

ESTRES Y PATOLOGÍA EXPERIMENTAL INDUCIDA CON DMBA EN GLANDULAS SALIVALES DE RATA.

FONSECA, MIGUEL MARIO *, RINS DE DAVID, MARÍA LUISA **,
GENDELMAN, HÉCTOR ***

R E S U M E N

Se estudia la influencia del estres, en patología oncológica experimental, inducida por DMBA (1-2 dimetil 9-10 bencentracene) en glándulas salivales de rata Wistar. Se utilizaron 2 grupos de 24 animales cada uno. Grupo 1: DMBA aplicado en forma de pellet. Grupo 2: DMBA y estres.

Como agente estresor se empleó el frío, en una sola aplicación diaria de 15 minutos a -10° C.

La respuesta flogística al DMBA, a los 5 y 8 días por el efecto del estres, se presentó aumentada.

No se observaron cambios en los tiempos de inducción para las neoplasias, pero sí en la frecuencia de los porcentajes (que aparecen en plazos menores). Testigos con DMBA: frecuencia 100 % de las neoplasias a los 20 días. DMBA y estres: frecuencia 100% de las neoplasias a los 15 días. Los detalles histológicos (adenocarcinomas - carcinomas epidermoides) y las características histoquímicas, fueron similares en ambos grupos.

S U M M A R Y

Stress influence in experimental oncologic pathology induced by DMBA in salivary glands of Wistar rats.

Stress influence in experimental oncologic pathology induced by DMBA (1-2 dimethyl 9-10 bencentracene) is studied in salivary glands of the Wistar rat. Two lots of 24 animals each were used. DMBA was applied in the form of pellet in group 1. DMBA and stress were applied in group 2.

- * Profesor Adjunto de Anatomía Patológica
- ** Profesora Adjunta (Interina) de Fisiología
- *** Profesor Titular de Anatomía Patológica

Cold was used as stressing agent. It was daily applied during 15 minutes at -10°C . Phlogistic answer to DMBA appeared augmented on the 5th and 8th day because of stress effect.

Induction times for neoplasias in both groups were similar. Frequency of percentages in group 2 differs from that of group 1.

DMBA: 100 % on the 20th day in control rats.

DMBA and stress: 100 % on the 15th day.

Histologic findings (adenocarcinomas, epidermoid carcinomas) and histochemical characterizations were similar in both groups.

La carcinogénesis experimental inducida en las glándulas salivales de la rata, depende de varios factores conocidos como: administración, estructura química, concentración del cancerígeno y especie del animal de laboratorio utilizada (11).

El DMBA (dimelbencentracene) es un cancerígeno muy efectivo cuando se emplea en forma pura y aplicado a manera de pellet ya que su efecto es por contacto (11-12).

En el hamster produce fibrosarcomas (3-5) y en la rata carcinomas principalmente, aún en cortos períodos de inducción (4-11). Su acción se manifiesta en la glándula submaxilar que es más sensible a la droga que la sublingual (11).

La aplicación del cancerígeno produce una primera respuesta de 1 a 4 semanas, con necrosis, hemorragia y proceso inflamatorio (4). Luego de 8 a 10 semanas hay manifestaciones de su efecto inductor. Los cambios neoplásicos se inician con proliferación del conducto estriado el que pierde sus características normales con las siguientes modificaciones: Hiperplasia y engrosamiento de su pared, presencia de células atípicas conformando imágenes de adenocarcinomas, quistes epidermoides con transformación carcinomatosa en su pared, existiendo un número muy bajo de sarcomas (4-11-12).

La edad, sexo, castración y embarazo, parecerían no jugar un papel muy importante en la biología tumoral (11).

La administración sistemática de cortisona, desarrolla más rápidamente los cambios histológicos: metaplasia, disqueratosis, quistes epidermoides y su transformación en carcinoma epidermoide, aumentando su incidencia pero sin acortar su tiempo de inducción (1).

La influencia del estres en el organismo (10) ha sido bien establecida en algunos aspectos; como niveles hormonales, de glucosa, triglicéridos, estudiándose en diferentes animales de experimentación incluyendo la rata (6-7-9), existiendo poca información bibliográfica que relacione estres y glándulas salivales.

El objetivo del trabajo es reproducir la neoplasia experimental con DMBA en glándulas salivales de rata Wistar y estudiar que influencia ejercería un agente estresor (frío) en el tiempo de inducción y desarrollo de la neoplasia.

MATERIAL Y METODO

Se trabajó con 56 ratas machos, adultas jóvenes de la raza Wistar. La alimentación fue con dieta balanceada de laboratorio (purina y agua ad libitum). Todos los animales se mantuvieron a temperatura constante de 18 a 20°C en un régimen de 14 horas de luz y 10 de oscuridad.

Determinación del efecto estresante por frío: Se tomaron 4 animales y se llevaron a -10°C, en una sola sesión diaria de 15 minutos y durante 15 días. A cuatro animales normales, mantenidos a temperatura constante durante 15 días, se los utilizó como testigos. A los 8 animales se les hizo valoración final de corticosterona plasmática. Se los sacrificó a los 15 días y se pesaron sus glándulas adrenales.

El cancerígeno que se empleó fue el DMBA (1-2 dimetil 9-10 bencetracene Sigma) puro en forma de pellet de 5 mg., modificando la técnica de Cataldo-Shklar (4) al aplicarlo entre la glándula sublingual y submaxilar sin lesionar el parénquima glandular. Se controló que en todos los casos la evolución de las heridas, fuese normal.

Los animales fueron divididos en dos grupos de 24 animales cada uno.

Grupo 1 se aplicó el DMBA y se utilizan como *testigos*.

Grupo 2 se aplicó el DMBA y se induce estres mediante frío (-10°C) una sola aplicación diaria (de 15 minutos) durante todo el período experimental.

Para la experiencia el grupo 1 y 2 fueron separados en lotes de 4 animales cada uno y sacrificadas a los 5, 8, 12, 15, 18 y 20 días, entre las 10 y 12 horas A/M, con una sobredosis de éter.

Se disecaron juntas las glándulas sublingual y submaxilar (que denominaremos paquete glandular submandibular) tanto del lado derecho como del izquierdo del animal y se pesaron en balanza Mettler de precisión. El paquete submandibular izquierdo, que no contiene DMBA, servirá como control y denominaremos contralateral.

Para el estudio histológico e histoquímico se fijaron en formol al 10% tamponado a pH 7, posteriormente se incluyeron en parafina. En el momento de la inclusión, se divide el paquete glandular con bisturí y con maniobras delicadas se procede a extraer el pellet.

Coloración: Hematoxilina-eosina, estudio histoquímico (2-8-13) ácido periódico de Shiff (PAS), diatasa PAS; AB pH 1,2 y 2,5. Azul de Toluidina pH 1: 3,5 y 7. Aldehído fucsina-Alcian-blue.

Para evaluar la congestión se implementó como método histométrico el recuento de capilares arteriolas y vénulas a doble ciego y en cinco campos tomados al azar, en zonas periféricas a la droga y a 250 aumentos.

Las fotografías y fotomicrografías se tomaron con máquina Nikon y cámara Orthomat para microscopio Leitz respectivamente.

RESULTADOS

Animales estresados y no estresados

Macroscopia: Expuesto el paquete submandibular derecho (contiene el DMBA), se observa su aumento de volumen. Fig. 1. Su consistencia es firme desde los primeros tiempos de experiencia, posteriormente se adhiere a los planos profundos participando los ganglios vecinos en el proceso.

La glándula izquierda contralateral, no presenta cambios evidentes.

Ex situ, en plazos de 5 a 8 días, los paquetes glandulares submandibulares derechos de los animales estresados (grupo 2) tienen diferencias de peso y volúmen con los respectivos del grupo 1. A partir de estos plazos las diferencias desaparecen entre ellos.

Los resultados de peso (TABLA 1) indican que el grupo 2 únicamente a los 5 y 8 días tiene diferencias estadísticamente significativas entre los paquetes glandulares submandibulares derecho (con DMBA) y el izquierdo o contralateral de su lote. A partir de los 12 días esas diferencias se hacen significativas en ambos grupos (animales estresados y no estresados con DMBA).

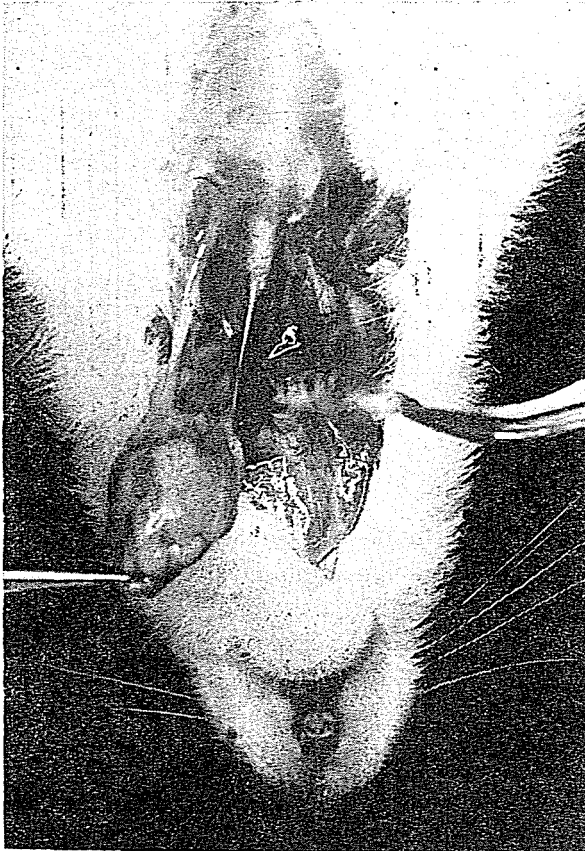
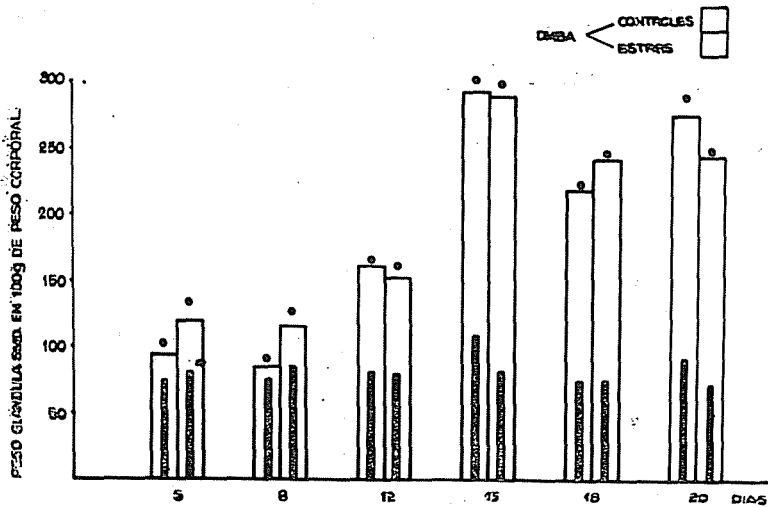


FIGURA 1.

El estímulo alarmógeno frío, determinó cambios en la corticosterona y plasmática (normales 40 μg , % estresados 48 μg , %) y en el peso de las glándulas adrenales.

Estos valores que indican los cambios y/o modificaciones provocados por el estrés, no fueron estadísticamente significativos.

TABLA I



Microscopia: DMBA

Las modificaciones están esencialmente presentes en la glándula submaxilar ya que la sublingual no da respuesta.

A los 5 días se observa congestión (promedio 11,6 vasos por campo, constituidos en su mayoría por capilares), escaso exudado y escasos polimorfonucleares neutrófilos.

A los 8 días, también se observa congestión (promedio 11 capilares), moderado edema, polimorfonucleares neutrófilos, signos de metaplasia epidermoide en los conductos, hiperplasia ductal con hiper cromatismo y discariosis, y la presencia de una sustancia de aspecto mixoide (Fig. 2).

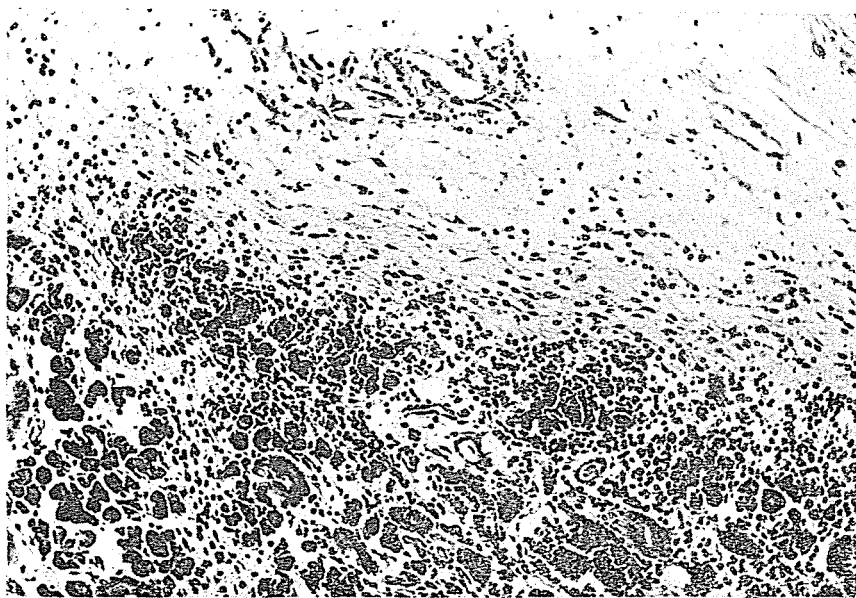


FIGURA 2. — Hematoxilina - eosina. 40 X. 8 días de experiencia DMBA. Se observa: congestión, mixoide, polimerfonucleares neutrófilos, hiperplasia ductal.

Las particularidades histoquímicas en los cambios morfológicos fueron las siguientes:

- En las áreas de hiperplasia ductal la cubierta de los conductos y la membrana basal son PAS positiva-diestasa resistentes; además la cubierta es alcianófila a pH 2,5.
- Metaplasia epidermoide es PAS positiva diastasa lábil.
- Se observa dispersión de gránulos PAS positivos de pars convoluta, asociados con imágenes de hiperchromatismo y discariosis.

La sustancia mixoide es PAS positiva diastasa resistente, además de ser alcianófila a pH 2,5.

A los 12 días de realizada la experiencia, en el 50% de los animales se observaron cambios histológicos de adenocarcinoma.

A los 20 días, se encontró el 100% de los animales con adenocarcinomas, y un solo caso de carcinoma epidermoide. (Fig. 6)

Los adenocarcinomas se presentaron como tumores primarios infiltrantes, no metastizantes.

A los 12 días, aparece delimitación manifiesta del proceso por el conjuntivo y la presencia de un infiltrado linfocítico.

DMBA y ESTRES

A los 5 días, se encontró mayor congestión (promedio 17,2 vasos por campo) con una población de capilares arteriolas y vénulas, edema, escasos polimorfonucleares neutrófilos, algunos eosinófilos y signos de hiperchromatismo. A los 8 días, persiste la congestión (promedio 16,4 vasos) abundante edema, polimorfonucleares escasos, hiperplasia ductal y metaplasia epidermoide de ductus con signos de atipia celular (Fig. 3).

A los 12 días, se observan cambios atípicos con aspecto de adenocarcinoma 60% de los casos (Fig. 4).

A los 15 días, presencia de adenocarcinoma en el 100% de los casos, con un infiltrado linfocítico delimitando el proceso (Fig. 5).

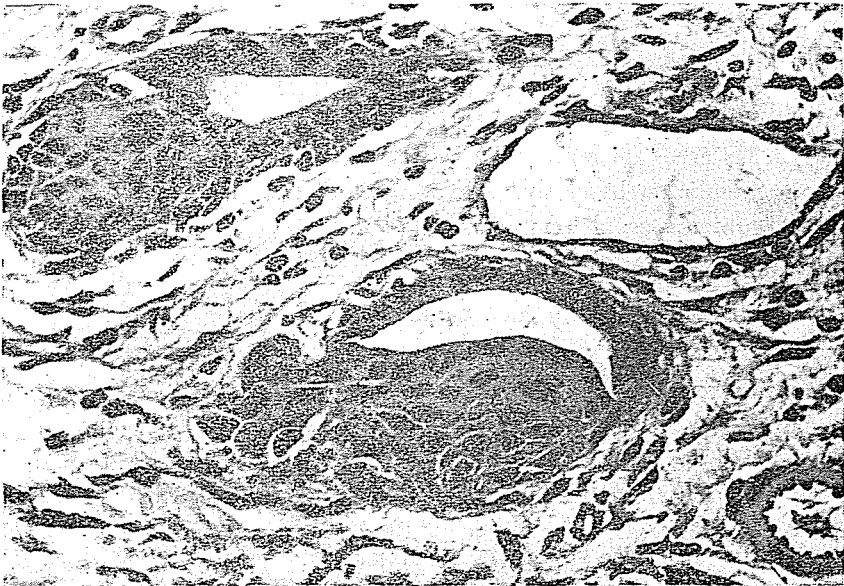


FIGURA 3. — Hematoxilina - eosina. 250 X. - 8 días de experiencia. Metaplasia epidermoide de ductus.

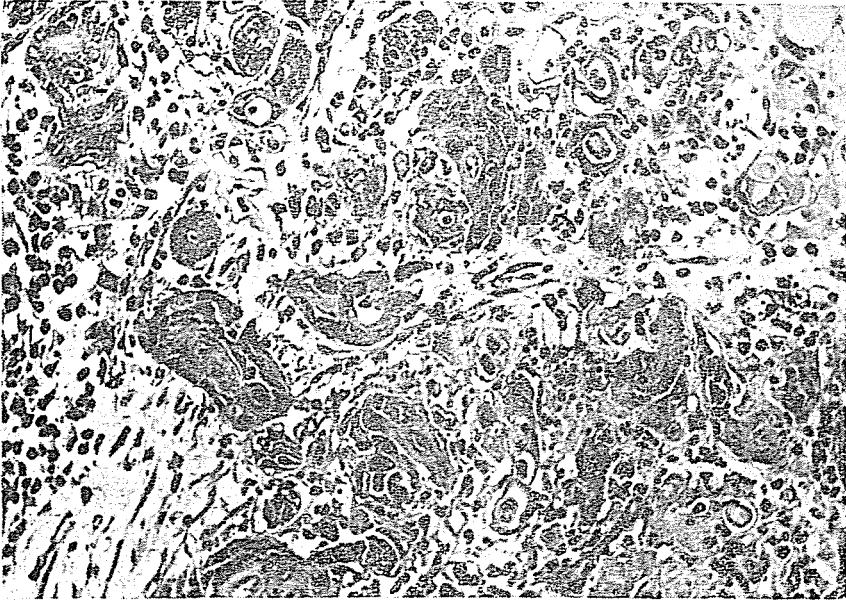


FIGURA 4. — Hematoxilina - eosina: 100 X. 12 días de experiencia DMBA.
Imagen de adenocarcinoma.

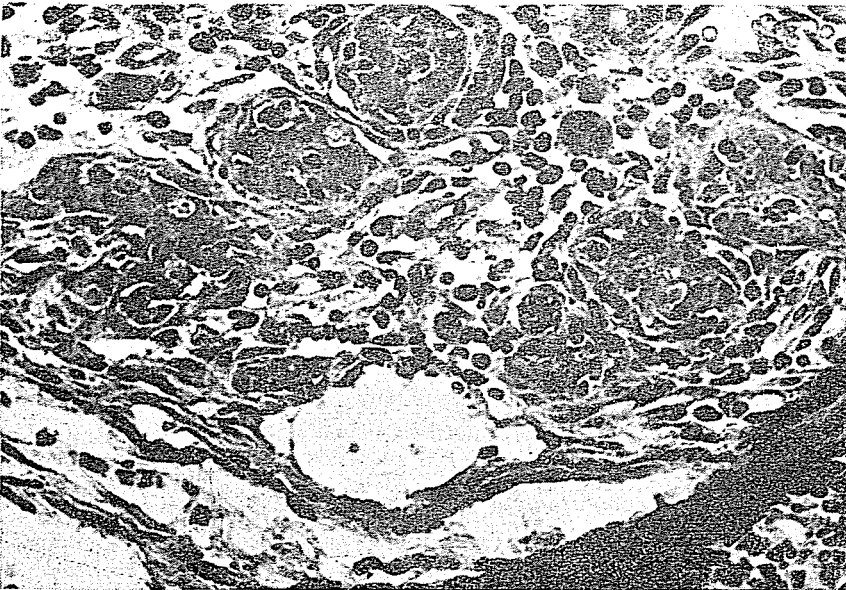


FIGURA 5. — Hematoxilina - eosina. 100 X. 15 días de experiencia: DMBA y
estres. Imagen de Adenocarcinoma e infiltrado linfocítico.

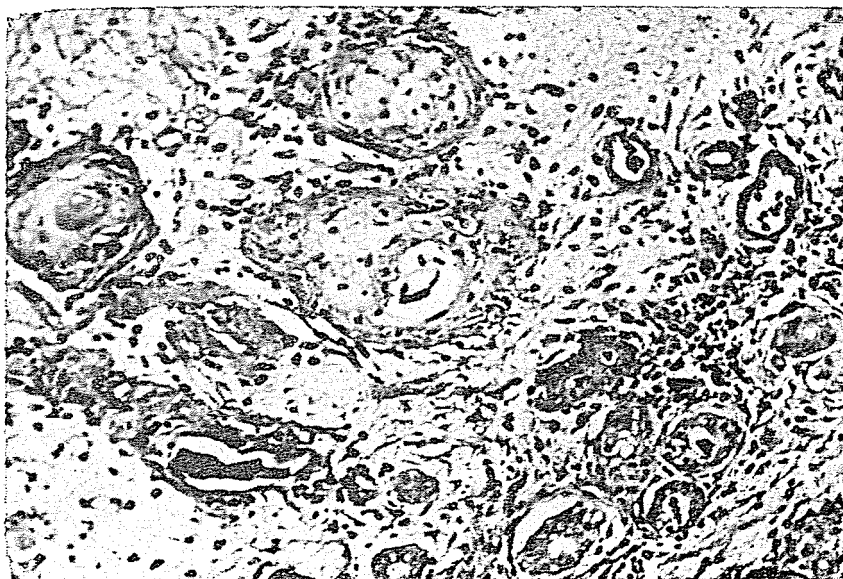


FIGURA 6. — Hematoxilina - eosina. 80 X. Experiencia de 20 días: DMBA. Imagen de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados corroboran la producción de neoplasia epitelial en las glándulas salivales de la rata (4-11-12).

La posibilidad de emplear el DMBA puro y en forma de pellet, permite la inducción de la neoplasia en plazos menores, que los obtenidos por Standish (12). (Cataldo y Shklar -3).

En nuestro material, encontramos plazos de inducción menores que en la literatura, que podrían obedecer a diferentes plazos de control, o diferencias en la capacidad inductora del carcinógeno empleado por nosotros 1-2 dimetil 9-10 bencentracene; 7-12 dimetil-bencentracene utilizado por Standish (12).

No hemos encontrado a las 2 semanas (12) la presencia de quistes epidermoides y por consiguiente tampoco la formación posterior de carcinomas epidermoides a expensas de su pared.

Los cambios observados en nuestro material son de adenocarcinomas y un solo caso de carcinoma epidermoide en sectores donde existían imágenes de adenocarcinoma. El plazo mínimo de inducción se verificó a los 12 días con un 50% de incidencia y un 100% a los 20 días, que no coinciden con los plazos mínimos de inducción comunicados en la literatura: 8 semanas (12).

El efecto del estres se manifiesta especialmente a los 5 y 8 días determinando una mayor respuesta inflamatoria al efecto del DMBA. Su acción carcinogénica a nivel histológico se caracteriza por una mayor incidencia de neoplasias (adenocarcinoma) en períodos más cortos (100% a los 15 días), mientras en lote testigo (100% a los 20 días).

Los resultados de Ambari (1): aumento de la incidencia neoplásica sin disminuir el tiempo de inducción, coinciden con los obtenidos por el estres.

B I B L I O G R A F I A

1. Ambari N., Sklar G. and Cataldo E.: The effect of systemically administered cortisone on salivary gland carcinogenesis in the rat. *J. Dent. Res.* 44: 1056, 1965.
2. Burka T. y Anderson P. J.: *Histoquímica*. Ed. Atika S. A. Madrid, 1967.
3. Cataldo E. and Shklar G.: Chemical carcinogenesis in the Hamster submaxillary gland. *J. Dent. Res.* 43: 568, 1964.
4. Cataldo E., Shklar G. and Chauncey H.: Experimental salivary gland tumors in rats: histology and histochemistry. *Archs. Pathol.* 77: 305, 1964.
5. Chaudhry A. P., Reynolds, D. H., Gorlin R. J. and Vickers R. A.: Experimental carcinogenesis in submandibular glands of Hamsters. *J. Dent. Res.* 40: 428, 1961.
6. Kvitnaski R., Weise U. K., Pgewertz G. and Koppen I.: Synthesis of adrenal catecholamines in rats during and after immobilization. *Endocrinology* 89: 46, 1971.
7. Loyber I., Perasi N. I., Lecuona F. A. and Peralta M. E.: Effects of handling normal and bulbectomized rats at adrenal and plasma corticosterone levels. *Experientia*. 33: 1393, 1977.
8. Pearse, A. G. E.: *Histochemistry*. Vol. 1 Little Brown. Great Britain, 1968.
9. Schalch, D. S., Rochester N. Y.: The influence of physical stress and exercise on growth hormone and insuline. *J. Lab. Clin. Med.* 69: 256, 1967.

10. Selye H.: Confusion and controversy in the stress field. *J. Human Stress*. 1. 37, 1975.
11. Shafer, W. C.. Experimental salivary gland tumorigenesis. *J. Dent. Res.* 41: 117, 1962.
12. Standish, S. M.: Early histologic changes in induced tumors of the submaxillary salivary glands of the rat, *Amer. J. Path.* 33: 671, 1957.
13. Spicer, S. S., Horn R. G. and Leppi, T.: Histochemistry connective tissue. Mucopolysaccharides. *Int. Acad. of Pathol. Monograph. n° 7 Chap 17* William & Wilkins. Baltimore, 1967.