



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Epidemiología Clínica

“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS ω 3 EN UN MODELO MURINO PARA CA DE MAMA”

TESIS

Que para optar por el grado de DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

Erika Alejandra Damasco Avila

Tutor Principal:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

Comité Tutorial:

Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Abril 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

ANTECEDENTES.....	03
JUSTIFICACION.....	26
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	37
DISCUSIÓN.....	46
ANEXOS.....	47
REFERENCIAS.....	51

ANTECEDENTES

1. CÁNCER

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado. En la mujer fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago.¹

La etiología no ha sido por completo dilucidada, pero múltiples estudios epidemiológicos, clínicos, y de biología molecular, han contribuido a la identificación de sustancias químicas, virus, genes y agentes físicos que actúan como carcinógenos; además de condiciones particulares en el huésped, como diferencias ambientales, hormonales, de resistencia inmunológica y hereditaria, que aumentan la susceptibilidad de presentar cáncer.²

En el año 2000, los tumores malignos fueron la causa del 12% de los casi 56 millones de muertes que se produjeron en el mundo por todas las causas; y de acuerdo al Informe Mundial sobre el Cáncer, la incidencia del cáncer podría aumentar en un 50% para el año 2020, con 15 millones de casos nuevos (Figura 1).^{1,2} En el año 2000, 5,3 millones de hombres y 4,7 millones de mujeres presentaron tumores malignos, de los cuales, 6.2 millones desencadenaron en muerte. El informe revela que el cáncer, es ahora un muy importante problema de

salud pública en los países en desarrollo, igualando el efecto que tiene en los países industrializados.³

Figura 1.

**Casos de cáncer Panorama Internacional
2000 - 2020***

Tipos de cáncer	2000		2020	
	Núm.	%	Núm.	%
Pulmón	1,000,200	12.34	2,000,000	13.33
Mama	1,000,100	12.34	2,000,000	13.33
Colon	940,000	11.60	1,700,000	11.34
Estómago	870,000	10.74	1,400,000	9.33
Hígado	560,000	6.91	1,000,000	6.67
Cuello uterino	470,000	5.80	800,000	5.33
Esófago	410,000	5.06	800,000	5.33
Cabeza y cuello	390,000	4.81	700,000	4.67
Vejiga	330,000	4.07	600,000	4.00
Hodgkin	290,000	3.58	550,000	3.67
Leucoemia	250,000	3.09	500,000	3.33
Próstata y de testículos	250,000	3.09	500,000	3.33
Páncreas	216,000	2.67	400,000	2.67
Ovario	190,000	2.35	380,000	2.53
Riñón	190,000	2.35	390,000	2.60
Endometrio	188,000	2.32	300,000	2.00
Sistema nervioso	175,000	2.16	250,000	1.67
Melanoma	133,000	1.64	250,000	1.67
Tiroides	123,000	1.52	230,000	1.53
Faringe	65,000	0.80	100,000	0.67
Enfermedad de Hodgkin	62,000	0.77	150,000	1.00
Total Mundial	8,102,300	100.0	15,000,000	100.00

Informe de Cáncer. Organización Mundial de la Salud

En México, entre el año 1922 y el año 2001, la proporción de muertes por cáncer pasó de 0.60% a 13.1% de la población. En el 2002 existieron 110,094 casos de cáncer, de los cuales el 34.9% se presentaron en hombres y el 65.1% en mujeres, reflejando también que a mayor edad, mayor incidencia.^{2,4} En el año 2003 la mortalidad por cáncer en hombres presentó en los tres primeros lugares: 4,563 defunciones por tumor en bronquios y pulmón, 4,231 por tumor en próstata y 2,757 por tumor en estómago. En contraparte los tres primeros lugares de mortalidad en

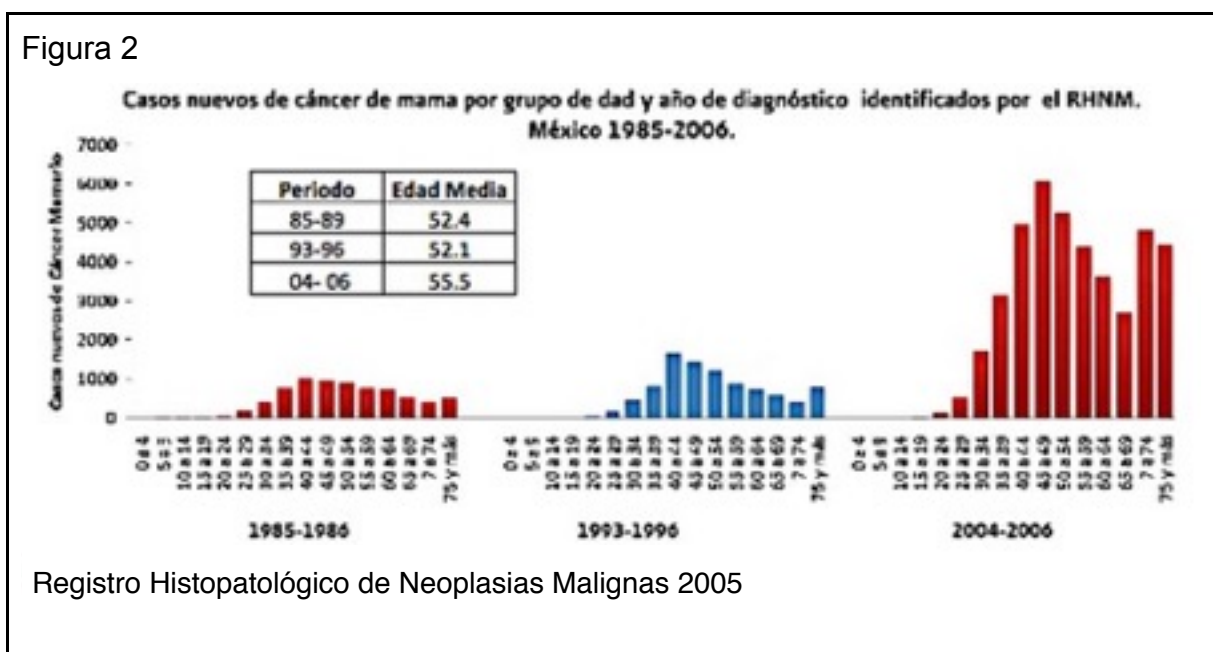
las mujeres fueron: 4,330 defunciones por tumor en cuello del útero, 3,861 por tumor en mama y 2,376 por tumor en estómago.^{2,5,6}

2. CÁNCER DE MAMA

A nivel mundial, en el 2000 el cáncer de mama se colocó como segunda causa de morbilidad por neoplasias, superado solo por cáncer pulmonar. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, para el 2020 se estima que podría alcanzar el primer lugar en morbilidad.²

El gran impacto que tiene sobre la salud en las mujeres ha condicionado que los programas en salud, se enfoquen en gran medida, a la identificación temprana de este tipo de cáncer.

En México, según datos proporcionados por el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), la incidencia de cáncer de mama en 2005 fue de 11,242, cantidad excepcional, al comparar con años anteriores en los que la cifra de 10 mil nuevos casos anuales no se sobrepasaba.¹ y ha incrementado año tras año (Figura 2).⁵



Actualmente, el cáncer de mama representa 15% de todos los tipos de cáncer en mujeres y es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel internacional.⁶ De acuerdo al Registro Nacional de Cáncer, se ha estimado que en México cada día mueren diez mujeres por cáncer de mama y una de cada ocho mujeres lo desarrolla; por tal razón, en algunos estados del país esta es la principal causa de muerte de mujeres en edad reproductiva (entre 15 y 64 años), 47% del total de muertes ocurre en mujeres entre 45 y 64 años, debido a que el riesgo aumenta con la edad, como sucede con cualquier tipo de cáncer.⁷

Tan sólo en el 2005, a nivel nacional se registraron 2,861 fallecimientos de mujeres por cáncer de mama, lo que representa el 21 por ciento de las muertes de mujeres por cáncer, comparado con el 19 por ciento que murieron por cáncer cervicouterino.²

La evidencia demuestra que el cáncer de mama es hoy en día una de las principales causas de muerte y discapacidad entre las mujeres de países en vías de desarrollo y en México en particular.

Fisiopatología: El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células de la glándula mamaria. Estas consisten principalmente en lobulillos, conductos y estroma. La mayoría de los cánceres de mama comienza en las células que recubren los conductos, algunos otros se originan en las células que recubren los lobulillos, mientras que un pequeño número se origina en otros tejidos. La mayoría son carcinomas, un tipo de cáncer que comienza en las células epiteliales, a menudo llamados adenocarcinoma, que es el carcinoma que

comienza en el tejido glandular. Otros tipos de cáncer de mama son los sarcomas, que empiezan en las células del músculo, grasa o tejido conectivo.⁸ El tipo histológico más común del cáncer invasor de mama es el carcinoma ductal infiltrante, que representa 70-80% de las lesiones invasoras; le sigue el carcinoma lobulillar infiltrante, con un 10-15%; y los casos restantes se deben a diferentes tipos histológicos.⁹

El cáncer de mama también se puede clasificar en función de las proteínas que se encuentran sobre la superficie de las células cancerosas o dentro de ellas, en grupos como “receptor hormonal positivo” o “triple negativo”.¹⁰

Factores de Riesgo:^{11,12}

- Sexo (99% mujeres)
- Edad (85% >40 años)
- Cáncer previo en una mama
- Nulíparas en comparación con multíparas
- Primer parto después de los 34 años
- Menarca antes de los 12 años
- Menopausia después de los 50 años
- Administración de terapia de reemplazo estrogénico postmenopáusico y anticonceptivos orales
- Judíos en comparación con otros grupos étnicos
- Estrés psicológico crónico
- Obesidad
- Triada: Obesidad, HAS y DM
- Raza blanca en comparación con raza asiática.

3. PREVENCIÓN Y RIESGO DE CÁNCER RELACIONADO CON ALIMENTACIÓN

Se estima que un cambio en la dieta puede reducir la incidencia global de cáncer entre un 30-40%, lo que equivale a tres a cuatro millones de casos anuales en todo el mundo, también establece que el 35% de los tumores tiene origen o se relacionan con factores alimentarios.¹³ Situando los factores alimentarios a la cabeza de los factores de riesgo tumoral, debidos a una influencia ambiental externa.¹⁴

Se sabe que existen cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos importantes relacionados con el desarrollo de cáncer: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. Sin embargo también existen protectores dietéticos y de estilo de vida como el consumo adecuado de fibra, consumo de fitoquímicos provenientes de frutas y verduras principalmente.¹⁵

La evidencia relacionada con factores dietéticos y su asociación con la carcinogénesis viene de estudios tanto epidemiológicos como experimentales.

PROTECCIÓN Y RIESGO (Figura 3)

FRUTAS, VERDURAS, CEREALES Y LEGUMINOSAS

La ingesta elevada de fibra dietética, se asocia, no solo a menor riesgo de enfermedad cardiovascular, también a menor incidencia de algunos tipos de cáncer, entre ellos páncreas, colorrectal y de mama. Así mismo, el consumo de cereales con grano entero posiblemente disminuyen el riesgo de cáncer,

concentraciones al mínimo. Los principales alimentos, donde estas aflatoxinas pueden crecer son, cereales de todo tipo, oleaginosas, semillas y principalmente leguminosas. La evidencia existente mas contundente relacionada a estas sustancias, es con el desarrollo de cáncer de hígado.^{13,19,20}

Con respecto a frutas y verduras, estudios epidemiológicos refieren que el consumo frecuente estas, especialmente cítricos, verduras ricas en carotenos, y crucíferas, se asocia con una menor incidencia de cánceres en diversos sitios. Los componentes específicos responsables de estos efectos no se identifican con claridad, aunque la evidencia epidemiológica parece inclinarse hacia el efecto protector del caroteno para cáncer de pulmón y en menor medida para las vitaminas A y C para diversos tipos de cáncer . La evidencia experimental es más consistente para la deficiencia de Vitamina A y su asociación con aumento en la tumorigénesis; así como para diversos componentes no nutritivos en las crucíferas para bloquear la carcinogénesis *in vivo*.^{13,21-23}

PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL.

El consumo de carne roja y procesada presenta una evidencia convincente con el desarrollo de cáncer colorrectal, y evidencia limitada, al sugerir que se asocia con cáncer de esófago, pulmón, páncreas y endometrio; así como con el consumo de carne procesada.¹⁵

El consumo de pescado salteado estilo cantonés es una probable causa de cáncer nasofaríngeo, por ser sujeto de fermentación; pero este hallazgo no aplica a otro tipo de preparación con pescado. La evidencia es limitada con respecto a la

protección por el consumo de pescado y alimentos ricos en vitamina D para cáncer colorrectal.¹³

Preparaciones como: a la parrilla, escabeche, barbecue, ahumados y curados; tienen evidencia moderada para cáncer de estómago, al generar nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos o aminas heterocíclicas, los cuales parecen aumentar el riesgo de cáncer de esófago y estómago, sin embargo, los agentes causales específicos en estos alimentos no están claramente identificados. Con respecto a otros métodos preservación y preparación, la evidencia es escasa; la evidencia general sigue siendo meramente sugerente.^{13,15,24}

LECHE Y SUS DERIVADOS

Tienen impacto en diferentes tipos de cáncer. La leche protege probablemente contra cáncer colorrectal y cáncer de vesícula. El queso se asocia a riesgo para cáncer colorrectal y dietas altas en consumo de calcio, al parecer es un factor probable para cáncer de próstata, aunque la evidencia es escasa.¹³

SAL, AZÚCAR Y ALCOHOL

La evidencia de sal y su relación con el desarrollo de cáncer, está conferida únicamente con cáncer de estómago. Sin embargo, el mismo tipo de cáncer, con tiene una relación limitada con respecto a azúcar.¹³

Edulcorantes artificiales como sacarina, ciclamatos, aspartame, etc. han sido pensados como posibles causas de cáncer, debido a que en modelos murinos, se encontró que muy altas dosis de sacarina, incrementaron la incidencia de cáncer de vesícula. Sin embargo, aun cuando muestren ser carcinogénicos en modelos

experimentales, la dosis está muy lejos de ser consumida por el ser humano en alimentos y bebidas. La evidencia en estudios epidemiológicos no sugieren que los edulcorantes artificiales tengan efecto como factores de riesgo para desarrollo de cáncer.¹³ El consumo excesivo de alcohol entre los fumadores parece estar asociado con un riesgo elevado de cáncer de la cavidad oral, esófago, laringe y el tracto respiratorio.¹⁵

GRASAS

Se ha asociado al desarrollo de cáncer de pulmón y de mama en mujeres postmenopausicas, sin embargo, la evidencia es pobre. En zonas de países desarrollados en Europa, Norteamérica y Australia, con dietas ricas en grasas y alimentos procesados, los tumores mas frecuentes suelen ser de colon, próstata o mama. Los mecanismos son especulativos.²

En 1982, el Committee on Diet, Nutrition, and Cancer of the National Research Council, llevó a cabo una evaluación completa de la evidencia. Dicha evaluación, sugiere que una dieta alta en grasas se asocia con mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer en diferentes sitios, en particular mama y colon, y en menor medida, próstata. Sin embargo, dicha asociación es controversial. En contraste, el interés por los AGPI w3, comenzó con estudios ecológicos que encontraron relación inversa entre el desarrollo de Ca de mama y consumo de AGPI procedentes del pescado. Datos epidemiológicos encuentran una relación inversa entre la ingesta de ácidos grasos w3 y la incidencia de cáncer de próstata, mama y colon.^{15,25}

Estudios realizados en modelos animales, con AGPI w3 (EPA y DHA), indican que pueden tener un

efecto preventivo en el desarrollo de tumores y en enfermedad metastásica.^{26,27}

Existe interés en el rol de los diferentes tipos de ácidos grasos y su efecto en el desarrollo de cáncer de mama, sin embargo, hasta ahora las conclusiones son variadas.

4. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

CLASIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos se pueden clasificar de acuerdo con la longitud de la cadena, el número, posición y configuración de dobles enlaces, así como por la existencia adicional de otros grupos funcionales. Otra característica para su división es la distribución de los ácidos grasos en los alimentos.²⁸

Con respecto a la longitud de la cadena de carbonos, los ácidos grasos se clasifican en: ácidos grasos de cadena corta (menos de 8 carbonos), ácidos grasos de cadena media (de 8 a 11 carbonos), ácidos grasos de cadena intermedia (de 12 a 15 carbonos) y ácidos grasos de cadena larga (igual o mayor de 16 carbonos).²⁹

Los ácidos grasos presentes en los aceites y grasas comestibles se clasifican por su grado de saturación en: ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados.

^{29,30}

ACIDOS GRASOS SATURADOS

Contienen solamente enlaces carbono-carbono simples que se denominan saturados y son los menos reactivos químicamente. Generalmente son de cadena recta, principalmente con número par de átomos de carbono, pero también se han detectado ácidos grasos impares de origen animal y marino, como así mismo, se han encontrado algunos ácidos grasos ramificados.³⁰

Los ácidos grasos saturados son sintetizados en el organismo y los más comunes son: palmítico

(C:16), esteárico (C:18), araquidónico (C:20), entre otros.^{29,30}

ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS ^{29,30}

Se caracterizan por tener una cadena hidrocarbonada, en la que aparece una doble unión C = C. Cuando un ácido graso presenta un único doble enlace se le denomina “monoinsaturado” y si contiene más de uno se le llama “poliinsaturado”. Los monoinsaturados se encuentran entre 10 y 22 átomos y los poliinsaturados entre 16 y 22 átomos de carbono.

La presencia de dobles enlaces en la estructura de un ácido graso cambia notablemente sus propiedades químicas y físicas. Por ejemplo, mientras un ácido graso saturado puede ser un sólido a temperatura ambiente, el ácido graso mono o poliinsaturado de igual número de carbonos será generalmente un líquido.

Familias de ácidos grasos insaturados.

Las relaciones estructurales entre los ácidos grasos no conjugados obtenidos por biosíntesis, se ponen de manifiesto cuando se indica la posición del doble enlace a partir del grupo metilo terminal. Se obtienen así tres familias $\omega 3$, $\omega 6$ y $\omega 9$. Respecto a la nomenclatura se señala además de forma adicional el número de carbonos y seguido de dos puntos la cantidad de dobles enlaces presentes en la molécula (Figura 4).

Los mamíferos y particularmente el hombre son incapaces de sintetizar el ácido linoléico (LA) (C18:2 $n-6$) y ácido alfa linolénico (ALA) (C18:3 $n-3$). Por esta razón, deben ser ingeridos con la dieta. El ácido linoléico y alfa linolénico al ser consumidos con los alimentos, pueden ser transformados por el organismo en ácidos grasos con un número mayor de dobles enlaces y con cadenas más largas, utilizando sistemas enzimáticos constituidos por *desaturasas* y *elongasas*.

Figura 4.



El proceso bioquímico de elongación y de desaturación del LA y ALA, es realizado por enzimas localizadas en el retículo endoplásmico y en los peroxisomas de las células hepáticas. Los ácidos grasos de las series $\omega 3$, $\omega 6$ y $\omega 9$ compiten por las $\Delta 6$ -desaturasa, que muestran afinidad por los ácidos en orden de preferencia $\omega 3$, $\omega 6$ y $\omega 9$.

Por lo tanto, existe una interacción competitiva entre los ácidos grasos, de modo que los de la familia 18:3 $\omega 3$ suprimen el metabolismo de los de la familia 18:2 $\omega 6$ y la familia 18:2 $\omega 6$ suprime el de los de la familia 18:3 $\omega 9$, aunque con menos potencia.

ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA 3 (AGPI $\omega 3$)

Los AGPI $\omega 3$ son ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga que van de 18 a 22 átomos de carbono de longitud, en donde el primer de varios dobles enlaces comienza en el tercer carbono (a contar desde el metilo terminal de la estructura de los ácidos grasos). El AGPI $\omega 3$, ácido docosaheptaenoico (DHA) consiste en 22 átomos de carbono y 6 dobles enlaces; y el ácido eicosano Estructura química de Ácido Linoléico (LA), Alfa linolénico (ALA), Ácido Araquidónico (AA), Eicosapentanoico (EPA) y Docosaheptaenoico (DHA)

(Figura 5). Cabe señalar que el DHA y EPA pueden ser designados en forma abreviada como 22:6 $\omega 3$ y 20:5 $\omega 3$, respectivamente. Tienen estructuras curvas que se deben a la presencia de los dobles enlaces con una conformación estética "cis". Además, la presencia de múltiples dobles enlaces resulta en una disminución del punto de fusión de estas estructuras, de manera que los AGPI son altamente fluidos a 23 ° C y más aún a temperaturas como la del cuerpo humano (37 ° C).

Estas propiedades hacen que la proporción y tipo de AGPI juega un papel central para mantener la fluidez de las membranas celulares y organelos.³¹

Figura 5. Estructuras generales de AGPI

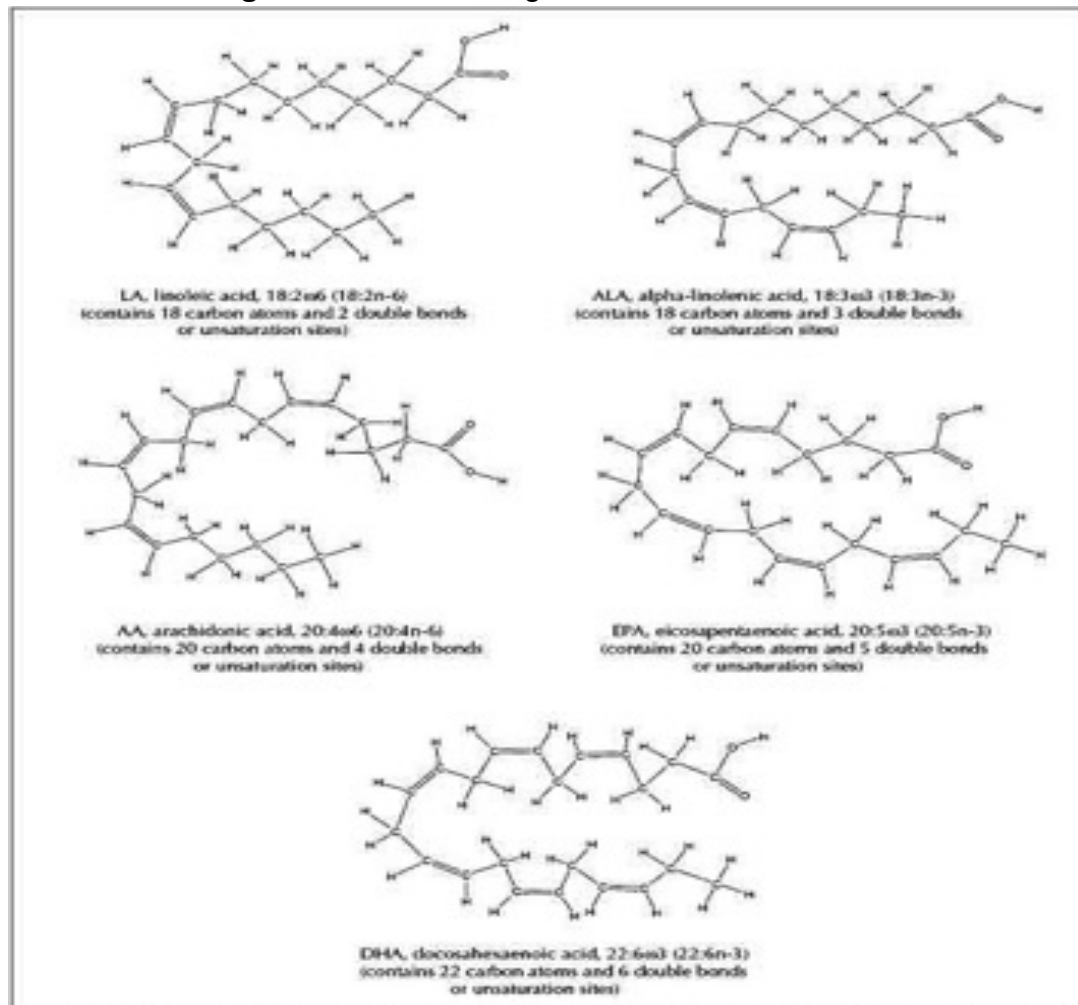


Fig. 1: Chemical structures of linoleic acid (LA), alpha-linolenic acid (ALA), arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA).

La conversión metabólica de Ácido Alfa Linolénico (ALA) a DHA / EPA (combinado) por el metabolismo es muy limitada en los seres humanos, por lo que la forma más directa de obtención de dichos AG es a través de su consumo directo.³²

El aceite de pescado es la fuente dietética más rica en dichos AGPI al contrario de fuentes vegetales ricas en LA como el lino, aceite de canola y nueces que carecen de ellos. Los alimentos vegetales y aceites vegetales carecen completamente de

DHA y EPA, algunos contienen cantidades variables de ALA (18:3 w3). Aceites vegetales (maíz, cártamo, girasol y aceite de soya) son ricos en AG w6 LA (18:2 w6). Algunas plantas (incluido el aceite no hidrogenado de canola, semillas de linaza y las nueces) también son ricas fuentes de LA.³²

El ácido Araquidónico (AA) (20:4 n-6), se consume en pequeñas cantidades en la dieta típica americana, se encuentra en animales y no alimentos de origen vegetal.

El metabolismo del LA en el organismo da lugar a cantidades significativas de AA.

31

Ácido Graso	Fuente Dietética
Tipos de Omega-6	
LA, Ácido Linoléico (18:2 n-6)	Aceites vegetales (maíz, cártamo, girasol, soya), carne
AA, Ácido Araquidónico (20:4 n-6)	Sólo fuentes animales (carne y huevo)
Tipos de Omega-3	
ALA, Ácido Alfa Linoléico (18:3 n-3)	Semilla de linaza, aceite de canola, nuez inglesa, huevos adicionados
EPA, Ácido Eicosapentanóico (20:5 n-3)	Pescado, aceite de pescado, fuentes marinas
DHA, Ácido Docosahexanóico (22:6 n-3)	Pescado, aceite de pescado, huevos y productos adicionados

Figura 6. Fuentes dietéticas de Ácidos Grasos Omega-3 y Omega-6 ³²

En la actualidad existe un gran interés en los efectos benéficos de los AGPI w3, se considera que tienen efectos benéficos en la prevención y modulación de algunas enfermedades crónico degenerativas.³¹ Habitualmente, los ácidos grasos predominantes en la dieta occidental, son los AGPI w6. Sin embargo, la

importancia del consumo de AGPI ω 3 ha resultado evidente, y por ello su efecto ha sido estudiado en múltiples enfermedades.³²

En cáncer de mama se les ha puesto atención por las siguientes razones: estudios epidemiológicos han mostrado con resultados controversiales, aunque la mayoría positivos, un incremento en la incidencia de cáncer de mama y enfermedades cardiovasculares en poblaciones con relaciones de AGPI ω 3: ω 6 bajos, baja incidencia de dichas enfermedades en poblaciones con relaciones altas de AGPI ω 3: ω 6 como Japón, nativos de Alaska y Groenlandia; y finalmente, por los incrementos importantes en la incidencia de cáncer de mama y enfermedades cardiovascular en cohortes con baja incidencia que migran a países occidentales y/o que adoptan el estilo de dieta occidental.³³

5. MECANISMOS DE ACCIÓN DE AGPI ω 3 PROPUESTOS EN LA PREVENCIÓN DE CÁNCER ALTERACIÓN EN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO^{34,36}

Los intermediarios reactivos, derivados del estrés oxidativo (ROS, reactive oxygen species), pueden alterar la bicapa membranal y causar peroxidación lipídica de los los AGPI, llevando a la formación del radical lipoperoxilo (LOO•), que en consecuencia, reacciona con el lípido para producir un radical lipídico y un hidroperóxido lipídico (LOOH). Los LOOHs son inestables, generan nuevos radicales peroxilos y alcoxi, que se descomponen a productos secundarios.

Dichos radicales libres producidos durante la peroxidación lipídica tienen efectos locales, por su vida media corta, pero los productos de descomposición sirven como “segundos mensajeros de estrés oxidativo”, debido a su prolongada vida

media y a su habilidad de difundir desde su sitio de formación. Estos productos de descomposición, en su mayoría aldehídos (malonaldehído, hexanal, acroleína y particularmente el 4-hydroxinonenal), han recibido gran atención, por su gran reactividad.

La peroxidación lipídica y el rompimiento lipídico con formación de compuestos lipídicos pueden llevar a cambios en la permeabilidad y fluidez de la bicapa membrana y alterar dramáticamente la homeostasis y la integridad celular.

Un incremento en las ROS refleja la interrupción de la homeostasis redox, ya sea debido a una elevación de la producción o a una disminución de la capacidad de eliminación. El incremento de la producción de ROS depende de varios mecanismos, como la activación de oncogenes, metabolismo aberrante, disfunción mitocondrial y pérdida funcional de p53. Factores de crecimiento y citocinas, también estimulan la producción de las ROS para ejercer sus diversos efectos biológicos en cáncer.

Para prevenir el daño ocasionado por ROS, la célula tiene enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) MnSOD y Cu/ZnSOD, que están localizadas en la mitocondria y el citosol, respectivamente; donde convierten el superóxido en peróxido de hidrógeno. La descomposición del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno es catalizada por catalasas. Otro mecanismo de defensa antioxidante incluye antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (GSH), cuya capacidad antioxidante depende de su reducción por NADPH derivado de una de la vía de las pentosas. Por otra parte, a través de distintas cascadas de señalización, ROS puede inducir la expresión de familias de proteínas de choque térmico, genes tempranos inmediatos de los miembros de la familia bZIP como c-Jun y c-Fos,

factor inductor de hipoxia (HIF), y enzimas antioxidantes que ayudan a regular la homeostasis redox, la expresión de oncoproteínas de transformadoras, y factores de crecimiento.

Se ha demostrado que los niveles de enzimas para la eliminación de ROS, como SOD, glutatión peroxidasa y peroxiredoxina, se ven alterados en células tumorales y tejidos primarios de tumor, sugiriendo regulación aberrante de la homeostasis redox y la adaptación de células tumorales al estrés.

Efectos celulares de las ROS^{34,37-40}

Las ROS pueden provocar un amplio espectro de respuestas en función de: la magnitud, nivel, duración, exposición, localización y la naturaleza de los ROS involucrados. En general, niveles bajos de ROS son mitogénicos, y además promueven la proliferación celular y supervivencia, mientras que niveles intermedios causan arresto transitorio o permanente del ciclo celular, e inducen diferenciación celular.

Niveles altos de ROS reaccionan fácilmente con lípidos de membrana, causando alteración de la permeabilidad membranal; a nivel del DNA, causan daño e inestabilidad genómica; en proteínas, causan modificaciones oxidativas que pueden resultar en menor actividad catalítica de enzimas, o proteínas más susceptibles a degradación proteolítica. En este caso, las ROS son perjudiciales y pueden inducir apoptosis o necrosis celular. Sin embargo, cuando a pesar de su incremento, la mayor producción de ROS no altera irreversiblemente la viabilidad celular, actúa como primer mensajero, modulando varias cascadas de señalización intracelular que favorecen la progresión de la célula tumoral. Se ha demostrado

que ROS activan las vías de MAPKs, PI3K/Akt, PLC γ 1, protein cinasa C, NF- κ B, y las vías Jak/Stat.

La producción de ROS por las células inflamatorias como los neutrófilos y los macrófagos está bien establecida, y representa un mecanismo para eliminar células tumorales, mediada por NADPH oxidasa, que ocasiona la formación de radicales superóxido, con la subsecuente producción de peróxido de hidrógeno, estrés oxidativo y muerte celular. Sin embargo, muchos cánceres surgen de sitios de inflamación crónica, la cual se considera como un componente crítico de la progresión del tumor.

Inducción de apoptosis por ROS y efecto de AGPI 34,40-42

Tanto la proliferación celular, como el arresto se han observado como consecuencia del estrés oxidativo varios estudios han demostrado que la hiperoxia induce inhibición de la proliferación en las fases G1, S y G2 del ciclo celular; la respuesta varía dependiendo del trasfondo molecular de la célula y el tejido, la concentración individual de especies las ROS y de la concentración de antioxidante en la célula.

Mientras que el arresto del crecimiento inducido por un pequeño incremento del estrés oxidativo puede ocurrir en las fases G1, S o G2 y ser transitorio; un aumento desproporcional de las ROS, logrado con quimioterapia, depleción celular a partir de proteínas antioxidantes, o generación de las ROS por células inmunológicas; puede inducir arresto permanente del ciclo celular, que terminará en senescencia y apoptosis. La apoptosis está ligada a un incremento en el estrés

oxidativo mitocondrial que causa la liberación de citocromo c y activación de caspasas, lo que conduce a muerte celular. Adicionalmente, la generación de superóxido a través de la vía oxidasa RAC-1/NADPH también puede inducir señalización proapoptótica.

La muerte celular por apoptosis es precedida por el colapso del potencial membranaral mitocondrial, aumento en la expresión de Bax, y activación de caspasa-3. Sturlan y cols. demostraron que algunos AGPI, como el DHA, puede sensibilizar el tejido tumoral a agentes antitumorales generadores de ROS.

El efecto combinado de As₂O₃ y DHA se asocia con producción aumentada de ROS intracelular y productos tóxicos de peroxidación lipídica; pero este efecto fue abolido por Vitamina E, o cuando se utilizó ácido oleico en lugar de DHA. Los autores concluyen que la reducción de ROS y de productos tóxicos de la peroxidación lipídica constituyen los mediadores clave, contribuyentes al efecto combinado de DHA y As₂O₃. Estas células, cuando se exponían a DHA y As₂O₃ mostraron inducción de apoptosis y un incremento concomitante en los productos de peroxidación lipídica. Más aun, esta combinación es selectivamente tóxica para células malignas, ya que no se observó el mismo efecto en fibroblastos de piel sanos, células endoteliales y células mononucleares de sangre periférica derivados de donantes sanos.

REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR ^{33,43-46}

La proliferación celular es fundamental en el proceso integral de carcinogénesis y existen muchos factores reguladores conocidos en cáncer de mama. El crecimiento y progresión son generalmente considerados como dependientes de una tasa alta de proliferación celular y tasa lenta de apoptosis. Marcadores de

proliferación nuclear, como Ki-67 son utilizados para evaluar la actividad proliferativa de la célula tumoral. Se ha encontrado expresión elevada de Ki-67 en varios tipos de cáncer, y se ha asociado con alta agresividad e invasividad. El antígeno Ki-67 es expresado en células activas y no en células en descanso; por tanto, la fracción de crecimiento puede ser detectada con mayor precisión. Estudios experimentales han demostrado que el aceite de pescado protege contra el daño oxidativo al DNA, potenciando apoptosis y disminuyendo la proliferación celular por Ki-67.

La clasificación actual de cancer de mama identifica formas luminales que expresan receptores de estrógeno alfa y de progesterona beta, formas Her2 positivo que no expresan los receptores hormonales y los triples negativos. La proteína Her-2/neu es un receptor de factor de estrógeno alfa y progesterona beta, formas Her2 positivo que no expresan los receptores hormonales y triples negativos. Se sobreexpresa en tumores de mama con potencial metastásico y se asocia a baja respuesta a regímenes de quimioterapia.

El factor de transcripción de c-Myc promueve la proliferación celular, regulando la expresión de varios genes blanco, C-Myc puede incrementar la inestabilidad genómica y potenciar tumorigénesis. Los miembros de la familia de Myc (c-Myc, N-Myc y L-Myc) muestran alteración en su expresión en un espectro amplio de tipos de cáncer, incluyendo carcinoma de pulmón, mama, próstata, leucemias y linfomas. Se ha encontrado que c-Myc está sobreexpresado en el 20 a 60% de los tumores primarios de cáncer de mama y en un 60% de las biopsias benignas de paciente que subsecuentemente desarrollaron carcinomas.

La suplementación con aceite de pescado efectivamente suprime la proliferación celular con la consecuente infraregulacion de la expresión de Ki-67, Her-2/neu y c-Myc en modelos murinos.

Aunque poco se sabe sobre el posible mecanismo protector de los AGPI w3 para cáncer, es posible que interfiera con la sobreexpresión de Her-2/neu y su amplificación. De forma alternativa, es posible que los AGPI w3 específicamente tengan como objetivo vías críticas para Her-2/neu, mediando señales que involucra a Pi3K. Adicionalmente, dichos ácidos grasos pueden causar

alteraciones en la composición membranal, activar caspasas y fragmentación de DNA. Los AGPI podrían modular las señales de transducción, afectando la proliferación celular y supervivencia.

Menendez y cols reportaron que la suplementación exógena con AGPI ω 3 (DHA) disminuyó la expresión oncogénica de HER-2/neu (c-erbB-2) en líneas celulares de cáncer de mama. También se reportó que los AGPI ω 3 suprimen la vía de señalización de HER-2/neu. Además, el aceite de pescado reduce la expresión de c-Myc.

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónicas constituyen un problema de salud importante en todo el mundo. La prevención primaria es la acción más económica y sostenible para hacer frente a la epidemia de enfermedades crónicas. El cáncer es una de las causas de muerte más importante a nivel mundial, y como población en proceso de envejecimiento, la complejidad de la vida actual favorece factores que aumentan el riesgo de desarrollar dicha enfermedad. Particularmente el cáncer de mama, se ha convertido en una de las epidemias más importante en nuestro país, no solo por el impacto económico en la sociedad, sino también por los costos de la atención directa de la enfermedad y la pérdida de la capacidad productiva. También la mortalidad mantiene una tendencia ascendente, por esto es hoy en día, uno de los desafíos más importantes para la investigación enfocada a la salud de la mujer adulta.

Resulta indiscutible la importancia de la generación de conocimiento sobre estrategias de prevención contra el cáncer. Debemos establecer líneas de trabajo claras que permitan fortalecer los grandes esfuerzos que ya se han hecho en el control del cáncer y sobre todo potenciar los logros ya obtenidos. En este sentido, ha quedado bien establecido el efecto que tiene la dieta como factor determinante para enfermedades crónicas, entre ellas el cáncer, lo que convierte a la alimentación en un componente fundamental para la prevención. En este caso, los hallazgos ya mencionados con relación a los AG Omega-3, estos se presentan como un candidato potencial para complementar los recursos actuales, de tal forma que vale la pena estudiar de manera más profunda su efecto y mecanismo de acción.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN: ¿Cuál es el efecto de la suplementación dietética con AGPI w3 DHA y EPA en la tasa de crecimiento tumoral en ratones desnudos de la cepa nu/nu, comprado con el efecto de una dieta estándar sobre los mismos parámetros.

HIPÓTESIS: La suplementación dietética con AGPI w3 DHA y EPA en un modelo murino disminuye la velocidad de crecimiento tumoral, comparada con una dieta estándar.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de la suplementación dietética con AGPI w3 DHA y EPA, en la prevención y/o crecimiento tumoral en un modelo murino inoculado con una línea celular de Cá de mama (MDA MB 231).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la suplementación dietética con AGPI w3 DHA y EPA, en la velocidad de crecimiento tumoral en un modelo murino inmunodeficiente inoculado con una línea celular de Cá de mama (MDA MB 231).

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño: Estudio piloto experimental.

Cultivo Celular: El estudio se llevará a cabo con la línea celular de cáncer humano de mama MDA MB 231. Serán mantenidas en la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ en incubadores a 37 C, 100% de humedad y 5% de

CO₂: **Línea Celular:**

- Nombre: MDA-MD-231
- Descripción: Adenocarcinoma de mama de mujer caucásica de 51 años.
- Morfología: Epitelial Adherente
- Medio de Cultivo: Medio L-15 de Leibovitz + 2 mM GLUTAMINA + 10% Suero bovino fetal inactivado.
- Cultivo: Se incuban a 37°C y no necesitan CO₂. Cambiar el medio 2-3 veces por semana.
- Comentarios: Expresa receptoras para TGF alfa. Produce nódulos en ratones.

Experimentación *in vivo*: La experimentación *in vivo* se llevará a cabo con ratones hembras desnudos blancos (Foxn1nu) de fondo genético Balb/c, que presentan una inmunodeficiencia que permite la implantación de trasplantes alogénicos. Además de su deficiencia de linfocitos T, tienen un complemento normal de linfocitos B dependientes de la médula ósea. Dicho antecedente genético es importante ya que durante el experimento los animales podrían tener una respuesta variable al tratamiento.



Nude Mice

Figura 7. Ratón desnudo de la cepa Fox1nu/Fox1nu de fondo genético Balb/c

Criterios de Selección: El estudio se llevará a cabo con ratones desnudos hembras para emular las variaciones del ciclo hormonal femenino. Los animales se recibirán a los 19-21 días de su nacimiento para iniciar inmediatamente la alimentación (suplementada o estándar).

Criterios de Inclusión:

- Hembras.
- Edad: 19 – 21 días.
- Saludables

Criterios de Exclusión y Eliminación:

- Presencia de traumatismos y/o infecciones
- Que hayan sido víctimas a estrés conductual
- Incremento de peso anormal
- Animales que manifiesten dolor (Anexo1)

Ambiente:

Posé ventilación con presión positiva de aire en pasillos y cuartos, manteniendo las gradientes de presión, para evitar el ingreso de patógenos desde el exterior. La ventilación controla la humedad, calor y gases tóxicos. Se debe generar entre 15 a 20 recambios de aire / hora.

Temperatura dentro del cuarto es de 20 a 25°C

Humedad relativa ambiental: entre 40 y 70%.

Luz: artificial. La iluminación se distribuye adecuadamente a través de la sala de alojamiento. Se mantiene 12 horas luz/12 horas oscuridad, programado con un reloj temporizador; con el fin de evitar alteraciones en el ciclo circadiano y hormonales.

1ª Etapa (Estandarización):

1. Estandarización del número de células a inocular y el tiempo óptimo para la generación de una masa tumoral de al menos 3mm³ con la línea celular MDA MB 231. Para ello se inyectaron vía subcutánea un volumen de 100µL de la suspensión celular en medio RPMI sin rojo fenol y sin suero fetal bovino, con diferentes densidades de células: 1,500,000, 2,500,000, 3,000,000, 4,000,000, 5,000,000 y 10,000,000. Cada cantidad se inyectó en 5 ratones para probar su capacidad de formar tumor. Las células a inyectar se mantuvieron en condiciones estériles y fueron preparadas el mismo día que se practicó la inoculación.

Para su identificación los animales se marcaron con orificios en los pabellones auriculares. Se pesaron y revisaron para registrar la aparición de masas tumorales cada tercer día y se llevó un control de los incrementos en sus radios mayores y menores. El desarrollo de tumor se evaluará durante un periodo máximo de 3 semanas. La evaluación de la masa tumoral se determinó midiendo los diámetros máximos y mínimos del tumor. Estos se midieron tres veces por semana con un Vernier. El volumen del tumor se determinó con la fórmula: $L*W^2/2$. En su caso se aplicaron criterios de punto final (Anexo2)

Grupos: Cada grupo estuvo conformado por 5 animales

- Grupo 1: 1,500,000cels
 - Grupo 2: 2,500,000cels
 - Grupo 3: 3,000,000cels
 - Grupo 4: 4,000,000cels
 - Grupo 5: 5,000,000cels
 - Grupo 6: 10,000,000cels
2. Estandarización del método de preparación de alimento y cantidad de alimento consumido en promedio por caja. Se verificó que fuera agradable al paladar y digerible, así como la seguridad de la nueva preparación, verificando infecciones, evacuaciones y peso.

2ª Etapa (Intervención):

Al recibir los animales, inmediatamente se les asignó grupo (por caja de 5 animales) de forma aleatoria, las cajas se marcaron, así como cada ratón y se comenzó con la determinación de la masa corporal. Durante el proceso de pesado, las cajas se dejaron libre de comida, dejando solo el aporte de agua, el cual siempre fue *ad libitum*. Al terminar con cada caja, procedimos a la preparación del alimento.

Grupos: Cada grupo estuvo conformado por 10 animales (5 ratones por caja)

- Grupo Control: Dieta Estándar.
- Grupo Intervención: Dieta Suplementada desde el tiempo 0.

Preparación del Alimento: La dieta se preparó en el Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

1. Se licuaron 40g de alimento estándar para ratón, por caja. (Composición de Alimento Estándar para Ratón. Anexo3).
2. Se agregó AGPI ω 3 y se volvió a licuar, se sacó del vaso de licuadora y se mezcló homogéneamente con un mezclador eléctrico.
3. Finalmente se agregaron 15ml de agua estéril y se volvió a licuar para lograr una consistencia firme, pero de masa.
4. Ya lista la mezcla, se procedió a formar bolas pequeñas de alimento.

El alimento fresco se sirvió sobre la rejilla superior de la caja. Veinticuatro horas mas tarde, se limpió la comida, se midió el consumo del día y se ofreció comida

fresca con la intención de reducir cambios organolépticos y cambios en el ácido graso.

La masa corporal se midió cada tercer día hasta el final del estudio.

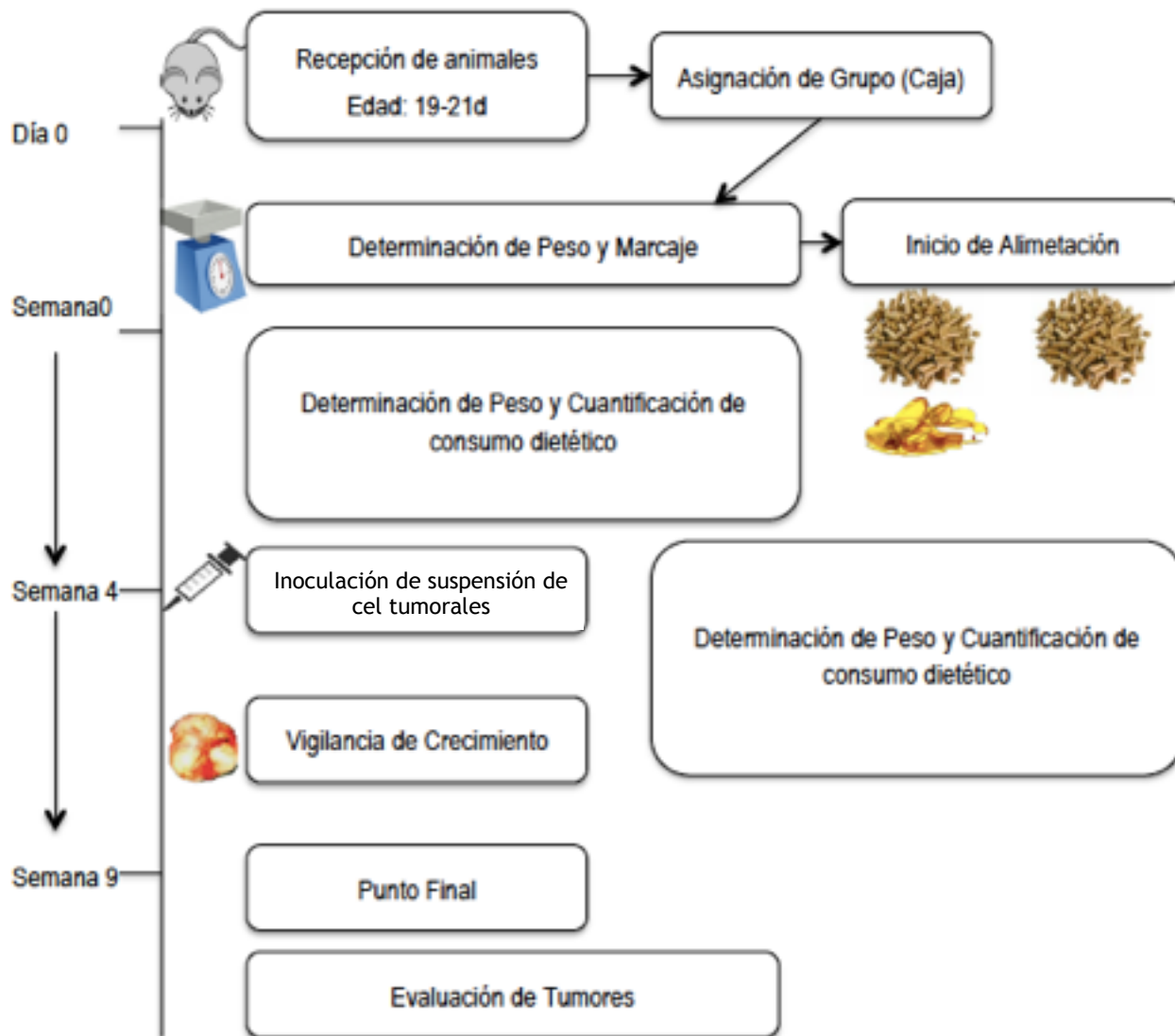
Inoculación de Tumor: Al pasar 4 cuatro semanas de haber iniciado la intervención, se inyectó la suspensión de la línea celular MDA-MB-231, vía subcutánea un volumen de 100uL de RPMI sin suero fetal bovino y sin rojo fenol, con una densidad celular de 5,000,000. Las células a inyectar se mantuvieron en condiciones estériles y se prepararon el mismo día que se practicó la inoculación.

Evaluación de masa tumoral y masa corporal: Cada ratón se pesó y revisó para registrar la aparición de masas tumorales cada tercer día y se llevó un control de los incrementos en sus radios mayores y menores.

La evaluación de la masa tumoral se determinó midiendo los diámetros máximos y mínimos del tumor. Estos fueron medidos tres veces por semana con un Vernier. El volumen del tumor se determinó con la fórmula: $L \cdot W^2 / 2$. En su caso se aplicaron criterios de punto final (Anexo 1)

Llegado al punto final, posterior a la necropsia se registró el peso húmedo del tumor. Las masas tumorales se fijaron con formalina para realizar estudios histopatológicos con tinción estándar de hematoxilina/ eosina.

Figura 8. Diseño Experimental



VARIABLES:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	UNIDAD	TIPO DE VARIABLE
PESO	Cantidad de materia en un objeto	Peso neto en condiciones estándar	g	Numérica Continua
DIETA	Régimen Alimentario	1. Suplementada 2. Estándar	NA	Ordinal Dicotómica
CONSUMO DIETÉTICO	Cantidad de alimento consumido	Gramos de alimento consumido en 24hrs	mg	Numérica Continua
TAMAÑO DEL TUMOR	Dimensión del Tumor	$L \cdot W^2/2$	mm ³	Numérica Continua
PESO TUMORAL	Masa del Tumor	Peso Neto del Tumor Húmedo	g	Numérica Continua

Figura 9. Variables y Definiciones

Análisis Estadístico: Se realizó estadística descriptiva utilizando Medias y DE. El volumen de los tumores control comparados con el volumen de los tumores de ratones suplementados en los mismos tiempos: t de Student para muestras no pareadas. El volumen de los tumores del grupo control se comparó en sus diferentes tiempos de desarrollo tumoral mediante el análisis estadístico del test t de Student para muestras pareadas. La misma prueba se utilizó para analizar el volumen de los tumores de los ratones suplementados de cada grupo experimental.

Consideraciones Éticas: Este protocolo fue elaborado de acuerdo con la guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council). Y fue sometido al Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos y Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y quedó registrado con el No. de registro CIIBH: BQO-1289-14/14-1.

RESULTADOS:

Fase I:

Experimentos de Densidad Celular para Generación de Tumor:

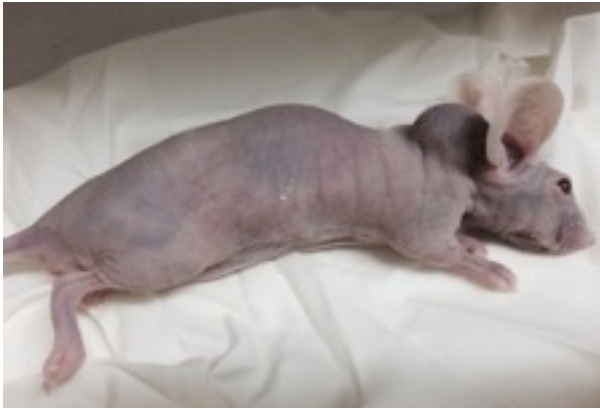
Posterior a la inoculación del tumor según la técnica descrita, decidimos sacrificar a los animales el día 28, ya que el grupo 6 desarrolló tumores muy grandes causantes de dolor. Se comparó el desarrollo y volumen tumoral en el día 28. Considerando los resultados, se eligió la cantidad de 5 millones de células/ratón (grupo 5).

Figura 10. Eficiencia tumorigénica de las células MDA-MB-231.

Panel superior: Tabla de incidencia.

Panel Inferior: Imágenes representativas de los tumores obtenidos después de 28 días.

Densidad Celular	No. de Raton es	No. Tumore s	Tiempo de aparición	Tamaño mm ³ (día 28)	Signos de Dolor	Ulceraci ón de Tumor
Grupo 1: 1,500,000cels	5	0	NA	NA	NA	NA
Grupo 2: 2,500,000cels	5	0	NA	NA	NA	NA
Grupo 3: 3,000,000cels	5	0	NA	NA	NA	NA
Grupo 4: 4,000,000cels	5	2	25 días	0.102	NO	NO
Grupo 5: 5,000,000cels	5	5	16 días	2.72	NO	NO
Grupo 6: 10,000,000cels	5	5	12 días	3.876	SI	SI (3)



Grupo 5: 5,000,000cels

Tiempo: día 28



Grupo 6: 10,000,000cels

Tiempo: día 28

Experimentos de Seguridad Alimentaria:

Este experimento se realizó con la intención de determinar la seguridad del alimento administrado.

Dos ratones de un total de 30, desarrollaron infección en el ojo, lo suficientemente importante como para ser sacrificado, sin embargo, creemos que dichas infecciones se debieron a un problema con el conducto de aire del cuarto, por lo que consideramos que el alimento es biológicamente seguro.

Figura 11. Valoración de la seguridad alimentaria.

Panel superior: Tabla de incidencia.

Panel Inferior: Imágenes representativas de sin infección ocular.

Densidad Celular	No. de Ratones	Infecciones	Diarrea	Vómito	Signos de Dolor
Grupo 1: 1,500,000cels	5	0	0	0	NO
Grupo 2: 2,500,000cels	5	1 (ojo)	0	0	NO
Grupo 3: 3,000,000cels	5	0	0	0	NO
Grupo 4: 4,000,000cels	5	1 (ojo)	0	0	NO
Grupo 5: 5,000,000cels	5	0	0	0	NO
Grupo 6: 10,000,000cels	5	0	0	0	NO



Fase II

Masa Corporal en Tiempos Clave:

Se determinó la masa corporal total de cada ratón con una báscula digital con capacidad para 2kg y precisión de 0.1g. Se realizó cada 3 días.

Grupo	Masa Corporal Semana 3 Media \pm DE (g)	Man-Max (g)	p
w3	13.7 \pm 1.1	12.5-15.1	0.69
Control	13.3 \pm 0.6	12.8-14.1	

Grupo	Masa Corporal Semana 9 (inoculación) Media \pm DE (g)	Mín-Max (g)	p
w3	24.9 \pm 0.3	24.6 -25.3	0.57
Control	25.7 \pm 0.5	25 – 26.2	

Grupo	Masa Corporal Semana 14 Media \pm DE (g)	Mín-Max (g)	p
w3	27.5 \pm 2.1	25.5 – 29.5	0.03
Control	33.8 \pm 2.6	31.3 -37	

Figura 12. Cambio de Masa Corporal a lo largo del periodo con dieta suplementada con w3. Se reporta la masa inicial a las 3 semanas, al momento de la inoculación con la suspensión de células tumores 5×10^6 células/ratón a las 9 semanas y cuando los tumores alcanzan su tamaño máximo a las 14 semanas. Los valores corresponden a promedio \pm DE.

Crecimiento Tumoral:

Se midió el largo y ancho del tumor con un Vernier metálico, con precisión de 1mm y para determinar el volumen tumoral se utilizó la fórmula $L \cdot W^2/2$. Se midieron cada 3 días, sin embargo se reportó semanalmente.

En el grupo control, todos los ratones (4/4) desarrollaron tumor, mientras que en el grupo w3 sólo dos ratones lo desarrollaron (2/4). El tamaño es significativamente mas grande en el grupo control. Esta diferencia en la que los tumores de los animales control fueron de 3.4 a 4.5g mas grandes que los de los animales con dieta suplementada con w3 y se mantuvo hasta la semana 11 y 14. En promedio los tumores de los animales del grupo control fueron 3.9 veces mas grandes.

Figura 13. Crecimiento tumoral en animales con dieta control o suplementada con w3.

Panel superior: Se presenta el volúmen tumoral evaluado a la semana(s) 11, 12, 13 y 14.

Panel Inferior: Imágenes de todos los animales sacrificados a las 14 semanas.

Grupo	No. Tumores Generados por Grupo	Media y DE (mm ³) S.11	Media y DE (mm ³) S.12	Media y DE (mm ³) S.13	Media y DE (mm ³) S.14
w3	2/4	0.22±0.26 (24%)	0.51±0.58 (27%)	0.84±0.98 (29%)	1.24±1.44 (22%)
Control	4/4	0.92±0.27 (100%) 4.1x	1.89±0.74 (100%) 3.7x	2.89±1.26 (100%) 3.4x	5.54±3.19 (100%) 4.5x
p	-	0.029	0.029	0.057	0.029



- A. Grupo con Dieta suplementada con AGPI w3
- B. Grupo con Dieta Control

DISCUSIÓN:

Nuestros resultados muestran una disminución clara en el crecimiento tumoral, tras la implantación de una línea de Ca. de mama en ratones Nu/Nu que tuvieron una dieta con suplementación de ácidos grasos w3 vs aquellos alimentados con una dieta convencional.

Estos hallazgos son compatibles con los reportados previamente por otros grupos, quienes observaron una reducción en la incidencia tumoral en ratones transgénicos negativos para receptor de estrógenos MMTV-HER-2/neu^{42,46}, el modelo de rata NMU receptor de estrógeno positivo, y el modelo de rata DMBA receptor de estrógenos positivo.²⁷

El cáncer es un proceso multifactorial y complejo, relacionado con factores endógenos, pero también con factores exógenos como el estilo de vida, dentro del cual vemos que la actividad física, composición corporal y la dieta, juegan un papel importante. En cáncer de mama, la evidencia epidemiológica no es contundente, sin embargo, cada vez hay más datos de estudios preclínicos que apoyan el hecho que los factores dietéticos tienen un papel importante en el desarrollo y prevención de este tipo de cáncer.

Pensando en la traducción de nuestros resultados a seres humanos, es importante señalar que la dosis requerida para lograr un efecto benéfico no ha quedado bien establecida, a pesar de otros estudios previos con modelos diferentes pero con resultados similares al nuestro. Esto se ve complicado aún más, ya que entre estudios varían las especies utilizadas, las fuente de AGPI w3, combinación de ácidos grasos, vía y tiempo de administración. En el caso particular de este estudio, se resalta la importancia de la suplementación temprana ya que la inclusión de estos ácidos grasos en la dieta se dio desde temprana edad; a partirse los 21 días de vida.

Aunque los efectos observados han sido prometedores, determinar los mecanismos por los cuales los AGPI w3 son capaces de mediar la inhibición de

carcinogénesis mamaria, requiere de mayor investigación, y escapa de los objetivos de este estudio piloto.

Los mecanismos de acción por los cuales estos ácidos grasos tienen un efecto benéfico en el desarrollo y crecimiento de cáncer de mama, han sido objeto de estudio previamente, sin embargo aún no han quedado bien establecidos. Estudios en animales e *in vitro*, muestran que se ven implicados en varias vías complejas relacionadas con carcinogénesis, proliferación y muerte celular, observando que los AGPI w3 pudieran ser efectivos en interrumpir estos procesos.

Por otro lado, existen factores de riesgo a nivel sistémico que pudieran alterarse en pacientes con dietas ricas en AGPI w3 y que pudieran reducir el riesgo de cáncer de mama:

- Dietas elevadas en densidad energética, entre otros muchos factores, reducen la edad de menarca; y la menarca temprana es un factor de riesgo bien establecido para cáncer de mama.
- Niveles altos de estrógenos endógenos después de la menopausia es un factor de riesgo para cáncer de mama. Existe relación entre la grasa dietética y la producción endógena estrogénica. Dietas bajas en grasa generalmente se asocian con un alto consumo de fibra, la cual puede ayudar a reducir la absorción intestinal de dichos estrógenos. En mujeres premenopáusicas, existe poca evidencia con respecto a los niveles estrogénicos en suero, consumo de grasa y riesgo de cáncer de mama.
- Un mecanismo alternativo por el cual los ácidos grasos de la dieta pueden influir los niveles de hormonas esteroideas es que el incremento de los ácidos grasos libres en el suero pueden desplazar el estradiol de la albúmina, incrementando las concentraciones libres de estradiol. Sin embargo, las concentraciones séricas de globulina de unión a hormonas esteroideas son más determinantes en la proporción de estradiol que puede entrar en las células epiteliales de la mama. Los niveles de estas globulinas disminuyen con el incremento en el IMC y la resistencia a la insulina.

En el caso de nuestro estudio, a pesar que existió una diferencia en el peso de los ratones, esta se observó posterior a la implantación del tumor, por lo cual no habría que suponer que una diferencia previa en el peso fue la causante del resultado benéfico obtenido.

Es importante señalar que en este experimento se utilizó una línea celular humana triple negativo (MDA-MB-231), la cual se caracteriza por ser un tumor más agresivo, y esto en cierto sentido exalta la importancia de nuestros resultados. Por otro lado, la falta de expresión de Her2/Neu en estos tumores, obliga a pensar que por lo menos en este modelo el mecanismo de acción de los AGPI ω 3 no involucra vías de señalización dependiente ni de Her2/Neu ni del receptor de estrógeno alfa (ER2) o del receptor de progesterona beta (PRb).

Nuestro estudio no permite establecer un potencial efecto adyuvante de los ácidos grasos ω 3 en el tratamiento del Ca. de mama, sin embargo, el potencial de utilizar una estrategia nutricional, que ayude a eliminar células malignas, sin dañar células normales o sanas, representa una ventana de oportunidad para coadyuvar con el tratamiento médico sin incrementar la toxicidad, para esto es necesario entender con mayor detalle los mecanismos de acción, y experimentos adicionales que permitan explorar esa posibilidad.

Para establecer claramente el papel de la suplementación con ácidos grasos ω 3 en la dieta como prevención de cáncer se requieren ensayos clínicos aleatorizados grandes y estudios epidemiológicos, sin embargo, es importante señalar que estos son difíciles de controlar por el número tan grande de factores y variables implicados. A pesar de esto, como profesionales de la salud, la prevención del cáncer es una tarea importante, que debe constituir una prioridad para todos los que trabajan en beneficio del interés público en los ámbitos internacional, nacional y comunitario. Los estilos de vida saludable, entre ellos la buena alimentación y la actividad física, pueden desempeñar un papel trascendental en la prevención. La información provista por este tipo de ensayos experimentales, y que sugiere una interacción gen-nutrimiento, de gran importancia en la patología de la glándula mamaria, puede contribuir con la medicina preventiva.

Esto los propone como excelentes candidatos para estudios de prevención primaria y secundaria en pacientes con riesgo alto, así como en sobrevivientes de cáncer.

ANEXO 1: CRITERIOS DE DOLOR Y EUTANASIA

Categoría	Signos	Valoración	Puntuación				
Peso corporal	Normal	0					
	< 9% pérdida	1					
	10-15% pérdida	3					
	> 16% pérdida	8					
Apariencia	Normal	0					
	Acicalado pobre	1					
	Pelaje descuidado, descarga nasal/ocular, diarrea	3					
	Pelaje mal estado, postura anormal, anemia, ictericia, hemorragia	6					
	Midriasis, cianosis, signos nerviosos centrales, letargia marcada y persistente	7					
Constantes vitales	Normal	0					
	Modificaciones escasas	1					
	Cambio temperatura 1-2°C, taquicardia/taquipnea > 30%	2					
	Cambio de temperatura > 2°C, taquicardia/taquipnea > 50% o muy reducida	8					
Comportamiento espontáneo	Normal	0					
	Cambios leves	1					
	Anormal, movilidad reducida, alerta reducida, inactivo	4					
	Vocalización, automutilación, inmóvil	8					
	Tembor cabeza, trémor, espasticidad, parálisis, convulsión, marcha en círculos, ataxia	10					
Comportamiento en respuesta a estímulos	Normal	0					
	Depresión leve o respuesta exagerada	1					
	Respuestas anormales moderadas	3					
	Reacciones violentas, convulsiones o coma	10					
RATA Peso/tamaño tumor	<i>Peso corporal (gr)/Diámetro (cm)</i>						
	500	400	300	200	100 gr		
	2,0	1,8	1,8	1,3	1,1 cm	2	
	4,0	3,6	3,0	2,6	2,3 cm	5	
	6,0	5,5	4,5	4,0	3,5 cm	10	
RATÓN Peso/tamaño tumor	<i>Peso corporal (gr)/Diámetro (cm)</i>						
		75	50	25 gr			
		1,0	0,8	0,7 cm		2	
		2,0	1,7	1,4 cm		5	
		3,0	2,5	2,0 cm		10	
TOTAL							

* Eutanasia recomendada si > 10 puntos

ANEXO 2: CRITERIOS PARA PUNTO FINAL

El criterio para evaluar el desarrollo de tumor tendrá punto final cuando el ratón presente alguna de las siguientes características:

- Disminución de masa corporal de >20%.
- Se observe falta de movilidad, letargia u otros cambios semejantes en el comportamiento.
- Hayan transcurrido 8 semanas después de la inoculación.
- Crecimiento de la masa tumoral sea mayor al 5% del peso corporal del animal
(aproximadamente 17 mm).
- Presencia de trauma autoinflingido.
- Cuando la palpación del tumor induce respuesta dolorosa.
- En el caso de tumores superficiales: presencia de ulceración, necrosis o infección.
- Ulceración de tumor.

La eutanasia se practicará con anestésico inhalado en altas concentraciones dentro de una cámara dedicada a este procedimiento con el fin de causar depresión cardiorrespiratoria y evitar prolongar el dolor en los animales.

Los cadáveres primero se almacenarán en bolsas sellables y bolsa para residuos sólidos patológicos y se entregarán a quien corresponda para su desecho.

ANEXO 3: COMPOSICIÓN DE ALIMENTO ESTÁNDAR PARA RATÓN

Componente	Porcentaje
Proteína cruda (caseína, metionina,	20%
Grasa cruda (aceite de maíz)	9.81%
Fibra cruda (dextrosa, pectina o celulosa)	2.15%
Cenizas (vitaminas)	6.20%
Consumo diario de alimento	3-6g
Consumo diario de agua	Libre

Fuente: Bioterio Central - INS 2000

Fuente: Bioterio Central - INS 2000

Esta debe cubrir las necesidades de crecimiento, gestación, lactancia y mantenimiento del ratón. Se revisará que el alimento tenga fecha de elaboración, caducidad y certificado de análisis químico proximal y microbiológico por cada lote, para comprobación de ser un alimento libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes patógenos.

Provisión de Agua:

Ad Libitum. Debe ser renovada en forma total cada dos días, eliminando todo contenido residual del frasco de bebida. Y los frascos de bebida deberán ser lavados y desinfectados por lo menos una vez por semana, los picos serán observados y lavados con cepillo periódicamente para evitar el taponamiento.



Fuente: Biotero Central – CNPD del INS. 2007



Fuente: Biotero Central – CNPD del INS. 2007

REFERENCIAS:

1. Informe mundial sobre el cáncer 2014, International Agency for Research on Cancer.
2. Perfil Epidemiológico de los Tumores Malignos en México. Secretaría de Salud. Subsecretaría de prevención y promoción de la salud. Dirección General de Epidemiología. Registro Nacional de Cancer. 2003
3. Organización Mundial de la Salud. La incidencia mundial del cáncer podría aumentar en un 50% y llegar a 15 millones de nuevos casos en el año 2020. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/es/>
4. Parkin, D.M., F.I. Bray, and S.S. Devesa, Cancer burden in the year 2000. The global picture.
5. Eur J Cancer, 2001. 37 Suppl 8: p. S4-66.
6. Compendio de Cáncer/ RHNM / Morbilidad/ Mortalidad. Registro Histopatológico de neoplasias Malignas 2005.
7. Parkin, D.M., et al., Global cancer statistics, 2002.CA Cancer J Clin, 2005. 55(2): p. 74-108.
8. Bray, F., P. McCarron, and D.M. Parkin, The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast Cancer Res, 2004. 6(6): p. 229-39.
9. American Cancer Society. Cáncer de Seno.
10. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002284-pdf.pdf>
11. Procedimientos medicoquirúrgicos. Manual de Oncología. Instituto Nacional de Cancerología.
12. Segunda Edición. Mc Graw Hill. 2004.
13. Holmberg L, Anderson H. HABITS (Hormonal replacement therapy after breast cáncer. Is it safe?), a randomised comparison: trial stopped. Lancet. 2004;363:453–455.
14. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Practice Guidelines in Oncology: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Version 1.2012. www.nccn.org

15. Olsson HL, Ingvar C, Bladstrom A. Hormone replacement therapy containing progestins and given continuously increases breast carcinoma risk in Sweden. *Cancer*. 2003; 97:1387–1392.
16. Food, Nutrition, Physical Activity and the prevention of Cancer: A Global Perspective, del World Cancer Research Fund International/ American Institute for Cancer Research 2007
17. Preetha Anand . Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 9, September 2008
18. Palmer S. Diet, nutrition, and cancer. *Prog Food Nutr Sci*. 1985;9(3-4):283-341.
19. Rogers AE, et al. Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1993 Nov;14(11): 2205-17.
20. Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, et al. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST).
21. *Int J Cancer* 2006;118:2559-66.
22. Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:235-56.
23. International Agency for Research on Cancer. 2002. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. In: IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum no 82.
24. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/volume82.pdf>.
25. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, United Nations Environment Programme International. 1999. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/meetings/mycotoxins_report_en.pdf.
26. Rossi RE. The role of dietary factors in prevention and progression of breast cancer. *Anticancer Res*.
27. 2014 Dec;34(12):6861-75.
28. Burgaz S, Torun M, Yardim S, et al. Serum carotenoids and uric acid levels in relation to cancer. *J Clin Pharm Ther* 1996;21:331-6.
29. Finley JW. Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Ann Bot (Lond)* 2005;95:1075-96.

30. World Health Organization. 2003. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases: Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. In: WHO Technical Report Series no 916.
31. <http://www.who.int/entity/dietphysicalactivity/publications/trs916/download/en/index.html>.
32. Astorg P. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Causes Control* 2004;15(4):367–86.
33. Gutt CN, et al. Dietary omega-3-polyunsaturated fatty acids prevent the development of metastases of colon carcinoma in rat liver. *Eur J Nutr* 2007;46(5): 279–85.
34. Hilakivi-Clarke L, et al. Mechanisms mediating the effects of prepubertal (n-3) polyunsaturated fatty acid diet on breast cancer risk in rats. *J Nutr* 2005;135(Suppl. 12):2946–52S.
35. Belitz, G. 1997. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1087 p.
36. Food and Agriculture Organization. *Fats and fatty acids in human nutrition Report of an expert consultation*. Rome, 2010.
37. Ziller, S. 1996. *Grasas y aceites alimentarios*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 71 p.
38. Holub, B.J. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *CMAJ*. 166: 608-615, 2002.
39. DHA/EPA Omega-3 Institute. www.dhaomega3.org
40. Fabian et al. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Research* (2015) 17:62
41. Halliwell, S. et al. “Review Article. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*. Volume 2012, Article ID 137289.
42. Jiang W, et al. Identification of a Molecular Signature Underlying Inhibition of Mammary Carcinoma Growth by Dietary N-3 Fatty Acids. *Cancer Res*; 72(15); 3795–806. !2012 AACR.
43. Signori C. et al. Chemoprevention of Breast Cancer by Fish Oil in Preclinical Models: Trials and Tribulations. *Cancer Res*; 71(19) October 1, 2011

44. Calviello G. et.al. Antineoplastic Effects of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Combination With Drugs and Radiotherapy: Preventive and Therapeutic Strategies. *Nutrition and Cancer*, 61(3), 287–301
45. Merendino N. Dietary ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA: A Potential Adjuvant in the Treatment of Cancer. *BioMed Research International* Volume 2013.
46. Jeong et al. Docosahexaenoic acid-induced apoptosis is mediated by activation of mitogenactivated protein kinases in human cancer cells. *BMC Cancer* 2014, 14:481
47. Luch A. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005;5:113-25.
48. Rogers AE, et.al. Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1993 Nov;14(11): 2205-17.
49. Sterlan S. et al. Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12): 4990-7.
50. Manna S. et.al. Fish oil regulates cell proliferation, protect DNA damages and decrease HER2/neu and c-Myc protein expression in rat mammary carcinogenesis. *Clinical Nutrition* 29 (2010) 531–537.
51. Zahid H. Siddik. Checkpoint Controls and Targets in Cancer Therapy. P. 148-150. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. ISBN 978-1-60761-177-6
52. Zou Z. et.al. Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice, *Journal of Lipid Research* Volume 54, 2013.
53. Yee L. et.al. Dietary (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit HER-2/neu-Induced Breast Cancer in Mice Independently of the PPAR Ligand Rosiglitazone. *J. Nutr.* 135: 983–988, 2005.
54. Leslie et al. Mammary tumour development is dose-dependently inhibited by n-3 polyunsaturated fatty acids in the MMTV-neu (ndl)-YD5 transgenic mouse model. *Lipids in Health and Disease* 2014, 13:96
55. Menendez JA, et.al. Exogenous supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) synergistically

enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells. Eur J Cancer Prev. 2005 Jun;14(3):263-70.