

Efectos de la suplementación dietaria con soja en un modelo experimental de cáncer de colon

Effects of dietary supplementation with soya on a colon cancer experimental model

Fontenla, M.; Cena, A.; Fontenla, R.; Pintos, S.; Sosa, L.; Prchal, A.; Fontenla, S.

Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

Remitido: 10/Diciembre/2012. Aceptado: 30/Mayo/2013

RESUMEN

Objetivos: Estudiar la acción de la leche de soja en la aparición de focos de criptas displásicas (FCD) en un modelo experimental de cáncer de colon y su relación con el estrés oxidativo, la actividad apoptótica y la inestabilidad genómica.

Metodología: La inducción de la carcinogénesis se produjo en ratas Wistar machos adultas por inoculación subcutánea de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (20 mg/kg) 2 dosis semanales de DMH durante 8 semanas. Se trabajó con 3 grupos (N=12 c/u): A) Control normal con dieta estándar B) Control de carcinogénesis, inoculados con DMH y dieta estándar C) Experimental: inoculados con DMH, con dieta con leche de soja. Los animales se estudiaron a los 4, 5 y 6 meses después de la última inoculación. El colon fue procesado con técnicas histológicas convencionales, se determinó proteína P53 (inmunohistoquímica) y actividad apoptótica (Test de Tunel). En suero se determinó (NO) Óxido Nítrico. En homogenatos de hígado se dosó malonil-dialdehído (MDA).

Resultados: En el período estudiado los animales experimentales no desarrollaron cáncer, en tanto que en los controles de carcinogénesis, se detectaron tu-

mores a partir del 5º mes. La detección de indicadores displásicos (FCD) se relacionó con la sobreexpresión de la proteína P53, el aumento de la actividad apoptótica y la disminución de NO y MDA.

Conclusiones: La administración de leche de soja, como suplemento dietario por un tiempo prolongado podría retardar la aparición de FCD. La función anticancerígena se debería a la acción antioxidante de la soja que disminuiría los daños acumulativos sobre el ADN.

PALABRAS CLAVES

Soja, cáncer de colon, antioxidante.

ABSTRACT

Objectives: to study the effects of soy milk consumption in the occurrence of dysplastic crypt foci (DCF) in an experimental model of colon cancer. To relate oxidative stress with apoptotic activity and genomic unsteadiness.

Methods: experimental model of colon cancer was achieved by subcutaneous injections of 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 20 mg/Kg) twice a week during eight weeks in adult male Wistar rats. Three groups were studied: A) Normal control: saline injections and standard diet (commercial formula and water ad libitum); B) Carcinogenesis control: DMH inoculation and standard diet; C) Experimental: DMH inoculation, soy diet (commercial formula and soy milk). Four rats of each group were study 4, 5 and 6 months after last inocula-

Correspondencia:

Silvia Fontenla de Petrino
E-mail: silviapetrino@gmail.com

tion: colon tissue was processed with conventional histological techniques; protein P53 was determined by immunohistochemistry. Apoptotic activity was measured by Tunel test, Nitric Oxide in serum and malondialdehyde in liver homogenates were also determined.

Results: Experimental rats did not develop cancer in the studied period, while we found tumors in carcinogenesis control groups in the 5th month. Dysplastic indicators (DCF) were related with P53 over expression, augmented apoptotic activity and decreases of nitric oxide and malondialdehyde.

Conclusions: Soy milk intake as diet supplement for prolonged time could delay de DCF emergence. These anticancers effects may be due to the soy antioxidative action, that could decrease the accumulative ADN damage.

KEY WORDS

Soy, colonic neoplasm, antioxidants.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad común y potencialmente letal. Al igual que en la mayoría de las enfermedades malignas, se desconoce la etiopatogenia del CCR; la casi totalidad de los estudios, plantean que es multifactorial. Se ha descrito que el proceso de CCR es el resultado de la interacción de la respuesta adaptiva del huésped, a factores ambientales y de alteraciones genéticas¹.

Los modelos experimentales con animales de laboratorio brindan una excelente oportunidad para estudiar los procesos pre-neoplásicos y tumorales en CCR. Las lesiones displásicas son lesiones precancerígenas o pre-malignas consideradas como marcadores histológicos de los estados iniciales de CCR. Son entidades solitarias que pueden aparecer en la mucosa colónica, formando focos de criptas displásicas (FCD), que son usadas como marcadores de carcinogénesis en individuos con un riesgo aumentado².

Se ha sugerido que el estrés oxidativo está implicado en la etiología de varias enfermedades crónicas, incluyendo cáncer, enfermedad cardiovascular, diabetes y procesos neurodegenerativos. Esto se debe a la capacidad oxidante que tienen los radicales libres que provocan un deterioro de la homeostasis celular y la aparición de diferentes lesiones preneoplásicas y neoplásicas, e incluso la muerte celular³.

El óxido nítrico (NO) es una molécula que desempeña importantes funciones en procesos fisiológicos y patológicos en humanos porque puede actuar como radical oxidante. Presenta una producción incrementada en procesos inflamatorios y es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer. Su síntesis se produce por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), cuyo sustrato es el aminoácido L-arginina. Una elevada actividad de estas enzimas se ha reportado en algunos tipos de tumores, y se ha correlacionado con daños al ADN, por ello los niveles de NO pueden utilizarse para evaluar el estrés oxidativo⁴.

Los radicales libres dañan las estructuras ricas en lípidos (ácidos grasos poliinsaturados) como las membranas celulares y las lipoproteínas. En las primeras se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular y en la segunda, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la génesis de la placa aterosclerótica. Durante la oxidación lipídica, el ácido graso se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina y así se perpetúa el proceso oxidativo. Esto se conoce como peroxidación lipídica y genera numerosos subproductos, entre ellos el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos por el que se evalúa también el estrés oxidativo⁵.

En los focos de criptas displásicas se producen alteraciones moleculares tempranas que pueden conducir al CCR. Esto podría deberse a la adquisición de múltiples mutaciones en diversos genes que aceleran la progresión de la neoplasia. Uno de los principales genes involucrados en esta transición es el gen p53 cuya actividad tiene un efecto considerable sobre la génesis de tumores⁶.

El *p53* es un gen supresor de tumores, localizado en el brazo corto del cromosoma 17p13.1; codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kDa, que actúa como un factor de transcripción e interviene en múltiples funciones celulares, especialmente en el control del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta al daño y la reparación del ADN. Se encuentra alterado en cerca del 50% de todos los cánceres estudiados; además, se lo propone como un marcador genético útil para el diagnóstico y el pronóstico de diversos tipos de tumores sólidos. Las mutaciones en el gen *p53* inducen a la inestabilidad genómica en las células transformadas⁷.

Por otro lado, algunos componentes de la dieta (como una alta ingesta de grasa de origen animal) constituyen importantes factores determinantes en la carcinogénesis

de intestino. Está demostrado que tanto los flavonoides como los compuestos fenólicos (vegetales) inhiben el estrés oxidativo y por lo tanto la lipoperoxidación, resultando ser potentes antioxidantes y también anticancerígenos, inhibiendo el crecimiento de tumores incluyendo el cáncer de colon⁸. Este es el caso de la soja, que posee potentes antioxidantes como las isoflavonas, cuya acción sería mayor cuando se administran junto a las proteínas de la soja, debido a que sus aminoácidos constituyentes no son fácilmente oxidables. De allí que se ha recomendado suplementar la dieta con alimentos a base de soja⁹.

En experimentos previos, hechos en ratas, hemos demostrado que la suplementación dietaria con leche de soja mejora notablemente el perfil lipídico y produce una reducción de la lipoperoxidación en hígado, cerebro y riñón. Asimismo, los animales tratados perdieron menos neuronas en el hipocampo y presentaron índices notablemente elevados de supervivencia¹⁰.

Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar los efectos de la administración de la leche de soja, como complemento dietario, sobre la aparición y los cambios estructurales de focos de criptas displásicas (FCD) en un modelo de cáncer de colon en ratas Wistar, y su relación con el estrés oxidativo, la actividad apoptótica y la inestabilidad genómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron según las directivas de la Unión Europea (86/609/EEC) y las reglas y recomendaciones, en el manejo de los animales de la FESSCAL (Federación de Sociedades Sudamericanas de la Ciencia de Animales de Laboratorio).

Se emplearon Ratas Wistar macho, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán (Argentina), con un peso entre 180 y 200 g. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio. Los líquidos y los alimentos de las dos dietas utilizadas (ver abajo) estuvieron disponibles *ad libitum*. Después del destete (21 días desde el nacimiento) los animales fueron divididos en tres grupos: A: Grupo Control de bioterio (N=12): con una dieta de alimento balanceado (Cargill, Buenos Aires, Argentina) y agua (dieta normal); B: Grupo control de carcinogénesis (N=12): alimentados con dieta normal; C: Grupo Experimental (N=12): alimentados con alimento balanceado y leche de soja.

La composición de la leche de soja utilizada (AdeS, Unilever, Argentina) es la siguiente: proteínas: 2.6 g%;

carbohidratos: 4 g%; lípidos: 1.5 g%; (Ácidos grasos esenciales: ácido alfa linoleico, omega 6: 0.81 g%; ácido linoléico omega 3: 1.3 g%); fibras: 0.5 g%; minerales: Ca, 60 mg%; Fe, 1.1 mg%; P, 40 mg%; Mg, 16 mg%; Na, 17 mg%; K, 150 mg%; Zn, 1.1 mg%; vitaminas: A, 60 ug%; B1, 01 mg%; B2, 0.2mg%; B3, 1.8 mg%; B6, 0.2 mg%; B9 (Ácido Fólico), 20 ug%; B12, 0,1 ug%; C, 6 mg%; D, 0.5 ug%; Isoflavonas, 6.4 mg% (daidzeína: 2.4 mg% y genisteína: 4 mg%). El alimento balanceado (Cargill, Buenos Aires, Argentina) contiene 24,6% de proteínas de origen animal y vegetal.

Los animales del grupo A fueron inoculados con 0,1 mL de solución fisiológica, y los de los grupos B y C con el cancerígeno 1,2 Dimetilhidrazina. (DMH) (symmetrical dimethylhydrazine dihydrochloride, Sigma Chem. Co), a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal, por vía subcutánea. Las inoculaciones se realizaron dos veces por semana durante 8 semanas consecutivas.

La solución de DMH se preparó con 400 mg de la droga disuelta en 100 mL de agua destilada estéril, conteniendo 37 mg de EDTA, como agente estabilizador. Dicha solución fue mantenida a pH: 6.5, usando NaOH 0.1M.

A partir de los cuatro meses posteriores a la última inoculación, una vez por mes, se sacrificaron 4 animales de cada grupo, por sobredosis anestésica de Ketamina (Ketamine 50, HOLLIDAY-SCOTT S.A.), 250 mg/kg, y Xylacina (Xilacine 2% Alfasan, Woerden Holland), 7 mg/kg. De cada animal se extrajo intestino grueso, hígado y sangre periférica.

Estudio estructural e histoquímico del colon

El intestino grueso fue extraído en su totalidad, abierto longitudinalmente y colocado sobre una plancha de cartón, tras lo cual fue fijado con formaldehído en PBS al 4 %, a pH 7,4, durante 24 horas y procesado por la técnica histológica clásica para bloques parafinados. Posteriormente, los preparados histológicos fueron utilizados para hacer coloraciones de Hematoxilina-Eosina, PAS (ácido periódico-Schiff) y Alcian- blue a pH 2,5.

Determinación de la expresión de la Proteína P53

Al producirse la inactivación del gen p53, se origina una proteína anómala denominada P53 mutante, que tiene una vida media mayor que la nativa (p53 salvaje) y su so-

breexpresión se detecta por inmunohistoquímica¹¹. Para su determinación se utilizaron cortes histológicos de colon. Se realizó el método inmunohistoquímico de la estreptavidina-biotina-peroxidasa (ImmunoCruz™ mouse LSAB Staining System: sc-2050)¹². Como anticuerpo primario se utilizó Anti P53 (PAb 1801) (ab28) (ABCAM). Los resultados se expresaron como el porcentaje de núcleos teñidos en relación a las células totales analizadas.

Determinación de la actividad apoptótica

Se realizó en cortes histológicos que fueron desparafinados y rehidratados, para posteriormente someterlos a la técnica de T.U.N.E.L. de acuerdo a las instrucciones del fabricante (DeadEnd™ Fluorometric T.U.N.E.L. System, Promega). Esta técnica se basa en la adición catalítica de fluoresceína-12-dUTPs a los extremos OH 3' libres del ADN, por acción de una nucleotidil transferasa terminal recombinante¹³. La actividad apoptótica se expresó teniendo en cuenta el número de células apoptóticas por vellosidad colónica analizada (Nº cel apop/vell).

Estudio del Estrés Oxidativo

Determinación de los niveles de óxido nítrico (NO)

El NO se determinó en base a la concentración de nitritos, que es un compuesto oxidado del mismo. Se utilizó una modificación del Método de Griess validada por este grupo de trabajo¹⁴. Los resultados se expresaron en $\mu\text{moles/mL}$.

Determinación de la peroxidación de los lípidos

La peroxidación de lípidos se evaluó mediante la medición de malondialdehído (MDA), sobre la base que el

MDA reacciona con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se dosaron en homogenatos de hígado¹⁵. La concentración de TBARS se determinó utilizando el coeficiente de extinción: $1,56 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ y los resultados se expresan en nmoles / mL .

Análisis estadísticos

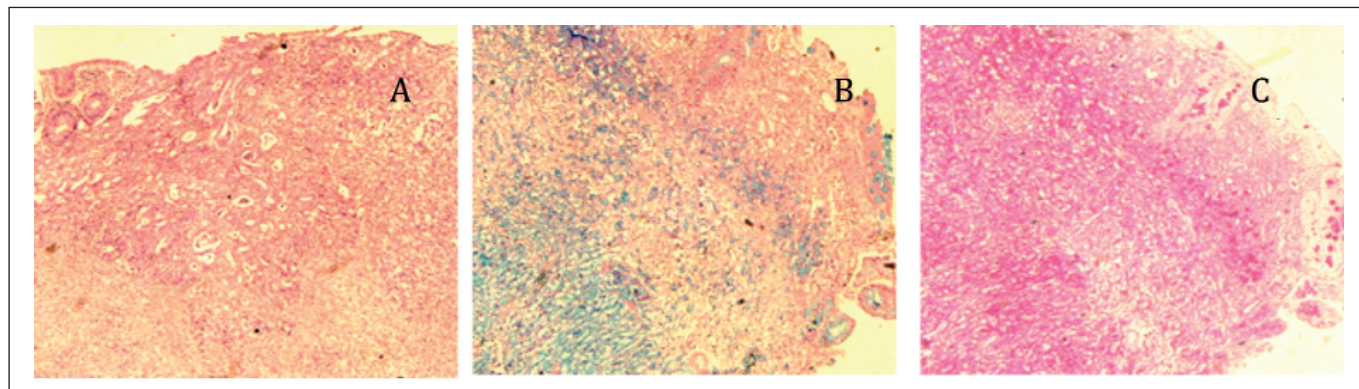
Los resultados fueron tabulados y procesados mediante SPSS (v. 9.0) Las diferencias fueron consideradas como significativas con $p < 0,01$ en todas las valoraciones.

RESULTADOS

Los FCD se detectaron en el grupo experimental (suplementado con soja) recién a partir del 6^{to} mes después de la última inoculación, mientras que en el control de carcinogénesis se observaron a partir del 4^{to} mes. En estos controles los FCD mostraron aumentos del tamaño con hiperplasia, crecimiento desorganizado de las células glandulares, y cambios en la superficie, caracterizados por una leve distorsión de las bocas de las criptas y aumento del grosor de sus paredes. Histoquímicamente se caracterizaron por disminución o ausencia de la coloración de mucosustancias neutras y ácidas, por falta de reacción al PAS (ácido periódico-Schiff) y al Alcian blue a pH 2,5. (Figura 1: A, B, C).

Los animales a los que se les administró la leche de soja no desarrollaron cáncer de colon, en todo el período estudiado. En el control de carcinogénesis se observó, en el 5^{to} mes, después de la última inoculación, un adenocarcinoma mucosecretor infiltrante constituido

Figura 1 (ABC). Los focos de criptas displásicas se detectaron en cortes histológicos de animales controles de carcinogénesis, en el 4^{to} mes posterior a la última inoculación de DMH. Se observa la desorganización celular del FCD (A)H-E, 10x; (B) débilmente coloreados con Alcianblue (AB-hematoxilina,10x) y (C)con negatividad al PAS-Hematoxilina, 10x.



por células con moco intracitoplasmático y núcleos localizados periféricamente. Los mismos se disponían en forma individual o formando grupos sueltos del tipo de células en "anillo de sello", afectando las distintas capas que componen la pared del colon.

(Figura 2 A y B). Estos animales presentaron también tumores observables macroscópicamente en hígado, riñón, páncreas, bazo y diafragma.

En la figura 3 se muestran los valores de la P53. Se observaron diferencias significativas entre los grupos, según el tratamiento ($F=376,84$ $p<0.001$), el tiempo ($F=49,61$ $p<0.0001$) y la interacción tiempo x trata-

miento ($F=12,56$ $p<0.0001$). Los resultados del análisis post hoc (Bonferroni) mostraron que los valores de P53 difieren significativamente en función del tratamiento y de la dieta.

En la determinación de la actividad apoptótica, se encontraron diferencias significativas entre los grupos, según el tratamiento ($F=64,62$ $p<0.001$), el tiempo ($F=11,48$ $p<0.0001$) y la interacción tiempo x tratamiento ($F=8,91$ $p<0.0001$). Los resultados del análisis post hoc (Bonferroni) mostraron que los tres grupos son significativamente diferentes en función de la alimentación y de la inoculación con DMH (figura 4).

Figura 2 (AB). En el control de carcinogénesis se observó, en el 5^{to} mes posterior a la última inoculación de DMH, un adenocarcinoma mucosecretor infiltrante constituido por células con moco intracitoplasmático y núcleos localizados periféricamente formando las células en "anillo de sello", afectando las distintas capas que componen la pared del colon. (A) (H-E,10x) con infiltración en tejido muscular (H-E, 10x) (B).

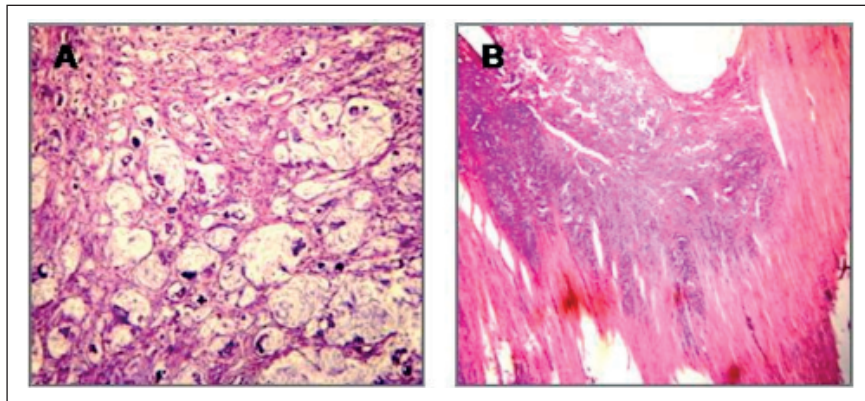
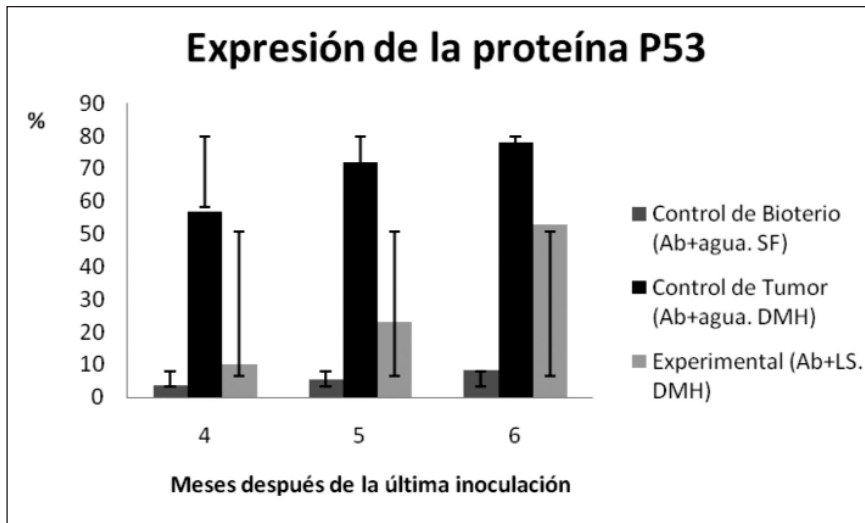


Figura 3. Se muestran los niveles de sobreexpresión de proteína P53 a los 4,5 y 6 meses posteriores a la última inoculación de DMH. Los resultados del análisis post hoc (Bonferroni) mostraron que los valores de P53 difieren significativamente en función del tratamiento y de la dieta.



Los niveles de nitritos se muestran en la figura 5. Se detectaron diferencias significativas entre los grupos, según el tratamiento ($F=176$, $p<0.001$), el tiempo ($F=122$, $p<0.0001$) y la interacción tiempo x tratamiento ($F=10$, $p<0.0001$). Los resultados del análisis post hoc (Bonferroni) mostraron que los tres grupos son significativamente diferentes en función de la alimentación y de la inoculación con DMH.

En cuanto a los valores de MDA, que se muestran en la figura 6, se hallaron diferencias significativas entre los grupos, según el tratamiento ($F=4733,78$, $p<0.001$), el tiempo ($F=436,41$, $p<0.0001$) y la interacción tiempo x tratamiento ($F=168,43$, $p<0.0001$). Los resultados del análisis post hoc (Bonferroni) mostraron que los tres grupos son significativamente diferentes en función del tratamiento.

Finalmente, se encontraron correlaciones (r de Pearson) altamente significativas entre las medidas de actividad antioxidante (NO y MDA, $r=-0,808$, $p<0.0001$) y entre estas y la actividad apoptótica ($r=-0,830$, $p<0,0001$ con NO y $r=-0,808$, $p<0,0001$, con MDA) y los valores de P53 ($r=0,835$, $p<0,0001$ con NO y $r=0,960$, $p<0,0001$ con MDA).

DISCUSION

Los recientes avances en la comprensión de la biología de cáncer de

Figura 4. Actividad apoptótica en las células de colon, a los 4,5 y 6 meses posteriores a la última inoculación. Los resultados del análisis post hoc (Bonferroni) mostraron que los tres grupos son significativamente diferentes en función de la alimentación y de la inoculación con DMH.

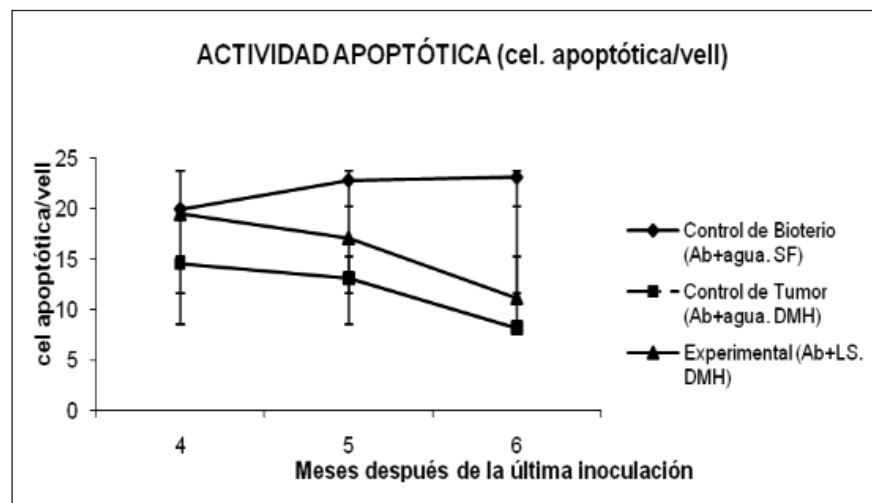
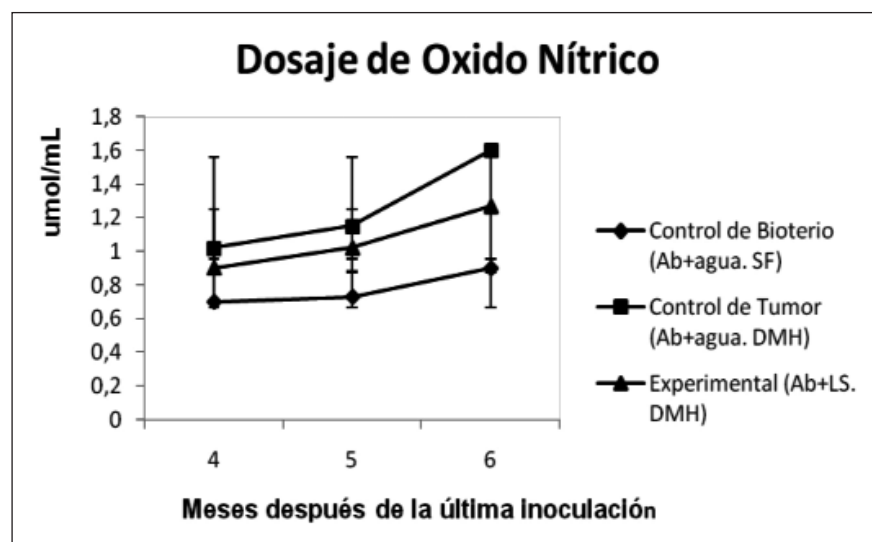


Figura 5. Niveles de NO en función de la concentración de nitritos a los 4,5, y 6 meses posteriores a la última inoculación. Los resultados del análisis post hoc (Bonferroni) mostraron que los tres grupos son significativamente diferentes en función de la alimentación y de la inoculación con DMH.



colon y las metodologías sobre nutrición hicieron posible relacionar ambas áreas. Teniendo en cuenta el alto valor nutritivo de los alimentos de soja y su potencial beneficio en la prevención del cáncer de colon¹⁶, en este trabajo se estudió el efecto de la leche de soja, como complemento nutricional de la alimentación estándar, en el proceso de formación de FCD inducidos por el carcinógeno DMH.

Se utilizó una leche de soja comercial porque es un alimento que está al alcance de prácticamente todos los

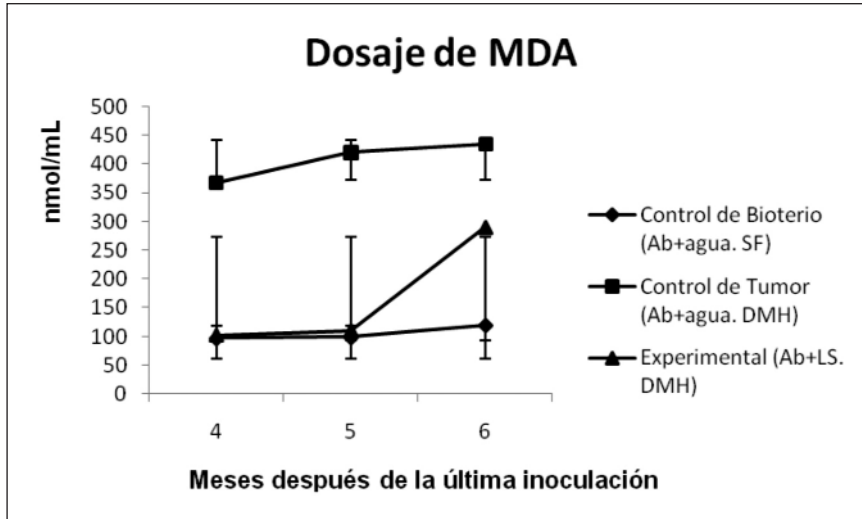
consumidores. En esta experiencia, al grupo inoculado con DMH y utilizando como única bebida la leche de soja, desde el destete, se observó un retardo importante en la aparición de los FCD, consideradas como lesiones pre-neoplásicas. En el período estudiado no desarrollaron cáncer. Sin embargo, el control de carcinogénesis desarrolló (fig.2 AB) un adenocarcinoma mucosecretor con células en anillo de sello, considerado una de las neoplasias más agresivas en cuanto a su capacidad infiltrativa y metastásica.

Estas observaciones están de acuerdo con las investigaciones que apoyan el hecho que las isoflavonas, genisteína y daidzeína, productos predominantes en la soja, son potentes inhibidores de las proteínas tirosina-quinasa y topoisomerasa II, enzimas cruciales para la proliferación celular. La inhibición de estas enzimas produciría una inhibición en la progresión de las neoplasias⁹. Entre los mecanismos responsables del efecto protector se postulan: la disminución del pH en el colon, que lleva a un aumento de la biodisponibilidad de los minerales, y a la dilución de los ácidos biliares¹⁷. Catuogno et al¹⁸ reportaron que los animales que consumían ácido butírico diluido en agua e inoculados con DMH tuvieron una marcada disminución del número de FCD.

Por otro lado, también observamos que los FCD, de los dos grupos tratados con DMH, presentaron una débil reacción con la técnica de PAS y Azul

Alcián pH 5 (Fig 1,A,BC), y no encontramos diferencias observables en la intensidad de coloración como para inferir, que se trataban de displasias en distintos grados de diferenciación. La disminución y/o ausencia de mucosustancias en FCD y adenocarcinomas se debería probablemente al menor grado de diferenciación celular y a la ausencia o menor número de células caliciformes. Debido a que este comportamiento es similar entre una displasia y una neoplasia, resulta de poca utilidad como posible marcador oncogénico a fin de di-

Figura 6. Valoración de los Niveles de Malonildialdehido (MDA) a los 4,5 y 6 meses posteriores a la última inoculación de DMH. Los resultados del análisis post hoc (Bonferroni) mostraron que los tres grupos son significativamente diferentes en función del tratamiento.



ferenciar en etapas previas si un FCD podría evolucionar hacia un tumor benigno o maligno. Esto concuerda con lo publicado por Catuogno et al.¹⁸ quienes observaron una distribución irregular de mucina en algunas lesiones displásicas leves, ausencia total de sustancias ácidas y neutras en lesiones severas y carcinomas. Se puede inferir que estos datos deben ser estudiados más a fondo en el futuro, para determinar su importancia en el diagnóstico precoz de las lesiones con potencial transformación maligna¹⁹.

La progresión de los adenomas a cáncer de colon está supeditada a la acumulación de defectos genéticos que involucran la activación de protooncogenes y mutación de los genes supresores de tumores. La alteración de la proteína P53 es uno de los defectos más comúnmente observados.

Bajo condiciones fisiológicas, la proteína P53 normal o de tipo "natural" tiene poca estabilidad, presentando una vida media demasiado corta para poder detectarse en cortes histológicos con métodos inmunohistoquímicos. Pero, cuando existe una mutación del gen, la proteína pierde su función y se vuelve bioquímicamente más estable con una vida media larga, pudiendo acumularse (sobreexpresión) en el núcleo y así alcanzar niveles detectables²⁰. Asimismo, cuando se inactiva el gen p53 (mutación) se promueve la proliferación de células tumorales y se inhibe la apoptosis²¹.

En función de nuestros resultados, pudimos determinar que los animales controles de carcinogénesis mos-

traron un porcentaje elevado para la expresión proteica de este gen (Fig.3). Esta se correlaciona con la detección de células apoptóticas (Fig.4), porque a medida que esta función disminuye, la sobre-expresión de la proteína P53 aumenta, coincidiendo con la aparición de los FCD.

Estos datos coinciden con lo expresado por Ramesh y col²² que sugieren que la baja expresión del gen p53 se asocia con una escasa diferenciación de las células tumorales, con alto índice mitótico, bajo índice apoptótico, y con elevada capacidad metastásica.

En aquellos estudios en los que han considerado el valor pronóstico de las mutaciones de p53, todos coinciden en que su mutación es un mal pronóstico para el paciente, en lo que respecta a la supervivencia y agresividad tumoral²³.

También estudiamos el estrés oxidativo determinando el nivel de NO y la concentración de MDA (Fig 5 y 6). Con respecto al NO los animales experimentales presentaron una concentración significativamente menor que los controles de carcinogénesis y una mejor respuesta histopatológica ya que los FCD no progresaron a cáncer, en el período estudiado. Estas investigaciones evidenciarían la trascendencia del NO en los adenocarcinomas de células colónicas y que la reducción de este es importante para prevenir la formación, crecimiento y proliferación de tumores. Takahashi et al, demostraron que la inhibición de la sintetasa inducida de óxido nítrico (iNOS) disminuye el crecimiento y proliferación de tumores en el colon. También, podría deberse a que los macrófagos que se infiltran el tumor podrían generar el factor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF) siendo el NO el modulador de la actividad del VEGF en la angiogénesis²⁴. Por otro lado, el NO y el O₂ pueden reaccionar simultáneamente de forma acelerada, generando otro ión mucho más activo y lesivo, peroxinitrito (ONOO⁻), el cual tiene un rol importante en la invasión tumoral, metástasis y angiogénesis^{25,26}.

La concentración de MDA del grupo experimental (leche de soja) si bien fue superior al grupo control de bioterio se mantuvo siempre por debajo de los niveles del grupo control de carcinogénesis. Estos resultados coin-

ciden ampliamente con otros estudios de cáncer (de colon y de otros tipos), en los que se asocia una reducción del estrés oxidativo con la nutrición con soja^{27,28}.

En conclusión, nuestro trabajo podría explicar, al menos en parte, que la leche de soja, cuando es consumida como suplemento dietario durante un tiempo prolongado, protege y retarda la aparición de focos de criptas displásicas de colon. El mecanismo de acción se debería a su acción protectora sobre el ADN, ya que disminuye los daños acumulativos del mismo por ser un antioxidante potente.

Para aseverar la posibilidad de que los resultados encontrados en ratas puedan aplicarse también en el ser humano, se necesitarían estudios más extensos. Sin embargo, nuestros datos podrían apoyar trabajos epidemiológicos haciendo hincapié en la hipótesis de que la nutrición suplementada con soja podría tener efectos beneficiosos sobre la salud.

CONCLUSIONES

Nuestro trabajo podría explicar, al menos en parte, que la leche de soja, cuando es consumida como suplemento dietario durante un tiempo prolongado, protege y retarda la aparición de focos de criptas displásicas de colon. El mecanismo de acción se debería a su acción protectora sobre el ADN, ya que disminuye los daños acumulativos del mismo por ser un antioxidante potente.

Para aseverar la posibilidad de que los resultados encontrados en ratas puedan aplicarse también en el ser humano, se necesitarían estudios más extensos. Sin embargo, nuestros datos podrían apoyar trabajos epidemiológicos haciendo hincapié en la hipótesis de que la nutrición suplementada con soja podría tener efectos beneficiosos sobre la salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ballinger AV, Anggiansah CI. Revisión clínica. Actualización en cáncer colorrectal. *BMJ*. 2007; 335:715-18.
2. Catuogno, M.S.; Montenegro, M.A.; Sánchez Negrette, M.; Ramirez, G.V Decrease of colonic dysplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in butyric acid supplemented rats. *Rev. vet.* 2011; 22 (1):13-8.
3. Cuerda C, Luengo L. M, Valero M. A., Vidal A, Burgos R, Calvo F. L, Martínez C. Revisión Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. *Nutr Hosp*. 2011;26 (1):68-78.
4. Díaz Arce Dariel. Óxido nítrico, mutagénesis y cáncer. *Rev Cubana Invest Bioméd* [revista en la Internet]. 2004 Sep [citado 2011 Nov 26]; 23(3): 184-189. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002004000300009&lng=es.
5. Chithra V, Leelamma S. Coriandrum sativum - effect on lipid metabolism in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;71(3):457-63.
6. Gao Y, Ferguson D.O., Xie W., Manis J.P., Sekiguchi J., Frank K.M. et al. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature*. 2000;404: 897-900.
7. Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromental CC, et al. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther*. 2009;16:1-12.
8. Zamorano-Ponce E, Lagos Muñoz P, Rivera Caamaño P, Fernández Romero J. Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimiopreención y anticarcinogénesis. *Theoria*. 2008;17(1): 71-86.
9. Ludueña B, Mastandrea C, Chichizola C, Franconi, MC. Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica. *Bioquímica y Patología Clínica*. 2007; 71(1): 54-66. [citado 2010-10-06] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=65111118009>.
10. Fontenla M., Prchal A., Cena A. M., Albarracín A. L., Pintos S., Benvenuto S, Sosa. M L. and Fontenla de Petrino, S. Effects of soy milk as a dietary complement during the natural aging process *Nutr Hosp*. 2008;23:607-613.
11. Bruner J, Connely J, Saya H. P53 protein immunostaining in routinely processed paraffin embedded sections. *Mod Pathol* 1993; 6: 189-94.
12. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. ImmunoCruz™ mouse LSAB Staining System: sc-2050 [citado 2010-09-03] Disponible en: <http://datasheets.scbt.com/sc-2050.pdf>.
13. Grasl Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, H Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. *In situ* detection of fragmented dna (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology*. 1995; 21,(5) :1465-1468.
14. Fontenla, R., Schoos V, Prchal A. Validación de una técnica espectrofotométrica para determinar la concentración de nitritos y nitratos en tejido nervioso de rata. [citado 2010-14-09] Disponible en <http://www.ct.unt.edu.ar/pubjornadas2010/trabajos/171.pdf>.
15. Satoh K: Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.
16. MacDonald RS, Guo J, Copeland J, Browning JD, Slepser D, Rottinghaus GE, Berhow MA. Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *J. Nutr*. 2005; 135(5): 1239-124242.
17. Pierart Z Camila, Rozowsky N Jaime. Papel de la nutrición en la prevención del cáncer gastrointestinal. *Rev. chil. nutr.* [revista en la Internet]. 2006 Abr [citado 2012 Nov 26]; 33(1): 8-13.

- Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182006000100001&lng=es.
doi: 10.4067/S0717-75182006000100001.
18. Catuogno, M; Montenegro, M; Sánchez Negrette, M; Ramirez, G. Decrease of colonic dysplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in butyric acid supplemented rats, *Rev. Vet.* 2011;22(1): 13-18.
 19. Yoshimi, N., Morioka, T., Kinjo, T., Inamine, M., Kaneshiro, T., Shimizu, T. et al. Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Science.* 2004;95: 792–797.
 20. Wester K, Wahlund E, Sundström C, Ranefall P, Bengtsson E, Russell et al. Paraffin Section Storage and Immunohistochemistry: Effects of Time, Temperature, Fixation, and Retrieval Protocol with Emphasis on p53 Protein and MIB1 Antigen. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology.*2000;8 (1): 61-70.
 21. Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat.* 2003; 21:182–191.
 22. Ray RM, Bhattacharya S, Johnson LR. Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1. *Apoptosis.*2011; 16:35–44.
 23. Kressner U, Inganas M, Byding S, Blikstad I, Pahlman L, Glimelius B, et al. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 17(2): 593-9.
 24. Xiong M, Elson G, Legarda D, Leibovich SJ. Production of vascular endothelial growth factor 96. *An Fac med.* 2010;71(2):88-96.
 25. Estévez, A. G. Jordán, J. Nitric Oxide and Superoxide, a Deadly Cocktail. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 962: 207–211.
 26. Lisa A. Ridnour L,. ThomasD, Switzer C, Flores-Santana W,. Isenber J, Ambs S, Roberts D, David A. W Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Review Article. Nitric Oxide.* 2008;19(2):73-76.
 27. Rodrigo L., Riestra S. Dieta y cáncer de colon. *Rev. esp. enferm. dig.* [revista en la Internet]. 2007 Abr [citado 2012 /11/ 22]; 99(4): 183-189. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082007000400001&lng=es.
<http://dx.doi.org/10.4321/S1130-01082007000400001>.
 28. Chimenos Küstner E. Aspectos prácticos en la prevención del cáncer oral. *Av Odontostomatol .* 2008 ; 24(1): 61-67. [citado 2012 Nov 22] Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852008000100006&lng=es.
<http://dx.doi.org/10.4321/S0213-12852008000100006>.