



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

**EFFECTO QUIMIOPREVENTIVO DE METFORMINA EN EL
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

MARGARITA ISABEL RETAMAL MENARES

Memoria presentada a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca para optar al grado académico de Magíster en Ciencias Biomédicas mención Patología Oral

**PROFESOR GUÍA: DR. BERNARDO VENEGAS ROJAS
DRA. XAVIERA LÓPEZ CORTÉS**

TALCA - CHILE 2020

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

© 2020 MARGARITA ISABEL RETAMAL MENARES

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

**EFFECTO QUIMIOPREVENTIVO DE METFORMINA EN EL
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

DR. SERGIO WEHINGER WEHINGER

DR. NELSON BROWN VEGA

DR BERNARDO VENEGAS ROJAS

DRA XAVIERA LÓPEZ CORTÉS

A mi amado Daniel y a mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores del magister por ayudar en todo lo necesario.

A mi familia por siempre confiar en mí y darme todo su apoyo

A Macarena Montes y Vania Alegría, estudiantes de pregrado que participaron en la parte experimental.

A Juan Lara y Ana Bastias, Médicos Veterinarios del Bioterio de la Universidad de Talca

A Fernando Guerrero y Nicole Cespedes del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Talca.

Y a Daniel, que sin el nada de esto sería posible, por siempre estar ahí y enseñarme además de lo procedimental, la perseverancia y la paciencia, por darme ánimo en todo momento y por ayudarme siempre que lo necesite.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	9
Introducción	10
Materiales y métodos	18
Resultados	25
Discusión	38
Conclusiones	44
Referencias	45
Anexos	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 24
Tabla 2 37

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1 20
Figura 2 21
Figura 3 26
Figura 4 27
Figura 5 28
Figura 6 29
Figura 7 30
Figura 8 31
Figura 9 32
Figura 10 33
Figura 11 34
Figura 12 35
Figura 13 36

RESUMEN

El cáncer de cavidad oral y de labio se encuentra en el lugar número 17 a nivel mundial, con una incidencia estimada en el año 2018, de 354.000 casos aproximadamente y una mortalidad de alrededor del 50%. El carcinoma oral de células escamosas (COCE), es el tipo histopatológico más común de cáncer dentro de la cavidad oral y se define como una neoplasia maligna derivada del epitelio plano estratificado de la mucosa oral, de gran invasividad, baja supervivencia y mal pronóstico.

En los últimos años se han realizado múltiples estudios en busca de agentes químicos para prevenir el COCE, dentro de los que se encuentra la metformina. Éste es un fármaco anti-hiperglucemiante oral, utilizado para mejorar los trastornos asociados con la diabetes mellitus tipo 2, reportándose además que en diversos tipos de cáncer produce la activación de múltiples vías de señalización, que redundarían en la inhibición de la proliferación celular y otros efectos con potencial terapéutico.

Se realizó un estudio experimental con animales de laboratorio (43 ratones machos C57BL/6) distribuidos en 4 grupos (2 grupos control y 2 grupos experimentales). Ambos grupos experimentales fueron sometidos a un proceso de carcinogénesis química con 4-NQO, pero solo a uno de estos grupos se les suministró metformina. Posteriormente se observaron las lesiones presentes en la lengua de cada uno de los ratones, se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas de las lesiones, determinándose en estas últimas el grado de diferenciación tumoral y el frente de invasión tumoral de Bryne.

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. No se observaron diferencias en el análisis histopatológico entre ambos grupos experimentales. A la luz de estos antecedentes, no es posible demostrar el uso quimiopreventivo de la metformina en el COCE.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo heterogéneo de patologías, que cada año va cobrando una mayor relevancia debido al aumento de su incidencia y mortalidad, debido principalmente al aumento en el envejecimiento de la población, como también a una mayor exposición a los diversos factores de riesgo que presenta esta enfermedad ¹. En el año 2018 se reportaron aproximadamente 18,1 millones de casos nuevos a nivel mundial y se estima que para el año 2040 esta cifra supere los 29,5 millones ².

Por otra parte, en Chile, en el año 2018 se reportaron 53.365 nuevos casos de cáncer, con 28.443 fallecimientos ³. Estas cifras hacen que el cáncer represente la segunda causa de muerte en Chile, después de las enfermedades del sistema circulatorio, proyectándose que durante el próximo decenio se instale como la principal causa de muerte, lo cual ya es una realidad en algunas regiones del país ⁴.

Entre los tipos más frecuentes de cáncer según ubicación anatómica, tanto a nivel mundial como en Chile, se encuentra el cáncer de pulmón, mama, estómago, próstata y el cáncer colorrectal ². Por otra parte, el cáncer de cabeza y cuello, en el que se agrupan el cáncer de cavidad oral y labio, el cáncer de faringe, laringe, cavidad nasal y paranasal, carcinoma primario desconocido en nódulos cervicales, melanomas del tracto aerodigestivo, cáncer de glándulas salivales mayores, cáncer de tiroides y carcinomas cutáneos de células escamosas de la piel de la cabeza y el cuello ⁵, corresponde en conjunto al quinto lugar entre los tipos de cáncer a nivel mundial.

El cáncer de cavidad oral y de labio, a su vez, se encuentra en el lugar número 17 a nivel mundial, con una incidencia estimada en el año 2018, de 354.000 casos nuevos aproximadamente y una mortalidad de alrededor del 50%. En Chile se encuentra en el lugar número 23, con 301 nuevos casos al año y con una mortalidad del 46% aproximadamente².

A pesar de que epidemiológicamente se reporte el cáncer oral junto al de labios, hay que tener en cuenta que son entidades diferentes. La cavidad oral se define como el territorio entre la cara mucosa de los labios y el istmo de las fauces, abarcando los 2/3 anteriores de la lengua, el piso de la boca, las encías, la cara interna de la mejilla, el triángulo retromolar, el paladar duro y la cara interna de los labios. Dado lo anterior, la cara mucosa del labio se comporta como cáncer de cavidad oral, pero la parte externa no mucosa del labio se comporta como cáncer de piel, el cual presenta una mayor incidencia y una etiología totalmente diferente al cáncer oral, asociada a la alta exposición a rayos ultravioletas ⁶. A diferencia, la etiología principal del cáncer oral es el consumo de tabaco y alcohol, además de la presencia de virus, como el virus papiloma humano (VPH)⁷ en subsitios anatómicos específicos.

El carcinoma oral de células escamosas (COCE), se define como una neoplasia maligna derivada del epitelio plano estratificado de la mucosa oral, de gran invasividad, baja supervivencia y mal pronóstico ⁸, que representa más del 90% de los tipos histopatológicos de cánceres de la cavidad oral ⁹, siendo el cáncer más frecuente de cabeza y cuello, y representando aproximadamente el 3% de los tumores malignos de todo el organismo. En Chile se estima que la morbilidad por cáncer oral y faríngeo corresponde aproximadamente al 1,6% del total de todos los cánceres ¹⁰ y se reporta que la supervivencia general de los pacientes con COCE a los dos años es de 48,3% y a cinco años de 33,9% ⁹.

Los desórdenes potencialmente malignos, antes conocidos como lesiones premalignas del COCE ¹¹, son un grupo de afecciones que se definen como "presentaciones clínicas que conllevan un riesgo de desarrollo de cáncer en la cavidad oral", ya sea en una lesión precursora clínicamente definible o en mucosa clínicamente normal ¹². Es un grupo diverso de lesiones y condiciones clínicas, entre las que destacan por su frecuencia o malignización lesiones como leucoplasias, eritroplasias y lesiones mixtas.

La presentación clínica del COCE es variable, las características clásicas de esta neoplasia incluyen ulceración, nodularidad y fijación a los tejidos subyacentes. La ulceración es una de las manifestaciones más comunes, donde se observa el piso y los márgenes de la lesión de forma irregular. En etapas más avanzadas, se observan tumores exofíticos con superficies verrugosas, límites mal definidos y difíciles de palpar ¹³. Dentro de las ubicaciones anatómicas intraorales más comunes en Chile, se encuentra la lengua (27,5%), la encía o reborde alveolar (20%) y la mucosa bucal (12%) ⁹.

Las características histopatológicas del COCE van a depender de lo avanzado que esté la neoplasia, y se pueden clasificar según el grado de diferenciación tumoral, donde dependiendo de variables como el grado de queratinización y las características morfológicas de las células epiteliales se pueden clasificar en carcinoma bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado ¹². Además, se pueden clasificar según el frente de invasión tumoral de Bryne, en donde se evalúa el grado de queratinización, el pleomorfismo nuclear, el patrón de invasión y la respuesta inmune ¹⁴.

A pesar de que el COCE es precedido por cambios visibles en la mucosa oral y que la cavidad oral es accesible al examen clínico, el diagnóstico de estas lesiones suele realizarse de forma tardía, esto es debido a las escasas visitas al odontólogo y al desconocimiento que existe en la población general de la existencia de este tipo de cáncer y de sus manifestaciones clínicas, siendo este diagnóstico tardío una de las razones de las bajas tasas de supervivencia ¹⁵. Es en este sentido que la prevención es potencialmente la estrategia más eficaz para mejorar las tasas de supervivencia de los pacientes con cáncer, orientándose hacia medidas que apuntan a incentivar el no consumo de tabaco y alcohol, como principales agentes etiológicos del COCE, educar a la población como realizar el autoexamen de la cavidad oral para poder pesquisar algún signo clínico sospechoso y buscar agentes quimiopreventivos, ya sean naturales o sintéticos, que ayuden a prevenir el COCE.

En los últimos años se han realizado múltiples estudios con agentes quimiopreventivos como el retinol, beta caroteno, curcumina y metformina, los cuales se

han llevado a cabo en un esfuerzo por detener la progresión de diferentes tipos de cáncer ¹⁶.

La metformina es un fármaco antihiperlipémico oral de la familia de las biguanidas, utilizado para mejorar los trastornos asociados con la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico desde hace más de 60 años ¹⁷. La metformina ha demostrado ser segura, ya que a diferencia de otros medicamentos antidiabéticos, no tiene efectos secundarios hipoglucémicos, aun cuando se utiliza como monoterapia ¹⁸. Su mecanismo de acción es reducir la producción hepática de glucosa por inhibición de neoglucogénesis y glucogenólisis. Además, incrementa la sensibilidad a la insulina, mejora la captación de glucosa periférica y retrasa la absorción intestinal de glucosa. Por estas razones, se ha convertido en una de las principales estrategias de tratamiento para estas enfermedades ¹⁹.

Estudios *in vitro* recientes han demostrado que la metformina inhibe la proliferación celular, ya que se ha visto que posee un efecto antimetabólico y produce inhibición del crecimiento celular en varios tipos de neoplasias malignas, incluyendo el cáncer pancreático en donde la metformina disminuyó significativamente la supervivencia celular, la clonogenicidad, y además disminuyó la expresión de marcadores tumorales ²⁰. En el carcinoma gástrico, se ha reportado que la metformina inhibió la proliferación celular en todas las líneas de cáncer gástrico y también suprimió la metástasis peritoneal ²¹. En el cáncer de mama se ha comprobado que a dosis bajas de metformina se inhibe la autorrenovación y proliferación de células madre del cáncer ²².

Además, otros estudios *in vivo* realizados en modelos animales han descrito que suprime el crecimiento tumoral de muchos tipos de cáncer, como por ejemplo el cáncer de ovario en donde se reporta una reducción significativa del crecimiento tumoral, acompañado por la inhibición de la proliferación de células tumorales y una disminución del tamaño del tumor y del recuento de células mitóticas ²³. En melanoma maligno se ha observado que la administración oral de metformina condujo a una reducción significativa en el tamaño del tumor en un modelo de melanoma de ratón B16 ²⁴. En cáncer de próstata, por otro lado, se ha estudiado la metformina en combinación con otros agentes químicos

como la quercetina, donde se indica que la terapia combinada ejerció efectos antitumorales sinérgicos mediante la inhibición de la vía VEGF /Akt / PI3K. ²⁵ Por último, en cáncer de mama se ha demostrado que la metformina inhibe el crecimiento celular y aumenta la apoptosis de las células 4T1 al mejorar la función supresora de tumores del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) ²⁶.

Si nos enfocamos en el territorio maxilofacial, en el año 2012 se estudió si la metformina era capaz de reducir el riesgo de desarrollo de cáncer de cabeza y cuello, encontrándose que esta inhibe específicamente el complejo 1 de la vía diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1) en la capa epitelial de proliferación basal de las lesiones premalignas orales y que redujo significativamente el tamaño y el número de lesiones tumorales orales, en ratones inducidas por 4-Nitroquinolina 1-oxido (4-NQO) ²⁷.

En el año 2015, se realizó una revisión en la cual se analizaron los efectos de la metformina en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) ²⁸. Los resultados mostraron que las personas que consumían metformina presentaban una disminución de la tasa de recurrencia y metástasis, además de mejorar la supervivencia total y el tiempo libre de la enfermedad. Además, personas con consumo habitual de metformina presentaron menor incidencia de CCECC en comparación a aquellos que no consumían.

En otro estudio del año 2017 se prueba la eficacia quimiopreventiva de la metformina y curcumina, de manera individual y combinada, en las células madre del COCE. Esta combinación de drogas se probó en un modelo de carcinogénesis oral en ratones inducidos con 4NQO, donde se observó que la metformina mejoró la supervivencia general de los animales y que también inhibió las propiedades migratorias y de autorrenovación de las células madre de cáncer *in vitro* ²⁹. Por lo tanto, según estos estudios la metformina podría tener un efecto antitumoral en el COCE.

Entre los posibles mecanismos por los cuales la metformina induciría una disminución en la proliferación de las células cancerígenas, se encuentra primero su efecto reductor de la hiperglicemia, ya que la hiperglicemia mantenida, por sí sola, se ha asociado al riesgo de desarrollo de cáncer, debido a que promueve el daño al ADN mediante la intensificación del estrés oxidativo por glicólisis anaerobia³⁰. Además se ha reportado que un aumento de la hemoglobina glicosilada se asocia con una mayor probabilidad de aparición del cáncer en cualquier localización³¹.

Por otro lado, la metformina es capaz de activar 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)³², y también mediante la expresión del gen supresor tumoral humano quinasa hepática B1 (LKB1). Al ser activada la AMPK bloquea el proceso de fosforilación que conduce a la estimulación de los procesos catabólicos que generan ATP, así como la β -oxidación de los ácidos grasos, la glicólisis y la neoglucogénesis³³. Al producirse la activación de la vía LKB1-AMPK se produce la inhibición de mTORC1, 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^{33,34}.

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 p53³⁵, proteína supresora tumoral que se encuentra mutada en un gran porcentaje de carcinomas orales de células escamosas. El aumento en la expresión de esta proteína se debe a que la vía AMPK modula la apoptosis dependiente de p53, al fosforilar esta proteína en la serina 15^{33,36}. Además, la proteína p53 es capaz de activar la expresión de REDD1, un inhibidor de la vía mTORC1^{33,35}. Sin embargo, y a pesar de que se ha reportado que la metformina inhibe específicamente la vía mTORC1 en la capa epitelial de proliferación basal de las lesiones premalignas orales, y que reduce significativamente el tamaño y el número de lesiones tumorales orales inducidas por 4-NQO²⁷, no se sabe si esto es producto de la activación

de p53, ya que en estos estudios la determinación de la actividad de la vía mTORC1 se realizó midiendo la hipofosforilación de la proteína ribosómica S6 corriente abajo de la vía.

El uso de la metformina como agente quimiopreventivo para el control del proceso de carcinogénesis de COCE es alentador ³⁷⁻³⁹, sin embargo, las vías y mecanismos subyacentes a los efectos terapéuticos de la metformina en el COCE siguen siendo inciertos ⁴⁰.

Para poder estudiar el efecto quimiopreventivo en la carcinogénesis oral existe una variedad limitada de modelos, siendo los principales aquellos que utilizan animales para inducir la carcinogénesis química, probablemente debido a que los componentes químicos del tabaco y el alcohol han sido identificados como posibles responsables de la mayoría de los COCE en humanos ⁴¹.

Ningún modelo animal es perfectamente aplicable a cualquier tipo de cáncer humano. Sin embargo, permiten aproximarse a la comprensión de la carcinogénesis, además de evaluar posibles esquemas terapéuticos ⁴¹.

La inducción de lesiones neoplásicas mediante 4-NQO es uno de los más utilizados. Este método tiene la ventaja de que el agente carcinógeno puede ser administrado en el agua de beber de los animales de experimentación y de esta manera se pueden administrar distintas dosis del agente y estudiar los efectos tanto a corto como a largo plazo ⁴².

El 4-NQO es un carcinógeno sintético derivado de una quinolina soluble en agua, sensible a las altas temperatura y a la luz ^{43,44}, es capaz de inducir en un 100% carcinoma de células escamosas en el paladar cuando se aplica en forma tópica mediante pinceladas en la mucosa palatina de ratas, en una concentración de 0,5% en propanodiol tres veces a la semana. Además, el 75% de los animales desarrolla carcinomas en el dorso de la lengua, el 20% en la encía y en el estómago después de 7 meses ⁴⁵. El mecanismo de acción

carcinogénico del 4-NQO es mediante la generación de radicales libres del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS) ⁴⁶. El 4-NQO induce mutaciones, siendo uno de los genes blanco identificado el gen *H-Ras* en el cromosoma 7 en el modelo experimental murino, mutación que también se observa en el COCE inducido por el tabaco de mascar ⁴⁷.

Los daños descritos en la mucosa oral son similares a los daños causados por otros agentes carcinógenos presentes en el tabaco, los que son un importante factor de riesgo de cáncer oral. Adicionalmente, la exposición al 4-NQO produce alteraciones histopatológicas similares a las que se observan en los COCE humanos ⁴⁴. En este modelo animal, entonces, se hace posible probar los efectos de agentes quimiopreventivos.

Dentro de este marco, se hace necesario aportar información clara y precisa sobre el potencial uso de la metformina en COCE y su factibilidad de actuar como agente quimiopreventivo en el proceso de carcinogénesis. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar el posible efecto de la metformina en la prevención del carcinoma oral de células escamosas, mediante la evaluación de las características macroscópicas de las neoplasias en ratones tratados con y sin metformina, y mediante el análisis de las características histopatológicas de las neoplasias de ratones tratados, para poder lograr en un futuro, potenciar los efectos de este fármaco o crear un nuevo medicamento similar que pueda servir tanto para la prevención como para el tratamiento del COCE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos de Estudio

Se utilizaron 43 ratones machos, cepa C57BL/6, de 8 semanas de vida, consanguíneos, con sus correspondientes certificaciones sanitarias. Los animales fueron adquiridos del Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Chile.

Se realizó el cálculo de tamaño muestral utilizando la plataforma on-line “Statisticalsolutions.net” (<http://www.statisticalsolutions.net/calculators.php>). El parámetro utilizado en este cálculo fue el promedio de focos de carcinoma oral de células escamosas por lengua de ratones expuestos a 4-nitroquinolina 1-oxido (4NQO) (ChemCruz, TCI) que será el control positivo.

Según lo registrado en experimentos anteriores, y lo reportado en la literatura ⁴⁸, la incidencia fue de un promedio de 1,2 +/- 0,3. En relación a esto se espera a lo menos una reducción de un 20% del número de focos de lesiones de COCE en el grupo tratado con 4- NQO más metformina para encontrar diferencias significativas (promedio de 0,96). Se usó un valor de 0,05 como error alpha, con un poder de test de 0,80 y con un contraste de dos colas.

Con todas las consideraciones anteriores el programa entregó un “n” de 12 animales por grupo, lo que sumado a un 25% de pérdida esperada de animales durante la etapa experimental arrojan un “n” de 15 animales por grupo tratado con 4-NQO para poder encontrar diferencias en el número de focos de carcinoma entre los tratados con o sin metformina. Para reducir lo más posible el número de animales a utilizar, los grupos controles se conformaron solo con 5 ratones. Por lo anterior se requieren para la realización de este protocolo un total de 40 ratones. Sin embargo, debido a que los animales venían en jaulas separados por camadas, no se pudieron conformar los grupos de manera exacta, y se tuvieron que agregar 3 ratones más al experimento.

Preparación de las Muestras

Todos los ratones se sometieron a un periodo de aclimatación de 2 semanas con una dieta estándar (Labdiet®, EE. UU), la cual fue la misma que consumieron durante todo el experimento. Los ratones se separaron por grupos experimentales, en grupos de cinco animales por jaula aproximadamente, en donde la identificación fue de la jaula y no de cada animal por separado.

Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas, acceso a alimentos y agua ad libitum (12/12 h ciclo luz / oscuridad, 22°C) en el Bioterio de la Universidad de Talca ⁴³.

Diseño Experimental

El diseño experimental se planificó dividiendo los 43 ratones en 4 grupos:

Grupo 1 (n=5): control (vehículo).

Grupo 2 (n=6): control con metformina.

Grupo 3 (n=16): tratamiento con 4-NQO, desde semana 3 hasta semana 18.

Grupo 4 (n=16): tratamiento con 4-NQO, desde semana 3 hasta semana 18 + metformina desde semana 1 hasta semana 22.

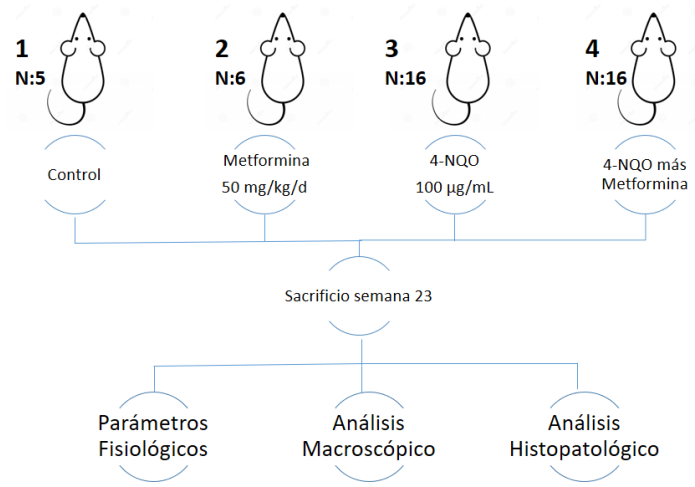


Figura 1: Diseño general del experimento. Se evaluó el efecto quimiopreventivo de la metformina en un modelo murino. Utilizamos un total de 43 ratones, los cuales se dividieron en 4 grupos. El primero fue el grupo control al cual se le administró agua destilada; al segundo, se le administró el fármaco (metformina 50 mg/kg) por sonda orogástrica; al tercero, se le suministró 4-NQO en el agua de beber a una concentración de 100 µg/mL, y al cuarto grupo se le administró 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 sacrificaron los animales, se evaluaron los parámetros fisiológicos y se realizó un análisis macroscópico y microscópico de las lenguas.

La administración del agente carcinogénico 4-NQO (ChemCruz, TCI. Japón) fue en el agua de beber. La dosis a aplicar fue una solución de 100 µg/mL de 4-NQO solubilizado en propilenglicol (vehículo) y diluido en agua destilada. Dicha solución fue cambiada 2 veces por semana por un total de 16 semanas ²⁷.

La suministración de metformina (Reutter SA, Chile) fue por vía oral por canulación orogástrica. La dosis diaria de metformina fue de 50 mg/kg de peso al día en 100 uL de agua destilada. Dicho compuesto se aplicó siguiendo las instrucciones del procedimiento operativo estandarizado (POE) BioterioUTAL 204 sobre aplicación vía Orogástrica (Figura 1 y 2).

El experimento duró 23 semanas. En la última semana se sacrificaron a los animales mediante anestesia intraperitoneal, con una mezcla de ketamina 100 mg/kg, xilacina 10 mg/kg y tramadol 20 mg/kg con posterior dislocación cervical, siguiendo las instrucciones del POE BioterioUTAL 206. Se efectuaron análisis macroscópicos de cavidad oral y se procesaron los tejidos de la lengua para el estudio histopatológico

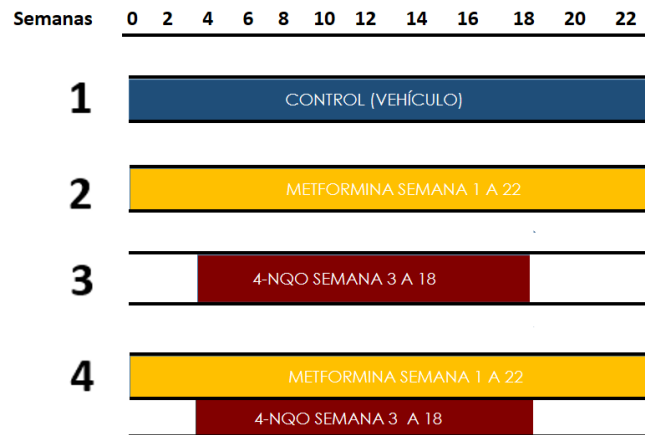


Figura 2: Esquema experimental. Desde la semana 0 a la 22, se administró a los grupos 2 y 4 metformina a dosis de 50 mg/kg/día por canulación orogástrica. Los grupos 1 y 3 recibieron por la misma vía agua destilada (solo vehículo) durante el mismo periodo. En la semana 2 se comenzó la administración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

Obtención de muestras

A las 22 semanas y 5 días se realizó la necropsia y disección de 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) se registró el peso corporal del animal y posteriormente se realizó la dislocación cervical (POE Bioterio UTAL 206).

La necropsia se realizó según protocolo estandarizado y los datos fueron registrados en ficha ad hoc. En el mismo momento de la necropsia, se les realizó punción

cardíaca, para la obtención de sangre para otros análisis bioquímicos y determinación de la glicemia mediante hemoglucotest (Accu-Check, Roche ®).

Análisis Macroscópico

En la lengua de los animales, se analizaron los siguientes parámetros ⁴⁸:

- 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).
 - b. Segmento (anterior, medio y posterior).
- 3) Color: se describieron 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.

Técnicas Histológicas

Fijación y procesamiento de las muestras

Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% en PBS (pH 7.3) durante 24 horas, las cuales fueron posteriormente deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol y aclaradas en xilol. Luego fueron incluidas en parafina y se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados previa tinción de rutina con

hematoxilina-eosina. Posteriormente las muestras fueron montadas en un medio de montaje resinoso. Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico convencional y las imágenes fueron capturadas con un equipo de digitalización acoplado al microscopio y procesadas empleando el programa computacional Adobe Photoshop.

Tinción de Hematoxilina-eosina

El estudio histopatológico se realizó mediante análisis con hematoxilina & Eosina. Las muestras fueron desparafinadas en una estufa a 70°C por 25 minutos y sometidas a 3 inmersiones sucesivas en xilol, por un tiempo de 5 minutos en los dos primeros y 10 minutos en el último. Luego fueron rehidratadas en etanol en concentraciones decrecientes (100, 100, 90 y 70%) por 5 minutos cada vez y sumergidas en agua, por un tiempo similar. Las muestras fueron teñidas por 7 minutos en hematoxilina, lavadas en agua corriente y sumergidas en agua amoniacal al 1% por 1 minuto. Posteriormente fueron lavadas con agua corriente, sumergidas en eosina acuosa por 4 minutos y lavadas en agua destilada ⁴⁹.

Análisis Histopatológico

Determinación del número de focos de lesiones premalignas y malignas

Se realizó el recuento del número de focos de hiperplasia, acantosis, displasia y carcinomas presentes en el corte histopatológico de cada lengua de ratón. Dicho recuento se realizó por 3 operadores previamente calibrados, quienes observaron las muestras de forma anonimizada en formato ciego simple.

Grado de diferenciación tumoral

En las muestras que presentaron lesiones de COCE se analizó el grado de diferenciación tumoral. Este análisis se realizó por 3 operadores, ciego simple, los cuales clasificaron cada una de las muestras obtenidas, procesadas y teñidas previamente con hematoxilina-eosina, en bien diferenciado (grado bajo), moderadamente diferenciado (grado intermedio), escasamente diferenciado o indiferenciado (grado alto) ¹².

Análisis de frente de invasión tumoral de Bryne

En las muestras que presentaron lesiones de COCE se analizó el frente de invasión tumoral de Bryne ¹⁴ (Tabla 1), el cual se realizó por 2 operadores, ciego simple, los cuales evaluaron las características de grado de queratinización, polimorfismo nuclear, patrón de invasión e infiltrado leucocitario, en las muestras obtenidas, procesadas y teñidas previamente con hematoxilina-eosina, asignándole una puntuación de 1 a 4 a cada parámetro. Posteriormente, dicho puntaje se sumó y se estableció a una mayor puntuación, mayor severidad de las lesiones de COCE.

Tabla 1: Parámetros evaluación frente de invasión tumoral de Bryne ¹⁴

Parámetro Morfológico	Puntaje			
	1	2	3	4
Grado de Queratinización	Altamente queratinizado (> del 50% de las células)	Moderadamente queratinizado (20- 50% de las células)	Mínima queratinización (5- 20% de las células)	No hay queratinización (0- 5% de las células)
Polimorfismo nuclear	Pequeño polimorfismo nuclear (>75% de células maduras)	Moderadamente abundante polimorfismo nuclear (50- 75% de células maduras)	Abundante Polimorfismo nuclear (25- 50% de células maduras)	Extremadamente abundante polimorfismo nuclear (0- 25% de células maduras)
Patrón de Invasión	Bordes bien delimitados	Infiltrativo. Cordones, bandas y/o acintados	Pequeños grupos o cordones de células infiltrantes (n>15)	Disociación celular marcada y desorganizada en pequeños grupos y/o células solas
Respuesta Inmune	Marcado	Moderado	Leve	Ausente

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 grupos. El primer grupo correspondió a los parámetros fisiológicos, donde se controló el peso (figura 3), la alimentación (figura 4), el consumo de agua (figura 5) y, además, se midieron los niveles de glicemia posterior al sacrificio de los animales (figura 6).

El segundo grupo de resultados consistió en el análisis macroscópico de las 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 (figura 7), la ubicación de las lesiones según la cara lingual afectada (figura 8), su ubicación respecto al tercio lingual (figura 9), el color de las lesiones (figura 10), su tamaño (figura 11) y su forma (figura 12).

El tercer tipo consistió en el análisis microscópico de las muestras histopatológicas mediante tinción con Hematoxilina-Eosina, donde además se analizó el grado de diferenciación tumoral en las lesiones de carcinoma (figura 13). También se analizó el frente de invasión tumoral de Bryne en las lesiones malignas (Tabla 2).

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) y se controló dos veces por semana durante todo el periodo experimental (figura 3). Los valores de peso fueron registrados por jaula en la bitácora experimental.

El peso de los animales, tanto del grupo control, como el grupo tratado con metformina, presentó una tendencia al aumento 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, 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.

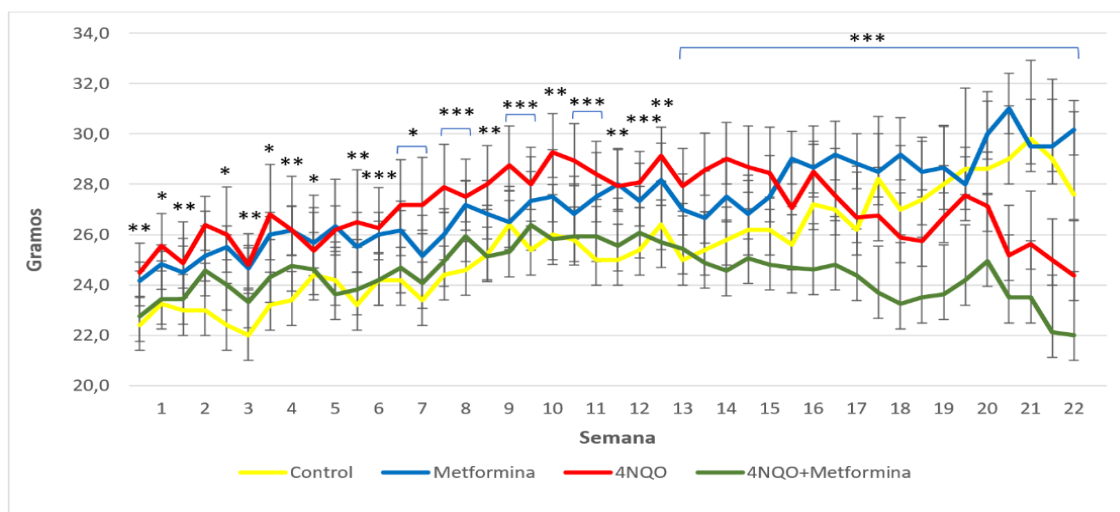


Figura 3: Evaluación del peso promedio en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación 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 amarilla

corresponde al grupo control, la azul al grupo tratado con metformina, la roja al tratado con 4-NQO, y la verde 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 (figura 4), 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.

En todos los grupos, el consumo de alimento tuvo una tendencia a la disminución en el transcurso de las 22 semanas, con excepción de ciertos aumentos en las semanas 6, 7 y 8. 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, con excepción del grupo tratado con metformina, el cual tuvo valores inferiores en todo el tiempo de experimentación.

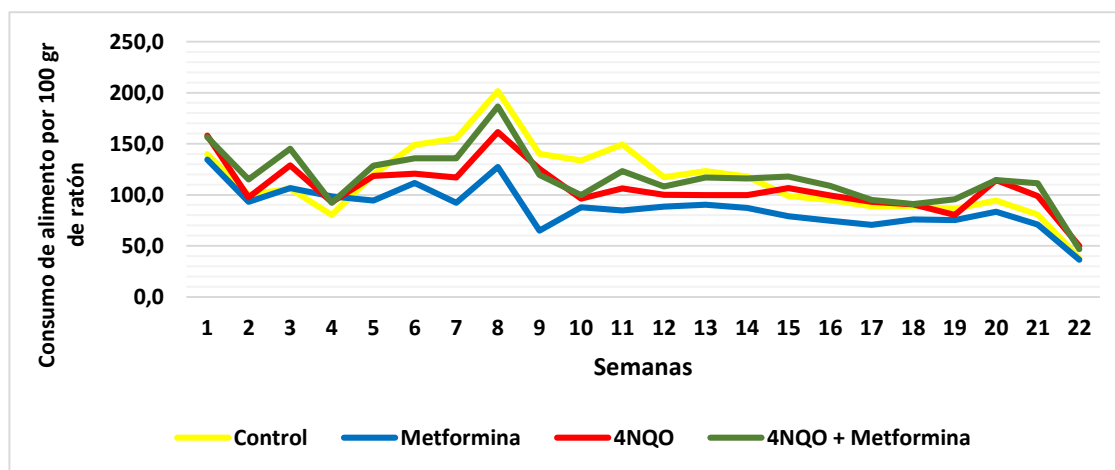


Figura 4: Evaluación del consumo de alimento semanal de los ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizó el alimento consumido para 43 ratones cepa C57BL/6,

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 amarillo corresponde al grupo control, el azul al grupo tratado con metformina, el rojo al grupo tratado con 4-NQO, y el verde 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 (figura 5), 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 del grupo 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.

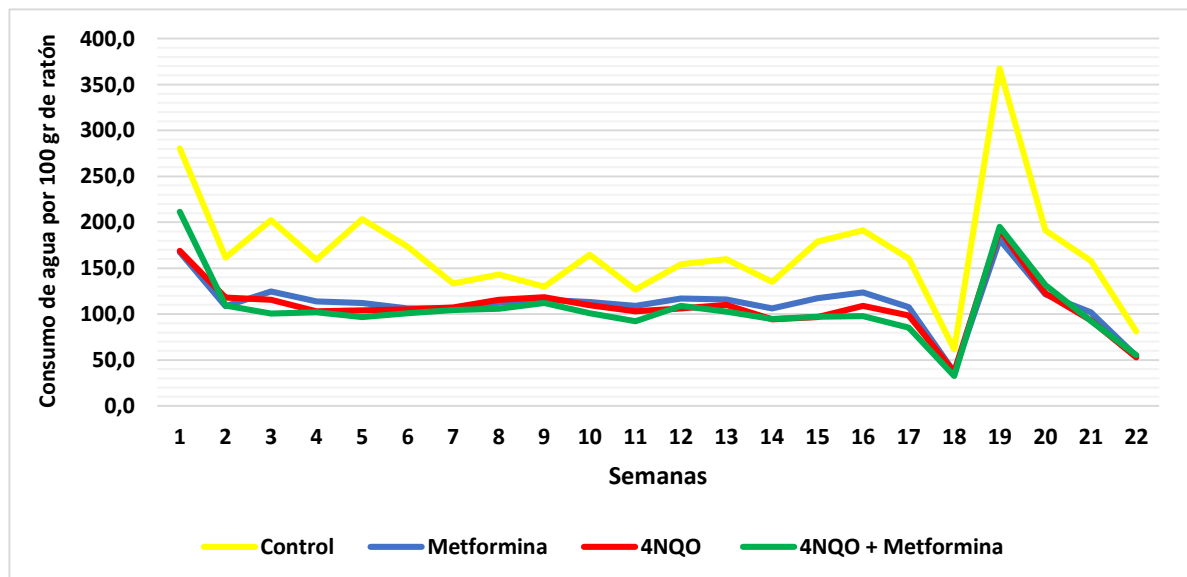


Figura 5: Evaluación del consumo de agua semanal de los ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizó el agua consumida en 43 ratones cepa C57BL/6, divididos

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 amarillo corresponde al grupo control, el azul al grupo tratado con metformina, el rojo al grupo tratado con 4-NQO, y el verde 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 (figura 6) se midieron mediante un hemoglucotest (Accu-Check, Roche®), en sangre extraída por punción cardiaca al momento del sacrificio de los animales. Se observó un valor de glicemia mayor en el grupo tratado con metformina y en el grupo control, con valores de 302,2 mg/dL y 297,4 mg/dL, respectivamente, contrario a lo que se observó 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.

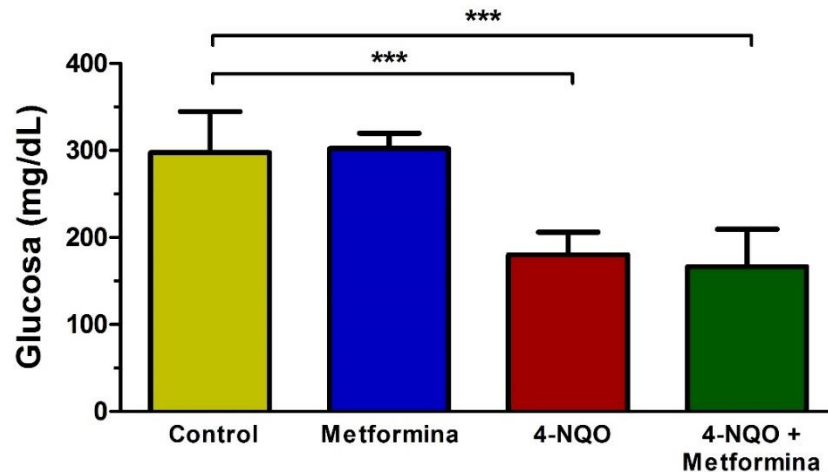


Figura 6: Análisis de los niveles de glicemia en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizó la glicemia de 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral 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 roja al grupo tratado con 4-NQO, y la verde 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 (figura 7), existiendo un total de 102 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.

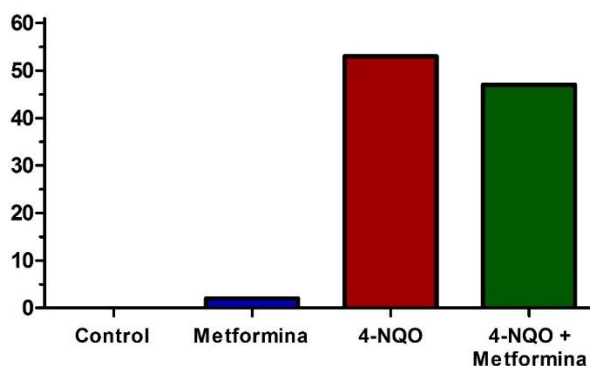


Figura 7: Número total de lesiones macroscópicas en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante 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 roja al grupo tratado con 4-NQO y la verde 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 (figura 8). 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.

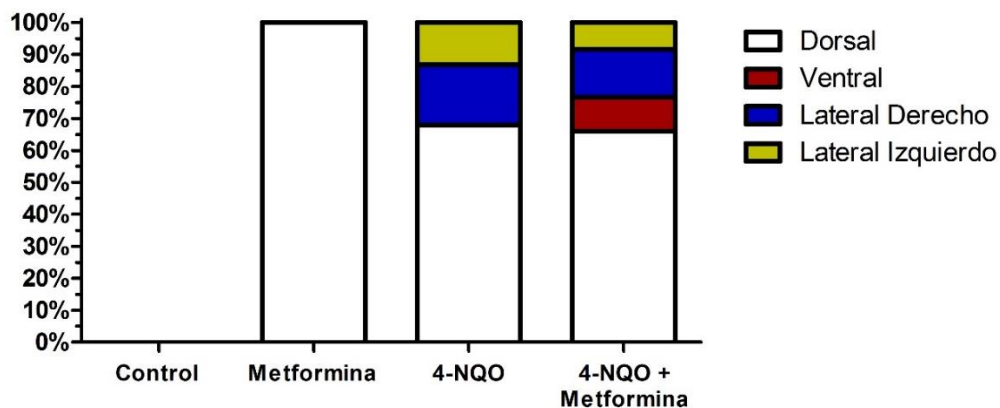


Figura 8: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según ubicación en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados 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, blanca; cara ventral, rojo; lateral derecha, azul; lateral izquierda, amarilla. 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 (figura 9). 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.

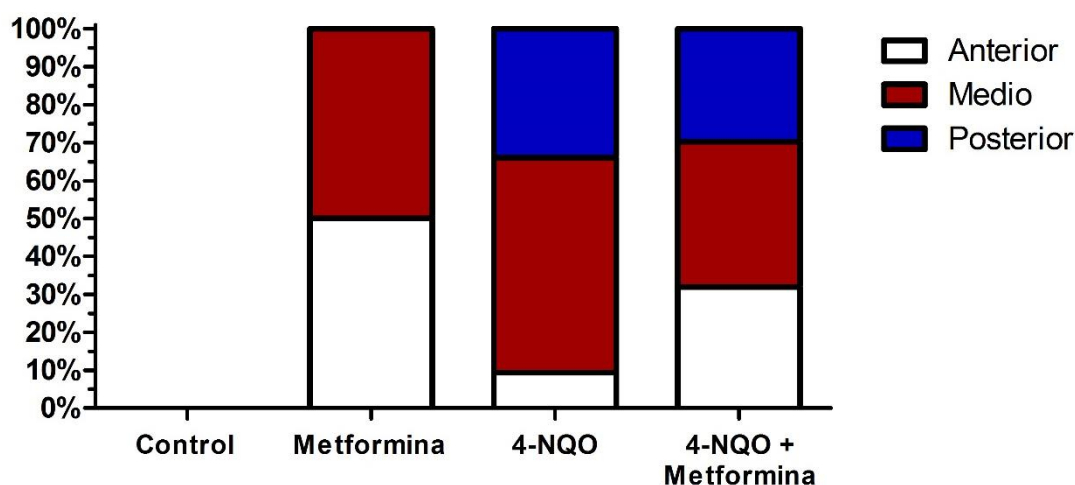


Figura 9: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según el tercio de la lengua en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO 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, blanco; tercio medio, rojo; tercio posterior, azul. 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 en leucoplasia, eritroplasia, o mixta (figura 10). 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.

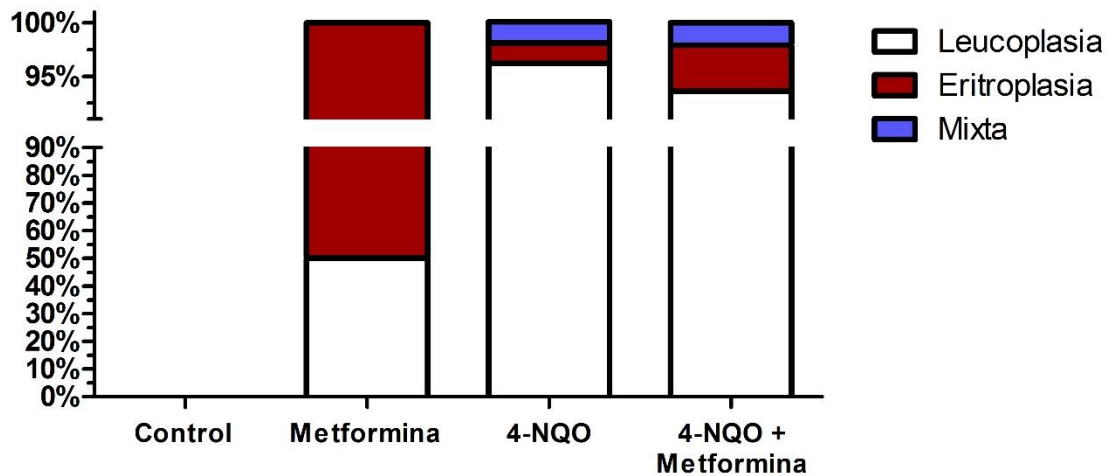


Figura 10: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según color en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con 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, blanco; eritroplasia, rojo; mixtas, azul. 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 (figura 11). 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.

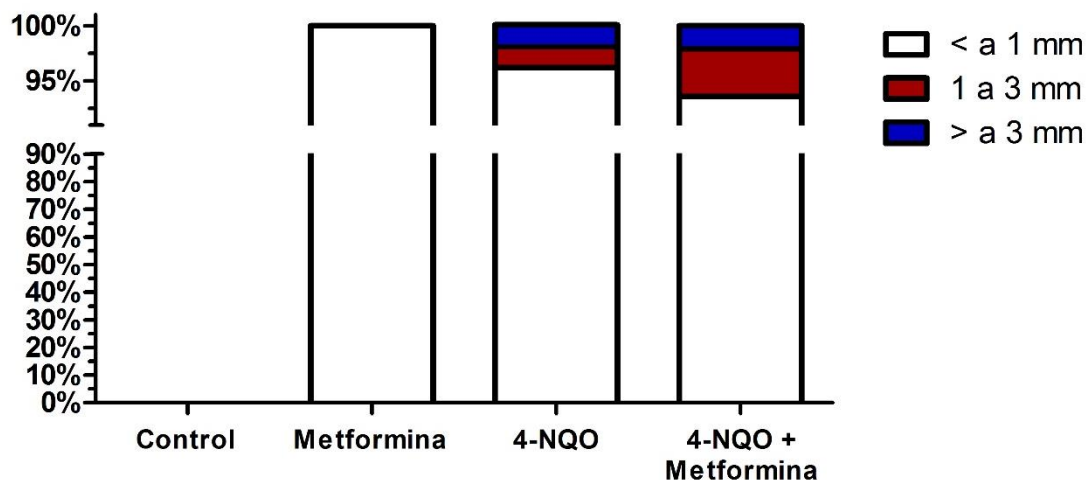


Figura 11: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según tamaño en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con metformina por vía oral mediante canulación orogástrica. Se cuantificó el número de lesiones según tamaño en los distintos grupos. El tamaño de las lesiones se clasificó en: < a 1 mm, blanco; 1-3 mm, rojo; > a 3 mm, azul. 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 (figura 12). 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.

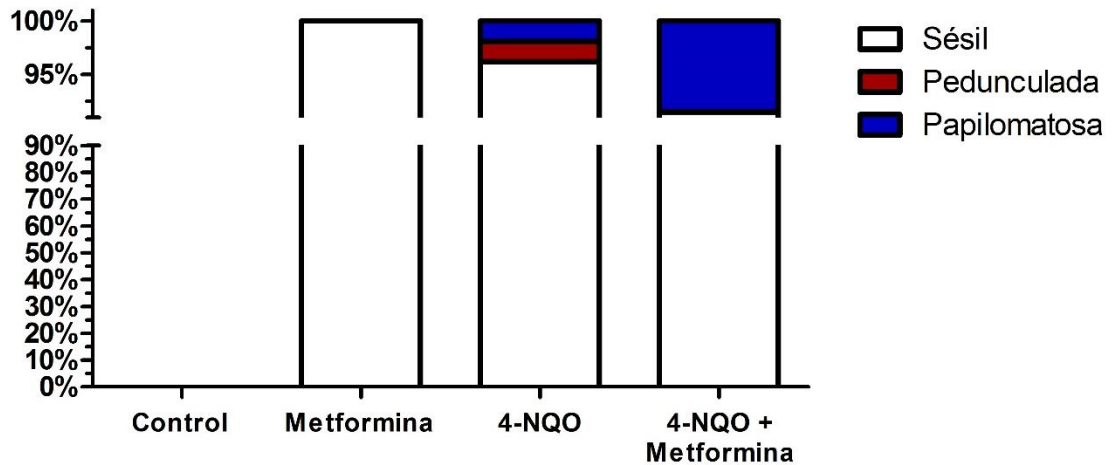


Figura 12: Análisis macroscópico porcentual de las lesiones linguales según forma en ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO y/o tratados con 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, blanco; pedunculada, rojo; papilomatosa, azul. 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 luego de ser 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

Las 99 lesiones que se originaron en los grupos tratados con 4-NQO, asociado o no a metformina, fueron clasificados según diagnóstico histopatológico que presentaron (figura 13). En general, se ve un predominio de displasias leves en ambos grupos, seguido, de lejos, por acantosis e hiperplasias. Para 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.

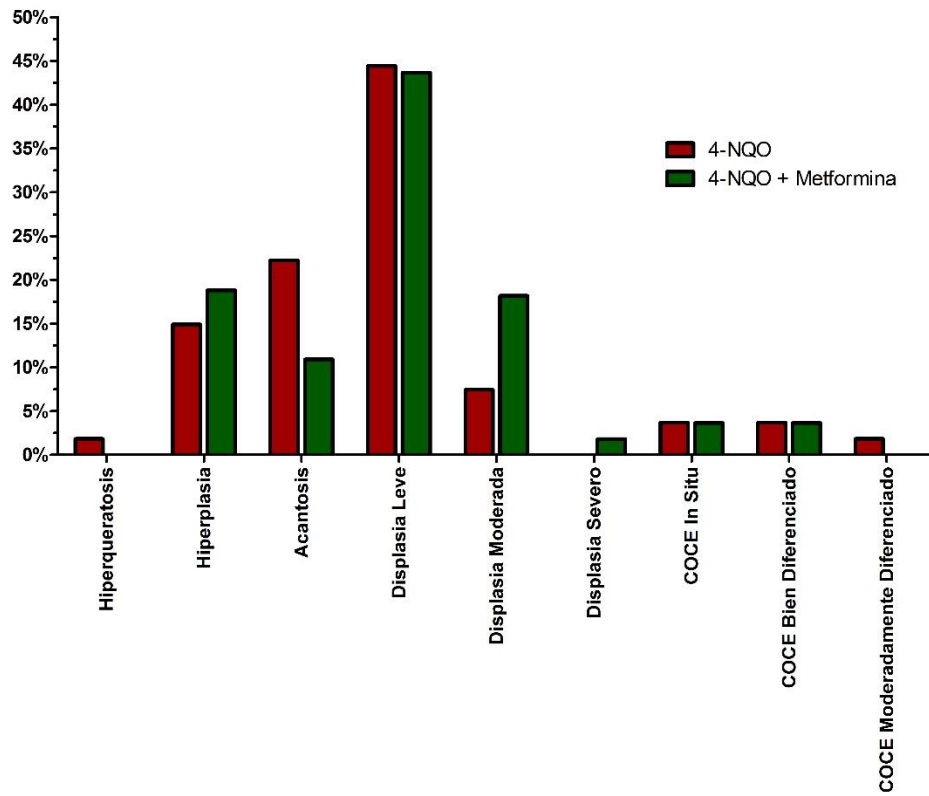


Figura 13: Análisis del porcentaje de incidencia de lesiones histopatológicas por tipo en lenguas de ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se analizaron 43 ratones cepa C57BL/6, divididos en 4 grupos, los que fueron sometidos a carcinogénesis mediante 4-NQO 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. Grupo tratado con 4-NQO, rojo; grupo 4-NQO más metformina, verde. El análisis estadístico se realizó mediante test Kruskal Wallis ($p < 0,001$).

4.3.2. No existen diferencias en la severidad del frente de invasión tumoral de Bryne entre los CECOs de animales tratados con o sin metformina

Se realizó el análisis de frente de invasión tumoral de Bryne, donde se evaluaron las características de grado de queratinización, polimorfismo nuclear, patrón de invasión e infiltrado leucocitario en las muestras obtenidas con lesiones de cáncer, las cuales son sólo 5, se observa que no hay diferencias significativas entre los valores de las lesiones del grupo tratado con 4-NQO y las lesiones del grupo tratado con 4-NQO más metformina (Tabla 2).

Tabla 2: Análisis del frente de invasión tumoral en las lesiones de carcinoma presentes en lenguas de ratones sometidos a carcinogénesis inducida por 4-NQO y/o tratados con metformina. Se observan los valores obtenidos para los distintos parámetros del frente de invasión tumoral de Bryne, en las 3 lesiones de cáncer del grupo sometido a 4-NQO más metformina, y en las 2 lesiones de cáncer obtenidas en el grupo tratado con 4-NQO.

Grupo	Grado de queratinización	Polimorfismo nuclear	Patrón de invasión	Respuesta inmune	TOTAL
4NQO+M	3	2	2	1	8
4NQO+M	1	3	1	2	7
4NQO+M	3	3	2	2	10
4NQO	2	2	1	2	7
4NQO	3	2	2	3	10

DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó el efecto de la Metformina, un medicamento anti-hiperglicemiante, de la familia de las biguanidas, ampliamente utilizado para tratar el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2, en un modelo de carcinogénesis experimental de COCE inducido por 4-NQO.

Lo primero que debemos mencionar es que en nuestro estudio no hubo ningún animal que sucumbiera durante la etapa experimental, contrario a lo que se estimaba o a lo que relatan algunos autores, donde la mortalidad de los animales tratados con 4-NQO varía entre un 25-35% ⁴⁸, o incluso puede llegar al 65% ²⁹.

Entre los parámetros evaluados se encuentran los parámetros fisiológicos. En relación al peso de los animales se pudo observar que ambos grupos tratados con el agente carcinógeno 4-NQO tuvieron una disminución estadísticamente significativa del peso a partir de la semana 13-14 del experimento. Esto se puede explicar debido a que los animales, al estar expuestos al 4-NQO, pueden haber disminuido su peso por el fenómeno denominado caquexia del cáncer, el cual se define como un síndrome multifactorial caracterizado por una pérdida continua de masa muscular esquelética (con o sin pérdida de masa grasa) que no puede revertirse por completo con el soporte nutricional convencional y conduce a un deterioro funcional progresivo ⁵⁰. Como lo relatan otros autores la caquexia puede presentarse por un aumento en la lipólisis, que además es favorecida por una disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa del tejido adiposo y que propicia además un aumento de los niveles de triglicéridos circulantes ⁵¹. Por otra parte, las citocinas inflamatorias juegan un rol sumamente importante en la caquexia cancerosa, dentro de las cuales se encuentra el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- alfa) y la interleucina (IL) -6. En modelos de caquexia por cáncer existe evidencia 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 ⁵². Además, el TNF α se identificó en alta concentración en el tejido de la lengua de ratones tratados con 4-NQO; la inhibición de la señalización de este, eliminó la alodinia funcional. Por lo tanto, el TNF α

es un mediador prominente en la nocicepción e inflamación inducidas por el cáncer oral ⁵³, lo cual podría relacionar, que la baja de peso, puede deberse al dolor que podrían presentar estos animales al momento de masticar o de tragar los alimentos. Es por todos estos motivos que pensamos que la baja de peso en los grupos tratados con 4-NQO tiene relación directa con la exposición al carcinógeno y las lesiones premalignas y malignas asociadas.

El consumo de alimento de los animales tuvo una tendencia a la disminución en todos los grupos en el transcurso de las 22 semanas. Sin embargo, el grupo con menor consumo de alimentos fue el grupo control tratado solo con metformina. Esto se podría explicar debido a que recientemente un estudio publicado en Nature Metabolism, demuestra que existe una citocina hepática o hepatocina conocida como Gdf15, la cual es inducida por metformina y que esta citocina es capaz de actuar en distintos tejidos del organismo produciendo una disminución del apetito ⁵⁴.

El consumo de agua de los animales fue mayor durante todo el tiempo experimental en el grupo control; los grupos experimentales con 4-NQO y el grupo control con metformina tuvieron valores similares. Esto se explica debido a que el grupo control con metformina, al consumir menor cantidad de alimento, tendría una ingesta proporcionalmente menor de agua. Por otra parte, si nos centramos en los grupos que consumían 4-NQO hay que recordar que este agente cancerígeno se les suministró a los animales en el agua de beber. Por lo tanto, el mal sabor que otorga el 4-NQO podría ser el motivo del menor consumo de agua ⁵⁵.

En relación a los niveles de glicemia, se pudo observar que los ratones del grupo control y en los que solo se les administró metformina presentaron valores más altos que los grupos tratados con 4-NQO. El valor promedio de glicemia para ratones C57BL/6 es de 296 +/- 37 según los estándares fisiológicos normales de laboratorios Jackson, por lo que los ratones de los grupos control mostraron niveles dentro de los valores normales. Por otro lado los grupos tratados con 4-NQO presentaron niveles bajo lo normal, incluso estimándose que los valores observados en nuestro estudio podrían estar aumentados del

nivel normal que tenían estos animales, debido al estrés que pudieron sufrir al momento del sacrificio, ya que la hiperglicemia inducida por el estrés es una respuesta adaptativa fundamental que moviliza los depósitos de energía en respuesta a las amenazas ⁵⁶. Por lo tanto, si consideramos lo anterior, los grupos tratados con 4-NQO deben haber tenido niveles aún más bajos de glicemia de lo que muestran los resultados y esto puede ser explicado por la caquexia del cáncer, que se mencionó anteriormente, ya que no se encontraron estudios que asocien el consumo de 4-NQO con una hipoglicemia.

En el análisis macroscópico de las lesiones se observa que el grupo tratado solo con metformina presentó dos lesiones, lo cual solo puede ser atribuible a lesiones traumáticas producto de la canulación orogástrica a la que fueron sometidos los animales durante el periodo experimental. También se pudo observar una disminución de las lesiones en el grupo tratado con 4-NQO más metformina de un 11,3% en relación al grupo tratado solo con 4-NQO. Sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa, y este resultado no se condice con los estudios que avalan la metformina como agente antitumoral en pacientes, en donde se ha observado un efecto beneficioso sobre la prevención y el tratamiento del cáncer en pacientes con diabetes mellitus tipo II y que usan de metformina ⁵⁷. Ni tampoco se condice con los efectos de la metformina reportados a nivel de cáncer oral en modelos de carcinogénesis inducidos por 4-NQO, en donde se observa que el uso de metformina reduce significativamente el tamaño ²⁹ y el número de lesiones tumorales orales ²⁷.

En relación a la ubicación de las lesiones, la mayoría de estas se encontraron en la cara dorsal y en el tercio medio de la lengua, esto se explica debido a que es precisamente en esa zona donde ocurre contacto del 4-NQO que se encuentra en el agua de beber, con la lengua del animal, esto ya ha sido reportado en otros estudios ⁴⁸.

c

Los tamaños de las lesiones mostraron una leve tendencia a ser menores en el grupo con 4-NQO más metformina, de la misma forma en que lo describe Zhao M. et al.,

en donde se evaluó a la metformina y la aspirina como agentes antitumorales de cáncer oral en ratones tratados con 4-NQO, en donde una combinación de metformina y aspirina causó un fuerte efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, mientras que la metformina sola, presentó sólo un leve efecto inhibitorio ²⁶.

Por otro lado, en el estudio de Siddappa G, et al. se observó una reducción significativa en el tamaño promedio de los tumores orales en el grupo con consumo de metformina en ratones sometidos a carcinogénesis oral por 4-NQO ²⁹. Por otra parte, el estudio de Cho S.W., et al. determinó que el volumen tumoral medio en el cáncer de tiroides fue significativamente menor en los ratones tratados con metformina, que en los ratones tratados sólo con 4-NQO ⁵⁹.

En el análisis histopatológico observamos que si bien se obtuvo un alto número de lesiones (n=99), el 45% de estas fueron displasias leves. Este resultado se condice con otros estudios en donde se observa que el modelo 4-NQO muestra una progresión de la enfermedad en la cual, en las primeras semanas experimentales se observa que el 100% de las muestras son diagnosticadas como displasias ²⁹, lo que nos podría orientar a que quizás debimos prolongar el experimento unas semanas más para lograr mayores tasas de transformación maligna, y de esta forma apreciar de mejor manera el efecto de la metformina como agente quimiopreventivo del COCE.

En el análisis histopatológico se observó también que las lesiones de carcinoma fueron poco prevalentes, representando menos del 10% de las lesiones en ambos grupos experimentales. Esto es contrario a lo que se plantea en el experimento de Siddappa M, et al., donde a las 25 semanas experimentales, el 25% de las lesiones que se encontraron fueron carcinomas ²⁹. En este sentido, nuestro estudio duró 23 semanas y las lesiones de cáncer fueron mucho menos prevalentes. Por otro lado, Vitale Cross et al. plantea un modelo de optimización de carcinogénesis oral con 4-NQO durante distintos periodos de tiempo, siendo el tiempo máximo de exposición al agente cancerígeno de 16 semanas y el sacrificio de los animales en la semana 22, tal y como se realizó en este experimento. Sin

embargo, sus resultados son muy disímiles, ya que en su estudio se pudo apreciar que con 16 semanas de exposición a 4-NQO se obtuvieron múltiples carcinomas orales ²⁷.

Lo anterior, nos hace reflexionar que, al cumplir con el tiempo planteado del experimento, pero no obtener las lesiones de cáncer anticipadas, el error puede estar en la marca del agente cancerígeno utilizado, o en la concentración del mismo. En los estudios similares se ocupó 4-NQO de la marca comercial Sigma-Aldrich ²⁹²⁷⁶⁰, mientras que en este estudio se utilizó 4-NQO de la marca comercial de laboratorios TCI®.

Por otra parte, debemos analizar también las concentraciones utilizadas del agente cancerígeno. En dos estudios la dosis fue de 50 µg/ml ²⁹²⁷, mientras que en otro estudio fue de 20 mg/L ⁶⁰. En nuestro experimento la concentración fue de 100 µg/ml, guiándonos por estudios anteriores ⁴³⁴⁸. Esta alta concentración de 4-NQO debió reflejarse en un aumento en la cantidad de lesiones cancerosas, lo cual no se evidenció.

Por otro lado, la administración de la metformina en nuestro experimento fue a una concentración de 50 mg/kg/día, al igual que en el estudio de Vitale Cross et al. ²⁷, aunque la forma de administración fue diferente ya que nosotros la administramos vía oral, para que se asemejara al consumo normal de este fármaco por los pacientes diabéticos. Vitale Cross et al. la administraron vía inyección intraperitoneal, lo cual puede haber aumentado la eficacia del fármaco. Ya que en nuestro estudio no se pudo comprobar que la metformina disminuyera significativamente las lesiones premalignas ni malignas.

En todos los estudios que existen en relación a la metformina y el COCE, la administración de la droga se realizó después de haber terminado el tiempo designado con el agente cancerígeno; en nuestro estudio, la administración fue previa, durante y posterior al consumo de 4-NQO. Por lo tanto, lo que se buscaba era ver si la metformina producía quimio-prevención al provocar una disminución de todas las lesiones orales, incluso de las lesiones premalignas, lo cual no se observó en nuestro experimento, rechazándose la hipótesis de que la metformina es un agente quimiopreventivo para el COCE.

CONCLUSIONES

Metformina no presenta un efecto quimiopreventivo sobre las lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas en la mucosa lingual en ratones sometidos a carcinogénesis experimental mediante 4-NQO, a pesar de que se observa una leve tendencia a la disminución del número de lesiones.

Creemos que se requiere de una mejor estandarización de las dosis de los compuestos químicos utilizados y además evaluar 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.

REFERENCIAS

- 1.- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
- 2.- International Agency for Research on Cancer WHO. Bladder Globocan 2018. *Globocan*. 2019;1–2.
- 3.- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF. Observatorio Global del Cáncer: Cancer Today [Internet]. Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer. 2018.
- 4.- Chile M de S de. Plan Nacional de Cáncer 2018-2028 [Internet]. 2018.
- 5.- Asakage T, Kiyota N, Homma A, Matsuura K, Hanai N, Kodaira T, et al. A review of head and neck cancer staging system in the TNM classification of malignant tumors (eighth edition). 2019;49(7):589–95.
- 6.- Momares BD, Contreras GC, Martínez BR, Ávalos nicolás J, Carmona LR. SOBREVIDA EN CARCINOMA ESPINOCELULAR DE MUCOSA Oral: análisis de 161 Pacientes*. 2014;66:568–76.
- 7.- Valls-Ontañón A, Hernández-Losa J, Somoza Lopez de Haro R, Bellosillo-Paricio B, Ramón y Cajal S, Bescós-Atín C, et al. Impact of human papilloma virus in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Med Clin (Barc)*. 2019;152(5):174–80.
- 8.- 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. *J Med Virol*. 2017;89(6):1096–101.
- 9.- Maraboli-Contreras S, Adorno-Farias D, Maturana-Ramirez A, Rojas-Alcayaga G, Fuentes-Alburquenque M, Espinoza-Santander I. Sobrevida de carcinoma oral de células escamosas: reporte de la Universidad de Chile. *Rev clínica periodoncia, Implantol y Rehabil oral*. 2018;11(3):147–51.
- 10.- García-García V, Bascones MA. Cáncer oral: Puesta al día. *Av Odontoestomatol*. 2009;25(5):239–48.

- 11.- Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007 Nov;36(10):575–80.
- 12.- El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T SP. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th Editio. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T SP, editor. Lyon, Francia; 2017.
- 13.- Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: Clinical features. *Oral Oncol.* 2010;46(6):414–7.
- 14.- Bryne M, Eide GE, Lilleng R, Langmark F, Thrane PS, Dabelsteen E. A multivariate study of the prognosis of oral squamous cell carcinomas. Are blood group and hemoglobin new prognostic factors? *Cancer.* 1991 Nov;68(9):1994–8.
- 15.- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4–5):309–16.
- 16.- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003;23(1A):363–98.
- 17.- Zhou J, Massey S, Story D. Metformin : An Old Drug with New Applications. 2018;1–15.
- 18.- Thomas F, Paneni F, Lüscher TF. Cardiovascular Protection in the Treatment of Type 2 Diabetes : A Review of Clinical Trial Results Across Drug Classes. 2017;130:18–29.
- 19.- Umezawa S, Higurashi T, Nakajima A. AMPK: therapeutic target for diabetes and cancer prevention. *Curr Pharm Des.* 2017 Jul;
- 20.- 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 Mar;5(3):355–64.
- 21.- Sekino N, Kano M, Matsumoto Y, Sakata H, Murakami K, Toyozumi T, et al. The Antitumor Effects of Metformin on Gastric Cancer In Vitro and on Peritoneal Metastasis. *Anticancer Res.* 2018 Nov;38(11):6263–9.
- 22.- Zhu P, Davis M, Blackwelder AJ, Bachman N, Liu B, Edgerton S, et al. Metformin Selectively Targets Tumor-Initiating Cells in ErbB2-Overexpressing Breast Cancer

Models. 2014;199–211.

- 23.- Rattan R, Graham RP, Maguire JL, Giri S, Shridhar V. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia*. 2011 May;13(5):483–91.
- 24.- Janjetovic K, Harhaji-Trajkovic L, Misirkic-Marjanovic M, Vucicevic L, Stevanovic D, Zogovic N, et al. In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. *Eur J Pharmacol*. 2011 Oct;668(3):373–82.
- 25.- Sun S, Gong F, Liu P, Miao Q. Metformin combined with quercetin synergistically repressed prostate cancer cells via inhibition of VEGF/PI3K/Akt signaling pathway. *Gene*. 2018;#pagerange#.
- 26.- 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 Mar;39(3):1414–22.
- 27.- 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 Apr;5(4):562–73.
- 28.- Rêgo DF, Pavan LMC, Elias ST, De Luca Canto G, Guerra ENS. Effects of metformin on head and neck cancer: A systematic review. *Oral Oncol*. 2015 May;51(5):416–22.
- 29.- Siddappa G, Kulsum S, Ravindra DR, Kumar V V, Raju N, Raghavan N, et al. Curcumin and metformin mediated chemoprevention of oral cancer is associated with inhibition of cancer stem cells. [Internet]. *Molecular carcinogenesis*. 2017.
- 30.- Villegas Valverde, Carlos Agustín; Frontela Noda, Maydelín; García Figueredo I. Nuevas evidencias del uso de la metformina en el tratamiento del cáncer. *Rev Cuba Endocrinol*. 2016;27(3):80–90.
- 31.- Goto A, Noda M, Sawada N, Kato M, Hidaka A, Mizoue T, et al. High hemoglobin A1c levels within the non-diabetic range are associated with the risk of all cancers. *Int J cancer*. 2016 Apr 1;138(7):1741–53.
- 32.- 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):1–9.
- 33.- Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth

- control in tumor suppression. *Nat Rev Cancer*. 2009 Aug;9(8):563–75.
- 34.- Dowling RJO, 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.
 - 35.- 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.
 - 36.- 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 Apr;18(3):283–93.
 - 37.- 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 Mar;42(3):250–6.
 - 38.- 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*. 2012 Mar;5(3):355–64.
 - 39.- 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 Mar;11(3):549–60.
 - 40.- Chen C-H, Tsai H-T, Chuang H-C, Shiu L-Y, Su L-J, Chiu T-J, et al. Metformin disrupts malignant behavior of oral squamous cell carcinoma via a novel signaling involving Late SV40 factor/Aurora-A. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–15.
 - 41.- Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol*. 2006 May;42(5):448–60.
 - 42.- Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I, Rotem N, Bodner L. Experimental tongue cancer in desalivated rats. *Oral Oncol*. 1997 Mar;33(2):105–9.
 - 43.- Tang X-H, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):301–13.

- 44.- Tanaka T, Kawabata K, Sugie S. 4-Nitroquinoline 1-Oxide-Induced Tongue and Esophagus Carcinogenesis in Obese and Diabetic TSOD Mice. *World J Oncol.* 2017 Aug;8(4):97–104.
- 45.- Wallenius K, Lekholm U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontol Revy.* 1973;24(1):39–48.
- 46.- Nunoshiba T, Demple B. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res.* 1993 Jul;53(14):3250–2.
- 47.- Srinivasan P, Suchalatha S, Babu PVA, Devi RS, Narayan S, Sabitha KE, et al. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. *Chem Biol Interact.* 2008 Apr;172(3):224–34.
- 48.- Droguett D, Castillo C, Leiva E, Theoduloz C, Schmeda G, Kemmerling U. Efficacy of quercetin against chemically induced murine oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2015;10(4):2432–8.
- 49.- Kmiec Z. J.A. Kiernan. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* 5th edition, Scion Publishing, 2015, 571 pp. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;54(1):58–9.
- 50.- Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia : an international consensus. *Lancet Oncol.* 12(5):489–95.
- 51.- Dalal S. Lipid metabolism in cancer cachexia. *Ann Palliat Med.* 2019 Jan;8(1):13–23.
- 52.- Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2009 Dec;3(4):263–8.
- 53.- Scheff NN, Ye Y, Bhattacharya A, MacRae J, Hickman DN, Sharma AK, et al. Tumor necrosis factor alpha secreted from oral squamous cell carcinoma contributes to cancer pain and associated inflammation. *Pain.* 2017 Dec;158(12):2396–409.
- 54.- Greenhill C. Metformin-induced hepatokine reduces appetite. 2020;16(March):2020.
- 55.- 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. 2017;(December 2008).

- 56.- Zhao Z, Wang L, Gao W, Hu F, Zhang J, Ren Y, et al. A Central Catecholaminergic Circuit Controls Blood Glucose Levels during Stress. *Neuron*. 2017 Jul 5;95(1):138-152.e5.
- 57.- Morales DR, Morris AD. Metformin in Cancer Treatment and Prevention. 2015;(August 2014):1–13.
- 58.- Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006 Aug;42(7):655–67.
- 59.- Cho SW, Yi KH, Han SK, Sun HJ, Kim YA, Oh B-C, et al. Therapeutic potential of metformin in papillary thyroid cancer in vitro and in vivo. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Aug 5;393(1–2):24–9.
- 60.- Thompson MD, Lubet RA, McCormick DL, Clapper ML, Bode AM, Juliana MM, et al. Lack of chemopreventive efficacy of metformin in rodent models of urinary bladder, head and neck, and colon/intestine cancer. *Oncol Lett*. 2017 Sep;14(3):3480–6.

ANEXOS



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 Ravetllat Ballesté	Abogado	Fac. de Ciencias Jurídicas y Sociales
Soledad Pinochet Urrutia	Veterinaria	Bioterio UTalca

1. **Título completo del proyecto:** "Determinación del efecto quimiopreventivo de Metformina en el carcinoma oral de células escamosas".
2. **Nombre del investigador responsable:** Dr. Bernardo Venegas.
3. **Co-investigador:** Dr. Daniel Droguett.
4. **Institución:** Universidad de Talca. **Unidad académica:** Departamento de Estomatología.
5. **Documentos revisados:**
 - Protocolo de manejo y cuidados de animales de laboratorio.
6. **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.
7. **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

