

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
"DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ"
SANTA CLARA, VILLA CLARA

LÍPIDOS POLIINSATURADOS DEL TIPO N-6 Y EXPRESIÓN DE P21 RAS EN
CARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES

Por:

Dra. Otmara Guirado Blanco¹, Dra. Irgard Costa² y Dr. Eduard Escrich Escriche³

1. Especialista de II Grado en Fisiología Normal y Patológica. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Profesora Auxiliar. ISCM-VC. e-mail: otmaragb@iscm.vcl.sld.cu
2. Especialista en Anatomía Patológica. Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Teruel. Barcelona. España.
3. Doctor en Ciencias Médicas. Profesor Titular. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Director del Grupo multidisciplinario para el estudio del cáncer de mama. Universidad Autónoma de Barcelona, España. e-mail: Eduard.Escrich@uab.es

Resumen

Se utilizó un modelo experimental de cáncer de mama inducido con dimetilbenz(α)antraceno en la rata, con el objetivo de determinar los efectos de una dieta rica en lípidos poliinsaturados del tipo n-6 sobre la expresión de la proteína oncogénica p21 Ras. La determinación de la expresión de p21 Ras se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas por el método de estreptavidina-biotina. Se analizaron 146 carcinomas: 19 del grupo control (C), 62 del grupo Inducción (I) y 65 del grupo Promoción (P). Los resultados mostraron que, aunque la media de la expresión de la proteína p21 Ras fue superior en los carcinomas del grupo P, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos. Se concluye que los lípidos de la dieta del tipo n-6 no incrementaron significativamente los niveles de expresión de la proteína p21 Ras en las células tumorales de los grupos de ratas sometidas a dieta hiperlipídica.

Descriptores DeCS:

PROTEINA DE ONCOGENO P21(RAS)
GRASAS EN LA DIETA
NEOPLASMAS DE LA MAMA/inducido
químicamente
ANIMALES DE LABORATORIO

Subject headings:

ONCOGENE PROTEIN P21(RAS)
DIETARY FATS
BREAST NEOPLASMS/chemically induced
ANIMALS, LABORATORY

Introducción

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en los países desarrollados y es el responsable de aproximadamente uno de los 10 millones de neoplasias diagnosticadas cada año en ambos sexos¹. Se ha constatado un aumento acelerado de la incidencia en los últimos 20 años, lo cual se ha relacionado con una mayor exposición a factores de riesgo; entre estos, los nutricionales se consideran de gran trascendencia debido a la continua exposición a la que está sometida la población por sus hábitos alimentarios². Es un hecho bien conocido que ciertos lípidos de la dieta estimulan el cáncer de mama cuando se hallan en cantidades elevadas³. En diversos

estudios experimentales, se ha demostrado que los más eficaces promotores de la carcinogénesis son los lípidos que contienen cantidades importantes de ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-6, como los aceites de maíz y girasol⁴.

El desarrollo neoplásico es el resultado, al menos parcialmente, de la activación anormal de protooncogenes que resultan en niveles de expresión alterados del producto de la proteína normal, o en niveles de expresión normales o alterados de una proteína anormal. Actualmente, se han identificado más de 100 de estos genes; dentro de estos, la familia de genes ras es una de las más frecuentemente involucradas en el desarrollo del cáncer^{5,6}. El oncogén c-Ha-ras1 es un miembro de la familia ras que ha sido identificado con frecuencia en el desarrollo de tumores humanos y experimentales, incluyendo el cáncer de mama⁷. Su producto es una pequeña proteína de 21 kDa, conocida como p21 Ras. Las proteínas p21 Ras se localizan en la superficie interna de la membrana celular, donde actúan como interruptores moleculares binarios en las vías de señalización que influyen en el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis^{5,6}.

El modelo biológico de cáncer de mama inducido con el carcinógeno dimetilbenz (α) antraceno [DMBA] en ratas produce la aparición de tumores mamarios, de características muy parecidas a las de los tumores humanos en su patogénesis y bases moleculares, lo que permite realizar estudios de expresión de diversos genes implicados en la carcinogénesis mamaria⁸. Los niveles incrementados de expresión de los genes *ras* han sido encontrados en cerca del 50 % de los tumores mamarios humanos y experimentales en relación con los niveles del tejido normal; además, es conocido que la sobreexpresión constituye un importante mecanismo de activación oncogénica asociado con peor pronóstico⁹. En este estudio, la hipótesis de trabajo se basó en que los lípidos de la dieta podrían ejercer su influencia en el desarrollo tumoral mamario induciendo sobreexpresión de la proteína p21 Ras; para ello, se estudió el efecto de una dieta hiperlipídica rica en ácido linoleico (18:2n-6), en el modelo de carcinogénesis experimental inducida con DMBA en ratas, por lo que nos propusimos como objetivos los siguientes:

- a) Determinar la expresión de la proteína p21 Ras en los carcinomas de mama inducidos experimentalmente en la rata.
- b) Estudiar el efecto de una dieta hiperlipídica poliinsaturada (20 % de aceite de maíz) sobre los niveles de expresión de la proteína p21 Ras en los carcinomas mamarios.

Métodos

Este trabajo se soporta experimentalmente en el modelo biológico de cáncer de mama inducido en ratas Sprague Dawley, mediante el carcinógeno dimetilbenz(α)antraceno (DMBA). La inducción tumoral se efectuó siguiendo el método de Huggins y colaboradores, modificado¹⁰. El estudio estuvo integrado por 60 animales que fueron distribuidos en tres grupos, los cuales se establecieron en dependencia de la dieta recibida y del momento de su administración. En todos los grupos, los animales recibieron lactancia materna desde su nacimiento hasta el destete, en el día 22-23 de vida. A partir de ese momento, se les administraron las dietas experimentales: normolipídica (m3) o hiperlipídica rica en aceite de maíz (M20).

La serie experimental fue diseñada para estudiar el efecto de una dieta con elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados del tipo n-6 sobre las etapas de la carcinogénesis y, posteriormente, determinar en los tumores mamarios la expresión de la proteína oncogénica p21 Ras. El estudio comenzó el día 22, a partir del cual se establecieron los diferentes grupos de 20 animales cada uno: un grupo control (C), alimentado con dieta m3 durante todo el estudio; un grupo para analizar el efecto de la dieta M20 sobre la iniciación de la carcinogénesis (I), alimentado con esta dieta hiperlipídica rica en aceite de maíz durante todo el ensayo, y otro grupo en el que se estudió el efecto de dicha dieta sobre la promoción (P), el cual recibió dieta m3 hasta la inducción y dieta M20 desde ese momento hasta el sacrificio (tabla 1).

Tabla 1 Grupos experimentales de la serie del estudio.

| Grupo | Objetivo del estudio | Dieta |
|-------|----------------------|--|
| C | Control | m3: 3 % 18:2 n-6 |
| I | Iniciación | M20: 20 % 18:2 n-6 |
| P | Promoción | m3: 3 % 18:2 n-6 M20: 20 % 18:2 n-6 |

Todos los animales fueron inducidos el día 53 –día cero del tiempo postinducción– con una dosis única del carcinógeno dimetilbenz (α) antraceno (DMBA). Para ello, se administraron 5 mg de DMBA disueltos en 1 ml de aceite de maíz mediante instilación buco-gástrica. El fin del ensayo coincidió con el sacrificio, de los animales por decapitación, a una edad media de 278 días. Previamente al sacrificio, se determinó la fase estral de los animales mediante examen citológico vaginal, y se seleccionaron los que se encontraban en diestro, para conseguir la máxima homogeneidad de las muestras y la mínima interferencia de hormonas endógenas. Tras el sacrificio, se efectuó rápidamente la exéresis tumoral. Posteriormente, se separó una parte representativa de cada tumor o, en el caso de los tumores pequeños, la totalidad del mismo, y se fijó en formol al 10 % tamponado con fosfatos para su estudio anatomopatológico. Se practicaron varios cortes de cada muestra de 5 μ m de espesor, que se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Determinación de la expresión de p21 Ras

La determinación de la expresión de las proteínas p21 Ras se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas. Para ello, se utilizó el tejido parafinado y se practicó la técnica de detección por el método de estreptavidina-biotina. Se utilizó un anticuerpo c-Ha-Ras –Ab1- monoclonal. Cat#OP23. 100 μ g en 1 ml de tampón 0,05 M fosfato de sodio, con 0,1 % de sodio azide y 0,2 % de gelatina. Lote DO 495 1 (Oncogene Research Products). Clon 235-1.7.1 generado en el ratón al inmunizar ratones BALB/c con p21 recombinante fusionado con células de mieloma P3X63 Ag8.653. Se trata del isotipo IgG_{2a}K que reconoce el fragmento que corresponde a los residuos 54 a 188 de la proteína. Identifica específicamente la proteína codificada por *c-Ha-ras* y no detecta las codificadas por *c-K-ras* o *c-N-ras*. Reconoce las formas mutada y no mutada de la proteína.

Se analizaron para inmunohistoquímica 146 carcinomas (19 del grupo control, 62 del grupo I y 65 del grupo P). La positividad observada fue de tipo citoplasmática, en forma de fino granulado compatible con la localización de la proteína en el citosol y, ocasionalmente, se observó positividad nuclear. En las secciones estudiadas de los carcinomas de mama, se obtuvo inmunorreactividad al anticuerpo en las células epiteliales ductales y lobulillares, mioepiteliales, en los fibroblastos, en las paredes vasculares, y en el músculo esquelético y piel cuando estaban representados en la lámina. No obstante, la intensidad de esta positividad variaba según las características fenotípicas de las células. Para valorar las posibles diferencias en la expresión de p21 Ras en los tumores de mama por efecto de las dietas, se utilizó un analizador y procesador de imágenes (VISILOG 5.1 de NOESIS) que permite una medición automática sensible. El sistema se adaptó a las necesidades propias de la investigación (análisis de tinción citoplasmática, uniformidad en el número y las características de las imágenes a estudiar, etc.). Se midió el porcentaje de células tumorales positivas de un área previamente marcada y la intensidad de la tinción, a partir de los niveles detectados en el control negativo correspondiente realizado en cada una de las sesiones de inmunohistoquímica. Se reconocieron como valorables aquellas en las que el caso control negativo presentaba una positividad inespecífica de fondo, que no sobrepasaba el 2 % de las células. Los resultados se procesaron para su análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Resultados

Los resultados de la determinación de la expresión de la proteína p21 Ras en los carcinomas se muestran en la tabla 2. Como puede observarse, el promedio de células tumorales positivas de p21 Ras fue de 28,96 % en el grupo control, 26,30 % en el grupo I y de 33,75 % en el grupo P. Por tanto, aunque la media de la expresión de la proteína p21 Ras fue mayor en los carcinomas del grupo P, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos. La distribución de la intensidad de la tinción se observó de forma paralela a la de la expresión total, con mayor intensidad en el grupo P (13,72 %), pero los valores tampoco alcanzaron la significación estadística ($p = 0,200$).

Tabla 2 Expresión de la proteína p21 Ras en los carcinomas mamarios.

| Grupos | n | Expresión (%) | | | Intensidad (%) | | | Ras Total (%) | | |
|--------|----|---------------|------|------|----------------|-----|------|---------------|------|-------|
| | | X ± | SD | m | X ± | SD | m | X ± | SD | m |
| C | 19 | 28,68 | 19,1 | 28,7 | 0,52 | 0,7 | 0,26 | 28,96 | 19,4 | 28,74 |
| I | 62 | 25,49 | 21,6 | 17,2 | 1,73 | 2,9 | 0,32 | 26,30 | 22,9 | 17,24 |
| P | 65 | 32,25 | 21,1 | 28,7 | 3,72 | 6,0 | 0,69 | 33,75 | 23,7 | 28,73 |

N = número de carcinomas.

$p > 0,05$

\bar{X} = media.

SD = desviación estándar de la media.

m = mediana.

Fuente: Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Grenollers. Barcelona.

En la figura, a modo de ilustración, se muestra una fotografía de un corte histológico de un carcinoma mamario con elevada tinción para el anticuerpo anti-p21 Ras. En el mismo, se puede observar que las células que expresan p21 Ras se colorean intensamente de color castaño.

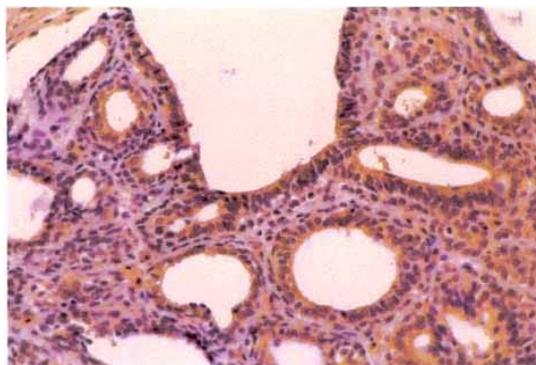


Figura Imagen fotográfica de corte histológico de un carcinoma mamario con elevada tinción para el anticuerpo anti p21 Ras.

Discusión

Los análisis de los resultados de la expresión muestran que, aunque los tumores del grupo P presentaron niveles superiores, estos no alcanzaron la significación estadística. Estos resultados coinciden con estudios similares realizados en un modelo inducido con N-mótilnitrosourea (NMU) en la rata, en los que tampoco se encontraron diferencias en los niveles de la proteína p21 Ras por

efecto de la misma dieta¹¹. Por otra parte, varios autores han descrito niveles aumentados de p21 Ras por efecto de lípidos n-6 en comparación con lípidos n-3 en tumores mamarios inducidos con DMBA¹², en cultivos de glándula mamaria en ratones inducidos con el mismo carcinógeno y en líneas celulares de cáncer de mama humano¹³. Estudios en ratones transgénicos MMTV/v-H-ras sometidos a una dieta hiperlipídica de aceite de maíz, mostraron un aumento de los niveles del ARNm de ras respecto al control con dieta normolipídica, pero estos cambios ocurrieron a nivel del transgen y no en el gen endógeno. A su vez, un estudio realizado en glándulas mamarias de ratas sanas alimentadas con dietas ricas en lípidos n-6 y n-3, mostró que las alimentadas con n-6 presentaron niveles aumentados de ARNm y de la proteína p21 respecto al control alimentado con dieta normal¹⁴. Sin embargo, en estudios previos del laboratorio de origen de este trabajo, no se encontraron diferencias en los niveles de abundancia relativa del ARNm, ni de la proteína p21 Ras por efecto de la misma dieta.

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, puede plantearse que con los métodos utilizados no se pudo demostrar que a nivel molecular los lípidos del tipo n-6 modifiquen los niveles de expresión de la proteína p21 Ras. Por tanto, es posible que estos lípidos actúen sobre la actividad de la proteína (favoreciendo la formación de Ras-GTP) y que regulen, de esta forma, el estado de activación de p21 Ras, conociendo que uno de los mecanismos clásicos postulados para explicar el efecto modulador de los lípidos en el cáncer de mama es el de inducir modificaciones en la membrana plasmática. Se ha demostrado que los cambios en el perfil lipídico de las membranas celulares, debidos al consumo de un tipo concreto de grasa, pueden modificar el comportamiento celular mediante la influencia en la fluidez de membrana y las vías de transducción de señales¹⁵. Los cambios en la fluidez de membrana, a su vez, pueden afectar la movilidad lateral de proteínas específicas, su conformación e interacción con otros componentes de membrana, lo que podría producir cambios funcionales. Recientemente, se ha demostrado que las distintas isoformas de p21 Ras están localizadas en microdominios discretos en la membrana plasmática, así como en endomembranas a nivel de endosomas, aparato de Golgi y mitocondrias, lo que condiciona las vías de señalización en las que participan y la interacción con sus efectores¹⁵⁻¹⁷. En relación, específicamente, con la ubicación de Ha-Ras en la membrana plasmática, se ha observado que Ha-Ras-GDP está localizado en microdominios conocidos como "lipids rafts" (regiones formadas por una composición lipídica rica en colesterol y glicoesfingolípidos), pero su forma activa, Ha-Ras-GTP, se encuentra fuera de estos, en sitios "no rafts", desde los cuales emite su señal.^{18,19} Se ha determinado que la activación de la vía de señalización de Ha-ras es un proceso dinámico caracterizado por una rápida segregación lateral de Ras GTP hacia los microdominios "no rafts", con formación de conglomerados de Ras activo. La formación de estos nano acúmulos de Ras-GTP podría constituir un mecanismo de amplificación, que estaría asociado con el hecho de que la salida desde p21 Ras hacia la cascada Raf-MEK-ERK es sensible a bajos niveles de activación de dicha proteína, solo cuando la señal de Ras es iniciada desde la membrana plasmática²⁰.

Summary

An experimental model of dimethylbenz[α]anthracene induced breast cancer in rats was used with the aim of determining the effects of a diet rich in type n-6 polyunsaturated lipids on the expression of the p21 Ras oncogenic protein. The determination of the p21 Ras was carried out through immunohistochemical techniques, using the streptavidin-biotin method. One hundred and forty six carcinomas were analyzed: 19 from the control group (c), 62 from the induction group (I), and 65 from the Promotion group (P). The results showed that even though the mean for the p21 Ras protein expression was higher in the carcinomas from the group P, there were not significant differences among the groups. It was concluded that the lipids on the type n-6 diet did not increase significantly the p21 Ras protein expression levels in tumoral cells from the rat groups that underwent a hyperlipidic diet.

Referencias bibliográficas

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, XU J, Thum MJ. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007;57:43-66.
2. Rock CL. Diet and breast cancer: Can dietary factors influence survival? *J. Mamm. Gland Biol Neopl.* 2003;8(1):119-32.
3. Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ, Chen WY, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1079-85.
4. Reyes N, Reyes I, Tiwari R, Geliebter J. Effect on linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett.* 2004; 209:25-35.
5. Gielhl K. Oncogenic ras in tumors progression and metastasis. *Biol Chem.* 2005;386:193-205.
6. Herman NC. Ras effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13:122-9.
7. Calaf GM, Alvarado ME, Hei TK. Oncoprotein expression and morphological phenotypes of human breast epithelial cells transformed by the c-Ha-ras. *Oncol Rep.* 2005;14(4):885-93.
8. Costa I, Solanas M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in the rat. A comparative analysis with human breast tumours. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(8):915-27.
9. Guerra E, Vacea G, Palombo B, Alberti S. Prognostic value of mutation in TP53 and Ras genes in breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2003;18(1):49-53.
10. Huggins C, Grand LC, Brillantes FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature.* 1961;189:204-7.
11. Wang Z, Pei H, Kaeck M, Lu J. Mammary cancer promotion and MAPK activation associated with consumption of a corn oil-based high-fat diet. *Nut Cancer.* 1999;34(2):140-6.
12. Karmali RA, Chao CC, Bsau A, Modak M. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on mammary H-ras expression and PGE2 levels in DMBA-treated rats. *Anticancer Res.* 1989;9:1169-74.
13. Telang NT, Basu A. Modulation in the expression of murine mammary tumor virus, ras proto-oncogene and of alveolar hyperplasia by fatty acids in mouse mammary explant cultures. *Anticancer Res.* 1998;8:971-6.
14. Badawi AF, El-Sohemy A, Stephen LL, Ghoshal AK, Archer MC. The effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of cyclooxygenase 1 and 2 and levels of p21 ras in rat mammary glands. *Carcinogenesis.* 1998;19:905-10.
15. Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH, Else PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev Cambridge Philos Soc.* 2005;80:155-69.
16. Ma DWL, Seo J, Davinson LA, Callaway ES, Fan YY, Lupton JR, et al. n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *The FASEB Journal.* 2004;18:1040-2.
17. Lane KT, Beese LS. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type 1. *J Lipids Res.* 2006;47:681-99.
18. Parton RG, Hancock JF. Lipids rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends in Cell Biology.* 2004;14:141-7.
19. Edidin M. The state of lipids rafts. From model membranes to cells: *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2003;32:257-83.
20. Ashery U, Yizhar O, Rotblat B, Kloog Y. Nonconventional trafficking of Ras associated with Ras signal organization. *Traffic.* 2006;7:1119-26.