

---

## TRABAJOS ORIGINALES DE INVESTIGACIÓN BÁSICA

---

### PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN EPITELIO LINGUAL DE RATONES CON TUMORES SALIVALES INDUCIDOS POR DIMETILBENZANTRACENO (DMBA) Y MODULADOS POR LÍPIDOS DIETARIOS

Adriana B. Actis\*, Mirta A. Valentich\*, David C. Cremonuzzi\*, Silvia Joekes\*\*.

\* Instituto de Biología Celular. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre y Enrique Barros s/n. Ciudad Universitaria. 5000 Córdoba. Argentina.

\*\* Instituto de Estadística y Demografía. Facultad de Ciencias Económicas. Universidad Nacional de Córdoba. Av. Valparaíso s/n. Ciudad Universitaria. 5000 Córdoba. Argentina.

#### RESUMEN

**Introducción:** Según el concepto de cancerización de campo, existiría alteración en la proliferación epitelial en áreas cercanas a tumores. Dicha proliferación podría ser modificada por lípidos dietarios. **Objetivos:** Este estudio fue diseñado para analizar proliferación y apoptosis en epitelio lingual de ratones portadores de tumores salivales inducidos por DMBA y alimentados con dietas a base de diferentes lípidos. **Materiales y Métodos:** Cuarenta y cinco días posteriores al destete, diez ratones BALB/c fueron asignados a dos dietas: maíz (M) y bacalao (B). Dos semanas después se inyectó DMBA en la zona submandibular. Los animales fueron sacrificados a la 13<sup>a</sup> semana post-inyección. Muestras de lengua fueron fijadas en formol-etanol y procesadas inmunohistoquímicamente con marcadores de proliferación (Ki-67) y apoptosis (Bax). Mediante microscopía óptica, se efectuó un conteo de núcleos positivos a ambos marcadores en un total de trescientas células en interfase, tanto en cara dorsal como ventral de lengua. Los resultados fueron analizados mediante Análisis de Varianza y Test t. **Resultados:** La proliferación celular fue mayor en cara dorsal que en ventral ( $p < 0.0001$ ), sin diferencias por dieta. La apoptosis fue significativamente mayor en ratones alimentados con B que M, en particular en cara dorsal ( $p < 0.018$ ). **Conclusiones:**

Este estudio demuestra que la dieta B induce mayor apoptosis en el epitelio lingual, sugiriendo un mecanismo defensivo de los tejidos ante el agente cancerígeno-tumoral.

**Palabras clave:** glándulas salivales - tumores - cancerización de campo - lípidos dietarios - proliferación celular - apoptosis

#### ABSTRACT

**Introduction:** According to the concept of field defects during the carcinogenesis process, excessive epithelial proliferation/apoptosis may exist in areas near tumors. Proliferation or apoptosis could be modified by dietary lipids. **Purpose:** The present study was designed to analyze proliferation and apoptosis in tongue epithelium of mice fed diets based on different lipids followed by induction of salivary tumors with DMBA. **Materials and Methods:** Forty-five days after weaning, ten BALB/c mice were assigned to two diets: corn oil (CO) and fish oil (cod liver, FO). Two weeks later, DMBA was injected in the submandibular area. Animals were sacrificed at the 13th post-injection week. Samples of tongue were fixed in formalin-ethanol and immunohistochemically stained for proliferation (Ki-67) and apoptosis (Bax). By light microscopy, the number of nuclei positive for these markers were counted out of three-

hundred total interphase cells both in dorsal and in ventral tongue surfaces. Results were analyzed through Analysis of Variance and t Test. Results: Cell proliferation was greater in dorsal than in ventral tongue surfaces ( $p < 0.0001$ ) with no diet difference. Apoptosis was significantly greater in mice fed FO than CO, particularly in tongue dorsal epithelia ( $p < 0.018$ ). Conclusions: This study shows that FO diet induces higher levels of apoptosis in tongue epithelia suggesting a tissue defensive mechanism when exposed to a carcinogenic-tumoral agent.

**Key words:** salivary glands – tumors – field cancerization – dietary lipids – cell proliferation – apoptosis

## INTRODUCCIÓN

La cancerización de campo fue descrita por primera vez en 1953 como una alteración histológica del epitelio circundante a los tumores extirpados del tracto aerodigestivo, incluidos los de cavidad bucal (6). Los pacientes con carcinoma espinocelular bucal tienen riesgo de desarrollar segundos o múltiples tumores primarios en el tracto aerodigestivo superior como resultado de la expansión de campos preneoplásicos, siendo éste un paso crítico en el proceso de tumorigénesis (12, 4).

La exposición a cancerígenos induce cambios genéticos en los epitelios, entre ellos el lingual, que los ponen en riesgo de desarrollar diferentes estados carcinogénicos (9, 11).

Se ha sugerido que la saliva ejerce una acción protectora contra cancerígenos en la cavidad bucal de animales, siendo aún desconocidos los componentes salivales involucrados y su mecanismo de acción (8).

Marcadores inmunoreactivos de células que expresan Ki-67 y Bax han sido utilizados para determinar la proliferación y muerte celular, respectivamente, a fin de valorar el pronóstico (14, 2). Una elevada expresión celular de Ki-67 y un bajo índice apoptótico han sido considerados como indicadores de la proliferación celular (3). Algunos marcadores como c-Myc, p53,

pRb, Ras, PKC, Bcl-2, NF-kappa B, CDK, ciclinas y CKI han demostrado que ambos fenómenos -proliferación y muerte celular- están conectados entre sí y en equilibrio (13).

Los lípidos dietarios, como otros agentes ambientales, regulan mecanismos celulares implicados en el proceso de tumorigénesis: proliferación, apoptosis, adhesión y comunicación intercelular. En este sentido, los ácidos grasos de la familia n-3 (bacalao) controlan la proliferación e inducen apoptosis, mientras que los metabolitos resultantes del ácido araquidónico (n-6, maíz) ejercen efectos opuestos (1).

Como las glándulas salivales constituyen anexos de la cavidad bucal, el objetivo del presente estudio fue analizar los índices de proliferación celular y apoptosis en epitelio lingual de ratones portadores de tumores salivales inducidos por DMBA y alimentados con dietas que contenían diferentes fuentes lipídicas.

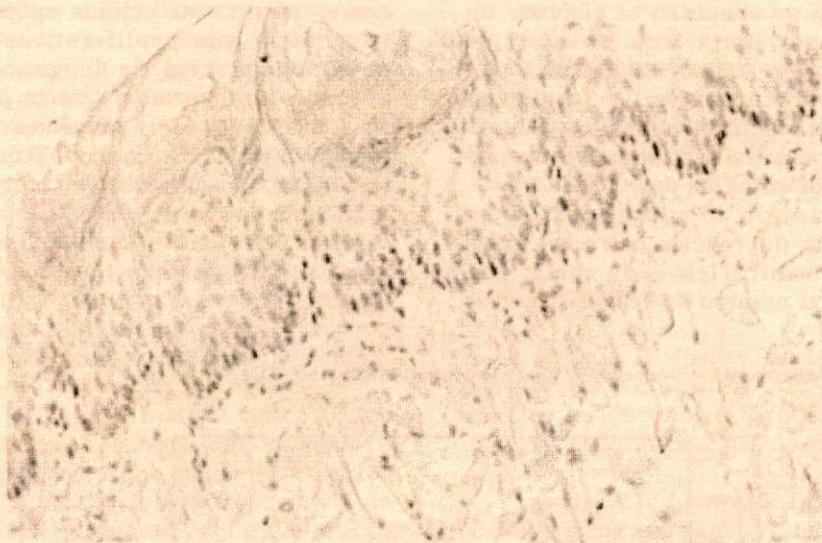
## MATERIALES Y MÉTODOS

Cuarenta y cinco días posteriores al destete, diez ratones BALB/c fueron asignados a dos grupos dietarios: maíz (M) y bacalao (B). Los animales fueron alimentados con una fórmula semisintética compuesta por caseína 16%; sacarosa 34.9%; almidón de maíz 39%; fibra 2%; sales 3.5% y vitaminas 0.5%, adicionada con 5% de aceite de maíz o bacalao. Las dietas no variaron significativamente en valor calórico por gramo. Se administró alimento y agua *ad libitum*. Dos semanas después, se efectuó una inyección subcutánea de 0.5 mg de DMBA en la zona submandibular a fin de inducir tumores en las glándulas salivales submaxilares, lo que se consiguió en un 100% de los casos. Los animales fueron sacrificados a la 13ª semana post-inyección. Se obtuvieron muestras de lengua que fueron fijadas en formol 10%-etanol 70% (4 y 12 horas, respectivamente), incluidas en parafina y procesadas inmunohistoquímicamente en el Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, USA) con marcadores de proliferación (Ki-67) y apoptosis (Bax) y

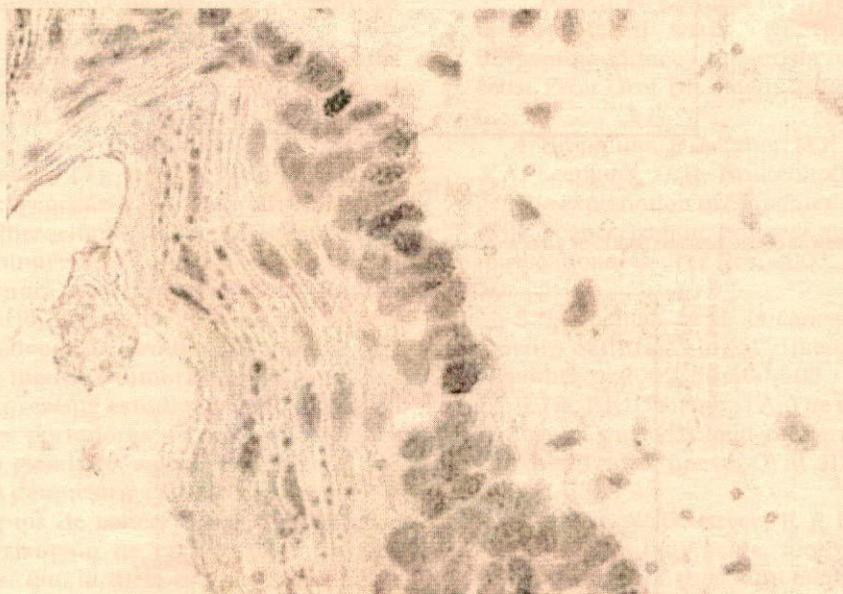
contrastadas con Hematoxilina, según la técnica descrita por Actis (2).

Mediante microscopía óptica, se efectuó un conteo de núcleos positivos en un total de trescientas células en interfase, tanto

en cara dorsal como ventral de lengua (Figuras 1 y 2). Los resultados fueron analizados mediante Análisis de Varianza y Test t.



**Figura 1:** Epitelio plano estratificado de cara dorsal de lengua (grupo Maíz). Núcleos con reacción (+) (flecha). Inmunomarcación con Ki-67. Contraste con hematoxilina. 100X.



**Figura 2:** Epitelio plano estratificado de cara ventral de lengua (grupo Bacalao). Núcleos con reacción (+) (flecha). Inmunomarcación con Bax. Contraste con hematoxilina. 400X.

### RESULTADOS

Con respecto a Ki-67, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas caras ( $p < 0.0001$ ), siendo mayor la proliferación celular en la superficie dorsal que ventral. La misma diferencia se encontró al efectuar un análisis por dieta, con un nivel de significación de 0.001 y 0.002 para B y M, respectivamente. No se hallaron diferencias significativas en los conteos positivos para este marcador al comparar los epitelios entre las dos dietas.

En relación a apoptosis, no se observaron diferencias entre las caras dorsal y ventral en cada dieta. Sin embargo, el número de células positivas

para el marcador Bax fue significativamente mayor en animales del grupo B que M, en particular en cara dorsal ( $p < 0.018$ ).

Comparando Ki-67 y Bax en cada una de las caras linguales, se encontraron diferencias significativas referidas a un mayor número de células apoptóticas ( $p < 0.001$ ) que proliferativas en la superficie dorsal de lengua de los animales alimentados con la dieta B ( $p < 0.001$ ) (Figura 3). También se observó mayor conteo de Bax en grupo B que en M ( $p < 0.008$ ). En cara ventral, se observó mayor marcación para Bax que para Ki-67 ( $p < 0.0001$ ), tanto en grupo B como M ( $p < 0.012$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente) (Figura 4).

Figura 3: Media de células positivas para Ki-67 y Bax en cara dorsal de lengua según dieta

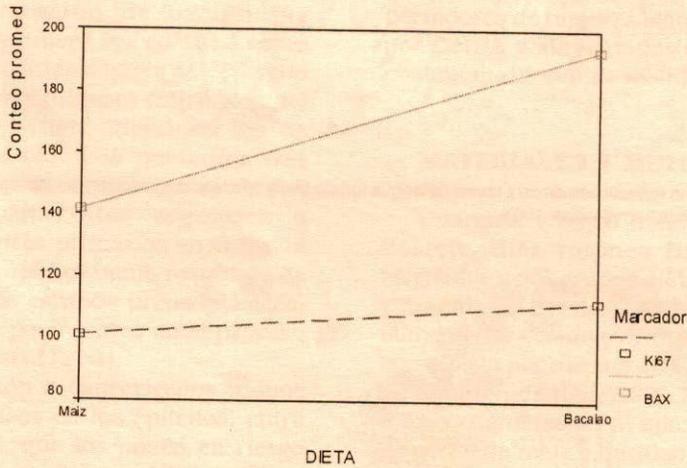
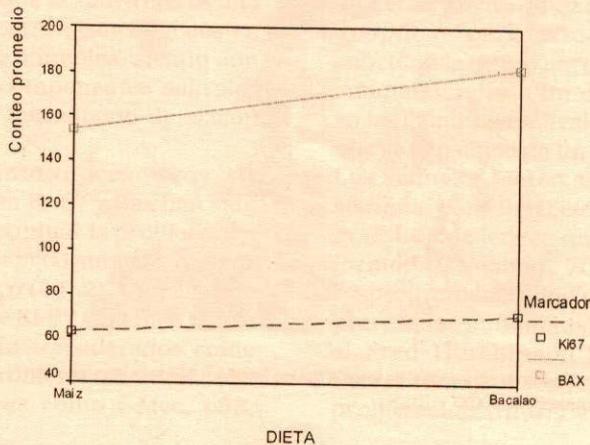


Figura 4: Media de células positivas para Ki-67 y Bax en cara ventral de lengua según dieta



## DISCUSIÓN

Debido a la exposición a un cancerígeno, el cáncer bucal se desarrolla generalmente desde hiperplasia hacia carcinoma por cancerización de campo (10).

Estudios moleculares recientes han demostrado que un tumor puede estar rodeado por un campo que consiste en células genéticamente alteradas. Es el clásico concepto de cancerización de campo (4). Bronchud propone su sustitución por el de "cancerización de campo de múltiples etapas" lo que, sumado a las posibilidades actuales de medición de los antecedentes carcinogénicos, permitiría la detección precoz de riesgo de cáncer a fin de desarrollar estrategias terapéuticas tendientes a demorar o inhibir el proceso de tumorigénesis (5).

El desequilibrio entre dos mecanismos celulares importantes en dicho proceso, como son la proliferación y muerte celular programada, revela un estado de "inquietud" del epitelio. Los marcadores de proliferación celular y apoptosis -Ki-67 y Bax- y, en particular la combinación de ambos, tienen valor pronóstico de utilidad para la implementación de medidas preventivas (14).

Se conoce que diferentes compuestos dietarios, entre ellos los lípidos, modifican los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el proceso neoplásico (7). Así, la falta de ácidos grasos esenciales poliinsaturados estimula la proliferación e indiferenciación celular y disminuye la apoptosis, marcando una tendencia protumorigénica. Por el contrario, los ácidos grasos de la familia n-3 detienen la proliferación celular en varios modelos tumorales (1).

El presente estudio, llevado a cabo en ratones portadores de tumores malignos de las glándulas salivales inducidos por DMBA demuestra, en consonancia con los conceptos de cancerización de campo o cancerización de campo de múltiples etapas, que la dieta a base de aceite de bacalao induce mayor apoptosis en el epitelio lingual, sugiriendo un mecanismo defensivo desarrollado por los tejidos ante

la presencia de un agente cancerígeno-tumoral.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Dres. Johanna y Paul Lampe del Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA, por su colaboración; a JoAnn Prunty, por la realización de las técnicas de inmunohistoquímica; a Nélida Ramonda y Ricardo Mattos, por la asistencia técnica en el cuidado de los animales.

## REFERENCIAS

1. Actis, A B, Joekes, S, Cremonezzi, D, Morales, G, Eynard, AR: Effects of dietary lipids on cell proliferation of murine oral mucosa. *Lipids Health Dis*; 2002, 1:3.
2. Actis, A B, Lampe, P, Eynard, A R: Cellular basis and clinical implications of biological markers in salivary tissues: their topological distribution in murine submandibular gland. *Oral Oncol*; 2002, 38: 441-449.
3. Baisch, H: Elevated Ki-67 expression is correlated with TNFalpha- and IFNgamma-induced apoptosis in tumour cells. *Prolif Oral Biol Med*; 2003,14:363-9.
4. Braakhuis, B J, Tabor, M P, Kummer, J A, Leemans, C R, Brakenhoff, R H: A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*; 2003, 63:1727-30.
5. Bronchud, M H: Is cancer really a "local" cellular clonal disease? *Med Hypotheses*; 2002, 59:560-565.
6. Ha, P K, Califano, J A: The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Oral Biol Med*; 2003,14:363-9.
7. Jiang, W G, Bryce, R P, Horrobin, DF: Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. *Oncol Hematol*; 1998, 27:179-209.

8. Kaplan, I, Hochstadt, T, Dayan, D: PCNA in palate and tongue mucosal dysplastic lesions induced by topically applied 4NQO in desalivated rat. *Med Oral*; 2002, 7:336-43.

9. Kim, T W, Chen, Q, Shen, X, Regezi, J A, Ramos, D M, Tanaka, H, Jordan, R C, Kramer, R H: Oral mucosal carcinogenesis in SENCAR mice. *Anticancer Res*; 2002, 22:2733-40.

10. Li, N, Chen, X, Liao, J, Yang, G, Wang, S, Josephson, Y, Han, C, Chen, J, Huang, M T, Yang C S: Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. *Carcinogenesis*; 2002, 23:1307-1313.

11. Thomas, G, Hashibe, M, Jacob, B, J, Ramadas, K, Mathew, B, Sankaranarayanan, R, Zhang, Z F: Risk factors for multiple oral premalignant lesions. *Int J Cancer*; 2003, 107:285-91.

12. Thompson, P J: Field change and oral cancer: new evidence for widespread carcinogenesis? *Int J Oral Maxillofac Surg*; 2002, 31:262-6.

13. Vermeulen, K, Berneman, Z N, Van Bockstaele, D R: Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*; 2003, 36:165-75.

14. Xie, X, De Angelis, P, Clausen, O P, Boysen, M: Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*; 1999, 35:502-9.