

LA INFLAMACIÓN INDUCIDA POR FORMALINA FAVORECE EL DESARROLLO DEL MELANOMA B16 EN RATONES Balb/C

*Arlyne Colmenarez *Claudina Rodríguez *Rafael Bonfante

RESUMEN

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo representando el melanoma 1% de todos los tipos de cáncer. Se ha planteado que el cáncer es una enfermedad inflamatoria sistémica que genera radicales libres causando mutaciones y liberan factores tróficos que favorecen la iniciación tumoral y la proliferación celular, respectivamente. Con el objetivo de estudiar el efecto de la inflamación inducida por formalina sobre el desarrollo del melanoma B16, 22 ratones Balb/C fueron distribuidos en tres grupos: Control Melanoma, Melanoma-Formalina y Control Formalina. A los grupos CF y MF se les aplicó 20 µl de Formalina al 2% en el dorso de la pata trasera derecha a nivel subcutáneo; a los grupos CM y MF se les trasplantaron 100.000 células melanocíticas vía subcutánea en la superficie plantar de la pata derecha, 24 horas posteriores a la formalina. Los ratones del grupo CF desarrollaron una inflamación que fue máxima entre la primera y segunda semana y luego cedió progresivamente hasta desaparecer a la sexta semana. Los ratones del grupo CM desarrollaron máculas tumorales hasta 30 mm² que involucionaron espontáneamente. Los ratones del grupo MF desarrollaron masas tumorales que alcanzaron hasta 300 mm³ entre la 3-4 semanas post-trasplante y luego disminuyeron progresivamente de volumen. Los ratones de los grupos CF y MF disminuyeron significativamente de peso respecto al grupo CM. En conclusión, la inflamación inducida por formalina favorece el desarrollo tumoral en un modelo alogénico de melanoma maligno.

Palabras clave: cáncer, melanoma B16, ratones Balb/C, inflamación, formalina

INFLAMATION INDUCED BY FORMALINE PROMOTES THE DEVELOPMENT OF MELANOMA B16 IN Balb/C MICE

ABSTRACT

Cancer is the second cause of death around the world, representing melanoma 1% of all cancer. It has been suggested that cancer is a systemic inflammatory disease that generates free radicals causing mutations and releasing trophic factors that favors tumor initiation and cell proliferation. In order to study the effect of formalin-induced inflammation on the development of B16 melanoma, 22 Balb/C mice were divided into three groups: Control Melanoma (CM), Melanoma-Formalin (MF) and Control Formalin (CF). CF and MF groups were injected with 20 µl of 2% formalin on the back of the right paw at the subcutaneous level; CM and MF groups were transplanted with 100,000 melanocytic cells subcutaneously in the plantar surface of the right paw, 24 hours after formalin. CF group mice developed an inflammation that was maximal between the first and second week, then progressively diminished until disappearance by the sixth week. CM group mice developed tumoral macules up to 30 mm², which involute spontaneously. MF group mice developed tumor masses that reached up to 300 mm³ between 3-4 weeks post-transplant and then progressively decreased in volume. CF and MF mice significantly decreased in weight with respect to CM group. In conclusion, inflammation induced by formalin favors tumor development in an allogenic model of malignant melanoma, indicating that anti-inflammatory treatments may be useful in the management of melanoma.

Keywords: cancer, melanoma B16, Balb/C mice, inflammation, formalin

*Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias Funcionales, Unidad de Bioquímica, Barquisimeto, Venezuela. [correo electrónico: rbonfantecabarcas@gmail.com](mailto:rbonfantecabarcas@gmail.com).

Recibido: 10/02/2018

Aceptado: 10/04/2018



Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

INTRODUCCIÓN

El término cáncer engloba un grupo numeroso de enfermedades caracterizadas por crecimiento celular no regulado con invasión de tejidos adyacentes y a distancia (capacidad de metastásica) que aparece como consecuencia de mutaciones en el ADN. La célula cancerosa es una célula que acumula suficientes aberraciones genéticas que le permite adquirir como consecuencia de selecciones clonales la capacidad de evadir eficientemente la respuesta inmunitaria del huésped y de ignorar las señales de control de su entorno⁽¹⁾.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global con un impacto significativo en salud pública siendo la segunda causa de muerte en el mundo⁽²⁾. El melanoma representa 1% de todos los tipos de cáncer a nivel mundial, causante del 79% de mortalidad por cáncer de piel. Según el último boletín de mortalidad emitido, en el 2011 en Venezuela murieron 384 personas por cáncer de piel y casi 1/3 de dichas muertes fueron por causa del melanoma⁽³⁾.

El melanoma es una neoplasia maligna que puede presentarse en cualquier tejido al cual hayan migrado células derivadas de la cresta neural, con mayor frecuencia en la piel. El melanoma es considerado un cáncer de difícil tratamiento por su agresividad y elevada mortalidad⁽⁴⁾. Los factores de riesgo para el desarrollo de melanoma maligno incluyen inflamación cutánea crónica, infección viral, radiación ultravioleta (UVR) y otros agentes inductores de inflamación y traumas.

La inflamación se caracteriza por la infiltración de plasma y leucocitos a los tejidos, lo cual conlleva a la alteración de los procesos homeostáticos locales o sistémicos. Las causas de la inflamación van desde infección patógena, daño tisular, hasta mal funcionamiento y estrés tisular. En condiciones normales, la inflamación sirve como mecanismo de defensa del huésped, que permite la regeneración tisular, posterior a un evento infeccioso o a un daño tisular. Sin embargo, si la infección o la agresión tisular persisten conlleva a una inflamación crónica, que produce especies reactivas de oxígeno

(ROS) e intermedios reactivos de nitrógeno (RNI), que son capaces de inducir daño en el ADN e inestabilidad genómica, impulsando la carcinogénesis. Además, las células mieloides y linfoides infiltrantes de los tumores cancerígenos producen citosinas tróficas que apoyan el crecimiento y supervivencia de las células transformadas⁽⁵⁾.

En base a lo anteriormente expuesto se puede plantear que la inflamación es un componente crítico en el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, una hipótesis plausible es que muchas enfermedades malignas son promovidas en áreas de inflamación, simplemente como consecuencia indeseada de la respuesta normal de un huésped susceptible⁽⁶⁾.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la inflamación en la evolución del melanoma maligno, en el presente trabajo se analizó el efecto de la inflamación inducida por la formalina en la evolución del melanoma maligno B16 trasplantado en ratones Balb/C.

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra estuvo conformada por 22 ratones machos de la cepa Balb/C con un peso promedio de $21,4 \pm 0,9$ grs, conformados en tres grupos: Control Melanoma (n=8), Melanoma-Formalina (n=10) y Control Formalina (n=4). Los sujetos fueron colocados en jaulas de acero inoxidable de 32.5 x 33.5 x 13.5 cm, con agua y comida a libre demanda, ciclos de luz y oscuridad de 12/12 horas y temperatura media de 27°C.

El trasplante de las células e inducción de inflamación se llevó a cabo en el tejido subcutáneo de la planta trasera derecha. A cada ratón le fueron inoculados 50 µl de suspensión tumoral conteniendo 100.000 células.

Para inducir la inflamación, se inoculó 20 µl de formalina al 2% en el dorso de la pata trasera derecha a nivel subcutáneo. La evolución del tumor fue evaluada semanalmente a través de la cuantificación del peso de los individuos y el volumen tumoral utilizando un vernier. La inflamación fue valorada mediante una escala

semicuantitativa en las cuales se evaluaron cada signo básico de la inflamación.

RESULTADOS

Durante el desarrollo del protocolo experimental, todos los sujetos disminuyeron su peso entre 1 a 6 grs. Los grupos inoculados con formalina perdieron significativamente más peso al ser comparados con el grupo control melanoma, sin embargo, al comparar entre si los grupos con formalina no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (figura 1).

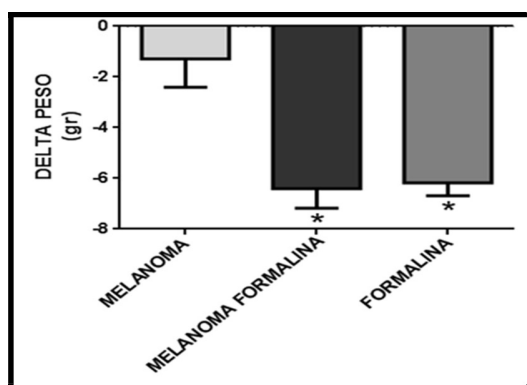


Figura 1. Variabilidad del peso corporal en ratones trasplantados con células de melanoma B16 tratados o no tratados con formalina. Se evidencia que la pérdida de peso corporal en el grupo Melanoma/Formalina y Formalina fue estadísticamente mayor al compararlo con el grupo Control/Melanoma. * $p < 0,05$.

La formalina indujo inflamación que alcanzó mayor puntaje en el grupo inoculado con células melanocíticas. Al analizar los datos de la inflamación inducida por formalina en ratones sanos no trasplantados respecto a ratones trasplantados con melanoma, observamos que los ratones sanos desarrollaron la máxima inflamación a la segunda semana post-inoculo y luego disminuyó progresivamente hasta prácticamente desaparecer en la sexta semana. Los ratones trasplantados mostraron grados de inflamación significativamente mayores durante las 6 semanas de observación, sin regresar a valores normales.

La evolución del melanoma en los ratones del grupo control consistió en el desarrollo de una macula tumoral que involucionó espontáneamente o dejó una macula hipercrómica residual, mientras que en el grupo Melanoma-Formalina se desarrollaron tumores que alcanzaron su máximo volumen entre la 3 y 4 semana (8 y 10 mm de diámetro), para luego disminuir progresivamente.

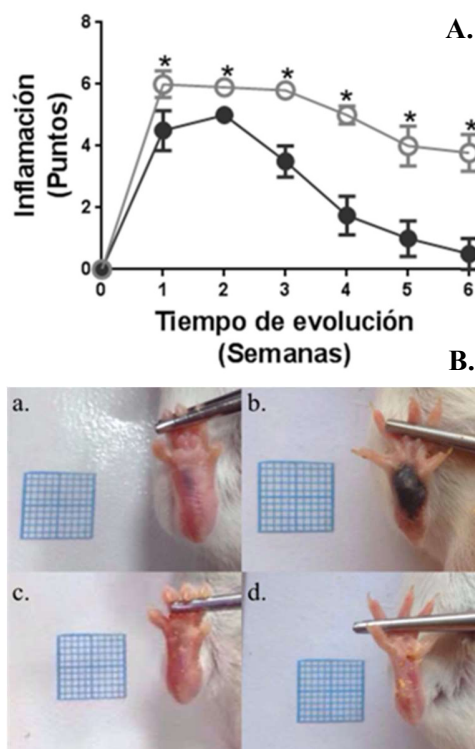


Figura 2. Cuantificación de la inflamación inducida por formalina en ratones sanos y trasplantados con células de melanoma maligno.

En la figura 2, panel A, se reconoce la inflamación inducida por formalina en función del tiempo de evolución (semanas) en el grupo MF (círculo vacío) y en el grupo CF (círculo relleno). MF obtuvo mayor puntaje inflamatorio, observándose en cada semana una diferencia estadísticamente significativa (*). En el panel B se muestran fotografías tomadas en la pata derecha de los ratones (a y b: MF. c y d: CF). En 'a' se puede observar el edema y el enrojecimiento en conjunto con una macula tumoral. En 'b' se muestra la evolución del mismo a las 6 semanas, observándose el tumor, sin embargo, en el área peritumoral no se

observan signos de inflamación. En 'c' se muestra la inflamación inducida por formalina, la cual es resuelta a las 6 semanas de evolución ('d').

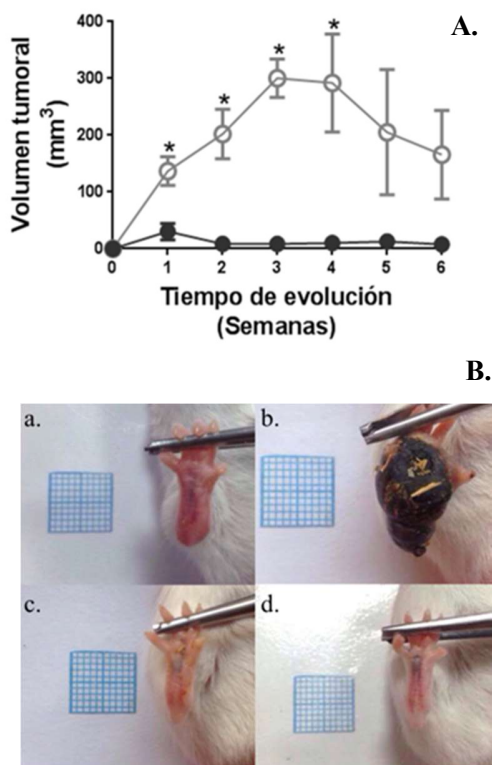


Figura 3. Evolución del Melanoma B16 en ratones tratados y no tratados con formalina.

En la figura 3, panel A, se observa la evolución del volumen tumoral en función del tiempo de evolución en el grupo MF (circulo vacío) y en el grupo CM (circulo relleno). MF tuvo un mayor incremento del volumen tumoral a lo largo de las 6 semanas, siendo las diferencias estadísticamente significativas en las primeras cuatro semanas (*) respecto al grupo CM. En el panel B se aprecian las fotografías tomadas en la pata derecha de los ratones (a y b: MF, c y d: CM). En 'a' se muestran los signos de edema y enrojecimiento y en 'b' cuando el melanoma alcanza su máximo desarrollo. En 'c' se muestra la aparición de la macula y en 'd' cuando el melanoma alcanza 4 semanas de evolución.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra que la inflamación inducida por formalina favorece la evolución del melanoma maligno en ratones Balb/C confirmando que la inflamación es un fenómeno fisiopatológico que condiciona favorablemente el desarrollo de los tumores cancerígenos.

El desarrollo del melanoma en los ratones Balb/C fue marginal, sólo se logró observar máculas que nunca desarrollaron masas tumorales. En un estudio sobre la evolución del melanoma B16 en ratones Balb/C reportó que la gravedad de la enfermedad está en relación con la cantidad de células trasplantadas, encontrando que 500.000 o 1.000.000 de células trasplantadas generaban un tumor ulcerado y sangrante, con metástasis y alta mortalidad; mientras que los ratones inoculados con 100.000 células sólo desarrollaron máculas que involucionaron espontáneamente⁽⁷⁾; estos resultados son similares a los observados en el presente trabajo, donde los ratones Balb/C fueron trasplantados con 100.000 células.

Por otra parte, en los protocolos experimentales utilizamos el melanoma B16, el cual es una línea celular tumoral usada como modelo de cáncer de piel, la cual fue descubierta y aislada en 1954 en los laboratorios Jackson (Maine, EEUU) a partir de tumores que crecieron espontáneamente detrás de la oreja de ratones C57BL6⁽⁸⁾. En este trabajo, las células B16 fueron trasplantadas en ratones Balb/C, definiendo entonces un modelo de trasplante alogénico; generalmente este tipo de modelo genera una respuesta de rechazo al trasplante, mediada por una respuesta inmune adaptativa⁽⁹⁾, sin embargo, si esta respuesta hubiera sido eficiente, las células B16 no hubieran sobrevivido y proliferado. Los ratones Balb/C son clásicamente definidos como ratones que generan respuestas inmunológicas predominante de tipo T_H2⁽¹⁰⁾. La respuesta de rechazo de trasplante es predominantemente de tipo T_H1; la respuesta T_H2 regula y disminuye la respuesta T_H1 lo cual explica que los ratones Balb/C inoculados con melanoma B16 hayan desarrollado pequeñas masas tumorales (máculas) que curaron espontáneamente.

El modelo de inflamación utilizado fue el modelo de inflamación inducida por formalina por lo tanto para analizar los resultados debemos analizar los elementos carcinogénicos de la inflamación y los efectos particulares del formaldehído (FA).

En los ratones tratados con formalina, el melanoma maligno B16 tuvo un mayor desarrollo volumétrico, indicando que la inflamación inducida por formalina potencia el desarrollo de este tumor. Se demostró ⁽¹⁾ que el formaldehído es capaz de inducir respuestas alérgicas al ser inhalado, induciendo una polarización de la respuesta inmunológica hacia el fenotipo T_{H2}, también demostró que la respuesta alérgica T_{H2} inducida por formaldehído es más intensa en los ratones Balb/C que en los ratones C57BL6, resultados que pueden ser explicados por el trasfondo genético de ambas cepas de ratones, siendo los ratones Balb/C propensos a generar una respuesta T_{H2} y los ratones C57BL6 a generar una respuesta T_{H1}. En consecuencia nuestros resultados pueden ser explicados por el efecto potenciador del formaldehído en la respuesta T_{H2} de los ratones Balb/C, permitiendo una mayor proliferación de las células tumorales. La inflamación ha sido involucrada en favorecer la aparición y desarrollo del cáncer, se pueden plantear dos mecanismos básicos para explicar este fenómeno, el efecto genotóxico generado por los radicales libres y el trofismo hormonal. Durante la inflamación se generan radicales libres, capaces de generar mutaciones, amplificar genes y activar oncogenes en las células cancerígenas, seleccionándose las células con mayor capacidad proliferativa y de supervivencia. Asimismo las células inflamatorias, especialmente los neutrófilos y los macrófagos liberan factores tróficos que favorecen la supervivencia celular al inhibir la apoptosis, asimismo estimulan la proliferación celular y la síntesis de proteínas tumorales capaces de generar una retroalimentación positiva potenciando la supervivencia, la proliferación y la capacidad de generar metástasis.

En conclusión en el presente trabajo demostramos que la inflamación inducida por formalina favorece el desarrollo de melanoma

B16 alogénico en ratones Balb/C, posiblemente como resultado de una respuesta T_{H2} potenciada por la formalina.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado en el marco del talento científico de la Unidad de Bioquímica, Decanato de Ciencias de la Salud de la Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J. Hematology and Oncology, Harrison's Principles of Internal Medicine. 19th edition, New York: MC Graw Hill; 2015. p. 758-784.
2. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
3. Anuario de Mortalidad. [Internet]. MPPS Disponible en: www.mpps.gov.ve.
4. Lavanderos J, Pérez J, Jeria S. Actualizaciones en melanoma maligno cutáneo. Cuadernos de Cirugía. 2010; 24: 47-56.
5. Lihua T, Kepeng W. Chronic Inflammation in Skin Malignancies. J Mol Signal 2016; 11: 2.
6. Coussens L, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002; 420(6917):860-7.
7. Kuzu O, Nguyen F, Noory M, Sharma A. Current state of animal (mouse) modeling in melanoma research. Cancer Growth Metastasis 2015; 8(1): 81-94.
8. Teicher B. Tumor Models in Cancer Research. Humana Press; New York, Dordrecht, Heidelberg and London: 2010.
9. La Rosa D, Rahman A, Turka L. The innate immune system in allograft rejection and tolerance. J Immunol 2007; 178(12):7503-9.

10. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1-and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 2004; 22(5): 460-6.
11. Luanluan L, LI H, Yafang H, Yixiao B. Differential effects of formaldehyde exposure on airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *PLOS ONE* 2017; 12(6): e0179231