelo murino ortotópico de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello *Acta Otorrinolaringol Esp*; 2005; 56: 89-95.

11. Haque J, Katakura A, Kamiyama I, Takagi R, Shibahara T, Noma H. Effects of sex hormones on rat tongue carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO). Bull Tokyo Dent Coll. 2007 Feb; 48(1):9-17.
12. Taverna G, Giusti G, Seveso M, et al. Mast Cells as a Potential Prognostic Marker in Prostate Cancer, Disease Markers 2013, 35 (6).
13. Xia Q, Ding Y, Wu XJ, Peng RQ, Zhou Q, Zeng J, Hou JH, Zhang X, Zeng YX, Zhang XS, Chen YB. Mast Cells in Adjacent Normal Colon Mucosa rather than Those in Invasive Margin are related to Progression of Colon Cancer. Chin J Cancer Res. 2011 Dec; 23 (4):276-82.

## ANEXOS-FIGURAS-TABLAS

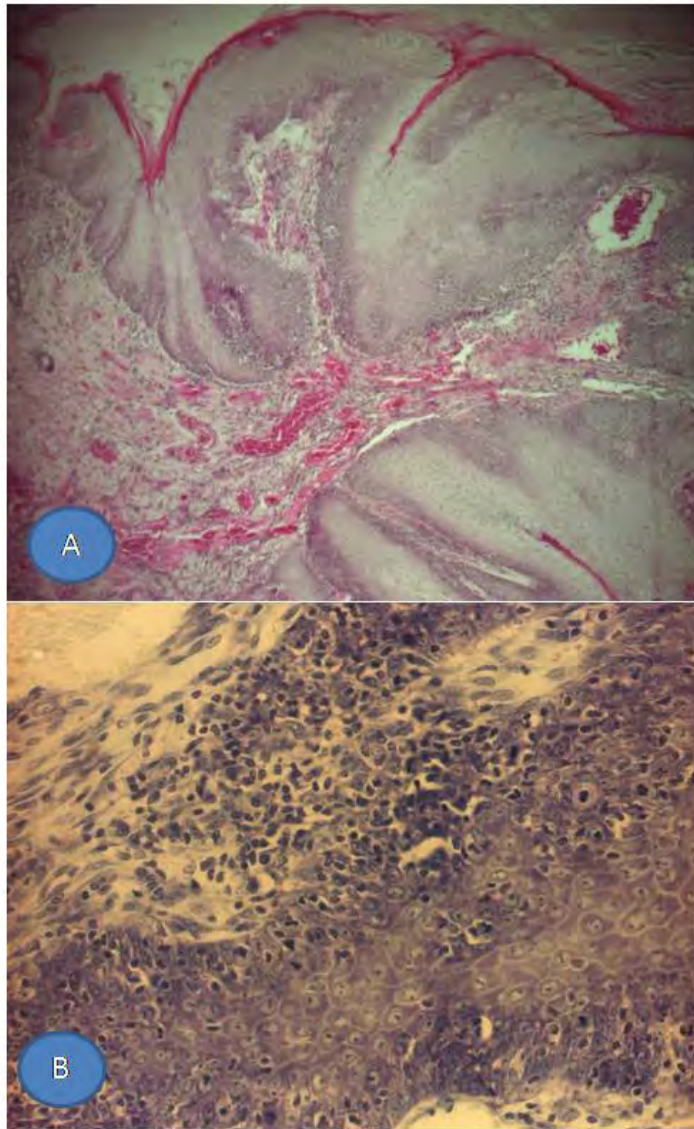


**Figura 1: Semana 12-16.**

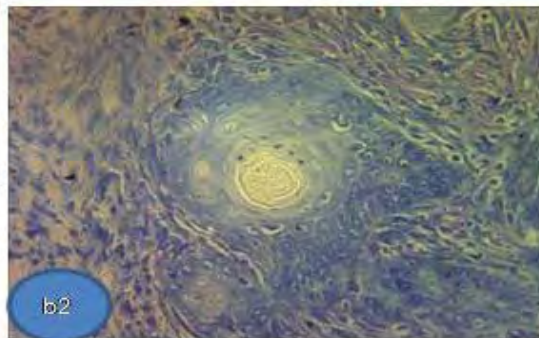
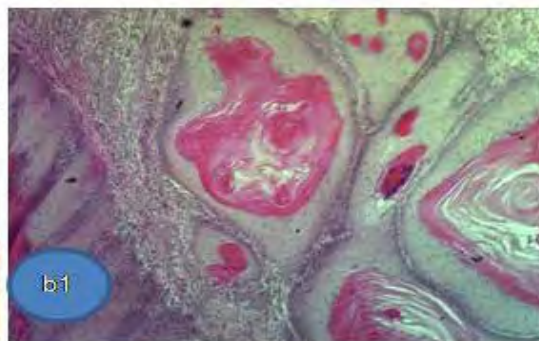
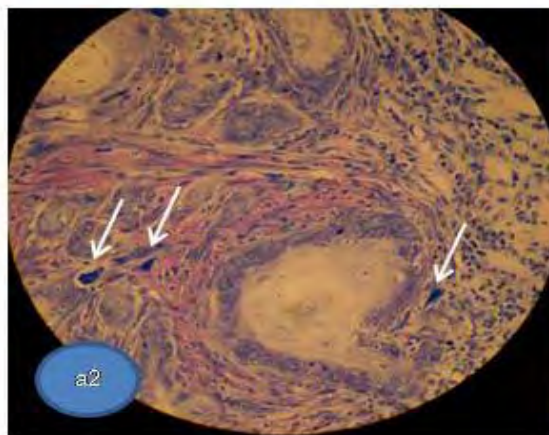
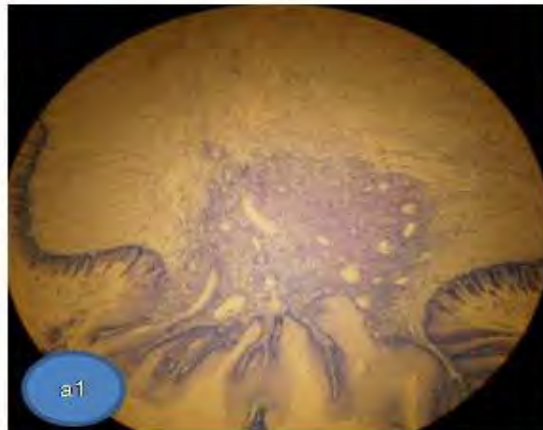
**A) Sección representativa, se observa epitelio y lámina propia (corion) con tejido lingual normal (x400).**

**B) Mastocitos toluidina positivos, lengua control normal**



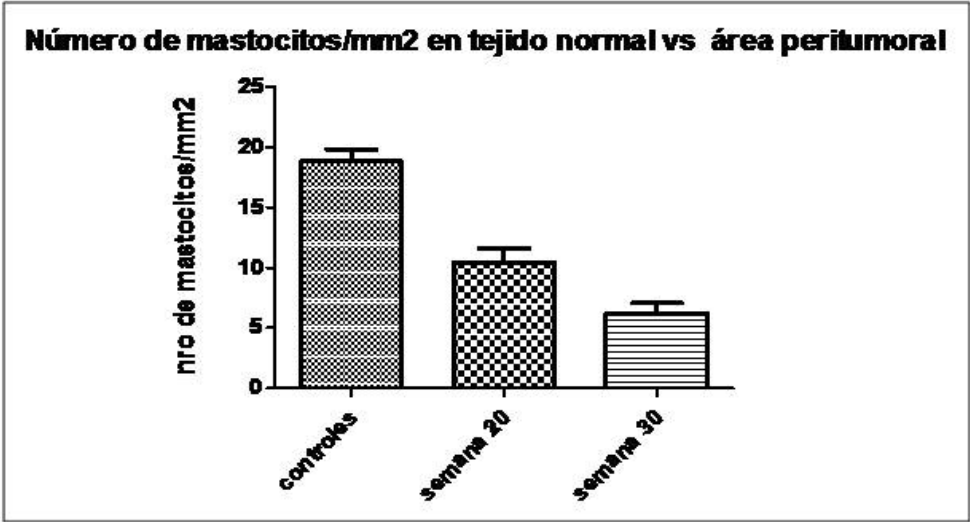


**Fig 2** Semana 20. A) lesión tumoral exofítica (con gran vascularización. B) cambios displásicos leves (toluidina x400).



(3 Semana 26-30: a) y b) lesiones exofíticas ubicadas en la región dorsal posterior de la lengua.  
 ) corte histológico de a , a mayor aumento (a2) se observan los mastocitos peritumorales. toluidina +  
 b1 y b2 se observan los cambios displásicos avanzados.

Figura 4



Tukey's Multiple Comparison Test		Summary
controles vs semana 20	P<0.0001	***
controles vs semana 30	P<0.0001	***
semana 20 vs semana 30	P<0.0001	*