



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

Cambios histológicos en Glándula Submandibular de ratas tratadas con ciclofosfamida y vitaminas antioxidantes. Estudio preliminar

Histological changes in Submandibular Gland of rats treated with cyclophosphamide and antioxidant vitamins. Preliminary study

Mazzeo MA¹, Bachmeier E¹, López MM¹, Linares JA¹, Samar ME², Finkelberg AB¹, Fonseca I³

¹Cátedra de Fisiología Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba

²Cátedra de Histología y Embriología A Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba

³II Cátedra de Patología, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

Resumen

Ciclofosfamida (Cf) es un citostático utilizado en esquemas de acondicionamiento para trasplante de médula ósea (MO) provocando alteraciones en cavidad bucal. Trabajos previos demostraron un efecto oxidativo de Cf evaluado a través del incremento de superóxido dismutasa (SOD) y ácido úrico (AU) en Glándula Submandibular (GSM) de ratas. Es conocido el efecto antioxidante de las vitaminas C y E. En el presente evaluamos cambios histológicos en conductos y acinos de GSM de ratas tratadas con Cf así como el efecto de la administración de vitaminas C y E. Se utilizaron ratas macho Wistar, divididas en cuatro grupos experimentales: 1) C: Control, 2) Cf: ciclofosfamida; 3) VIT.C+ Cf; 4) VIT E + Cf. Se efectuaron cortes histológicos y tinción con Hematoxilina/Eosina. Se analizaron posibles cambios estructurales en conductos y acinos. Los preparados mostraron en Cf células acinares con macro y anisocariosis, hiperromasia nuclear y binucleación, estroma con vasocongestión y focos de extravasación eritrocitaria respecto de C. En el grupo VIT C +Cf: Células acinares con cromatina laxa, algunas con nucléolos evidentes. En VIT E + Cf: Células acinares con binucleación y citoplasma que exhibía mayor cantidad de gránulos. Estroma con cambios similares a los descriptos. En este trabajo observamos que las células acinares de los animales tratados con Cf mostraron alteraciones histológicas respecto de los animales control. El grupo tratado con Cf y Vitamina E evidenciaron un citoplasma con mayor secreción granular. Se infiere a partir de ello, que la administración de Vitamina E podría incrementar la actividad funcional de GSM tratada con Cf.

PALABRAS CLAVE: ratas Wistar, ciclofosfamida, glándula submandibular, vitaminas antioxidantes

Abstract

Cyclophosphamide (Cf) is a cytostatic drug used in conditioning schemes for bone marrow transplantation (TMO), causing alterations in the oral cavity. Previous work demonstrated an oxidative effect of Cf evaluated through the increase of superoxide dismutase (SOD) and uric acid (AU) in Submandibular Gland (GSM) of rats. The antioxidant effect of vitamins C and E is known. In the present study we evaluated histological changes in secretory ducts and acini of GSM rats treated with Cf as well as the effect of the administration of vitamins C and E. Male Wistar rats were divided into four experimental groups: 1) C: Control, 2) Cf: cyclophosphamide 3) VIT.C + Cf; 4) VIT. E + Cf. Histological sections were stained with Hematoxylin / Eosin. Possible structural changes in ducts and acini were analyzed. Cf group showed acini cells with macro and anisocariosis, nuclear hyperchromasia and binucleation, stroma with vasocongestion and erythrocyte extravasation compared to C. VIT C+ Cf group showed ductal cells with lax chromatin some with evident nucleoli. VIT E+ Cf group showed acini cells with binucleation and cytoplasm that exhibited a greater amount of granules. In the present work, we observed that the acini cells of the animals treated with Cf showed histological alterations compared to Control animals. The group treated with Cf and Vitamin E showed a cytoplasm with greater granular secretion. We hypothesized from this that the administration of Vitamin E could increase the functional activity of GSM treated with cyclophosphamide.

KEY WORDS: Wistar rats, cyclophosphamide, submandibular gland, antioxidant vitamins

Introducción

La Ciclofosfamida (Cf) es un citostático de naturaleza alquilante, que se utiliza asociado a otras drogas oncológicas para el tratamiento farmacológico de tumores sólidos o en esquemas de acondicionamiento para trasplante de médula ósea. Numerosos autores informaron entre sus efectos adversos, alteraciones funcionales en tejidos blandos de la cavidad bucal y en glándulas salivales^{1,2}.

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron un incremento de la concentración de superóxido dismutasa (SOD) en saliva de pacientes sometidos a trasplante de médula ósea, cuyos esquemas de acondicionamiento incluían el uso de

Cf. Este hallazgo puede interpretarse como un incremento de la actividad oxidativa en glándulas de pacientes tratados con dicha droga³.

En trabajos posteriores, observamos no solo un incremento de la concentración de SOD sino también de ácido úrico (AU) en GSM de ratas sometidas a la acción de Cf.

Por otra parte, es conocido el efecto antioxidante de la vitamina C debido a la facilidad con que se oxida reversiblemente a ácido dehidroascórbico, mientras que la vitamina E ejerce dicho efecto a través del secuestro de radicales libres y de radicales peróxidos. Numerosas investigaciones hacen referencia a la capacidad y eficacia de estas vitaminas para reducir o revertir los procesos oxidativos frente a distintas situaciones de injuria celular⁴⁻⁶.

A partir de estos antecedentes los objetivos del presente trabajo consistieron en evaluar cambios histológicos en conductos y acinos de GSM de ratas tratadas con Cf, y el posible efecto antioxidante mediante la administración de vitaminas C y E. Con estos resultados se intentará establecer una correlación con los parámetros funcionales obtenidos previamente³.

Métodos

Se utilizaron 28 ratas macho Wistar de tres meses de edad, alojadas en jaulas individuales, con temperatura e iluminación controlada y dieta libre. Fueron divididas en cuatro grupos experimentales (Tabla 1): 1) **C**: Control, 2) **Cf**: tratadas con ciclofosfamida aplicándose una dosis i.p. de 50 mg/kg de peso corporal, durante dos días consecutivos, 3) **VIT.C+ Cf**: tratadas con vitamina C, 200mg/kg por tres días consecutivos previos a la inyección i.p. de Cf en iguales condiciones que el grupo 2 y 4) **VIT. E + Cf**: tratadas con vitamina E, 100 mg/kg de peso corporal por tres días consecutivos previos a la inyección i.p. de Cf como en grupo 2. Los animales fueron ayunados por 24 horas previas al sacrificio. Luego fueron anestesiados combinando una dosis de ketamina y xylazina (80 y 12,8 mg/Kg Peso Corporal respectivamente) y se les extirparon ambas glándulas submandibulares. Al finalizar el procedimiento quirúrgico se procedió a la eutanasia de los animales mediante una maniobra física de dislocación cervical. Todas las actividades experimentales se efectuaron siguiendo

el protocolo internacional para cuidado y tratamiento de animales (NIH) y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba⁷. Se analizaron los cortes histológicos seriados de biopsias de glándulas submandibulares fijadas en formol bufferado (Lillie) e incluidas en parafina que se procesaron para el análisis estructural de posibles cambios en conductos y acinos por medio de las técnicas de Hematoxilina/Eosina.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el uso del test "t" de Student, estableciendo el valor de $p < 0.05$, para significación estadística.

TABLA 1 Esquema experimental de los grupos utilizados. Cf: Ciclofosfamida; Ip: Intraperitoneal; Pc: Peso corporal

| GRUPO | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------|-------------|
| Control N: 7 | _____ | _____ | _____ | _____ | _____ | Ayuno | Experiencia |
| Cf N: 7 | _____ | _____ | _____ | Ip. 50mg/kg Pc | Ip. 50mg/kg Pc | Ayuno | Experiencia |
| Vit c + cf N: 7 | Vit. C Ip. 200 mg/kg. Pc | Vit. C Ip. 200 mg/kg. Pc | Vit. C Ip. 200 mg/kg. Pc | Cfip 50mg/kg Pc | Cfip 50mg/kg Pc | Ayuno | Experiencia |
| Vit e + cf N: 7 | Vit. E Ip. 100 mg/kg. Pc | Vit. E Ip. 100 mg/kg. Pc | Vit. E Ip. 100 mg/kg. Pc | Cfip 50mg/kg Pc | Cfip 50mg/kg Pc | Ayuno | Experiencia |

Resultados

Los preparados mostraron en **Cf** células acinares con macro y anisocariosis, hiperromasia nuclear y binucleación, estroma con vasocongestión y focos de extravasación eritrocitaria respecto de **C** (Figuras 1-3). En el grupo **VIT C +Cf**: Células ductales con cromatina laxa, algunas con nucléolos evidentes. En **VIT E + Cf**: Células acinares con binucleación y citoplasma que exhibía mayor cantidad de gránulos. Estroma con cambios similares a los descriptos (Figura 4 y 5).

Discusión

La información bibliográfica sobre los cambios histológicos y funcionales de GSM por acción de drogas oncológicas es escasa. Algunos autores hacen referencia a la exposición de altas dosis de ciertas drogas citostáticas como el 5-fluorouracilo y leucovorina cálcica, observando alteraciones microscópicas relacionadas con evidente inflamación, necrosis de la GSM e infección bacteriana asociada⁸.

Las células acinares de los animales tratados con Cf mostraron alteraciones histológicas respecto de los animales control. En cambio el grupo tratado con Cf y Vitamina E evidenciaron un citoplasma acinar con mayor cantidad de gránulos. Se infiere a partir de ello, que la administración de Vit E podría incrementar la actividad funcional de la GSM tratada con Cf. Algunos autores informaron que la Vitamina E, protegería las membranas celulares contra la lipoperoxidación y proveería protección celular a nivel mitocondrial contra el estrés oxidativo inducido por agentes alquilantes como Cf⁹⁻¹³.

Por su parte, si bien a nivel estructural los animales tratados con Cf y vitamina E evidenciaron vasocongestión y binucleación, hubo ausencia de macrocariosis sin manifestación de hiperromasia nuclear. El hallazgo más notable fue que el citoplasma del grupo de animales tratados con vitamina E, adquirió mayor concentración granular respecto de los controles y de los animales tratados con Cf. De alguna manera, la protección a nivel de las membranas celulares y de las mitocondrias informados por otros autores, más un notable incremento de la secreción granular mostrado en el presente trabajo, podrían favorecer una mejor respuesta secretoria frente a la administración de la Cf, que tiene la particularidad, como todas las drogas oncológicas convencionales, de actuar no solo sobre células tumorales, sino también en sistemas orgánicos con alta tasa de mitosis y actividad funcional¹⁴.

Estos hechos informados a nivel histológico podrían correlacionarse con los resultados funcionales obtenidos por nosotros, donde el incremento de la concentración de SOD y AU a nivel experimental actuaría como indicativo de aumento de los procesos oxidativos en glándulas salivales. Se podría hipotetizar que las alteraciones estructurales causadas por Cf estaría modificando

el patrón funcional secretorio de las mismas. A su vez, esta situación adversa, estaría siendo revertida favorablemente por la acción de la Vitamina E que neutraliza al radical OH por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante¹⁵.

Respecto a vitamina C considerada al igual que la vitamina E como “scavenger o eliminador”, los animales de este grupo experimental no mostraron cambios significativos a nivel estructural¹⁶.

De esto podría inferirse que la Vitamina C a estas dosis carecería de la capacidad de revertir los procesos oxidativos generados por Cf tal como se observó en el caso de la vitamina E.

No obstante estos hallazgos, se sugieren nuevos estudios, incrementando la dosis y tiempo de exposición a Cf y vitaminas. De este modo se podría evaluar con mayor claridad si el efecto deletéreo de Cf sobre la secreción salival podría ser minimizado mediante la administración de vitaminas antioxidantes, que actuando sobre las glándulas salivales pudiesen mejorar la eficacia y calidad secretoria salival, considerada como factor primordial en el mantenimiento de la homeostasis de la cavidad bucal.

Agradecimientos

Agradecemos a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT) por el financiamiento del presente proyecto de investigación.

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.

Referencias

1. Jensen SB, Mouridsen HT, Reibel J, Brüner N, Nauntofte B. Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary gland hypofunction. *OralOncol.* 2008;44 (2):162-73.
2. H. S. Brand, C. P. Bots, J. E. Raber-Durlacher.. Xerostomia and chronic oral complications among patients treated with haematopoietic stem cell transplantation. *Br Dent J.* 2009; 14; 207(9).
3. Bachmeier E, Mazzeo MA, López MM, Linares JA, Jarchum G, Wietz FM, Finkelberg AB Mucositis and salivary antioxidants in patients undergoing bone marrow

- transplantation (BMT). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014; 19 (5):e444-50.
4. Yoshizawa, J.M. ,Schafer, C.A. ,Schafer, J.J. ,Farrell, J.J. ,Paster, B.J. ,Wong, D.T .Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *ClinMicrobiol Rev*. 2013; 26,781–791.
 5. Tóthová L, Kamodyová N, Červenka T, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015; 20; 5:73.
 6. Tai Y, Inoue H, Sakurai T, Yamada H, et al. .Protective effect of lecithinized SOD on reactive oxygen species induced xerostomía. *Radiat Res* 2009; 172:331–8.
 7. Yingjian L, Junming H, Min C, Chenyue L, Dachao Z, Yuanhua H, Zhi L.A health food high-peptide meal alleviates immunosuppression induced by hydrocortisone and cyclophosphamide in mice. *Food Funct*. 2013; 4(9):1352-9.
 8. Ewens, A, Mihich E; EhrkeMJ. Fluorouracil plus Leucovorin induces Submandibular Salivary Gland enlargement in rats.*Toxicologic Pathology*2005; 33:507–515.
 9. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther*. 1991; 51: 155-194.
 10. Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res. Rev*.1997; 25: 335-358.
 11. Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Schmittgen TD, Zakrajsek BA, et al. Glutathione-dependent regulation of nitric oxide production in isolated rat hepatocyte suspensions. *Antioxid. Redox. Signal*. 2008; 2: 767-777.
 12. Zhang JG, Nicholls-Grzemeski FA, Tirmenstein MA and Fariss MW. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents.*Chem. Biol. Interact*. 2001; 138: 267-284.
 13. Düsman E., I.V. Almeida, R.G. Mariucci, M.S. Mantovani, V.E.P. VicentiniCytotoxicity and mutagenicity of fluoxetine hydrochloride (Prozac), with or without vitamins A and C, in plant and animal model systems.*Genetics and Molecular Research* 2014;13 (1): 578-589.
 14. H. S. Brand, C. P. Bots, J. E. Raber-Durlacher. Xerostomia and chronic oral complications among patients treated with haematopoietic stem cell transplantation. *Br Dent J*. 2009; 14; 207(9).
 15. Pérez Gastell PL, Pérez de Alejo, JL. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev. Cubana Med. Milit*. 2000; 29(3):192-8.
 16. Oxilia, RM. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop*. 2010; 5(2):23-29.

Correspondencia:

Dr Marcelo Adrián Mazzeo

Cátedra de Fisiología. Facultad Odontología. UNC

Ciudad Universitaria. Córdoba. Argentina Haya de la Torre

s/n. Pabellón Argentina

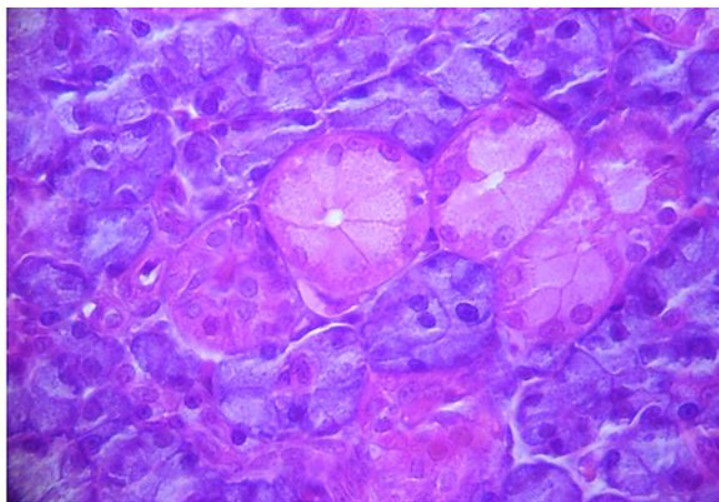


Figura 1. Control: Glándula Submandibular de rata. H/E. 400x.

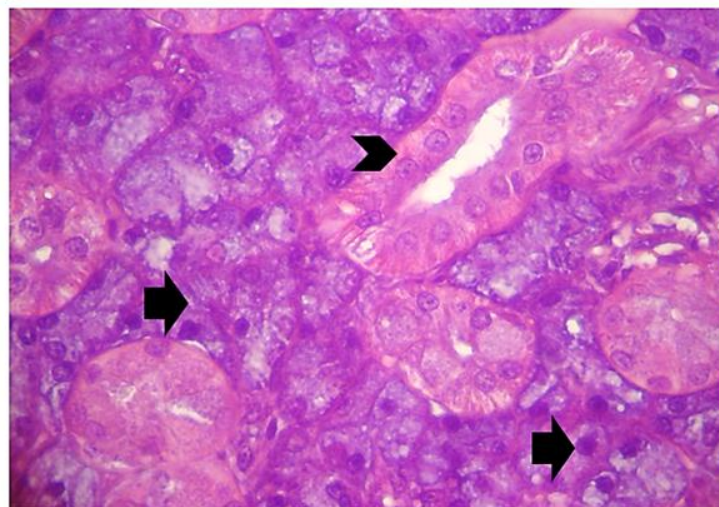


Figura 2. Ratas tratadas con Cf. Se destaca la hiperchromasia nuclear en las células de los acinos (➡). Conducto con anisocariosis (➡) H/E. 400x.

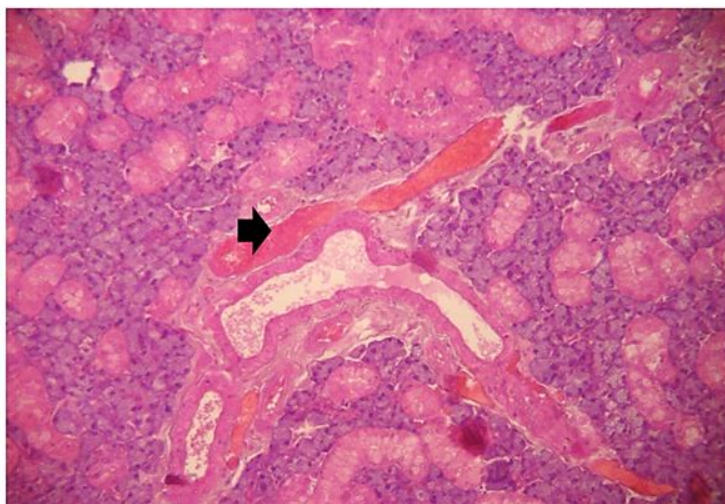


Figura 3. Ratas tratadas con Cf. Se señala el estroma con importante vasocongestión (flecha). H/E. 100x

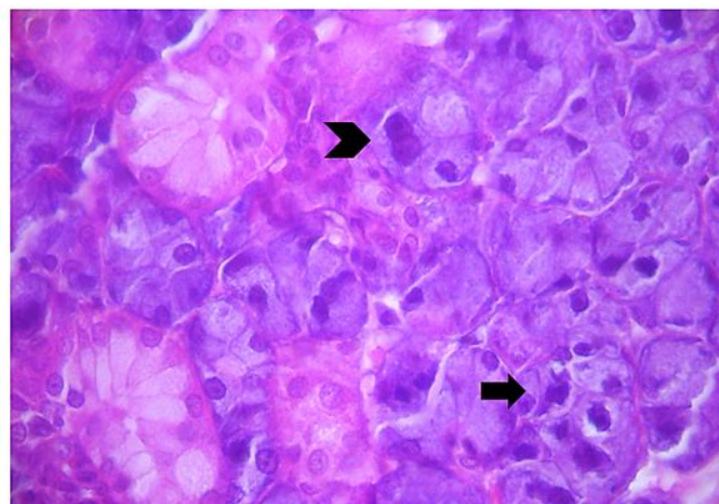


Figura 4. Ratas tratadas con Cf+ E. Se destaca la hiperchromasia nuclear en las células acinares (flecha) y la binucleación (cabeza de flecha). H/E. 400x.

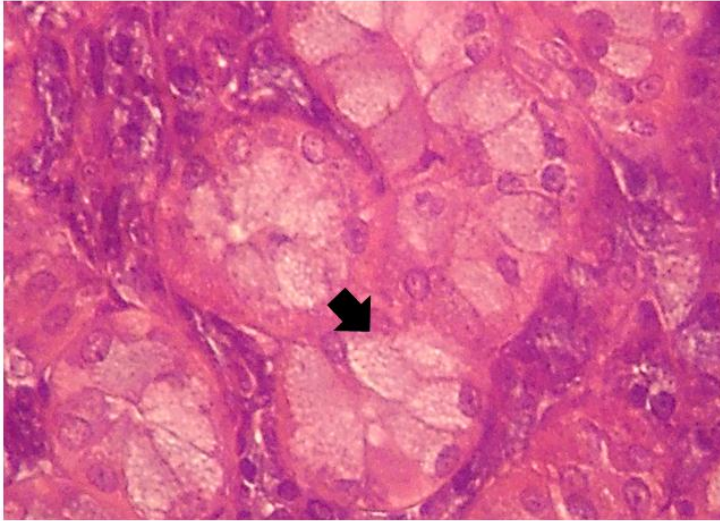


Figura 5. Ratas tratadas con CF+E .Se señalan conductos con células cargadas de abundantes granulaciones. H/E. 400x