

“EFECTO DE LA INGESTA DE RETINOL EN RATONES ALBINOS CON CÁNCER INDUCIDO”

Elena R. Benavides R., Eloísa M. Hernández F.,
Augusto M. Reyes C., Mariel Moore D.

Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la ingesta dietaria de retinol en 80 ratones albinos hembras, cepa Balb C53, inoculados vía subcutánea con Sarcoma 180. La dosis ensayada, 200 UI/día, previamente determinada en 10 de los ratones; fue administrada por vía oral. Para medir el efecto, se evaluaron tres parámetros: a) la concentración hepática de catalasa en tres grupos de ratones: 1) ratones sanos con dieta basal, 2) ratones inoculados con dieta basal, y 3) ratones inoculados con dieta suplementada con retinol; b) la supervivencia de los animales inoculados con sarcoma y divididos en los grupos A (dieta basal) y B (dieta suplementada con retinol) y c) el desarrollo del tumor. Los resultados indican una diferencia significativa entre la actividad de catalasa del grupo 2 (Act. prom.= 8,904) con relación al grupo 1 (Act. prom = 16,878); a diferencia del grupo 3 (Act. Prom = 12,778) con relación al grupo 1 (Act. Prom = 16,878). Un incremento en el tiempo de supervivencia en los ratones que ingerían la dieta suplementada con retinol (56 días) con respecto a los que ingerían la dieta basal (38 días). Con relación al desarrollo del tumor, la diferencia de peso, entre los animales inoculados que ingerían la dieta suplementada y los animales que ingerían la dieta basal, fue de 0,28 pero no significativa. Lo cual indica que el retinol cumple un rol antioxidante, evitando que disminuya la concentración de catalasa e incrementando significativamente el período de supervivencia.

Palabras clave: retinol y cáncer, sarcoma 180 y retinol, supervivencia-retinol, retinol-catalasa.

SUMMARY

The current study is an evaluation of Vitamin A supplement diet in female white mice Balb C53 inoculated with Sarcoma 180. The oral administration of a dose of 200 IU per day of Vitamin A in mice inoculated with sarcoma and divided in two groups, obtained a greater group B (vitamin A supplemented diet) mice survival curve than group A (normal diet) mice survival curve; however more studies are necessary to get a statistical significance. Liver concentration of catalasa was also quantified in three groups of mice: (1) healthy mice with normal diet; (2) sarcoma inoculated mice with normal diet; an (3) sarcoma inoculated mice with vitamin A supplement diet. It showed a significant difference of concentration of catalasa in group 2 in relation to group 1, unlike group 3 in relation to group 1. All it indicates to us vitamin A anti-oxidant action, avoiding that the enzyme levels decreases. To determinate a possible existence of tumor expand inhibition related to vitamin A ingestion, a monitoring of the evolution of the tumor was made; registering group A and group B mice weights in different intervals until 22 days. Statistical difference didn't be finding.

Keywords: retinol, cáncer, sarcoma 180, survival, catalasa, Kaplan-Meier

Introducción

El cáncer y la enfermedad cardiovascular constituyen dos problemas importantes de salud humana causantes del mayor número de muertes prematuras (1), por lo que su prevención es un objetivo de máximo interés. Los mecanismos en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer incluyen: la generación de derivados tóxicos del oxígeno llamados “radicales libres”; y el daño de las membranas celulares causados por la interacción de ciertas grasas con el oxígeno para formar peróxidos (peroxidación lipí-

dica) (4,5). Se ha descubierto que muchos componentes bioactivos que se encuentran en los alimentos como vitaminas antioxidantes, minerales y ciertos ácidos grasos esenciales, pueden prevenir o neutralizar el daño causado por los radicales libres (1,3,6,8). Pero aún no se ha demostrado si la carencia de estos componentes predispone al cáncer o si su uso frecuente evita la adquisición de este mal(9). Evaluar el efecto del retinol sobre: la actividad de la catalasa, el tiempo de supervivencia y sobre el crecimiento de la masa tumoral son los objetivos de la presente investigación.

MATERIALES Y MÉTODO

Es un diseño experimental de tipo longitudinal.

Animales de experimentación 95 ratones albinos hembras consanguíneos cepa Balb C53, de 4 semanas de nacidas, peso promedio 20 g procedentes del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Salud (INS); se mantuvieron en jaulas de polietileno de alta densidad en ambiente a temperatura 23 ± 2 °C, humedad relativa $50 \pm 5\%$ y ciclo de 12 horas de luz / oscuridad. Su alimento basal elaborado por el departamento de Nutrición de la Facultad de Zootecnia de la UNALM, a base de torta de soya, harina de trigo, aminoácidos sintéticos y antifúngico, tenía la siguiente composición %: Proteínas 19,33; Humedad 12,68 ; Grasa 04,33 ; Fibra 02,83; Cenizas 04,80; Extracto libre de nitrógeno (ELN) 56,03. El Agua y el alimento eran libremente disponibles.

Implante celular del Sarcoma 180. Las células del Sarcoma fueron proporcionadas por el NAMRID (Naval Medical Research Institute Detachment de Lima - Perú), el implante se realizó por vía intraperitoneal con jeringa para insulina 27Gx1/2", el volumen de inoculación fue de 0,5 mL.

Determinación de la dosis a emplear. A 10 de los ratones, divididos en subgrupos de 2 ratones cada uno, se les administró el retinol 100 000 UI frasco x 10mL. en diferentes concentraciones.

Fundamento. Se tomó como referencia la dosis suplementaria recomendada de vitamina A, en caso de enfermedad, para un grupo etéreo determinado (17), resultante de comparar la esperanza de vida del hombre adulto promedio (23) versus la esperanza de vida del ratón común (24). Adicionalmente, se tomó como referencia la dosis por peso, extrapolándola al peso de los ratones por regla de tres simple.

Procedimiento. La dosis referencial administrada a los ratones, se determinó de la siguiente manera:

La esperanza promedio de vida de un humano es de 64 años (23) y la de un ratón es de 3 años (24); entonces, el tiempo de vida de un ratón de 1 mes de nacido equivale a un humano de 21,3 meses de edad. Por consiguiente, la dosis requerida para los ratones sería la utilizada para un niño de 7,1 años. Si el peso promedio de un humano a esa edad es

de 22 kilos (27) y el del ratón es de 22 g, aproximadamente; entonces, la proporción de dosis es de 1000:1 (hombre/ratón). Por lo tanto, la dosis aproximada probable es de 200 UI de vit. A, la cual se tomó como referencia para utilizar cinco dosis de 5, 50, 200, 1000 y 2000 UI Vit. A

Efecto de la ingesta de retinol sobre la actividad de la catalasa Fundamento. La catalasa es una enzima oxido-reductasa que tiene como función neutralizar al peróxido de hidrógeno, produciendo oxígeno molecular y agua $10: \text{Catalasa} + 2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{Catalasa}$. Según H. U. Bergmeyer (16), la absorción ultravioleta de una solución de peróxido de hidrógeno puede ser fácilmente medida a 240 nm. Durante la descomposición del peróxido con catalasa, la absorción decrece con el tiempo y a partir de esa disminución, la actividad de la enzima puede ser calculada. Una unidad de catalasa descompone una micromol de peróxido por minuto a 25 °C y pH 7,0 bajo condiciones específicas (12). En consecuencia, a partir de la absorción del peróxido, la actividad de la enzima puede ser calculada. La determinación de la variación de absorbancia por minuto se obtiene tomando las primeras tres variaciones de lectura semejantes o que sean iguales para luego promediarlas y obtener la variación de absorbancia por cada 15 segundos y luego, multiplicarla por 4 para obtener la variación de absorbancia por minuto. Se aplica la siguiente relación:

Donde:

$$U \text{ CAT/mg muestra} = \frac{(\Delta A/\text{min.}) \times 1000}{\epsilon \times \text{mg de muestra} \times \text{ml de solución reactiva}}$$

$\Delta A/\text{min}$: Variación de absorbancia por minuto

ϵ : Coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno (240nm = $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Procedimiento. Se trabajó con 15 ratones distribuidos en 3 grupos de 5 ratones cada uno:

- Grupo Control. Compuesto por animales no inoculados que reciben dieta basal.
- Grupo Sarcoma. Compuesto por animales inoculados que reciben la dieta basal.
- Grupo Sarc.+ Retinol. Compuesto por animales inoculados con dieta suplementada con retinol.

Al décimo día de prueba, los animales se sacrificaron y se les extrajo el hígado; 15 g de éste se homogeneizaron sobre hielo con el equipo Elvenjheim

Potem. El homogeneizado fue centrifugado a 1000 rpm x 10 minutos. El sobrenadante se diluyó 1:1 con buffer fosfato 0,05 M, pH 7. Se continuó con el desarrollo de la técnica analítica.

Evaluación del tiempo de supervivencia por método de Kaplan-Meier

Fundamento. El periodo de vida es determinado desde la fecha de inoculación de células del tumor hasta que ocurre la muerte del animal, llamado también tiempo de falla (t). El análisis de supervivencia mide el riesgo de ocurrencia del evento (muerte) en función del tiempo. La curva de supervivencia que describe esta función decrece desde un máximo de 1 cuando t es igual a 0; cada vez que se registra un evento, terminando en una figura que tiene la forma de una escalera(32).

Procedimiento. 70 de los animales fueron distribuidos como sigue:

Grupo Basal. 10 ratones no inoculados que reciben dieta basal.

Grupo Control. 20 ratones inoculados que recibieron una dieta basal.

Grupo Experimental. 40 ratones inoculados que recibieron dieta suplementada con RETINOL (en la dosis determinada en la primera etapa). En todos los casos, se anotó el tiempo de vida desde la inoculación del sarcoma hasta la muerte del animal. Anotados los tiempos se efectuarán curvas de supervivencia empleando las gráficas de Kaplan Meier, además de elaborar una tabla que debe contener columnas que denoten el tiempo de falla (t), y se entienda las definiciones siguientes:

Número de fallas (muertes) hasta ese tiempo (Ft), número de ratones que permanecen en riesgo (sobreviven) hasta el tiempo (Rt), proporción de supervivencia al tiempo ($1-Ft/RT$), estimado de supervivencia en cada tiempo de falla (St).

Evaluación del crecimiento de la masa tumoral

Fundamento. Los ratones inoculados con células del Sarcoma, desarrollan un tumor con abundante proliferación celular y formación de líquido ascítico, lo que produce un incremento del peso de los mismos.

Procedimiento. A los ratones del experimento anterior divididos en los grupos A y B de 20 ratones cada uno se les hizo un seguimiento del desarrollo del sarcoma implantado. A las 24, 72, 96 y 120 horas, se anotaron los pesos respectivos y se procedió al análisis estadístico.

RESULTADOS

Determinación de la dosis a emplear de vitamina A

La administración del retinol fue por un periodo de 5 días y en todos los casos se tomó el peso de cada ratón, anotándose las diferencias encontradas. De los pesos obtenidos en la Tabla N.º 1, se puede observar en las respectivas gráficas, que hubo similitud en la tendencia de las curvas, lo que sugiere que el uso de la dosis de 200 UI vit.A no causará alteraciones en nuestra población de ratones.

Tabla N.º 1. Análisis de pesos para determinación de la dosis de vitamina A

Dosis	Ratón	Peso (g)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
20000 UI	r1	25.6	26.3	27.8	29.5
	r2	31.4	30.7	32.5	33.5
1000 UI	r3	26.5	26.1	27.4	28.6
	r4	29.6	29.0	31.2	33.0
200 UI	r5	23.5	23.0	24.4	25.6
	r6	27.8	26.3	29.4	29.8
50 UI	r7	30.2	29.6	30.4	31.2
	r8	31.4	31.3	33.2	33.5
5 UI	r9	33.8	32.8	33.8	33.8
	r10	30.2	29.9	31.7	31.5

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA VITAMINA A SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA Los resultados obtenidos por cada grupo se aprecian en la Tabla N.º 2.

El análisis estadístico demuestra que: La diferencia entre las medias del grupo control (16,878 U CAT/ml muestra) y el grupo con Sarcoma (8,904 U CAT/ml muestra) es significativa ($p < 0,05$). La diferencia entre las medias del grupo control (16,878 U CAT/ml muestra) y el grupo con Sarcoma+vit.A (12,778 U CAT/ml muestra) no es significativa ($p > 0,05$). La diferencia

Tabla N.º 2. Determinación de la actividad específica de Catalasa.

Nº de ratones	Actividad Específica de Catalasa (U. de CAT/ mg de muestra)		
	control	Sarcoma	Sarcoma+vit.A
	18.34	11.51	12.84
	22.02	11.01	12.48
	11.01	9.17	11.05
	18.35	7.33	14.68
	14.67	5.5	12.84
Prom.	16.878	8.904	12.778
Desv. St.,	4.18489	2.51803	1.2942
Error St.	1.8715	1.1261	0.5788

entre las medias del grupo con Sarcoma (8,904 U CAT/ml muestra) y el grupo con Sarcoma + vit.A (12,778 U CAT/ml muestra) no es significativa ($p > 0,05$).

EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

En el Gráfico N.º 3 se observa que el tiempo de vida para el grupo con dieta suplementada es mayor que el grupo con dieta basal.

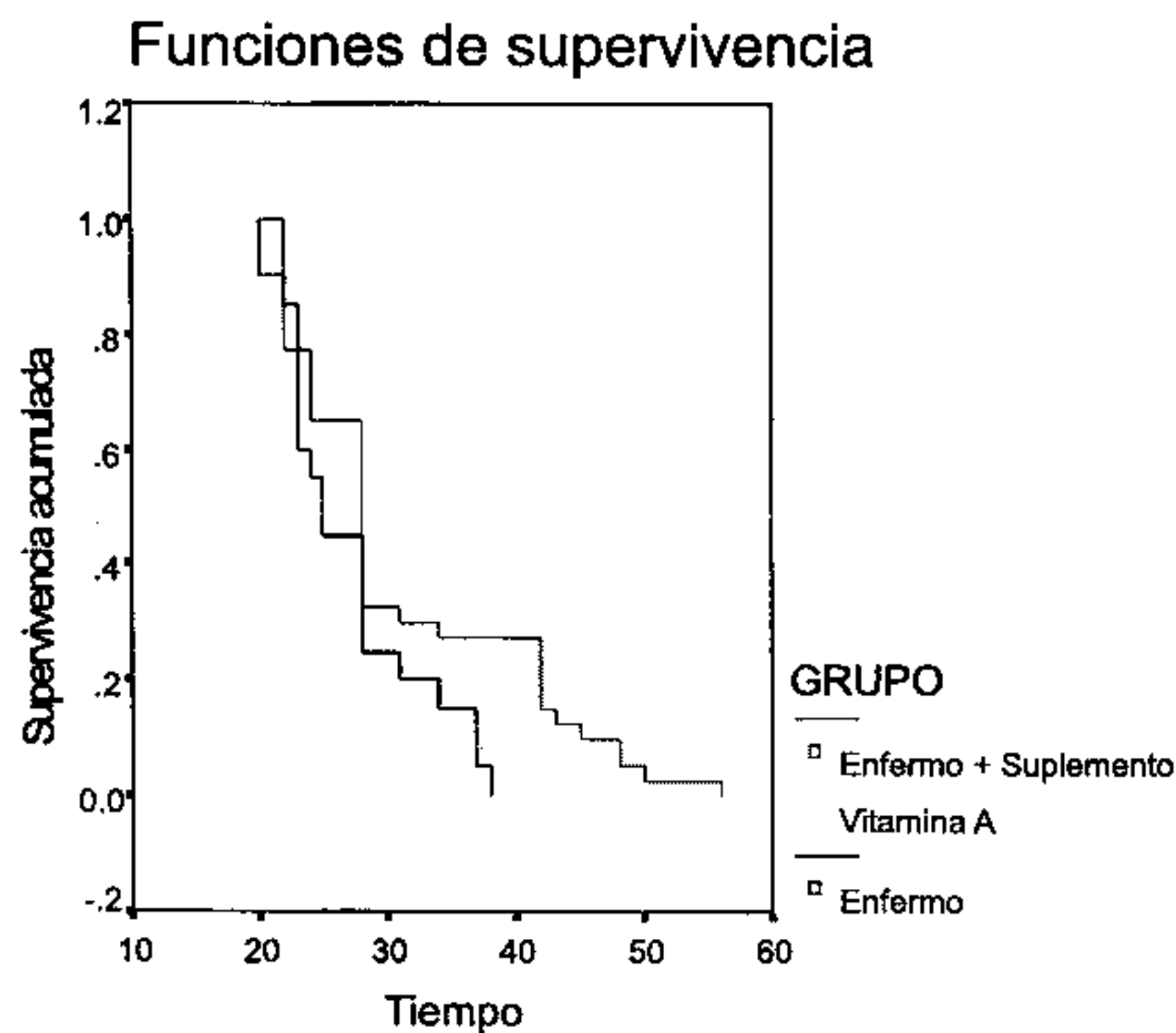


Gráfico N.º 3. Curva de supervivencia en dos grupos de ratones.

Se observa que las diferencias entre los valores de las medias del grupo A (1,95) y del grupo B (2,23) no son significativas.

CRECIMIENTO DE LA MASA TUMORAL. En la Tabla N.º 3 se aprecian los datos de los incrementos de peso de los ratones de cada uno de los grupos. Del análisis estadístico, se obtuvo que el incremento de peso fue de $1,95 \pm 1,92$ y $2,23 \pm 0,796$ para los grupos A y B, respectivamente, y no existiendo significancia en ambos grupos.

Tabla N.º 3. Incremento del peso en los ratones.

N.º de ratones	Incremento de pesos (g)	
	Grupo A	Grupo B
1	2.29	3.29
2	4.00	1.86
3	2.86	2.86
4	0.14	2.00
5	1.43	2.43
6	1.86	2.14
7	-2.86	3.43
8	1.86	2.86
9	2.57	3.14
10	1.86	3.14
11	4.29	2.29
12	3.14	2.71
13	3.00	1.57
14	-3.14	2.00
15	2.00	1.71
16	2.43	0.57
17	3.14	2.57
18	2.14	2.14
19	3.00	0.71
20	3.00	1.14
Prom.	1.95	2.23

Discusión. La inoculación de células tumorales y su desarrollo, en los animales de experimentación generan la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), tales como superóxido, radicales hidroxilo, complejo hierro-oxígeno, peróxido de hidrógeno, peróxidos lipídicos, etc. Estas especies ocasionan el llamado "estrés oxidativo" y conducen a la disminución de la concentración de las enzimas del sistema antioxidante natural, una de ellas es la Catalasa.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es estrictamente un ERO, pero por su capacidad de generar el OH- en presencia de metales como el hierro, se le incorpora como tal. En este estudio, la inoculación de las células del sarcoma 180 causó un incremento de la actividad de la catalasa para remover los metabolitos generados por el estrés oxidativo; hecho observado por la disminución de su concentración en hígado, que es uno de los tejidos en el cual se almacena. Así, los ratones inoculados con Sarcoma y que ingerían la dieta basal muestran una baja concentración hepática de catalasa () en comparación con los ratones no inoculados y con dieta basal (). En cambio, en los ratones inoculados con Sarcoma y que ingerían la dieta suplementada con 200 UI de retinol se observó mayores niveles en la concentración de la enzima catalasa () (Tablas N.ºs 2 y 3). Este resultado evidencia el efecto antioxidante del retinol, que redundó en una mejor calidad de vida del animal experimental.

La evaluación de la supervivencia indicó un mayor tiempo de vida para los ratones inoculados que ingerían la dieta suplementada con retinol (56 días) en comparación con los 38 días de vida de aquellos ratones con dieta basal. La propiedad inmunoestimuladora de los nutrientes antioxidantes que protege contra el daño celular debido a las ERO 30,31 explicaría la prevención o reducción del riesgo de muerte celular aquí observada, a juzgar por la prueba de Log Rango³² aplicado para detectar la diferencia (gráfico); ésta fue significativa ($p : 0.0233$). Sin embargo, cuando se aplican las pruebas de Breslow y Tarone-Ware⁽³²⁾, las diferencias entre los tiempos no son estadísticamente significativas (0.1569 y 0.0776, respectivamente). Si bien se puede aplicar una prueba, lo ideal sería que los tres converjan en un mismo resultado. Con respecto al crecimiento del Sarcoma 180, el análisis de la variación de pesos entre ambos grupos permite afirmar que la ingesta de retinol no tuvo efec-

to en inhibir o limitar la proliferación celular a la que se debe el desarrollo del Sarcoma 180 (Tablas N.ºs 7 y 8).

En conclusión, el efecto de la ingesta de 200 UI de retinol, en ratones con cáncer inducido por Sarcoma 180, se traduce en una acción sinérgica antioxidante con la catalasa y un incremento significativo del periodo de supervivencia, no así en la inhibición de la proliferación celular del Sarcoma 180. El retinol tiene un efecto protector frente a la injuria oxidativa producida por el sarcoma 180.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Doll R., Peto R. 1981; *The Causes of Cancer*. Oxford University Press, UK.
2. Ames B.N. 1982; *Dietary Carcinogens and Anticarcinogens*. Revisado en: *Mutagens in Our Environment*. M. Sorsa and H Vainio, Ed. Liss. New York.
3. Harman D., Pryor W.A. 1982; *Free Radicals in Biology*. Ed. Academic Press. New York, 5: 255-75.
4. Jones G.R. 1992; *Cancer destruction in vivo through disrupted energy metabolism. Part II. Lipid peroxidation and cell death; drug resistance as a consequence of reversible cellular injury; Physiol Chem NMR*, 24(3):181-94
5. Moss R.W. 1992; *Cancer Therapy: Introduction to vitamin section*. New York.
6. Hennekens CH. 1994; *Vitaminas Antioxidantes y Cáncer*. *Am J Med* 97 (suppl 3A): 2S-4S
7. **World Cancer Research Foundation, American Institute for Cancer Research**. 1997; *Food Nutrition and prevention of cancer: a global perspective*.
8. Halliwell B. 1994; *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet* 344: 721-4
9. Taketomo C.K., Huriburi J., Kraus D.M. 1999-2000. *Pediatric Dosage Handbook*. 6ta. Ed. Hudson, Ohio.
10. **Animalls, Fichas, "El Ratón"**. 2003. Website: <http://www.animalls.net/ARTIC80.HTML>
11. Lehninger A. L. *Bioquímica*. Ed. Omega. Barcelona, 1979 (2):514
12. Walter P. y Somogyi J.C. *Medición del Cambio del Estado Nutricional*.