

Experimental carcinogenesis with 7,12-dimethylbenz(a) anthrazene (DMBA) and its inhibition with extra virgin olive oil and a diet of mature olives (Picual variety)

Juan J. Soto-Castillo e Isicio Ortega-Medina

Faculty of Medicine. University of Seville. Spain

Abstract

DMBA is a carcinogen that induces carcinomas within a few weeks of application. Forty-four male hamsters were divided into four groups: DMBA dissolved in paraffin oil (DMBA- Po), DMBA dissolved in olive oil (DMBA-Oo), paraffin oil and olive oil. Their mouths were swabbed daily with paraffin oil or extra virgin olive oil alternatively for the first two weeks, during the biweekly application of DMBA at 0.5% diluted in paraffin oil or olive oil for five weeks and daily until the twentieth week. The animals in the DMBA-Oo and olive oil groups received an additional diet of mature Picual olives. The DMBA-Po carcinogen effect (35 carcinomas) is 100% and the inhibitory effect 0. The combination of olive oil as DMBA solvent and the ad libitum diet with Picual olive has an inhibitory effect of 80%, with only three intraepithelial carcinomas and four verrucous carcinomas occurring and no invasive carcinoma.

Keywords Carcinogenesis; Olive oil; Chemoprevention

Introducción

Uno de los primeros modelos de carcinogénesis experimental en animales fue realizado por Salley en 1954¹. Tras aplicar varios carcinógenos, entre ellos, el 9,10-dimetil-1,2 benzantraceno, o DMBA, sobre el epitelio oral del hámster sirio durante 3 meses, pudo comprobar la existencia de carcinomas de células escamosas y metástasis linfáticas. Posteriormente, varios autores han estandarizado este modelo y lo han repetido con el objeto de alcanzar nuevos conocimientos sobre el DMBA y el proceso de carcinogénesis inducida experimentalmente ^{2, 3}.

El 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) es un hidrocarburo aromático policíclico capaz, por sí solo, de producir lesiones precancerosas y carcinomas a las pocas semanas de su administración tópica,¹. Además, se ha utilizado combinado con un promotor, el etanol, ². Se libera tras la combustión del tabaco (especialmente de cigarrillos) o a partir de la grasa animal cuando se asa carne a la parrilla, encontrándose asimismo en carnes y pescados ahumados. Esta sustancia está, por tanto, firmemente implicada en la carcinogénesis del cáncer oral, laryngeal mucosa, bronquiopulmonar y del tubo digestivo ^{6, 7, 8, 9}.

Con objeto de utilizar nuevas sustancias con efecto quimiopreventivo sobre el cáncer, algunos autores han obtenido resultados prometedores a nivel de experimentación animal con sustancias como el ácido salvinólico B ¹⁰, derivado de *Salvia miltiorrhiza*, utilizado en fluorescencia; los isotiocianatos ¹¹, derivados sintéticos de coles, calabaza, nabos y grelos; la infusión de hojas de *Buddleja incana*, árbol que crece en Perú y Bolivia, y el efecto quimiopreventivo de extractos de hojas *Toona sinensis* ¹¹ o del aceite de oliva ^{9,13, 14,15}. En relación con este último, son bien conocidas sus propiedades protectoras cardiovasculares y antioxidantes, especialmente de los compuestos fenólicos ¹⁷. En este sentido, existen datos a favor de que el aceite de oliva podría actuar como quimiopreventivo o inhibidor de la carcinogénesis, e incluso sería capaz de modificar la naturaleza de lesiones pre-neoplásicas ya surgidas, confiriéndoles un comportamiento más benigno e indolente ¹⁴.

Material y métodos

Cuarenta y cuatro hámsteres machos (*Syriam Golden hamster*), de 4-6 semanas de vida y de 60-80g de peso, se dividieron en 4 grupos (2 de intervención y 2 de control).

Grupo DMBA-Ap (7,12-dimetilbenz(a)antraceno de Sigma Chemical Co., DMBA al 0,5% disuelto en aceite de parafina). En 12 animales se pincelaron las bolsas bucales, diariamente con aceite de parafina en las 2 primeras semanas. A continuación se aplicó DMBA al 0,5% en aceite de parafina, los lunes y viernes, y aceite de parafina (Ap) los martes, miércoles y jueves, durante 5 semanas. También se pincelaron diariamente con aceite de parafina hasta la vigésima semana. Estos animales se alimentaron con pienso estándar y agua ad libitum.

Grupo DMBA-Ao (7,12-dimetilbenz(a)antraceno de Sigma Chemical Co., DMBA al 0,5% disuelto en aceite de oliva virgen extra). En 12 animales se aplicó diariamente en las bolsas bucales aceite de oliva en las 2 primeras semanas. A continuación, aplicación de DMBA al 0,5% en aceite de oliva bisemanal y días alternos, durante 5 semanas. Posteriormente, aplicación de aceite de oliva hasta la vigésima semana. Estos animales se alimentaron con pienso estándar y aceitunas maduras variedad Picual extraídas de la recolección anual del árbol, y agua ad libitum. Fig.1.



Los 2 grupos controles:

En 10 hámsteres se pincelaron diariamente las bolsas bucales con aceite de parafina durante 20 semanas, pienso estándar y agua ad libitum.

En 10 hámsteres se pincelaron diariamente las bolsas bucales con aceite de oliva virgen extra y dieta con pienso estándar, y aceitunas maduras (variedad Picual) de la recolección anual del árbol, y agua ad libitum, durante 20 semanas.

Los animales de cada grupo fueron sacrificados a las 20 semanas, se realizó estudio histológico de los tumores y se determinó el número de tumores en las bolsas bucofaríngeas, esófago y estómago y el tipo neoplásico.

Para calcular el efecto carcinógeno/inhibidor, el efecto carcinógeno en los animales del grupo DMBA-Ap se consideró 100% y el efecto inhibidor 0. El efecto inhibidor en el grupo DMBA-Ao se estableció por la diferencia porcentual sobre 100, considerándose efecto inhibidor el superior al 50%.

El trabajo experimental fue examinado y aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla (07-11-2005), cumplía los requisitos exigidos para la experimentación con animales y se ajustaba a las normativas vigentes en España y en la Unión Europea.

Resultados

Se diseccionaron en todos los animales las bolsas bucales, el esófago y el estómago. Se observaron macroscópicamente en los animales de los grupos DMBA-Op y DMBA-Ao, múltiples tumores de tamaño microscópico, siendo en los animales del grupo DMBA-Ao poco numerosos y de menor tamaño (Fig. 2).



Fig.2. Comparación macroscópica de dos animales pertenecientes al grupo DMBA-Po N° 1 y DMBA-Oo N1. En el animal tratado con DMBA al 0,5% disuelto en aceite de parafina, las bolsas bucales, el esófago y el estómago presentan numerosos tumores visibles a simple vista. En el animal del grupo DMBA-Oo, las bolsas bucales, el esófago y el estómago muestran escasas lesiones de pequeño tamaño.

El tamaño de los tumores en el grupo DMBA-Ap osciló entre 0,1 y 9 mm de diámetro, y en el grupo DMBA-Ao, un tamaño menor entre 0,1 y 4 mm de diámetro (Tabla 1).

Table 1. Number, size and type of tumour in DMBA carcinogenesis at twentieth week.

Histological type	Location	DMBA-Po	DMBA-Oo
Squamous papillomas		24	51
	Buccal pouch epithelium	1 (1mm)	11 (0,1-02 mm)
	Esophagus	9 (0,2-1,2mm)	19 (0,2-1mm)
	Stomach	14 (0,3-1,2mm)	21 (0,2-1mm)
Intraepithelial carcinomas		21	3
	Buccal pouch epithelium	20 (0,1-0,4mm)	2 (2x0,3mm)
	Esophagus	0	1 (0,3mm)
	Stomach	1 (0,6mm)	0
Verrucous carcinomas		9	4
	Buccal pouch epithelium	1 (1,7mm)	2 (1 and 7mm)
	Esophagus	3 (0,8-1mm)	0
	Stomach	5 (0,8-2mm)	2 (1,2 and 1,8mm)
Invasive carcinomas		5	0
	Buccal pouch epithelium	1 (0,5mm)	0
	Esophagus	2 (2 and 4mm)	0
	Stomach	2 (1,5 and 9mm)	0

No se observaron tumores en los animales controles, tratados solamente con aceite de parafina o de oliva y alimentados con dieta supletoria de aceitunas maduras variedad Picual.

En el estudio microscópico se observaron squamous papillomas, intraepithelial carcinomas, verrucous carcinomas and invasive squamous carcinomas.

Squamous papilloma is an exophytic lesion. This lesion demonstrates typically papillary growth, highly differentiated with hyperkeratosis and the epithelium has not atypia nuclear and mitotic figures. Fig.3.

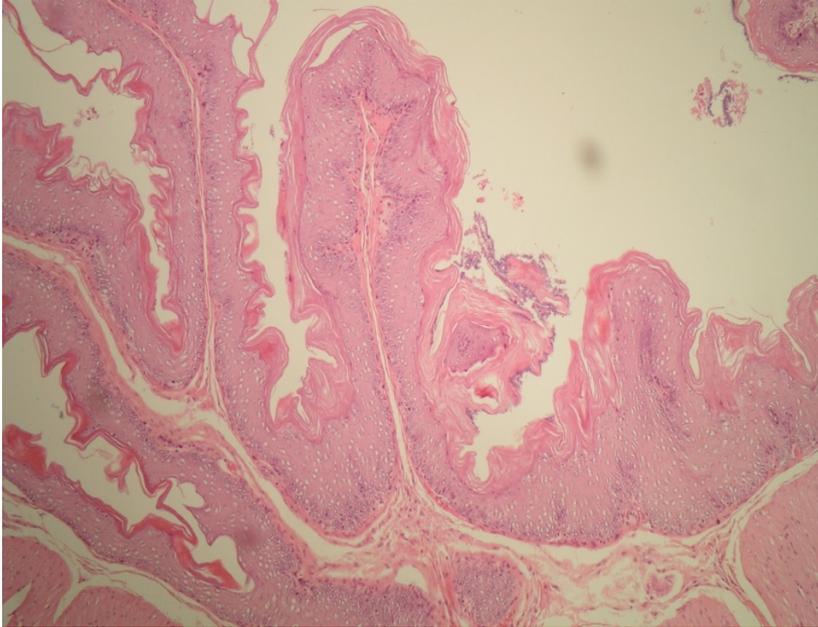


Fig.3. Squamous papilloma.

Intraepithelial carcinoma. This lesion is classically characterized by full-thickness with hyperkeratosis and parakeratosis, hypercellularity, atypia nuclear and mitotic figures. The epithelium-stroma interface to preserve. Fig 4

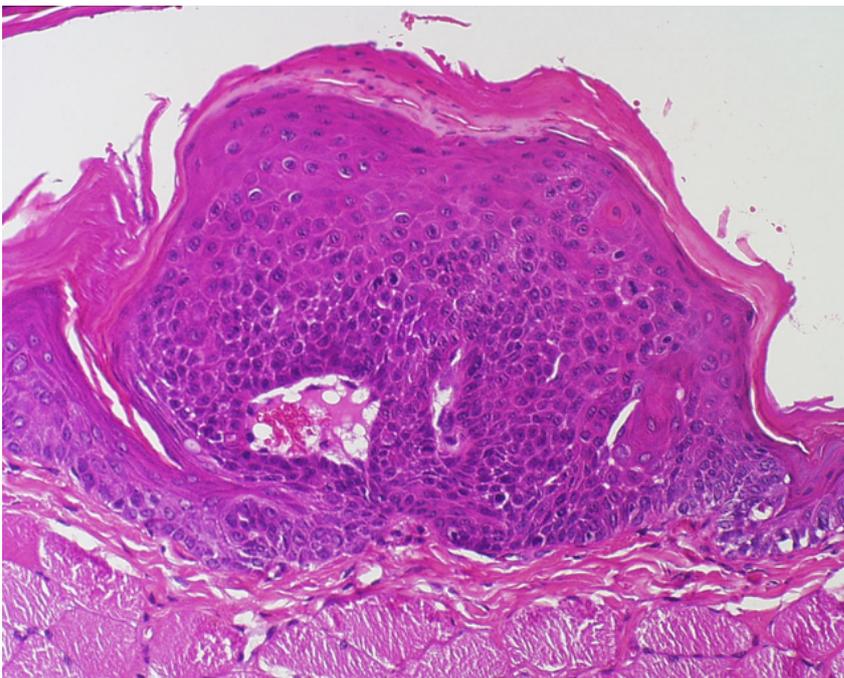


Fig.4. Intraepithelial carcinoma

Squamous cell carcinoma. Verrucous carcinoma, is warty-appearing, highly differentiated, with hyperkeratosis and invades in de form bulbous pegs with a pushing border. There is minimal atypia, abundant eosinophilic cytoplasm and normal mitotic figures. Fig 5.

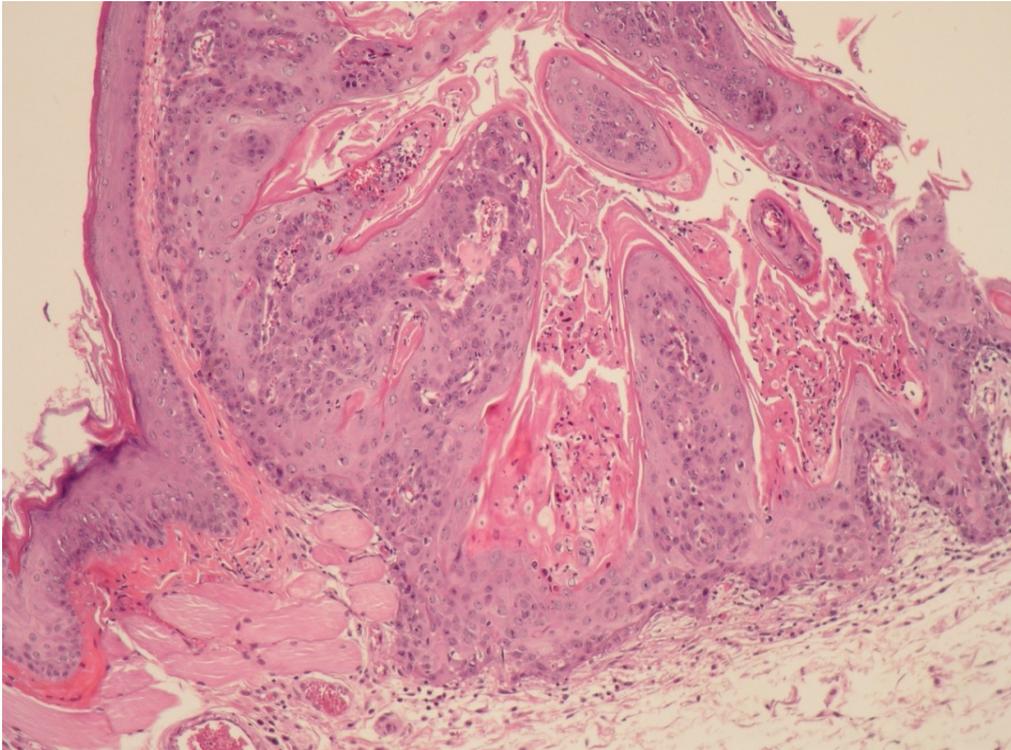


Fig.5. Squamous cell carcinoma. Verrucous carcinoma.

Invasive squamous cell carcinoma. The squamous cell carcinoma is composed of infiltrating islands of malignant squamous cell. Fig.6.

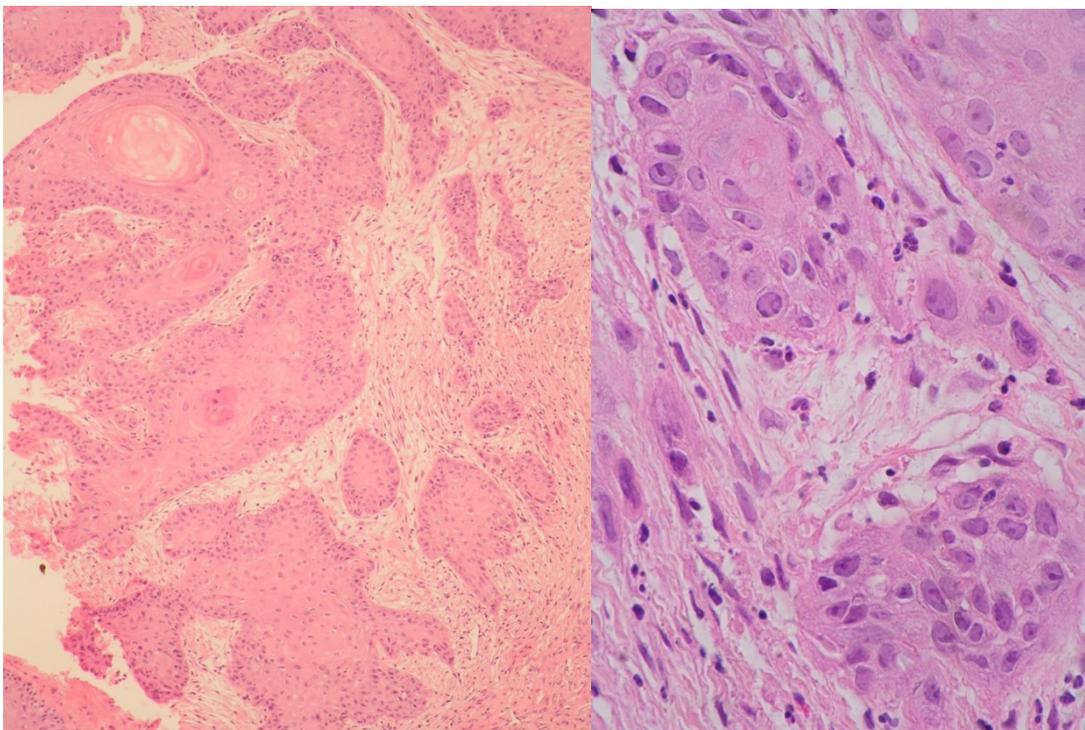


Fig. 6. Invasive squamous cell carcinoma. Infiltrative nets with an irregular growth pattern

En el grupo DMBA-Ap se desarrollaron 21 carcinomas intraepiteliales y solo 3 en el grupo DMBA-Ao; 9 carcinomas verrucosos en el grupo DMBA-Ap y menos de la mitad (4) en el grupo DMBA-Ao, y 5 carcinomas invasores en el grupo DMBA-Ap frente a ningún carcinoma invasor en el grupo DMBA-Ao. El efecto carcinógeno en los animales del grupo DMBA-Ap (35 carcinomas) corresponde al 100%, mientras que en el grupo DMBA-Ao (7 carcinomas), al 20%. Convencionalmente, el efecto inhibitor en los animales del grupo DMBA-Ao es del 80%, correspondiendo al intraepitelial carcinoma el 86%, verrucous carcinoma 56% and invasive squamous cell carcinoma, 100% (Tabla 2).

Table 2. Carcinogen effect DMBA-Po/inhibition DMBA-Oo in relation with number of carcinomas

	DMBA-Po	DMBA-Oo
Intraepithelial carcinomas		
Carcinogen effect	21 (100%)	3 (14%)
Inhibiting effect		(86%)
Verroucus carcinomas		
Carcinogen effect	9 (100%)	4 (44%)
Inhibiting effect		(56%)
Invasive carcinomas		
Carcinogen effect	5 (100%)	0
Inhibiting effect		100%
Toll carcinomas		
Carcinogen effect	35 (100%)	7 (20%)
Inhibiting effect		(80%)

Discusión

El presente trabajo de investigación sobre carcinogénesis se basa en un modelo experimental de inducción de carcinomas de células escamosas a partir de la administración del DMBA al 0,5% disuelto en aceite mineral, aplicado sobre las bolsas bucales del hámster. Pensamos, al igual que Nagini y Kowshik ³, que el modelo de carcinogénesis DMBA en las bolsas bucales del hámster es un modelo de tumores animales característico, previo a la investigación sobre carcinogénesis oral y eficaz en la quimio-intervención. Además, es ventajoso en la inducción de tumores, facilita la investigación, el seguimiento y la reproductibilidad de las lesiones, y puede ser utilizado como test de agentes quimiopreventivos y quimioterápicos. También, en este trabajo, se ha estudiado el efecto inhibitor de la carcinogénesis DMBA mediante la combinación de aceite de oliva como disolvente del DMBA, el aceite de oliva virgen extra aplicado antes, durante y después del DMBA, y la dieta ad libitum con aceitunas maduras variedad Picual, de la recolección del olivo.

Los carcinomas producidos en la carcinogénesis DMBA en el tubo digestivo superior fueron carcinomas de células escamosas, similares a los carcinomas de células escamosas de la mucosa oral en humanos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros trabajos experimentales ^{18,19}.

En carcinogénesis oral, con la utilización de DMBA en hámsteres, algunos autores han descrito el desarrollo de lesiones precancerosas y, posteriormente, su progresión hacia carcinoma intraepitelial y carcinoma invasivo a medida que avanzaban las semanas de experimentación; a las 8 semanas suelen aparecer lesiones precancerosas; a las 12 semanas evolucionan a carcinoma intraepitelial, y a las 18 semanas se desarrollan carcinomas invasores, fenómeno

también presente en el ser humano, aunque lógicamente más lento ²⁰. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo se ajustan al modelo de progresión neoplásica del cáncer oral descrito en la bibliografía.

Al igual que el campo de la carcinogénesis experimental, la investigación sobre la quimiopreención del cáncer no ha dejado de potenciarse en las últimas décadas de los agentes propuestos para tal fin, aunque con escasos resultados aún, es la dieta con aceite de oliva virgen extra en el cáncer experimental de mama ^{11, 13} y de colon ⁹. En el presente trabajo se ha utilizado la combinación del aceite de oliva como disolvente, aceite de oliva virgen extra aplicado antes, durante y después de la aplicación DMBA y dieta ad libitum con aceitunas maduras variedad Picual como agente quimiopreventivo sobre la carcinogénesis DMBA.

Menéndez et al (¹⁴). han demostrado que los polifenoles del aceite de virgen extra inhiben la transformación maligna erbB-2 de las células epiteliales del cáncer de mama humano. Owen et al. ¹⁷ expresan la importancia de los compuestos fenólicos aislados del aceite de oliva como antioxidantes y su potencial anticancerígeno.

En este sentido, la composición del aceite de oliva es un 99% de diferentes ácidos grasos, el más importante el ácido oleico, ácido graso monoinsaturado, con una riqueza del 60-80%, y otros ácidos grasos (palmítico, esteárico, palmitoleico, linoleico y linolénico). El 1% restante está formado por vitamina E y antioxidantes naturales. Los antioxidantes más importantes son los compuestos fenólicos, presentes en el mesocarpio de la aceituna y en el aceite de oliva virgen extra, principales responsables de las propiedades antioxidantes y que no están presentes en ningún otro aceite vegetal. Por este motivo, la dieta añadida al pienso estándar que recibieron los hámsteres fue aceitunas maduras del árbol, de reciente recolección y no atrojadas (almacenadas). La variedad de aceituna mas rica en compuestos fenólicos es la variedad Picual.

Tras la obtención de los resultados podemos afirmar que la combinación de aceite de oliva como disolvente del DMBA, aceite de oliva virgen extra aplicado antes, durante y después del DMBA y la dieta ad libitum con aceituna Picual ha demostrado capacidad para reducir la progresión carcinogénica de lesiones ya iniciadas y modificar el fenotipo maligno de algunas neoplasias, tornándolo menos agresivo.

Es posible que en el grupo DMBA al 0,5% disuelto en aceite de oliva se haya generado algún tipo de reacción/absorción del carcinógeno por los grupos-COOH y los enlaces insaturados de los aceites vegetales con disminución de la concentración efectiva del carcinógeno. No se puede olvidar el efecto antioxidante y potencial anticancerígeno del aceite de oliva virgen extra expresada por algunos autores^{14,17}, especialmente de los compuestos fenólicos.

El estudio de las lesiones a las 20 semanas evidenció un total de 59 neoplasias en el grupo DMBA-Ap y 58 en el grupo DMBA-Ao, por lo que no existen diferencias en el número de tumores con los animales del grupo anterior. Donde se apreciaron claras diferencias fue en el tipo de las neoplasias según su grado de malignidad.

El 88% de los tumores desarrollados en el grupo DMBA-Ao correspondieron a tumores benignos tipo papilomas escamosos, frente al 41% que se desarrollaron en el grupo DMBA-Ap; el resto fueron carcinomas.

Además, en los hámsteres que no comieron aceitunas maduras y no se les aplicó aceite de oliva virgen extra, se desarrollaron 21 carcinomas intraepiteliales, 9 carcinomas verrugosos y 5 carcinomas invasivos, mientras que los animales a los que se aplicó la combinación de aceite de oliva como disolvente del DMBA, aceite de oliva virgen extra aplicado antes, durante y después del DMBA y la dieta ad libitum con aceituna Picual desarrollaron solo 3 carcinomas intraepiteliales, 4 carcinomas verrugosos y ningún carcinoma escamoso invasivo.

Conclusiones

El efecto inhibitorio en la carcinogénesis química experimental del aceite de oliva virgen extra, en animales con dieta rica en aceitunas maduras variedad Picual, es del 80% de carcinomas, para el carcinoma intraepitelial (86%), carcinoma escamoso muy bien diferenciado tipo verrugoso (56%) y carcinoma escamoso invasor (100%).

Además, en los animales del grupo DMBA-Ao la mayoría de los tumores que se originan son benignos, del tipo papilomas escamosos.

Se sugiere, por tanto, que el aceite de oliva virgen extra y la dieta con aceitunas maduras extraídas de la recolección del árbol modulan la carcinogénesis experimental DMBA, desarrollándose tumores muy bien diferenciados y poco agresivos.

References

1. Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian Hamster. *J Dent Res.* 1954;33:253-62.
2. Santis H, Shklar G, Chauncey HH. Histochemistry of experimentally induced leukoplakia and carcinoma of the hamster buccal pouch. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1964;17:207-18.
3. Nagini S, Kowshik J. The hamster buccal pouch model of oral carcinogenesis. *Methods Mol Biol.* 2016;1422:341-50.
4. Hassan MM, Shklar G, Solt D, Szabo G. Acute effect of DMBA application on mitotic activity of hamster buccal pouch epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;59:491-8.
5. García FJG, Ortega VV, Sánchez NA, Jornet PL. Estudio comparativo de la aplicación del hidrocarburo aromático policíclico 7,12-dimetil-1,2-benzatraceno (DMBA) sobre la mucosa oral del hámster y del cobaya. *Rev Española Patol.* 2009;42:287-95.
6. Solt DB, Polverini PJ, Calderon L. Carcinogenic response of hamster buccal pouch epithelium to 4 polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Oral Pathol.* 1987;16:294-302.
7. Nagabhushan M, Ng YK, Elias R, Polverini PJ, Solt DB. Acute inhibition of DNA synthesis in hamster buccal pouch epithelium exposed to indirect acting carcinogens. *Cancer Lett.* 1990;53:163-73.
8. Calderon-Solt L, Solt DB. Gamma-glutamyl transpeptidase in precancerous lesions and carcinomas of oral, pharyngeal, and laryngeal mucosa. *Cancer.* 1985;56:138-43.
9. Bartolí R, Fernández-Bañares F, Navarro E, Castellà E, Mañé J, Alvarez M, et al. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: Modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandinE(2) synthesis. *Gut.* 2000;46:191-9.
10. Zhou ZT, Ge JP. The preventive effect of salvianolic acid B on malignant transformation of DMBA-induced oral premalignant lesion in hamsters. *Carcinogenesis.* 2006;27:826-32.
11. Warin R, Xiao D, Arlotti JA, Bommareddy A, Singh SV. Inhibition of human breast cancer xenograft growth by cruciferous vegetable constituent benzyl isothiocyanate. *Mod Carcinog.* 2010;49:500-7.
12. Wang WC, Chen CY, Hsu HK, Lin LM, Chen YK. Chemo-preventive effect of *Toona sinensis* leaf extract on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. *Arch Oral Biol.* 2016;70:130-42.
13. Manzanares MA, Solanas M, Moral R, Escrich R, Vela E, Costa I, et al. Dietary extra-virgin olive oil and corn oil differentially modulate the mRNA expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and in the mammary gland in a rat chemical induced breast cancer model. *Eur J Cancer Prev.* 2015;24:215-22.
14. Menéndez JA, Vázquez A, Oliveras C, García R, Carrasco A, Fernández A, et al. Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: Relationship between the chemical

- structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *Int J Oncol.* 2008;34:43-51.
15. Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menéndez JA, Colomer R, et al. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol.* 2002;21:745-53.
 16. Moral R, Solanas M, García G, Grau L, Vela E, Escrich R, et al. High corn oil and extra virgin olive oil diets have different effects on the expression of differentiation-related genes in experimental mammary tumors. *Oncol Rep.* 2008;20:429-35.
 17. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer.* 2000;36:1235-47.
 18. Chen YK, Lin LM. DMBA-induced hamster buccal pouch carcinoma and VX-induced rabbit cancer as a model for human oral carcinogenesis. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010;10:1485-96.
 19. 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;10:301-13.
 20. Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, et al. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol.* 2008;44:315-24.