



**UNIVERSIDAD DE TALCA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO QUIMIOPREVENTIVO DE
METFORMINA EN EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS EN MODELO MURINO**

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la
Universidad de Talca como parte de los requisitos exigidos
para la obtención del título de Cirujano Dentista.

**ESTUDIANTES: VANIA ANDREA ALEGRÍA SANDOVAL
MACARENA IGNACIA MONTES ESPINOZA
PROFESOR GUÍA: DR. DANIEL ANDRÉS DROGUETT OSSA
PROFESOR INFORMANTE: DR. MARCELO RICHARD SÁNCHEZ ASTORGA**

TALCA - CHILE 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. MÉTODOS	7
3.1. Diseño general	7
3.2. Animales de experimentación	7
3.3. Preparación de las muestras	8
3.4. Diseño experimental	8
3.5. Obtención de muestras	10
3.6. Análisis Macroscópico	10
3.7. Métodos histológicos	11
3.8. Análisis histopatológico	11
3.9. Bioética	13
4. RESULTADOS	14
4.1. Parámetros fisiológicos	14
4.1.1 Los ratones tratados con 4-NQO disminuyen significativamente su peso	14
4.1.2 Consumo de alimento tendió disminuir en todos los grupos	15
4.1.3 Consumo de agua tendió a disminuir en todos los grupos	16
4.1.4 Ratones tratados con 4-NQO disminuyen sus niveles de glicemia	17
4.2. Parámetros clínicos macroscópicos	18
4.2.1 El número de lesiones linguales no disminuyó significativamente al ser tratados con metformina	19
4.2.2 La mayor incidencia de las lesiones ocurrió en la cara dorsal de la lengua	20
4.2.3 La mayor incidencia de lesiones se encontró en el tercio medio de la lengua	21
4.2.4 La mayor incidencia de las lesiones de la lengua de los ratones fue de tipo leucoplasia	21
4.2.5 Existe un aumento en la variabilidad del tamaño clínico de las lesiones en el grupo tratado solo con 4-NQO.....	22

4.2.6	Las lesiones tipo sésiles predominaron en los tres grupos de estudio.....	23
4.3.	Parámetros histopatológicos	24
4.3.1	Existió una mayor incidencia de displasias leves en los grupos tratados con 4-NQO	24
5.	DISCUSIÓN	26
6.	REFERENCIAS	30
7.	ANEXOS	36
7.1.	Anexo 1	36

1. RESUMEN

El cáncer es considerado un problema de salud pública mundial por su alta incidencia y mortalidad. En particular, el cáncer de labios y cavidad oral ocupa el diecisieteavo lugar en el ranking mundial, siendo la gran mayoría carcinomas de células escamosas. La metformina es un fármaco de tipo biguanida, utilizado para el tratamiento de la diabetes, pero también, puede actuar a nivel de distintas vías de señalización, evitando la progresión de las células tumorales, y reduciendo el tamaño de dichos tumores. En este estudio evaluamos el posible efecto quimiopreventivo de la metformina en el carcinoma oral de células escamosas. Para ello, se utilizó un total de 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos: un primer grupo control, un segundo grupo tratado con metformina mediante sonda orogástrica, un tercer grupo tratado con 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO), un potente agente carcinogénico en el agua de beber, y un cuarto grupo con 4-NQO más metformina. La metformina se aplicó desde la semana 0 a la 22 y el carcinógeno desde la semana 2 a la 18. Medimos distintos parámetros, tanto macroscópicos como histopatológicos. Existió una sobrevida del 100% de los animales. Nuestros resultados mostraron solo una leve tendencia a la disminución en la cantidad de lesiones en el grupo tratado con 4-NQO más metformina y un aumento en la variabilidad en el tamaño de estas en el grupo tratado con 4-NQO, además de un aumento de estas en la porción media de la lengua. Sugerimos la realización de más estudios que avalen el real uso quimiopreventivo de la metformina en el COCE.

Palabras clave: cáncer oral, quimioprevención, metformina, 4-nitroquinolina-1-óxido, murino.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cáncer es considerado un problema de salud pública mundial, que no corresponde a una enfermedad única, sino a una multiplicidad de enfermedades relacionadas de diversas maneras, siendo una de las patologías más prevalentes en el mundo (1). En Chile, el cáncer es la segunda causa de muerte, sin embargo, en algunas regiones del país ya es la primera (2).

El cáncer de labios y cavidad oral (CLCO), en particular, ocupa el diecisieteavo lugar mundial según el ranking de incidencia por lugar anatómico de la OMS, con 354.864 nuevos casos el año 2018, y una mortalidad del 49,9% (3). Afecta principalmente los dos tercios anteriores de la lengua, el piso de la boca, la mucosa bucal, el triángulo retromolar, el paladar duro y las encías, compartiendo un origen y evolución en común. Los tumores del labio, si bien son altamente frecuentes, requieren una consideración especial, ya que su historia natural difiere del resto, dado que se asocian a la exposición a radiación solar (4). La gran mayoría CLCO son carcinomas de células escamosas (COCE) (5).

En nuestro país existen escasos datos epidemiológicos para el CLCO. La OMS estimó una incidencia de 301 nuevos casos, con una mortalidad de un 46% el año 2018 (3). Se espera que para el 2040 exista un aumento de un 69,4% en la incidencia y de un 84,6% en la mortalidad (3).

El COCE se define como una neoplasia maligna derivada del epitelio plano estratificado de la mucosa oral (6), de gran invasividad, baja supervivencia y mal pronóstico (7). Los principales factores de riesgo son el consumo de tabaco y alcohol (8, 9), pero también existe una fuerte asociación con la infección por virus papiloma (VPH) particularmente en el cáncer de orofaringe y base de lengua (10), entre otros (11).

Numerosos eventos ambientales, como los mencionados, pueden provocar cambios genéticos y epigenéticos que conducen al desarrollo del tumor y a la progresión de la enfermedad. Los cambios genéticos incluyen eventos que conducen a alteraciones irreversibles en las secuencias de ADN celular, como deleciones de genes, amplificaciones, y mutaciones genéticas, que dañan los genes supresores de tumores o activan oncogenes (12). La proteína supresora de tumores 53 (p53) responde al estrés celular, detiene el ciclo celular y promueve la reparación del ADN. La pérdida de la función de p53 favorece procesos de

malignización, encontrándose que más del 50% de COCE presentan mutaciones de esta proteína a nivel de su ADN (13).

Existen múltiples tratamientos para el COCE que generan un impacto importante y pueden ir en desmedro de la calidad de vida del paciente (14). Están los de primera línea, como la cirugía, radioterapia, quimioterapia o cualquier combinación de estas, que a menudo producen disfunción y distorsiones en el habla, la deglución, la masticación (15), entre otros.

La quimioprevención, por otra parte, es un enfoque terapéutico novedoso, que se define como la utilización a largo plazo de moléculas naturales o sintéticas para prevenir, inhibir o revertir el proceso de carcinogénesis (16). Se han descrito cientos de compuestos con posibles propiedades quimiopreventivas (17), siendo la metformina, uno de los últimos en ser estudiado. Este, es un fármaco de la familia de las biguanidas utilizado para el tratamiento de la diabetes (17, 18). Recientemente se ha descubierto su potencial para prevenir, y en conjunto con otros fármacos, tratar algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama, de próstata, gástrico y el linfoma in vitro e in vivo (18-21).

Dentro de los posibles mecanismos por los cuales induce una disminución en la proliferación de las células cancerígenas, se encuentra la activación de la vía adenosin monofosfato activada por proteína kinasa (AMPK), proteína involucrada en la regulación del metabolismo celular, la cual se activa por aumento en los niveles intracelulares del precursor adenosin monofosfato (AMP) (22), y también mediante la expresión del gen supresor tumoral humano quinasa hepática B1 (LKB1), que al ser activada la AMPK bloquea el proceso de fosforilación que conduce a la estimulación de los procesos catabólicos que generan ATP, como la β -oxidación de los ácidos grasos, la glucólisis y la gluconeogénesis (23). Al producirse la activación de la vía LKB1- AMPK se produce la inhibición del receptor diana para la rapamicina en los mamíferos (mTOR), proteína que se encuentra sobreexpresada en varias líneas celulares de cáncer y que les confiere un peor pronóstico, ya que regula positivamente el crecimiento, proliferación, motilidad y supervivencia de las células, así como la transcripción del material nuclear y la síntesis proteica (23, 24).

También se ha reportado que AMPK y LKB1 son capaces de inhibir la progresión del ciclo celular por medio del aumento de expresión de la proteína p53 (25), ya que la vía AMPK modula la apoptosis dependiente de p53 y produce la fosforilación de p53 en la serina 15 (23-26).

El uso de la metformina como agente quimiopreventivo para el control de carcinogénesis del cáncer de cabeza y cuello es alentador (27-29), sin embargo, las vías y mecanismos subyacentes a los efectos terapéuticos de la metformina en el COCE siguen siendo inciertos (19).

Nuestro objetivo general fue evaluar el posible efecto quimiopreventivo de la metformina en un modelo murino de carcinogénesis con 4-nitroquinolina 1-oxido (4-NQO) en el COCE.

3. MÉTODOS

3.1. Diseño general

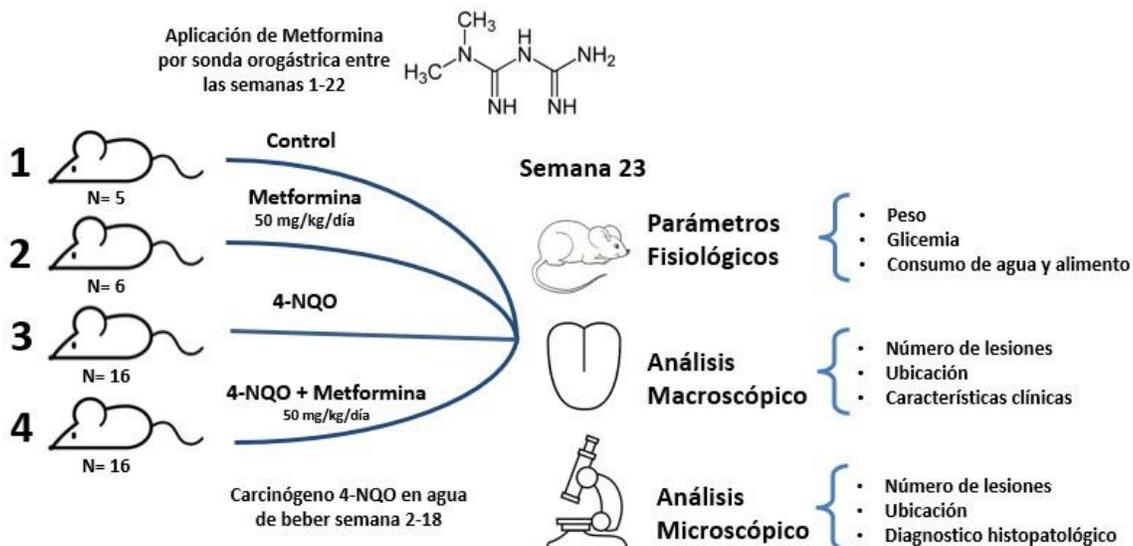


Figura 1: Diseño general del experimento. Se evaluó el efecto quimiopreventivo de la metformina en un modelo murino. Utilizamos un total de 43 ratones, los cuales se dividieron en 4 grupos, el primero fue el grupo control al cual se le administro agua destilada; al segundo, se le administro el fármaco (metformina 50 mg/kg) por sonda orogástrica; al tercero, se le suministro 4-NQO en el agua de beber, y al cuarto grupo se le administro 4-NQO más metformina. La metformina se aplicó desde la semana 0 a la 22 y el carcinógeno desde la semana 2 a la 18. En la semana 23 se sacrificamos los animales y se evaluamos los parámetros fisiológicos de estos, además de análisis macroscópicos y microscópicos de las lenguas.

3.2. Animales de experimentación

Utilizamos 43 ratones macho de la cepa C57BL/6, de 8 semanas de vida, consanguíneos, con sus respectivas certificaciones sanitarias, adquiridos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica.

El cálculo de tamaño muestral se realizó utilizando la plataforma on-line “Statisticalsolutions.net” (<http://www.statisticalsolutions.net/calculators.php>) (revisado el 07-01-2019). Se utilizó como parámetro el promedio de focos de COCE por lengua de ratones expuestos a 4-NQO (control positivo).

Según lo registrado en experimentos anteriores y lo reportado en la literatura, la incidencia de lesiones fue de un promedio de $1,2 \pm 0,3$. Esperamos que el promedio de lesiones en los grupos tratados con metformina tuviera una reducción a lo menos de un 20% del número de focos de lesión de COCE para encontrar diferencias significativas (promedio de 0,96). Fijamos un valor de 0,05 como error alpha, con un poder de test de 0,80 y con un contraste de dos colas.

Considerando los parámetros anteriores, el programa entrego un “n” de 12 animales por grupo, lo que sumado a un 25% de pérdida esperada de animales durante la etapa experimental arrojó un “n” de 15 animales por grupo tratado con 4-NQO para poder encontrar diferencias significativas en el número de focos de carcinoma entre los tratados con o sin metformina. Se debió agregar un animal más por grupo para poder compatibilizar las camadas de origen. Para reducir lo más posible el número de animales a utilizar en los grupos controles se formaron con sólo 5 o 6 animales.

3.3. Preparación de las muestras

Todos los ratones fueron sometidos a un periodo de aclimatación de 1 semana. Se mantuvieron con dieta estándar (Labdiet®, EE.UU) durante todo el bioensayo, bajo condiciones controladas, con acceso a alimentos y agua ad libitum, con 12/12 horas de ciclo luz / oscuridad a 22°C en el bioterio de la Universidad de Talca (30).

3.4. Diseño experimental

Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos:

1. Grupo 1 (n=5): Control con vehículo.
2. Grupo 2 (n=6): Control con metformina.
3. Grupo 3 (n=16): Tratamiento con 4-NQO.
4. Grupo 4 (n=16): Tratamiento con 4-NQO + metformina.

A los animales del grupo 1 se les suministró sólo agua destilada para beber.

A los animales del grupo 2 se les administro metformina (Reutter SA, Chile) por vía oral, mediante canulación orogástrica. La dosis diaria fue de 50 mg/kg de peso al día en 200 uL de agua destilada. Dicho compuesto se aplicó siguiendo las instrucciones del

procedimiento operativo estandarizado (POE) BioterioUTAL 204, sobre aplicación vía Orogástrica (31).

Los animales del grupo 3 fueron sometidos a la inducción química de carcinógenos mediante 4-NQO (ChemCruz, TCI), el que se les administró en el agua de beber a una concentración 100 µg/mL solubilizado en propilenglicol (vehículo) y diluido en agua destilada. Dicha solución fue cambiada 2 veces por semana.

Por último, a los animales del grupo 4, además, de la administración de 4-NQO recibieron metformina por vía oral mediante canulación orogástrica, siguiendo el mismo protocolo que en los animales del grupo 2.

Controlamos el peso de los ratones por jaula dos veces por semana para ajustar el cálculo y mantener la dosis de metformina administrada. Además, se registró el consumo de alimento y agua por jaula de manera semanal, en una bitácora experimental.

Luego de 22 semanas y 5 días los animales fueron sacrificados mediante anestesia intraperitoneal, con una mezcla de ketamina 100 mg/kg, xilacina 10 mg/kg y tramadol 20 mg/kg y posterior dislocación cervical para realizar la necropsia y obtención de las muestras.

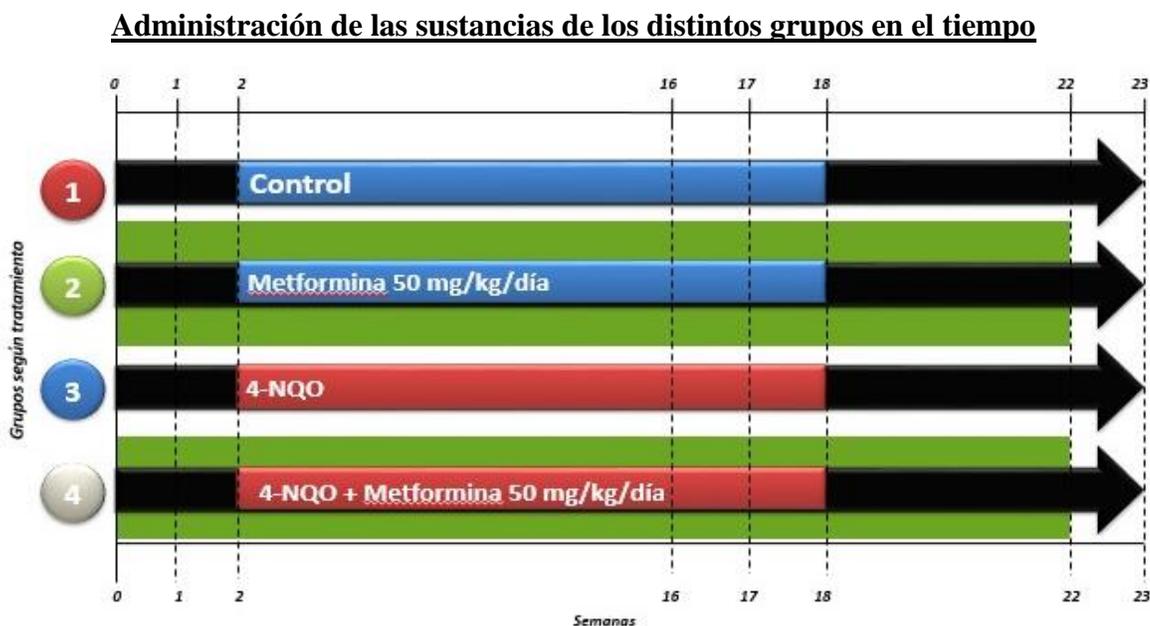


Figura 2: Esquema experimental. Desde la semana 0 a la 22, se administramos a los grupos 2 y 4 metformina a dosis de 50 mg/kg/día por canulación orogástrica (fondo verde). Los grupos 1 y 3 recibieron por la misma vía agua destilada (solo vehículo) durante el mismo periodo. En la semana 2 se comenzó la administración de 4-

NQO (100 µg/mL) en el agua de bebida en los grupos 3 y 4, la que finalizó en la semana 18. En la semana 23 se sacrificaron los animales y se obtuvieron las muestras.

3.5. Obtención de muestras

A las 22 semanas y 5 días se realizó la necropsia y se disecaron las lenguas para el análisis macroscópico e histopatológico de las lesiones. Una vez que el animal se encontró anestesiado y bajo plano quirúrgico (POE Bioterio UTAL 203) (32) se registró el peso corporal del animal y posteriormente se realizó la dislocación cervical (POE Bioterio UTAL 206) (33).

La necropsia se realizó según protocolo estandarizado (30) y los datos fueron registrados en ficha ad hoc. En el mismo momento de la necropsia, se les realizó punción cardiaca, para la obtención de sangre para otros análisis bioquímicos y determinación de la glicemia mediante hemoglucotest (Accu-Check, Roche ®).

3.6. Análisis Macroscópico

Inmediatamente disecado el animal, tomamos una imagen fotográfica sobre un papel milimetrado a todas las caras de la lengua. Sobre cada una de ellas, dos operadores previamente calibrados, realizaron el análisis macroscópico, mediante un sistema ciego simple. Para esto, un operador diferente aleatorizó las muestras utilizando el programa SPSS, anonimizando las muestras antes de ser analizadas por los investigadores.

El análisis consideró los siguientes parámetros de las lesiones:

- 1) Número de focos: cantidad total de lesiones clínicamente visibles.
- 2) Ubicación: se registró la localización de las lesiones en dos sentidos:
 - a. Caras linguales comprometidas (dorsal, ventral y lateral derecha e izquierda).
 - b. Segmento (anterior, medio y posterior).
- 3) Color: se describió a las lesiones según su coloración:
 - a. Leucoplásicas.
 - b. Eritroplásicas.
 - c. Mixtas.
- 4) Tamaño: se definieron 3 parámetros de tamaño:
 - a. Lesiones menores a 1 mm.

- b. Lesiones entre 1 y 3 mm.
 - c. Lesiones mayores a 3 mm.
- 5) Forma: se definieron 3 formas:
- a. Sésil o nodular.
 - b. Pedunculada.
 - c. Papilomatosa.

Posteriormente las lenguas fueron procesadas para su análisis histopatológico.

3.7. Métodos histológicos

Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10% durante 4 a 24 horas, luego fueron deshidratadas mediante inmersión en concentraciones crecientes de alcohol (70°, 90°, 95° y 100°) por 30 minutos cada vez. Posteriormente, fueron aclaradas en xilol al 100% 3 veces durante 50 minutos cada vez e incluidas en parafina fundida a 58° C durante 50 minutos para confeccionar tacos de parafina. A partir de dichos tacos se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor, los que fueron colocados en portaobjetos.

Los cortes fueron desparafinados en xilol al 100% 3 veces por 15 minutos e hidratados en concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 100%, 100%, 95%, 80% y 70%) y agua destilada por 10 minutos cada vez.

Utilizamos la tinción de Hematoxilina Eosina (H-E) para realizar el diagnóstico histopatológico de las lesiones. La Hematoxilina, es un colorante básico que tiñe estructuras basófilas de color azul-violeta oscuro. La Eosina, es un colorante ácido que tiñe estructuras acidófilas de color rojo o rosado.

Las muestras fueron teñidas por 7 minutos en Hematoxilina de Harris, lavadas en agua corriente y sumergidas en agua amoniacal al 1% por 1 minuto. Luego se lavaron con agua corriente y fueron sumergidas en Eosina acuosa por 4 minutos. Finalmente fueron lavadas con agua destilada, deshidratadas, aclaradas, montadas y analizadas microscópicamente (34).

3.8. Análisis histopatológico

Se analizaron un total de 43 muestras teñidas con H-E. El diagnóstico histopatológico fue realizado por dos observadores en forma independiente, previamente calibrados, ciego

simple y con un índice de concordancia al test de Kappa de 0,271. Se realizó posteriormente una reunión de consenso interobservador para unificar los diagnósticos.

El diagnóstico fue realizado acorde a los parámetros de la OMS (35), registrándose la presencia o ausencia de foco de forma cuantitativa.

Las lesiones fueron diagnosticadas en base a las siguientes definiciones operacionales:

a) **Papiloma:** lesión exofítica localizada y polipoide de epitelio hiperplásico con morfología verrugosa o de aspecto similar a una coliflor.

b) **Hiperplasia:** aumento del número de células del epitelio a expensas principalmente del estrato basal. La arquitectura epitelial se muestra regular y no existen atipias citológicas.

c) **Acantosis:** aumento del espesor del epitelio a expensas de un aumento en el número de células del estrato espinoso.

d) **Displasia leve:** perturbación de la arquitectura epitelial limitada sólo al tercio inferior del epitelio, es decir, a la capa basal y parabasal, acompañada de atipias citológicas mínimas.

e) **Displasia moderada:** ampliación de las perturbaciones arquitectónicas hasta el tercio medio del epitelio, es decir desde la capa basal hasta la porción media del estrato espinoso. Sin embargo, el examen del grado de atipia citológica podrá llevar a que esta pueda corresponder a una displasia severa.

f) **Displasia severa o Carcinoma in situ:** compromiso arquitectónico de más de dos tercios del epitelio o la totalidad de este, asociada a un mayor grado de atipias citológicas.

g) **Carcinoma invasor:** invasión del epitelio hacia el tejido conjuntivo, presentando nidos o islotes neoplásicos inmersos en el tejido conjuntivo o presencia de células epiteliales aisladas, no conectadas al epitelio.

En el caso de los carcinomas se determinó además la Clasificación Internacional de Tumores (36-38), basado en el grado de diferenciación (Tabla 1).

Grado de Diferenciación	
Bien diferenciado	Produce cantidades importantes de queratina y conserva algunos rastros de maduración desde células basales.
Moderadamente diferenciado	Produce escasa o nula queratina, pero conserva un epitelio aun reconocible como plano estratificado.
Poco diferenciado	No produce queratina, presenta una significativa falta de patrón estructural normal, falta de cohesión celular, anomalías extensas y escasa similitud respecto al epitelio normal.

Tabla 1. Grado de diferenciación de un tumor según la Clasificación Internacional de Tumores.

3.9. Bioética

Este estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional de Ética, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CIEQUAL) de la Universidad de Talca (Anexo 1).

4. RESULTADOS

Como resultados generales de esta investigación es de destacar que la sobrevivencia de todos los grupos experimentales fue de un 100%.

Para un mejor análisis de los resultados, estos se dividieron en tres tipos. El primer tipo correspondió a los parámetros fisiológicos, donde se controló el peso (Gráfico 1), la alimentación (Gráfico 2) y el consumo de agua (Gráfico 3) de cada grupo experimental, además de los niveles de glicemia previos al sacrificio de los animales (Gráfico 4).

El segundo tipo consistió en el análisis macroscópico de lesiones en la lengua de los ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se determinó el número total de lesiones por cada grupo (Gráfico 5), la ubicación de las lesiones según la cara lingual afectada (Gráfico 6), su ubicación respecto al tercio lingual (Gráfico 7), el color de las lesiones (Gráfico 8), su tamaño (Gráfico 9) y su forma (Gráfico 10).

El tercer tipo consistió en el análisis microscópico de las muestras histopatológicas mediante tinción con Hematoxilina- Eosina (Gráfico 11).

4.1. Parámetros fisiológicos

Los parámetros fisiológicos de los animales se controlaron durante todo el periodo experimental y fueron registrados en una bitácora ad hoc.

4.1.1. Los ratones tratados con 4-NQO disminuyen significativamente su peso

Para evaluar el peso de los animales, utilizamos una balanza digital (S-400), se controló dos veces por semana durante todo el periodo experimental (Gráfico 1) y fueron registrados por jaula en la bitácora experimental.

El peso de los animales (Gráfico 1), tanto del grupo control, como el grupo tratado con metformina, presentaron una tendencia al aumento de este a medida que transcurría el periodo experimental. Totalmente a la inversa de lo que ocurrió con los grupos tratados con 4-NQO, donde el grupo tratado sólo con el agente cancerígeno comenzó a disminuir su peso marcadamente a partir de la semana 14, mientras que el tratado con 4-NQO más metformina lo hizo a partir de la semana 13.

Las diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos se comenzaron a ver desde la primera semana entre todos los grupos experimentales, existiendo variaciones en esta, e intensificándose a partir de la semana 13. Los valores estadísticamente significativos más acentuados se encontraron entre las semanas 13 y 23, para todos los grupos.

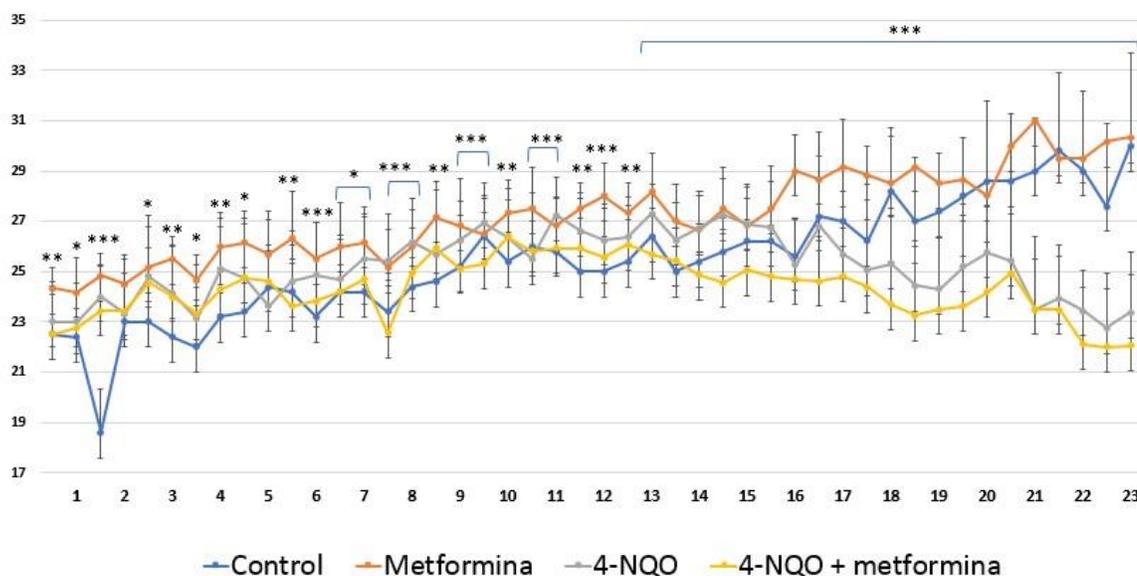


Gráfico 1: Evaluación del peso promedio en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. A estos se les tomó un registro de peso, mediante una balanza digital, durante 22 semanas y 5 días. Se muestra la evolución del peso promedio por grupo y su desviación estándar. La barra azul corresponde al grupo control, la naranja al grupo tratado con metformina, la gris al tratado con 4-NQO, y la amarilla al tratado con 4-NQO + metformina. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANDEVA, seguido del test de comparación múltiple de Tukey (* $p \leq 0,5$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$).

4.1.2. El consumo de alimento tendió a disminuir en todos los grupos

Se evaluó el consumo de alimento por jaula, el que se registró 2 veces por semana durante todo el periodo experimental, mediante una balanza digital, registrándose la diferencia entre la cantidad total de alimento suministrado y el alimento remanente en la jaula, dando como resultado el alimento consumido por jaula. Posteriormente se estableció una

proporción entre el peso promedio de los ratones y el total del alimento consumido por jaula durante cada semana, la cual se expresó en relación a 100 gr de ratón.

El consumo de alimento tuvo una tendencia a la disminución en el transcurso de las 22 semanas, en todos los grupos, a excepción de ciertos picos en las semanas 6, 7 y 8 en donde se observa un aumento. El grupo de ratones tratados solo con Metformina mantuvo un menor consumo de alimento con respecto a los otros grupos. Cabe destacar que entre la semana 12 y 20 el consumo se mantuvo similar entre los grupos, siempre con una tendencia a la baja, a excepción del grupo tratado con metformina, quien tuvo valores inferiores en todo el tiempo de experimentación.

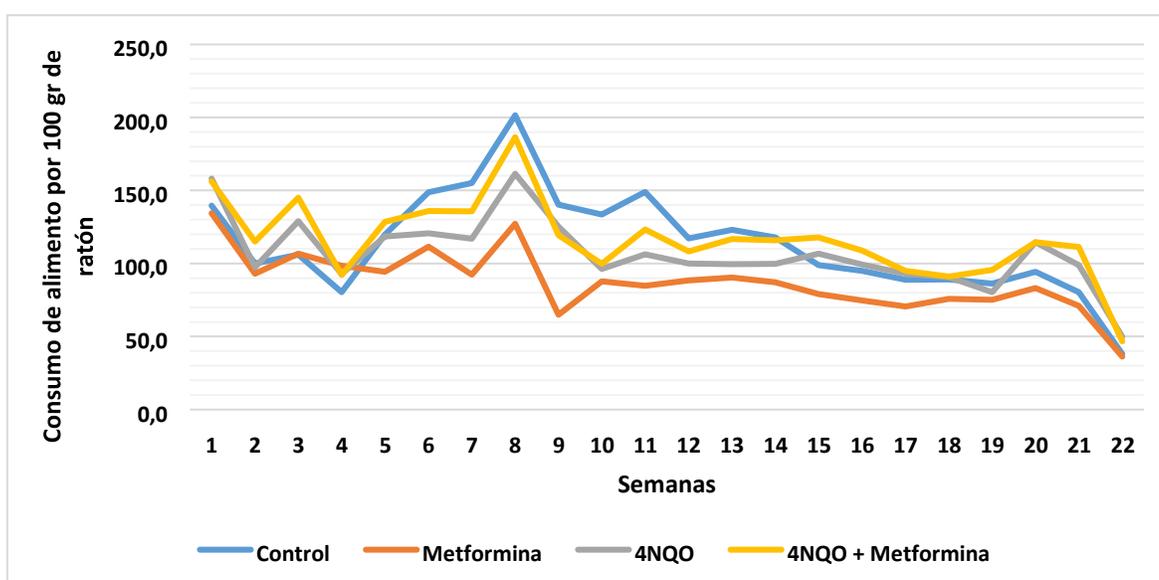


Gráfico 2: Evaluación del consumo de alimento semanal de los ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizó el alimento consumido por 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. El color azul corresponde al grupo control, el naranja al grupo tratado con metformina, el gris al grupo tratado con 4-NQO, y el amarillo al grupo tratado con 4-NQO + metformina.

4.1.3. El consumo de agua tendió a disminuir en todos los grupos

Se evaluó el consumo de agua por jaula, el que se registró 2 veces por semana durante todo el periodo experimental, registrándose la diferencia entre la cantidad total de agua suministrada y el agua remanente por jaula, dando como resultado el agua consumida

por jaula. Posteriormente se estableció una proporción entre el peso promedio de los ratones y el total de agua consumida por jaula durante cada semana, la cual se expresó en relación a 100 gr de ratón.

El consumo de agua de los ratones control fue superior en todo el transcurso del tiempo, respecto a los demás grupos. Los grupos restantes tuvieron comportamientos similares, pero se observó que los ratones tratados con el agente cancerígeno, tanto solo o acompañado de metformina tuvieron cifras inferiores.

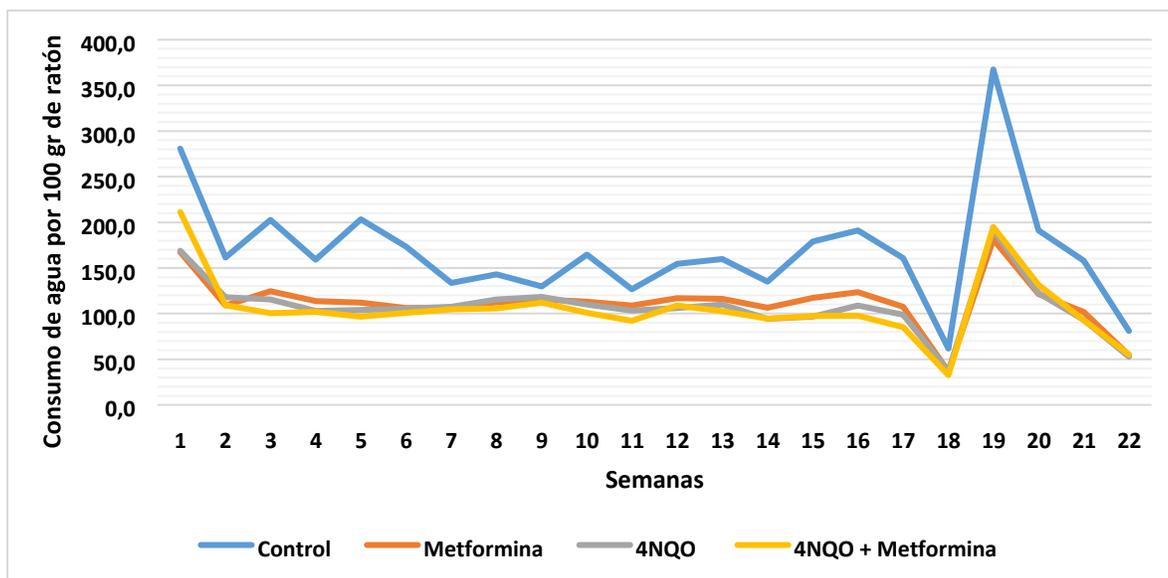


Gráfico 3: Evaluación del consumo de agua semanal de los ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizó el agua consumida por 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. El color azul corresponde al grupo control, el naranja al grupo tratado con metformina, el gris al grupo tratado con 4-NQO, y el amarillo al grupo tratado con 4-NQO más metformina.

4.1.4. Los ratones tratados con 4-NQO disminuyen sus niveles de glicemia

Los niveles de glicemia se midieron mediante un hemoglucotest (Accu-Check, Roche®), con sangre extraída por punción cardiaca al momento del sacrificio de los animales. Se observó un aumento en el promedio de la glicemia en el grupo tratado con metformina respecto al control, y una disminución en los grupos tratados con 4-NQO, con un valor de

180,1 mg/dL en el grupo tratado solo con 4-NQO y 166,5 mg/dL en el grupo tratado con 4-NQO más metformina. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

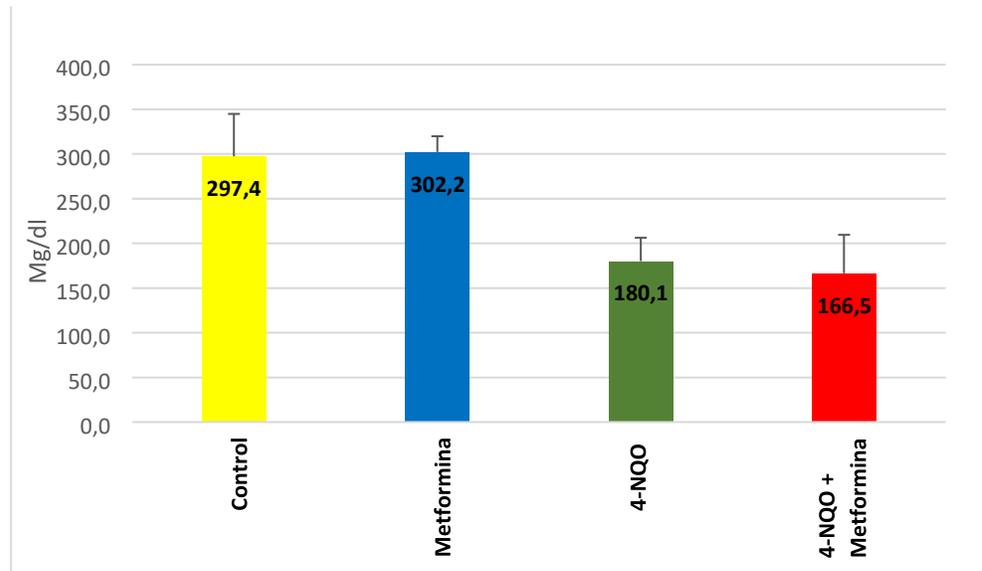


Gráfico 4: Análisis de los niveles de glicemia en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizó la glicemia de 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. Luego del tratamiento se sacrificaron y se obtuvo sangre mediante punción cardiaca, la que fue analizada mediante hemoglucotest (Accu-Check). La barra amarilla corresponde al grupo control, la azul al grupo tratado con metformina, la verde al grupo tratado con 4-NQO, y la roja al tratado con 4-NQO + metformina. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal- Wallis (valor $p < 0.001$).

4.2. Parámetros clínicos macroscópicos

Para evaluar el número de focos macroscópicos, posterior a la necropsia, se tomaron fotografías estandarizadas de las lenguas de los animales, con una cámara digital (EOS Rebel XSi, Canon ®) sobre un papel milimetrado en una superficie iluminada que no generara sombra.

4.2.1. El número total de lesiones macroscópicas no disminuyó significativamente al ser tratados con metformina

Se determinó el número total de focos por grupo (Gráfico 5), existiendo un total de 103 lesiones. En el grupo tratado con metformina se observaron solo 2 lesiones. El tratado con 4-NQO fue el que presentó la mayor cantidad de focos, con un total de 53 lesiones, a diferencia del grupo tratado con 4-NQO más metformina que mostro una disminución en el número de focos totales, que sólo presentó 47 lesiones, correspondiendo a un 11,3 % de disminución, lo que no resultó estadísticamente significativo. El grupo control no presento lesiones.

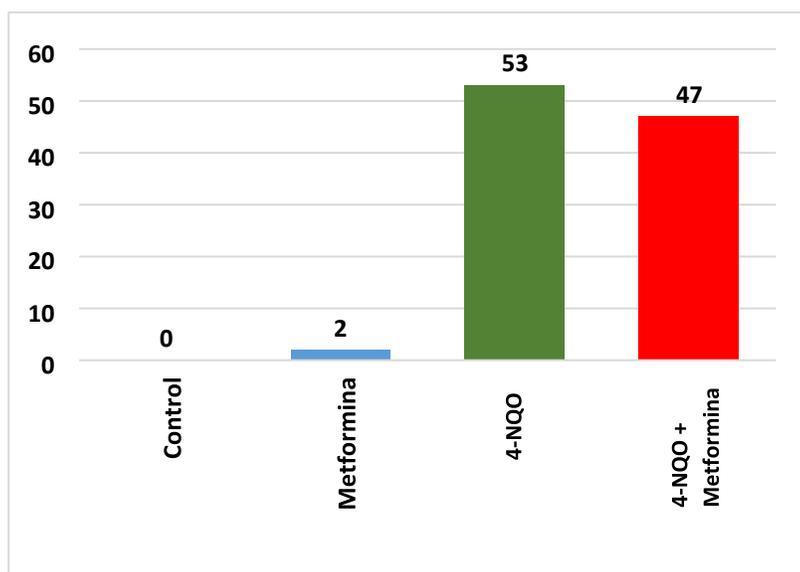


Gráfico 6: Número total de lesiones macroscópicas en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. Se cuantificó el número de lesiones en los distintos grupos. La barra amarilla corresponde al grupo control, la azul al grupo tratado con metformina, la verde al grupo tratado con 4-NQO y la roja al tratado con 4-NQO + metformina. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico, Mann-Whitney two tailed (valor $p=0.6636$)

4.2.2 La mayor incidencia de las lesiones ocurrió en la cara dorsal de la lengua

Se determinó la ubicación de las lesiones según cara lingual afectada; dorsal, ventral, lateral derecha o lateral izquierda (Gráfico 6). Los animales del grupo tratados con metformina presentaron solo dos lesiones en la cara dorsal. En el grupo tratado con 4-NQO existió una alta incidencia de lesiones en la cara dorsal, pero también hay lesiones en las caras laterales (derecha e izquierda). En el grupo tratado con 4-NQO más metformina, la mayor cantidad de lesiones se encontró en la cara dorsal, existiendo también lesiones en caras laterales (derecha e izquierda) y ventral. Las diferencias en dichos grupos no son estadísticamente significativas.

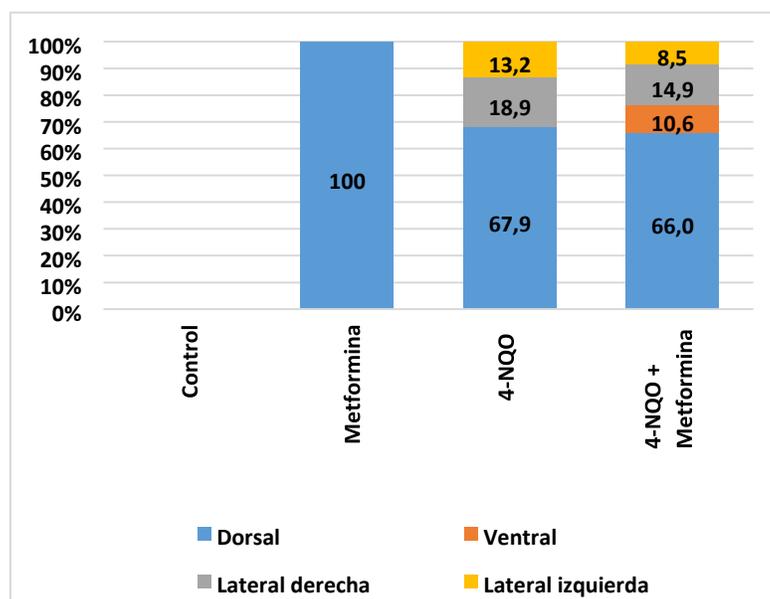


Gráfico 6: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según ubicación en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. Se cuantificó el número de lesiones según la ubicación en los distintos grupos. La ubicación de las lesiones fue graficada según distintos colores: cara dorsal, azul; cara ventral, naranja; lateral derecha, gris; lateral izquierda, amarillo. El análisis estadístico se realizó mediante test de Fisher ($p=0,240$).

4.2.3. La mayor incidencia de lesiones se encontró en el tercio medio de la lengua

Se determinó en qué zona se presentaban las lesiones, según el tercio lingual afectado (Gráfico 7). En el grupo tratado con metformina, una de las lesiones se encontró en el tercio anterior y la otra en el tercio medio. En el grupo tratado con el agente cancerígeno existió una mayor incidencia en el tercio medio de un 56,6%, y un 38,8% en el grupo tratado con 4-NQO más metformina. En ambos grupos se encontraron lesiones tanto en tercio anterior como posterior, pero en menor cantidad. Las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas, para todas las ubicaciones.

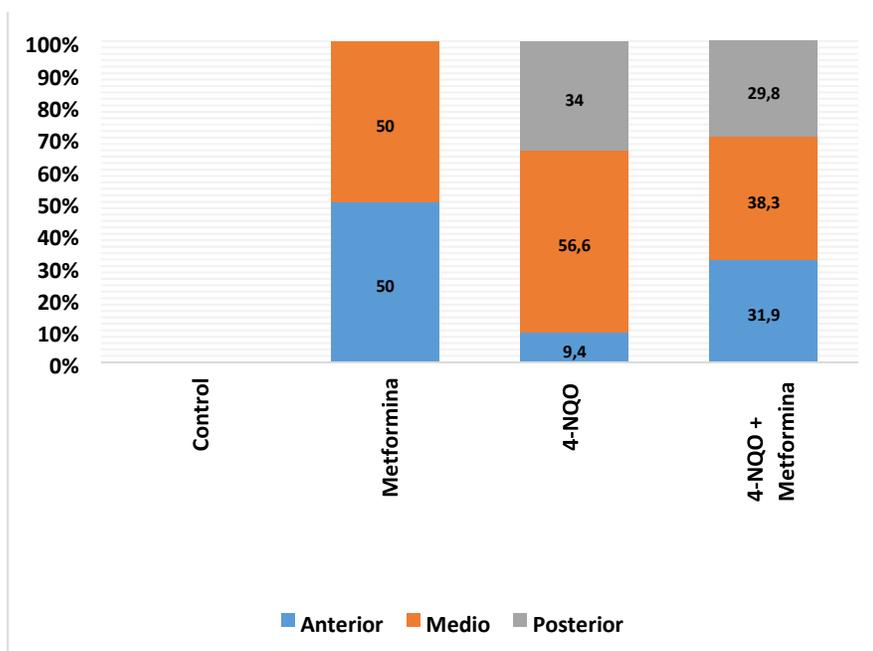


Gráfico 7: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según el tercio de la lengua en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. Se cuantificó el número de lesiones según el tercio lingual en los distintos grupos. La ubicación de las lesiones fue graficada según distintos colores: tercio anterior, azul; tercio medio, naranja; tercio posterior, gris. El análisis estadístico se realizó mediante test exacto de Fisher ($p=0,020$).

4.2.4. La mayor incidencia de las lesiones de la lengua de los ratones fue de tipo Leucoplasia

Se clasificó las lesiones según el color; leucoplasia, eritroplasia, o mixta (Gráfico 8). Ambas lesiones observadas en el grupo tratado con metformina corresponden a leucoplasias.

Un patrón similar predomina en los grupos tratados con 4-NQO y 4-NQO más metformina, aunque también, encontramos un pequeño porcentaje de lesiones tipo eritroplasia y mixtas. Las diferencias no son estadísticamente significativas.

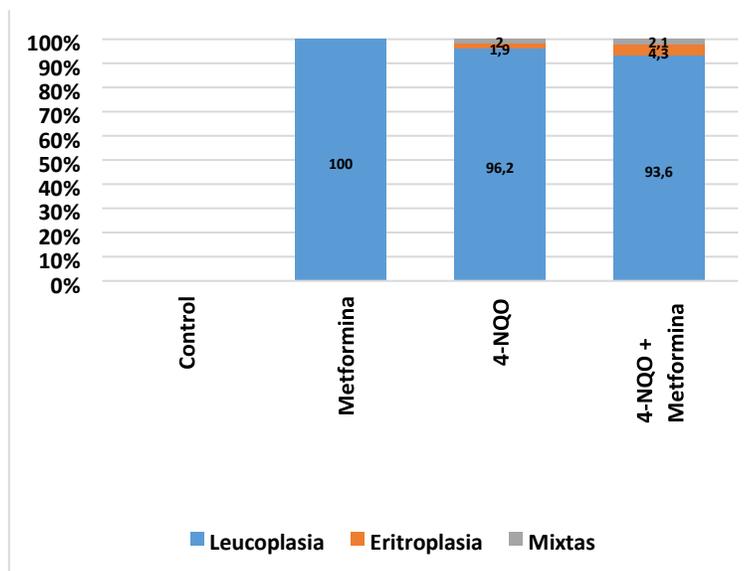


Gráfico 8: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según color en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. Se cuantifico el número de lesiones según color en los distintos grupos. El color de las lesiones fue graficado según: leucoplasia, azul; eritroplasia, naranja; mixtas, gris. El análisis estadístico se realizó mediante test de Fisher ($p=1$).

4.2.5 Existe un aumento en la variabilidad del tamaño clínico de las lesiones en el grupo tratado solo con 4-NQO

Se clasificaron las lesiones según el tamaño de estas (Gráfico 9). Las dos lesiones del grupo tratado con metformina se encuentran en el tamaño medio, entre 1 y 3 mm. Por otra parte, ambos grupos tratados con 4-NQO mostraron mayor variabilidad en los tamaños, presentando las 3 categorías de tamaño. Aunque las diferencias, entre ambos, no son estadísticamente significativas, el grupo tratado con 4-NQO más metformina muestra una tendencia a presentar lesiones de tamaños menores.

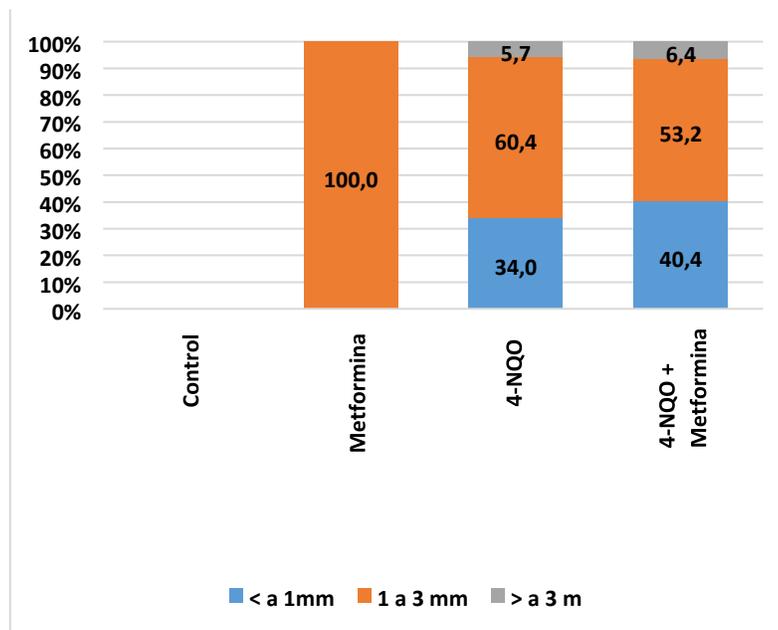


Gráfico 9: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según tamaño en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. Se cuantifico el número de lesiones según tamaño en los distintos grupos. El tamaño de las lesiones se clasifico en: < a 1 mm, azul; 1-3 mm, naranja; > a 3 mm, gris. El análisis estadístico se realizó mediante test de Fisher ($p=0,899$).

4.2.6. Las lesiones tipo sésiles predominaron en los tres grupos de estudio

Se clasificaron las lesiones según su forma, ya sea sésil, pedunculada o papilomatosa (Gráfico 10). Las lesiones de tipo sésil predominaron ampliamente en los tres grupos de estudio. Las dos lesiones encontradas en los ratones tratados sólo con metformina fueron de forma sésil. Ambos grupos tratados con 4-NQO presentan una pequeña variación en las formas, donde el grupo tratado solo con el agente cancerígeno presenta las tres formas y el grupo 4-NQO más metformina, presenta las formas sésil y papilomatosa. Las diferencias no son estadísticamente significativas.

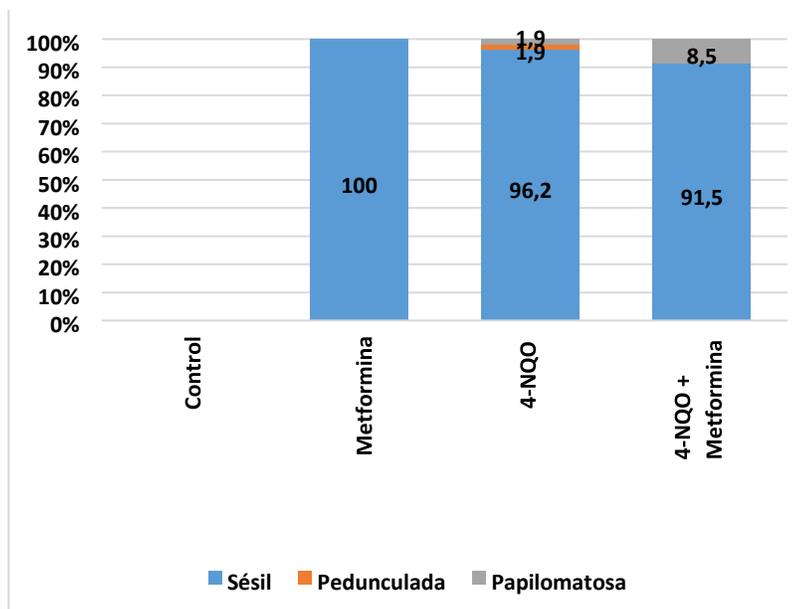


Gráfico 10: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según forma en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. Se cuantificó el número de lesiones según forma en los distintos grupos. La forma de las lesiones se clasificó en: sésil, azul; pedunculada, naranja; papilomatosa, gris. El análisis estadístico se realizó mediante test de Fisher ($p=0,262$).

4.3. Parámetros histopatológicos

Las lesiones en la lengua de los ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO con o sin metformina, así como muestras de epitelio lingual sano (ratones control) fueron analizadas mediante análisis histopatológico convencional y teñidas con hematoxilina-eosina. Los ratones control no presentaron lesiones.

4.3.1. Existió una mayor incidencia de displasias leves en los grupos tratados con 4-NQO

Se clasificaron las lesiones según el diagnóstico histopatológico que presentaron los grupos de 4-NQO, asociado o no a metformina (Gráfico 11). En general se ve un predominio de displasias leves en ambos grupos, seguido, de lejos, por acantosis e hiperplasias. En los diagnósticos de mayor gravedad; carcinoma in situ y carcinoma bien diferenciado, se ve una

similitud entre ambos grupos, a excepción del carcinoma moderadamente diferenciado que sólo se presenta en el grupo tratado con el agente cancerígeno.

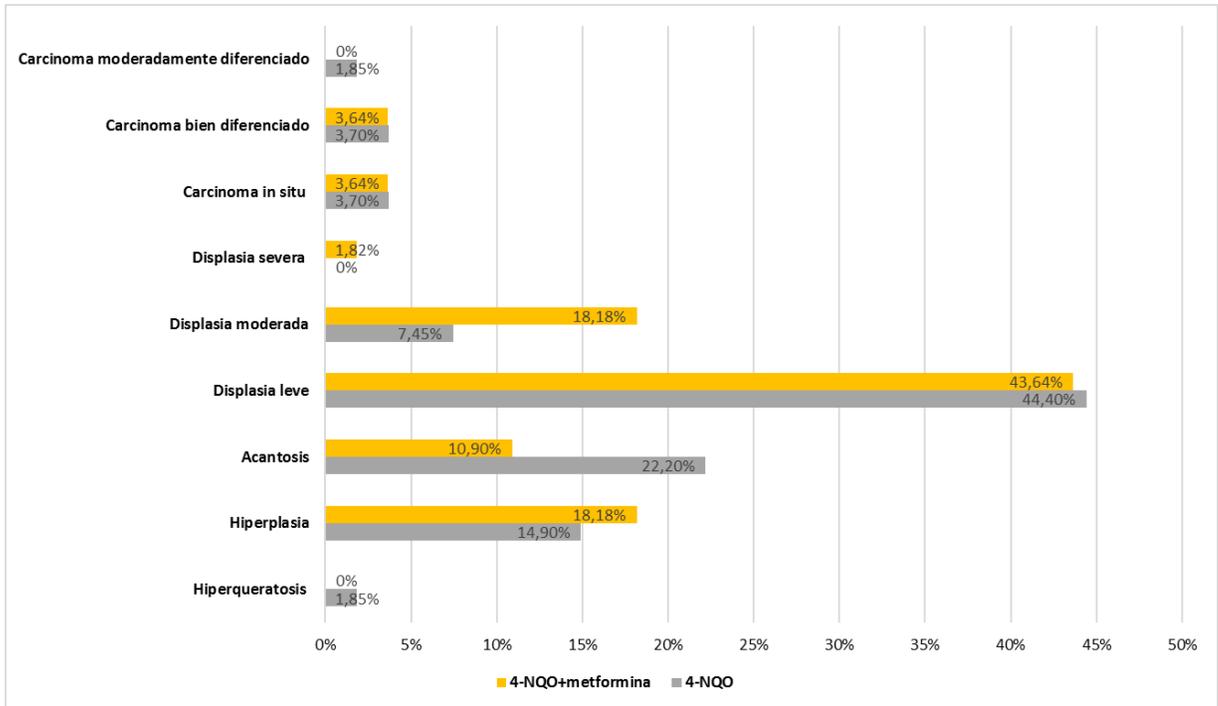


Gráfico 11: Análisis del porcentaje de incidencia de lesiones histopatológicas por tipo en lenguas de ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. Las lesiones fueron clasificadas en hiperqueratosis, hiperplasia, acantosis, displasia leve-moderada o severa, carcinoma in situ, carcinoma bien diferenciado y carcinoma moderadamente diferenciado. El análisis estadístico se realizó mediante test Kruskal Wallis ($p < 0,001$).

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó el uso quimiopreventivo de la metformina en un modelo carcinogénesis experimental de COCE inducida por 4-NQO. El uso de este modelo ha sido ampliamente aceptado en la investigación del COCE, debido a que el mecanismo de acción de 4-NQO implica daño oxidativo en macromoléculas (39, 40), lo que lo hace muy similar a los mecanismos etiológicos presentes en el COCE en humanos. Además, la utilización de un modelo murino para la inducción de cáncer es representativo ya que la mucosa oral de estos animales es similar a la mucosa oral humana, especialmente en paladar y lengua (41, 42), tanto a nivel histológico como molecular (43), permitiéndonos evaluar el efecto sólo y combinado de diversos compuestos *in vivo* en el curso biológico de la enfermedad.

Uno de los principales efectos que tiene el cáncer sobre el organismo es su impacto en la salud general, manifestadas en gran medida en la pérdida del peso corporal, asociable a un síndrome como la caquexia. Autores como R. Moore, et al. (44), lo definen como el deterioro progresivo que padecen algunos tejidos como el músculo esquelético y el tejido adiposo frente a diversas enfermedades, como la infección por VIH, enfermedades autoinmunes o el mismo cáncer. Este fenómeno se asocia a una disminución de la ingesta de alimentos, relacionado a alteraciones de carácter bioquímico y fisiológico. En nuestro estudio observamos una disminución marcada del peso de los ratones en los grupos tratados con 4-NQO y 4-NQO más metformina. El metabolismo en el ratón canceroso puede experimentar importantes alteraciones como consecuencia de la presencia del tumor (45), dentro de estas se puede presentar un aumento en la lipólisis, favorecida por una disminución de la actividad lipoproteína lipasa del tejido adiposo blanco y que propicia un aumento de los niveles de triglicéridos circulantes (46). Además, se produce un aumento en el recambio proteico tisular y una incrementada utilización hepática del lactato, generado en grandes cantidades por el tumor. También existen evidencias a favor del papel del TNF- α en la pérdida de proteína muscular, fenómeno asociado a una activación del sistema proteolítico dependiente de ATP y ubiquitina (47). Este mecanismo permite la degradación tanto de proteínas estructurales como funcionales, y se encuentra activado en el musculo esquelético de animales en

diferentes situaciones patológicas (48), como la caquexia cancerosa. El TNF- α también se asocia a situaciones de resistencia a la insulina (48). Además, la baja de peso la asociamos con que los animales pudiesen haber desarrollado otras lesiones a nivel del tracto gastrointestinal (49), que, junto a las lesiones linguales, generaban en el ratón dificultades para alimentarse, produciendo consigo una disminución en el consumo de alimento y por consiguiente en el peso de los mismos.

Por otro lado, cabe destacar que, según estudios, la aplicación de metformina sola tiende a disminuir el peso (50), contrario a lo que sucedió en nuestra investigación, en donde el peso de los animales tratados sólo con metformina mantuvo un aumento sostenido en el tiempo, respecto a los demás grupos. Por lo que se necesitan más estudios para saber la causa de esta conducta.

El consumo de agua tuvo un comportamiento similar al patrón de alimentación, existiendo una disminución del consumo en los ratones que fueron tratados con el agente cancerígeno, ya sea solo o con metformina. Esto puede estar relacionado con el mal sabor que le otorga el 4-NQO, que también puede influir secundariamente en el consumo de alimentos (51).

Respecto al análisis de glicemia, se observó que tanto en el grupo control como el grupo tratado solo con metformina mantienen niveles similares, no así, en ambos grupos tratados con el agente cancerígeno, en donde existe una disminución significativa. Esto se asocia, probablemente, al bajo consumo de alimento de este grupo durante las últimas semanas del experimento, lo que llevó a una disminución en los niveles de glucosa circulante (52). Además, se asocia al fenómeno de la caquexia, un síndrome metabólico complejo (53).

En cuanto al análisis macroscópico de las lesiones, se observó, aunque no de forma significativa, una disminución en el número de lesiones linguales del grupo con 4-NQO más metformina en comparación al grupo con 4-NQO solo. Diversas investigaciones han asociado el uso de metformina con un efecto antitumoral. Zakikhani, et al. (54), propone que las células de cáncer de mama son sensibles a la metformina, la cual actúa como un inhibidor del crecimiento tumoral. A su vez, Dowling RJ et al. (24) estudió este mecanismo en fibroblastos de ratón, describiendo una inhibición en la traducción proteica a través de mTOR, importante regulador del crecimiento y proliferación celular. A pesar de la evidencia existente en la literatura, nuestro estudio no reflejó una disminución significativa en el número de lesiones,

lo que puede ser explicado, entre otras causas, por la duración del estudio. Vitale-Cross L., et al. (49) planteó que a partir de las 22 semanas se evidenciaría mejor la aparición de lesiones cancerígenas, las cuales irían en aumento, por lo que de aumentar el tiempo de duración del experimento era de esperar, que hubiésemos encontrado diferencias significativas entre los dos grupos tratados con 4-NQO, y así observar, con claridad, el efecto quimiopreventivo de la metformina, que los estudios citados anteriormente describen.

Las lesiones del grupo con metformina que fueron detectadas macroscópicamente no pudieron ser corroboradas histopatológicamente, como lo citó Hawkins, et al.(55), producto de la limitación que tiene la técnica histológica. Posiblemente el corte o sección histológica de la muestra en algunos casos no abarcó la lesión vista macroscópicamente, lo que pudiese solucionarse con una técnica con cortes sucesivos o seriados, que complejiza mucho más el análisis posterior y limita otros posibles análisis posteriores debido al desgaste de las muestras. Es importante destacar que el grupo control y el tratado con metformina, presentaron escasas o nulas lesiones. Las lesiones encontradas en el grupo con metformina fueron de origen reactivo como las hiperqueratosis, las cuales están asociadas a factores irritantes como el roce o fricción propio de una dieta dura como la de los roedores.

El análisis macroscópico de las lesiones linguales según ubicación demostró que existe una alta prevalencia, en la región dorsal y media. Proponemos que esta tendencia es debido al contacto directo entre la región dorsal de la lengua y la punta del bebedero, que contiene el agente cancerígeno.

Por otra parte, las múltiples lesiones leucoplásicas que se encontraron en todos los grupos tratados con 4-NQO se explican debido a su mecanismo de acción, donde la mayoría de las lesiones exhiben un aumento en la proliferación celular con engrosamiento epitelial, asociados a cambios displásicos al final de la exposición al carcinógeno. Coincidimos con Vitale-Cross L., et al. (49), quien sugiere que la exposición a 4-NQO desencadena alteraciones genéticas en las células epiteliales orales que resultan en el desarrollo de lesiones premalignas, que luego pueden progresar espontáneamente a carcinomas. En su experimento los ratones desarrollaron de manera previsible tumores orales linguales irregulares visibles, palpables y blanquecinos.

Las lesiones del grupo con 4-NQO más metformina presentaron lesiones de menos de 1 mm, en mayor cantidad que los ratones tratados sólo con 4-NQO. Este resultado

significativo es coincidente con el estudio de Antonio H.M.R, et al. (56), que en su ensayo in vivo encontró que los tumores fueron más pequeños en ratones tratados con metformina. De la misma forma lo describen Zhao M., et al. (57) y Cho S.W., et al. (58), quienes determinaron que el volumen tumoral medio fue significativamente menor en los tratados con metformina (50 mg/ml) que en los ratones tratados sólo con 4-NQO.

En el análisis histopatológico se observó que tanto el grupo con 4-NQO, como el tratado con 4-NQO más metformina, presentaron una gran cantidad de displasias leves, existiendo más displasias moderadas y severas en el grupo con 4-NQO más metformina, e igual cantidad de carcinomas en ambos grupos. A priori estos resultados nos indican que la metformina no cumplió el efecto quimiopreventivo que hasta el momento la literatura ha planteado (59). Estos resultados disimiles pudiesen explicarse por otras causas propias del experimento, entre las que destacan las altas dosis utilizadas de 4-NQO o la vía por la que fue administrada la metformina, método que fue elegido para imitar su administración oral en pacientes diabéticos. Sin embargo, creemos que el factor tiempo fue determinante en nuestros resultados. Lo anterior nos plantea una limitación en la capacidad de examinar el beneficio de agentes quimiopreventivos por lo que sugerimos aumentar las semanas de duración del experimento para futuras experiencias.

La realización de este estudio fue un tanto ambiciosa, por la gran cantidad de cambios efectuados, respecto a estudios previos. Primero, se utilizó un agente cancerígeno del laboratorio TCI®, a diferencia del 4-NQO de laboratorios Sigma-Aldrich utilizado en estudios anteriores (30) y además se disminuyó la duración del experimento, que como mencionamos, pudo haber afectado en el desarrollo del cáncer o la acción preventiva de la metformina y que permitió la sobrevida del 100% de los animales, contrario a lo que probablemente hubiese ocurrido, si se aumentara la duración, posiblemente la mortalidad del grupo tratado con 4-NQO habría sido mayor, y por consiguiente la sobrevida del grupo tratado con 4-NQO más metformina también.

Creemos que se requiere de una mejor estandarización de las dosis y el tiempo de duración del experimento antes de continuar con una próxima investigación. Finalmente, concluimos que se requieren la realización de más estudios que avalen el real uso quimiopreventivo de la metformina en el COCE.

6. REFERENCIAS

1. Cancer IAfro. World health organization. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, lip, oral cavity, both sexes, all ages France2018. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=1&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D.
2. MINSAL DE. Puesta al día de la situación epidemiológica del cáncer en Chile. Chile. Ministerio de Salud Chile2018. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0.
3. Cancer IAfro. World health organization . Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, lip, oral cavity, both sexes, all ages France2018. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0.
4. Cáncer SAce. Factores de riesgo para los cánceres de piel de células basales y de células escamosas 2019. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel-de-celulas-basales-y-escamosas/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html#referencias>.
5. Kerawala C, Roques T, Jeannon JP, Bisase B. Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. J Laryngol Otol. 2016;130(S2):S83-s9. doi: 10.1017/s0022215116000499.
6. Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2002;31(10):598-604. doi: 10.1034/j.1600-0714.2002.00042.x.

7. Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, et al. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol.* 2008;44(4):315-24. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.08.015.
8. Wilkey JF, Buchberger G, Saucier K, Patel SM, Eisenberg E, Nakagawa H, et al. Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. *Mol Carcinog.* 2009;48(9):853-61. doi: 10.1002/mc.20531.
9. Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol.* 2005;35(3):169-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.04.002>.
10. Yete S, D'Souza W, Saranath D. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology.* 2018;94(3):133-41. doi: 10.1159/000485322.
11. Phusingha P, Ekalaksananan T, Vatanasapt P, Loyha K, Promthet S, Kongyingyoes B, et al. Human papillomavirus (HPV) infection in a case-control study of oral squamous cell carcinoma and its increasing trend in northeastern Thailand. *Journal of Medical Virology.* 2017;89(6):1096-101. doi: 10.1002/jmv.24744.
12. Lubek JE. Head and Neck Cancer Research and Support Foundations. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2018;30(4):459-69. doi: 10.1016/j.coms.2018.06.007.
13. Verma A, Rich LJ, Vincent-Chong VK, Seshadri M. Visualizing the effects of metformin on tumor growth, vascularity, and metabolism in head and neck cancer. 2018;47(5):484-91. doi: 10.1111/jop.12705.
14. Guimaraes TA, Farias LC, Santos ES, de Carvalho Fraga CA, Orsini LA, de Freitas Teles L, et al. Metformin increases PDH and suppresses HIF-1alpha under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(34):55057-68. doi: 10.18632/oncotarget.10842.
15. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, et al. Quercetin and Cancer Chemoprevention. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011;2011. doi: 10.1093/ecam/nej053.
16. George J, Singh M, Srivastava AK, Bhui K, Roy P, Chaturvedi PK, et al. Resveratrol and black tea polyphenol combination synergistically suppress mouse skin tumors growth by inhibition of activated MAPKs and p53. *PLoS One.* 2011;6(8):e23395. doi: 10.1371/journal.pone.0023395.

17. Castro M. CV, Ochoa A., Godínez S. La metformina y sus aplicaciones actuales en la clínica. *Med Int Mex.* 2014;30:562-74.
18. Villegas Valverde CA, Frontela Noda M, García Figueredo I. Nuevas evidencias del uso de la metformina en el tratamiento del cáncer. *Revista Cubana de Endocrinología.* 2016;27:80-90.
19. Chen CH, Tsai HT, Chuang HC, Shiu LY, Su LJ, Chiu TJ, et al. Metformin disrupts malignant behavior of oral squamous cell carcinoma via a novel signaling involving Late SV40 factor/Aurora-A. 2017;7(1):1358. doi: 10.1038/s41598-017-01353-8.
20. Licea Puig ME, Hernández Rodríguez J. La metformina como una alternativa en la prevención y tratamiento del cáncer. *Revista Cubana de Endocrinología.* 2016;27:69-79.
21. Duque JE, López C, Cruz N. Antitumor mechanisms of metformin: Signaling, metabolism, immunity and beyond. *Universitas Scientiarum.* 2010;15:122-9.
22. Lei Y, Yi Y, Liu Y, Liu X, Keller ET, Qian CN, et al. Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chin J Cancer.* 2017;36(1):17. doi: 10.1186/s40880-017-0184-9.
23. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):563-75. doi: 10.1038/nrc2676.
24. Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(22):10804-12. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-2310.
25. Emami Riedmaier A, Fisel P, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M. Metformin and cancer: from the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(2):126-35. doi: 10.1016/j.tips.2012.11.005.
26. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2005;18(3):283-93. doi: 10.1016/j.molcel.2005.03.027.
27. Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H, et al. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(3):549-60. doi: 10.1158/1535-7163.mct-11-0594.
28. Bao B, Wang Z, Ali S, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, et al. Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating

- miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(3):355-64. doi: 10.1158/1940-6207.capr-11-0299.
29. Patel H, Younis RH, Ord RA, Basile JR, Schneider A. Differential expression of organic cation transporter OCT-3 in oral premalignant and malignant lesions: potential implications in the antineoplastic effects of metformin. *J Oral Pathol Med*. 2013;42(3):250-6. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01196.x.
30. Droguett D, Castillo C, Leiva E, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G, Kemmerling U. Efficacy of quercetin against chemically induced murine oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2015;10(4):2432-8. doi: 10.3892/ol.2015.3598.
31. Talca Ud. Procedimiento Operativo Estandaizado Aplicación de Compuestos por Vía Orogastrica. POE BioterioUTAL204. Talca. p. 1-7.
32. Talca Ud. Procedimiento Operativo Estandarizado para Sedación con Isoflurano. POE BioterioUTAL203. Universidad de Talca. p. 1-3.
33. Talca Ud. Eutanasia Roedores de Laboratorio por Dislocación Cervical. POE BioterioUTAL 206. Talca. p. 1-2.
34. Malatesta M. Histological and Histochemical Methods - Theory and Practice. *European Journal of Histochemistry : EJH*. 2016;60(1):2639. doi: 10.4081/ejh.2016.2639.
35. Gale N, Pilch, BZ., Sidransky, D. WHO Classification of Head and Neck Tumours; Chapter 4 Tumours of the oral cavity and mobile tongue. 4th ed. El-Naggar A, Chan, J., Grandis, J., Takata, T., Slootweg, P., editor. France: International Agency for Research on Cancer; 2017. 105-13 p.
36. Sánchez López J, Sicilia Gutiérrez M, Capitán Cañadas L, Labrot Moleón I, Martínez-Villalobos Castillo S, Valencia Laseca E. Profundidad tumoral y variables histopatológicas en el carcinoma epidermoide lingual: Estudio retrospectivo sobre 60 pacientes. *Avances en Odontoestomatología*. 2005;21:241-9.
37. Cantín López M, Suazo Galdames I, Venegas Rojas B, Zavando Matamala D. Carcinoma de Células Escamosas de Labio Inferior: Asociación Entre Grado de Angiogénesis, Graduación Histológica y Frente de Invasión Tumoral. *International Journal of Morphology*. 2008;26:77-82.

38. Matilda F. MC. Carcinoma de células escamosas. A propósito de un caso. *Revista Internacional de Ciencias Podológicas*. 2012;8:37-44. doi: http://dx.doi.org/10.5209/rev_RICP.2014.v8.n1.43254.
39. Nunoshiya T, Demple B. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res*. 1993;53(14):3250-2.
40. Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006;42(7):655-67. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.10.013.
41. MacDonald DG. Comparison of epithelial dysplasia in hamster cheek pouch carcinogenesis and human oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1981;10(3):186-91. doi: 10.1111/j.1600-0714.1981.tb01264.x.
42. Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck*. 1996;18(5):441-9. doi: 10.1002/(sici)1097-0347(199609/10)18:5<441::aid-hed7>3.0.co;2-5.
43. Rivera Martínez CA. 4NQO Carcinogenesis: A Model of Oral Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Morphology*. 2012;30:309-14.
44. Moore R. Factores de transcripción en el desgaste muscular asociado a la caquexia. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2004.
45. Evans RD, Argiles JM, Williamson DH. Metabolic effects of tumour necrosis factor- α (cachectin) and interleukin-1. *Clin Sci (Lond)*. 1989;77(4):357-64. doi: 10.1042/cs0770357.
46. Argiles JM, Busquets S, Toledo M, Lopez-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2009;3(4):263-8. doi: 10.1097/SPC.0b013e3283311d09.
47. Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. The ubiquitin-dependent proteolytic pathway in skeletal muscle: its role in pathological states. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17(6):223-6. doi: 10.1016/0165-6147(96)10021-3.
48. Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ, Figueras M. Fisiopatología de la caquexia neoplásica. *Nutrición Hospitalaria*. 2006;21:4-9.
49. Vitale-Cross L, Molinolo AA, Martin D, Younis RH, Maruyama T, Patel V, et al. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-

- induced premalignant lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(4):562-73. doi: 10.1158/1940-6207.capr-11-0502.
50. Prado A B, Gaete P V, Corona H F, Peralta V E, Donoso A P, Raimann T X. Efecto metabólico de la metformina en adolescentes obesas con riesgo de diabetes mellitus tipo 2. *Revista chilena de pediatría*. 2012;83:48-57.
51. Droguett D. Expresión de cambios histopatológicos reaccionales, pre-neoplásicos y/o neoplásicos en el epitelio de la mucosa lingual de ratones CF-1 expuestos a 4-nitroquinolina-1-oxido 2008.
52. Donaldson MS. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J*. 2004;3:19. doi: 10.1186/1475-2891-3-19.
53. Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*. 2008;27(6):793-9. doi: 10.1016/j.clnu.2008.06.013.
54. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin Is an AMP Kinase-Dependent Growth Inhibitor for Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 2006;66(21):10269-73. doi: 10.1158/0008-5472.can-06-1500.
55. Hawkins BL, Heniford BW, Ackermann DM, Leonberger M, Martinez SA, Hendler FJ. 4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 1994;16(5):424-32. doi: 10.1002/hed.2880160506.
56. Antonio HMR, Sicchieri RD, Andrade JM, Tiezzi DG. Metformin is an effective drug to target the bevacizumab driven cancer stem cell stimulation in murine 4T1 breast cancer cell line. *Cancer Research*. 2013;73:2. doi: 10.1158/0008-5472.sabcs13-p6-04-22.
57. Zhao M, Wang Y, Du C, Liu Y, Zhang N, Luo F. Aspirin and metformin exhibit antitumor activity in murine breast cancer. *Oncol Rep*. 2018;39(3):1414-22. doi: 10.3892/or.2018.6190.
58. Cho SW, Yi KH, Han SK, Sun HJ, Kim YA, Oh BC, et al. Therapeutic potential of metformin in papillary thyroid cancer in vitro and in vivo. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;393(1-2):24-9. doi: 10.1016/j.mce.2014.05.021.
59. Wu X, Yeerna H, Goto Y, Ando T, Wu VH, Zhang X, et al. Metformin inhibits progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by acting Directly on Carcinoma Initiating Cells. 2019. doi: 10.1158/0008-5472.can-18-3525.

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1



Vicerrectoría Académica
Dirección de Investigación



CERTIFICADO DE EVALUACIÓN DE PROYECTO DEL COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA, CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO (CIEQUAL)

Fecha: 29 de noviembre de 2018
Folio: 2018-04-A

Miembros del CIEQUAL participantes:

Nombre	Profesión	Cargo
María Cristina Theoduloz Lafuente	Bióloga	Facultad de Ciencias de la Salud
Mónica Carrasco Pastenes	Bioquímica	Depto. de Ciencias Básicas Biomédicas
Alex Soto Poblete	Estadístico	Instituto de Matemática y Física
Isaac Ravetlat Ballesté	Abogado	Fac. de Ciencias Jurídicas y Sociales
Soledad Pinochet Urrutia	Veterinaria	Bioterio UTalca

- Título completo del proyecto:** "Determinación del efecto quimiopreventivo de Metformina en el carcinoma oral de células escamosas".
- Nombre del investigador responsable:** Dr. Bernardo Venegas.
- Co-investigador:** Dr. Daniel Droguett.
- Institución:** Universidad de Talca. **Unidad académica:** Departamento de Estomatología.
- Documentos revisados:**
 - Protocolo de manejo y cuidados de animales de laboratorio.
- Análisis:** Se acusa recibo de los antecedentes entregados y se realizan las siguientes sugerencias:
 - Debe explicitar la manipulación de la instrumentación que esté en contacto con el compuesto 4NQO. Este procedimiento debe ser analizado por el Comité de Bioseguridad.
 - Se sugiere una dieta de *gel packs* para el término del tratamiento.Favor incorporar las sugerencias.
- Resolución:** Aprobado con modificaciones menores.



Vicerrectoría Académica
Dirección de Investigación



Cristina Theoduloz Lafuente
Prof. María Cristina Theoduloz Lafuente
Vicepresidenta
Facultad de Ciencias de la Salud

Mónica Carrasco Pastenes
Prof. Mónica Carrasco Pastenes
Facultad de Ciencias de la Salud

Alex Soto Poblete
Prof. Alex Soto Poblete
Instituto de Matemática y Física

Isaac Ravetllat Ballesté
Prof. Isaac Ravetllat Ballesté
Facultad de Cs. Jurídicas y Sociales

Soledad Pinochet Urrutia
Prof. Soledad Pinochet Urrutia
Bioterio U Talca