

EARLY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC ALTERATIONS IN SUBMANDIBULAR GLAND ONCOGENESIS IN RATS

Mabel Brunotto¹, Alicia Malberti¹, Ana María Zárata¹, José Luis Barra², Olga Calderón³, Eugenia Piñas⁴, Luis Plavnik¹, Marta Crosa^{1,3,4}

¹Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, National University of Córdoba.

²Department of Biological Chemistry, CIQUIBIC, Faculty of Chemistry, National University of Córdoba. ³Institute of Cell Biology, Faculty of Medicine, National University of Córdoba.

⁴Fellow of the Córdoba Science Agency and CREO Foundation.

ABSTRACT

The present study evaluates the phenotypic and genotypic changes that take place during early oncogenesis. The submandibular glands of male rats were injected with a 0.5% solution of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) in acetone. Gland samples were taken at 0, 7, 30 and 150 days post-injection and submitted to histological, biochemical, immunocytochemical and PCR evaluation. Histopathological analysis was performed on hematoxylin-eosin stained slides. Total protein content was assessed by Lowry's method and the protein profile was analyzed by 12% SDS-PAGE. Bcl-2 was demonstrated by silver-enhanced gold immunolabeling. p53 immunolabeling was performed using the streptavidin-biotin system. All the treated animals developed carcinoma-like lesions at 30 and 150 days. Total protein concentration rose significantly ($p < 0.05$) above control values at 7, 30 and 150 days. The treated glands exhibited positive immunolabeling for p53 in the nuclei of neoplastic cells at 30 and 150 days. Treated

glands also showed positive cytoplasmic immunolabeling for Bcl-2, exhibiting statistically significant differences between 7, 30 and 150 days ($p = 0.0015$), and with controls ($p < 0.0001$). No p53 mutations were observed whereas a point mutation, C-to-A, of the Bcl-2 gene was detected at 7, 30 and 150 days by PCR amplification. This mutation led to a single aminoacid change (thre → asn) in the protein molecule. Our results suggest that the early histopathological changes correspond to quantitative and qualitative protein changes. The histopathological, biochemical, immunocytochemical and genetic alterations observed during the course of experimental carcinogenesis in the submandibular gland of the rat could constitute reproducible indices of malignant transformation applicable to human oncogenesis, given the high degree of homology between the oncogenes of mice, rats and human beings.

Key words: rat submandibular gland, DMBA, experimental oncogenesis, p53, Bcl-2.

ALTERACIONES TEMPRANAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS EN LA ONCOGÉNESIS DE GLÁNDULA SUBMANDIBULAR DE RATA

RESUMEN

Se evaluaron modificaciones del fenotipo y genotipo en glándulas submandibulares durante el desarrollo temprano de la tumorigénesis. Glándulas submandibulares de ratas macho fueron inyectadas con una solución al 0,5% de 9,10-dimetyl 1,2-benzanthracene (DMBA), diluida en acetona. Muestras de glándulas fueron analizadas mediante técnicas histológicas, bioquímicas, inmunocitoquímicas y por PCR a los 0, 7, 30 y 150 post inyección. Para los estudios histopatológicos se utilizó la técnica de Hematoxilina- Eosina. Se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry y se realizaron corridas electroforéticas en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% para determinar el perfil proteico. Se realizó inmunomarcación para Bcl-2 con oro coloidal-plata y para p53 por streptavidina-biotina. Todos los animales tratados desarrollaron cambios similares a carcinomas a los 30 y 150 días. La concentración de proteínas totales aumentó significativamente ($p < 0,05$) a los 7, 30 y 150 días en relación a los controles. En glándulas inducidas la inmunomarcación fue

positiva para la proteína p53 en núcleos de células neoplásicas a los 30 y 150 días. En las mismas glándulas, la marcación citoplasmática de Bcl-2 fue positiva a los 7, 30 y 150 días ($p = 0,0015$) y en relación a los controles ($p < 0,0001$). No se observaron mutaciones de p53 mientras que se observó una mutación puntual, C → A, del gen bcl-2 a los 7, 30 y 150 días que generó un cambio de aminoácidos en la proteína (thre → asn). Nuestros resultados sugieren que los cambios histopatológicos tempranos corresponden a modificaciones cuantitativas y cualitativas de las proteínas. Las modificaciones observadas a nivel histopatológico, bioquímico, inmunocitoquímico y genético en la carcinogénesis experimental de glándula submandibular de rata podrían representar parámetros reproducibles de transformaciones malignas transferibles al ser humano, dada la alta homología de estos oncogenes entre rata, ratones y el hombre.

Palabras clave: glándula submandibular de rata, DMBA, oncogénesis experimental, p53, Bcl-2.