

Efecto del aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la carcinogénesis de colon inducida por 1,2-dimetilhidrazina en ratas Holtzman

Effect of Sacha Inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in Holtzman rats

César Abel Centurión-Rodríguez^{1,a}, Juan Jorge Huamán-Saavedra^{1,b}, Víctor Raúl Requena-Fuentes^{1,2,c}

¹ Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

² Departamento de Patología, Hospital Belén. Trujillo, Perú.

^a Médico Cirujano; ^b Patólogo clínico, Doctor en Medicina; ^c Anatómo-Patólogo.

Recibido: 2-5-2016

Aprobado: 14-9-2016

RESUMEN

Objetivos: Evaluar el efecto protector del aceite de Sacha Inchi (ASI) sobre el desarrollo de cáncer de colon (CC) inducido con 1,2-dimetilhidrazina (DMH) en ratas Holtzman. **Materiales y métodos:** Estudio experimental con 28 ratas albinas machos de la cepa Holtzman distribuidas al azar en 4 grupos: un grupo control positivo expuesto a DMH (C₁), un grupo control negativo expuesto a ASI a 150 µL/kg/día (C₂), y dos grupos experimentales expuestos a DMH con ASI a 150 µL/kg/día (E₁) y ASI a 300 µL/kg/día (E₂). La DMH se aplicó por 8 semanas y con un tiempo total de inducción de 22 semanas. Luego se realizó el análisis patológico mediante la identificación de lesiones tumorales cancerosas en los intestinos. El efecto protector se evaluó en base a las proporciones de ausencia de lesión en los grupos expuestos a DMH. **Resultados:** Se identificaron lesiones tumorales cancerosas en: dos especímenes del grupo C₁, un espécimen del grupo E₁ y dos especímenes del grupo E₂. No se identificaron lesiones intestinales en el grupo C₂. Las proporciones de ausencia de lesión fueron: en el grupo C₁ de 75%, en el grupo E₁ de 87,5% y en el grupo E₂ de 75%. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). **Conclusiones:** No se evidenció un efecto protector significativo del ASI sobre el desarrollo de CC inducido con DMH en ratas Holtzman, respecto al grupo control.

Palabras clave: Neoplasias del colon; Ácido alfa-linolénico; Ácido linoleico; 1,2-dimetilhidrazina; Ratas (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the preventive effect of Sacha Inchi oil (SIO) on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis (CC) in Holtzman rats. **Materials and methods:** Experimental study with 28 Holtzman male albino rats randomly distributed into 4 groups: a positive control group exposed to DMH (C₁), a negative control group exposed to SIO at 150 µL/kg/day (C₂), and two experimental groups exposed to DMH with SIO at 150 µL/kg/day (E₁) and SIO at 300 µL/kg/day (E₂). The DMH was applied for 8 weeks and the total induction time was 22 weeks. Pathological examination was performed by identifying cancerous tumor lesions in the guts. The preventive effect was evaluated based on proportions of lack of lesion in the groups exposed to DMH. **Results:** Cancerous tumor lesions were identified in: two specimens of group C₁, one specimen of group E₁ and two specimens of group E₂. No intestinal lesions were identified in group C₂. The proportions of lack of lesion were: in group C₁ of 75%, in group E₁ of 87.5% and group E₂ of 75%. No significant differences were found ($p > 0.05$). **Conclusions:** It was not found a significant protective effect of SIO on DMH-induced CC in Holtzman rats, compared to control group.

Keywords: Colonic neoplasms; Alpha-linolenic acid; Linoleic acid; 1,2-dimethylhydrazine; Rats (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon (CC) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo, correspondiendo aproximadamente al 9% de los cánceres diagnosticados y siendo el tercer cáncer más frecuente en incidencia y el cuarto en mortalidad, en ambos sexos ⁽¹⁾. En el Perú se ha registrado un promedio de 612 casos de CC anuales desde el 2006. Correspondiendo al sexto cáncer más frecuente en hombres y al séptimo en mujeres ⁽²⁾.

La incidencia de CC está asociada principalmente con el tipo de dieta, el estilo de vida y factores

hereditarios. Es así que, dentro de los componentes de la dieta occidental, la grasa, principalmente de origen animal (ácidos grasos saturados), ha demostrado una sugerente asociación con el incremento del riesgo de CC, basado en la promoción de factores inflamatorios en modelos animales y algunos ensayos clínicos aleatorizados. Siendo recomendado reducir su ingesta o reemplazarla por grasa de origen marino o vegetal (ácidos grasos poliinsaturados) ⁽³⁾.

Estudios experimentales han demostrado los efectos antiinflamatorios, antiagregantes y antiarrítmicos de los ácidos grasos omega-3: ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA) y ácido α-linolénico

(ALA); presentes en gran cantidad en aceites de origen marino y vegetal. De la misma manera, se han demostrado efectos opuestos en los ácidos grasos omega-6: ácido linoleico (LA) y ácido araquidónico (AA); presentes en el resto de aceites y productos de origen animal ⁽⁴⁾. Por lo que se ha propuesto la reducción de la relación omega-6/omega-3 en la dieta como medio para reducir el riesgo de enfermedades como el cáncer. Evidenciándose una reducción de los marcadores de inflamación y proliferación celular con el aumento en la ingesta de omega-3 ⁽⁵⁾.

A nivel molecular, se han identificado los mecanismos de la actividad anticancerígena de los ácidos grasos omega-3 de cadena larga (EPA y DHA). Sin embargo, la evidencia aún no es concluyente respecto al efecto anticancerígeno de ALA (precursor de EPA y DHA) ⁽⁶⁾. No obstante, nuevos estudios experimentales utilizando dietas con alto contenido de ALA, han podido demostrar efectos antiinflamatorios y antioxidantes. Es así que, los aceites de origen vegetal (abundantes en ALA) constituyen una fuente alternativa para aprovechar los beneficios de los ácidos grasos omega-3, que a diferencia de los de origen marino se caracterizan por ser ecológicamente sustentables y libre de contaminantes ⁽⁷⁾.

Dentro de los aceites de origen vegetal con elevados niveles de omega-3, encontramos al aceite de Sacha Inchi (ASI), el cual está compuesto de hasta en 93% de ácidos grasos insaturados, entre los cuales se encuentra ALA hasta en un 51% y LA por lo menos en un 34%, que lo diferencia del resto de aceites vegetales en los que predominan LA y que sumado a la presencia de compuestos bioactivos antioxidantes como el δ -tocoferol (vitamina E) y el β -caroteno (pro-vitamina A), hacen del ASI una importante fuente de fitoquímicos promotores de la salud ⁽⁸⁾.

Debido a que no existen muchas investigaciones sobre el efecto de aceites con elevados niveles de ácidos grasos omega-3 de origen vegetal en el desarrollo de CC y siendo los más representativos aquellos realizados con el aceite de linaza (*Linum usitatissimum*), los cuales aún no han demostrado resultados concluyentes ⁽⁹⁾. Se plantea la siguiente investigación para evidenciar si el ASI tiene un efecto protector sobre el desarrollo de CC inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas Holtzman.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y población

Estudio experimental, realizado en ratas albinas machos de la cepa Holtzman, de entre 3 a 3,5 meses de edad y de 300 a 350 g de peso (al inicio), procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud.

Los especímenes fueron mantenidos en un ambiente del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, a una temperatura de 25 ± 2 °C, sometidos a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, y con alimentación balanceada para roedores procedente de la Universidad Agraria La Molina y agua *ad libitum*.

Tamaño de la muestra

Se determinó aplicando la fórmula de estimación de valores medios poblaciones ⁽¹⁰⁾, con una proporción en el grupo control de $1,94 \times 10^{-4}$, según el programa de vigilancia y epidemiología del Instituto de Nacional de cáncer ⁽¹¹⁾; y en el grupo experimental de 0,93, según el protocolo de inducción de CC de Gigola et al. ⁽¹²⁾. Obteniéndose una muestra de 7 especímenes por grupo y con un margen de mortalidad de 1, se utilizó un total de 8 por grupo (un grupo control positivo y dos experimentales) y la mitad en un grupo control negativo, de acuerdo a las recomendaciones de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos ⁽¹³⁾.

Grupos de experimentación

Se formaron cuatro grupos: un grupo control positivo (C₁), un grupo control negativo (C₂) y dos grupos experimentales (E₁ y E₂). La exposición carcinogénica y la dosis de ASI suministrada, se describe en la Tabla 1.

Variables de estudio

Aceite de Sacha Inchi (ASI)

Aceite obtenido a partir de la semilla de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.), planta perenne y oleaginosa perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, que crece en

Tabla 1. Distribución de los especímenes de experimentación en 4 grupos.

Grupo	Denominación	Nro. de Especímenes	Exposición carcinogénica	Dosis de ASI
C ₁	“DMH”	8	DMH	Ninguna
C ₂	“ASI*150”	4	Ninguna	150 μ L/kg/día
E ₁	“DMH+ASI*150”	8	DMH	150 μ L/kg/día
E ₂	“DMH+ASI*300”	8	DMH	300 μ L/kg/día

DMH: 1,2-dimetilhidrazina; ASI: Aceite de Sacha Inchi.

la selva amazónica peruana entre los 200 a 1500 m. de altitud y es utilizada desde tiempos ancestrales por las poblaciones originarias en estas regiones ⁽¹⁴⁾.

Se utilizó el aceite “Inca Inchi” (Agroindustrias Amazónicas – Perú), aceite de semillas seleccionadas de Sacha Inchi con una composición específica de ácidos grasos omega-3 de 48,61% y omega-6 de 36,80%.

1,2-dimetilhidrazina (DMH)

Agente alquilante utilizado en la inducción de la carcinogénesis de colon en roedores. Tras ser administrado, se metaboliza en el hígado hacia formas intermedias de azoximetano y metilazoximetanol, y luego al ion metildiazonio, el cual produce la metilación de la guanina del ADN de las células epiteliales del colon, promoviendo la activación de la apoptosis celular e incremento de la proliferación y mutaciones celulares ⁽¹⁵⁾.

Se utilizó el diclorhidrato de N,N'-dimetilhidrazina al 98% (Sigma-Aldrich – Estados Unidos), con número CAS 306-37-6.

Cáncer de colon (CC)

Tumor maligno localizado en el colon, originado predominantemente del epitelio glandular, caracterizado por penetrar la capa muscular de la mucosa y por poseer grados variables de diferenciación ⁽¹⁶⁾.

Se utilizó la clasificación histológica de tumores de colon y recto de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual describe los siguientes subtipos: adenocarcinoma (de patrón tubular, tubulovelloso o velloso), adenocarcinoma mucinoso (si más del 50% del tumor está compuesto de mucina extracelular), carcinoma de células en anillo de sello (si más del 50% está compuesto por células con prominente mucina intracitoplasmática), carcinoma indiferenciado (si no se distinguen estructuras glandulares) y otros menos frecuentes como carcinoma de células pequeñas, de células escamosas y medular ⁽¹⁷⁾.

Procedimientos

El proceso experimental tuvo una duración total de 26 semanas y estuvo compuesto por 4 fases. Adicionalmente, se realizó un registro semanal de la variación del peso de cada espécimen.

Alimentación con dieta balanceada: Los 28 especímenes fueron distribuidos al azar en los cuatro grupos descritos. A continuación, se inició una dieta a base de alimento balanceado y agua de mesa, en una cantidad aproximada al 10% de su peso por día.

Administración de ASI: Transcurrido 3 semanas, se le adicionó ASI a 150 μ L/kg/día a la dieta de los

especímenes de los grupos C₂ y E₁, dosis media recomendada por Vicuña et al. ⁽¹⁸⁾. Administrada por vía oral mediante una micropipeta automática, un total de 23 semanas. De la misma manera, se le adicionó el doble de ASI (300 μ L/kg/día) al grupo E₂, durante el mismo tiempo.

Exposición a DMH: Transcurrido 10 días de la administración de ASI, se inició la exposición a DMH a los grupos C₁, E₁ y E₂, mediante la inyección intramuscular de 20 mg/kg/semana durante 8 semanas, de acuerdo al protocolo descrito por Gigola et al. ⁽¹²⁾. Se diluyó la DMH en solución fisiológica, se estabilizó con EDTA y se llevó a pH 7,0 con una solución de bicarbonato de sodio 1 M. Obteniéndose una concentración de 10 mg/mL de solución.

Desarrollo de CC: Luego de la exposición a DMH, se realizó el seguimiento diario de la evolución del estado general de todos los especímenes durante 14 semanas, para completar un tiempo de inducción de 22 semanas, en el que se esperó el efecto de la DMH sobre el epitelio del colon.

Análisis patológico

Los especímenes fueron sacrificados mediante el protocolo de eutanasia con pentobarbital sódico ⁽¹⁹⁾. Inmediatamente, se procedió con la disección de la pared abdominal y extracción del intestino delgado y grueso, que fueron almacenados y fijados en frascos con una solución de formol al 10%, por 4 semanas.

En el análisis macroscópico, se incidió longitudinalmente el intestino para la identificación de lesiones tumorales macroscópicas (más de 5 mm de diámetro), que son los centros iniciales de carcinogénesis denominados lesiones en placa múltiples (LPM) ⁽²⁰⁾. Estos hallazgos fueron reportados topográficamente, dividiendo al tejido en intestino delgado proximal, intestino delgado distal, intestino grueso proximal (ciego y colon proximal) e intestino grueso distal (colon distal y recto). Luego, las LPM fueron recortadas, incluidas en parafina, seccionadas en cortes de 5 μ m y teñidas con hematoxilina y eosina.

En el análisis microscópico, se utilizó un microscopio óptico para identificar la presencia histopatológica de lesiones tumorales asociadas al CC según la clasificación de la OMS ⁽¹⁷⁾.

Aspectos éticos

Se siguieron las normas internacionales de ética en el manejo de animales de experimentación especificadas en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” ⁽¹³⁾.

Tabla 2. Hallazgos microscópicos del análisis del tejido intestinal de los especímenes.

Grupo	Denominación	Nro. de espécimen	Ubicación	Hallazgo patológico
C ₁	DMH	"2"	IGP	Adenocarcinoma
			IGD	Adenocarcinoma
		"3"	IDP**	Adenocarcinoma
			IGP	Adenocarcinoma
C ₂	ASI*150	-	-	No lesiones tumorales
E ₁	DMH + ASI*150	"8"	IDP**	Adenocarcinoma mucinoso
E ₂	DMH + ASI*300	"7"	IGP	Carcinoma de células en anillo de sello
		"8"	IDP**	Adenocarcinoma mucinoso

DMH: 1,2-dimetilhidrazina; ASI*: Aceite de Sacha Inchi y dosis en µL/kg/día; IGP: Intestino grueso proximal; IGD: Intestino grueso distal; IDP: Intestino delgado proximal. **Metástasis

Análisis de datos

Para evaluar el efecto protector del ASI sobre el desarrollo de CC, se comparó la proporción de ausencia de lesión (especímenes que no desarrollaron lesiones tumorales / número de especímenes del grupo) entre los grupos expuestos a DMH: Grupo control positivo (C₁) y los grupos experimentales alimentados con ASI (E₁ y E₂). Se aplicó la prueba de chi-cuadrado para evaluarlas diferencias entre estas proporciones.

Se utilizaron los programas SPSS (Statistical Product and Service Solutions) versión 20 y Microsoft® Excel versión 2013.

RESULTADOS

La variación promedio de peso registrada en cada grupo de experimentación tras finalizar las 22 semanas de inducción de CC, evidenció una ganancia total de peso que en orden decreciente fue: 101,50±27,18 g en el grupo E₂ ("DMH+ASI*300"), 99,37±46,24 g en el grupo C₁ ("DMH"), 97,50±50,09 g en el grupo C₂ ("ASI*150") y 95,12±32,62 g en el grupo E₁ ("DMH+ASI*150"). Tal como se describe en la Figura 1. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

En el análisis macroscópico de los intestinos de los especímenes se hallaron diversos tipos de LPM en las diferentes regiones del intestino grueso y delgado.

En el análisis microscópico de las LPM, se identificaron lesiones tumorales del tipo adenocarcinoma en dos especímenes del grupo C₁, del tipo adenocarcinoma mucinoso en un espécimen del grupo E₁ y un espécimen del grupo E₂ y del tipo carcinoma de células en anillo en sello en un espécimen del grupo E₂. No se identificaron lesiones tumorales cancerosas en el grupo C₂. Estos hallazgos se describen en la Tabla 2, Figura 2 y Tabla 3.

DISCUSIÓN

El efecto protector del ASI se evaluó en base a la incidencia de lesiones tumorales cancerosas en los intestinos de los especímenes, el cual se analizó junto a otros parámetros cuantitativos y cualitativos, como la variación de pesos, efectividad del modelo aplicado, tipo de lesión histopatológica, localización anatómica y diseminación tumoral.

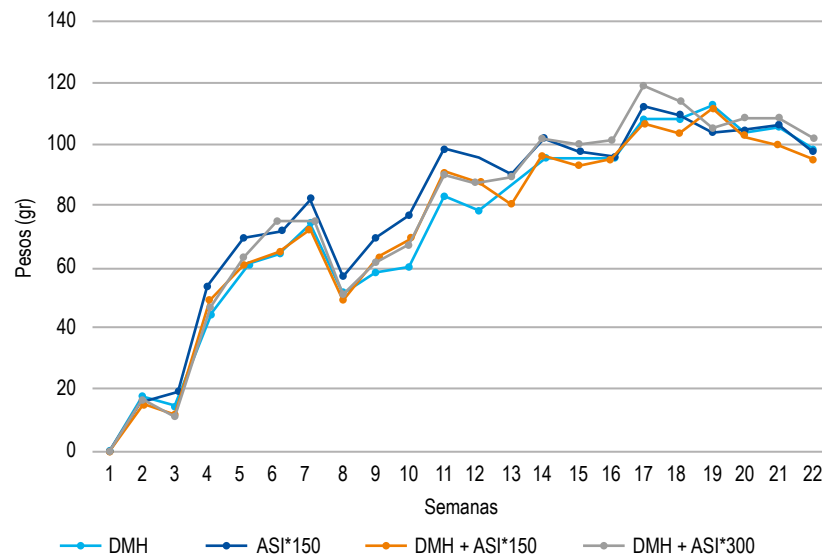
El incremento de peso al finalizar el proceso experimental fue estadísticamente similar entre los 4 grupos. Este hallazgo es semejante al de Hijová et al. ⁽²¹⁾, en un modelo experimental de CC en ratas alimentadas con diversas sustancias bioactivas como el aceite de linaza, aceite con similar concentración de omega-3 que el ASI ⁽⁸⁾.

Respecto a la efectividad del modelo de CC aplicado, se obtuvo un 25% de incidencia de CC en el grupo expuesto solo a DMH, en el cual se quiso replicar el protocolo descrito por Gigola et al. ⁽¹²⁾, que fue ajustado en el presente trabajo utilizando otra

Tabla 3. Frecuencia y porcentaje de la presencia y ausencia de lesiones tumorales cancerosas en los intestinos de los especímenes de los grupos expuestos a 1,2- dimetilhidrazina.

Grupo	Denominación	Con lesiones		Sin lesiones**	
		n	%	n	%
C ₁	DMH	2	25,0	6	75,0
E ₁	DMH + ASI*150	1	12,5	7	87,5
E ₂	DMH + ASI*300	2	25,0	6	75,0

DMH: 1,2-dimetilhidrazina; ASI*: Aceite de Sacha Inchi y dosis en µL/kg/día. **No se encontraron diferencias significativas (p=0,777).



DMH: 1,2-dimetilhidrazina; ASI*: Aceite de Sacha Inchi y dosis en $\mu\text{L/kg/día}$. No se encontraron diferencias significativas a la semana 22 ($p=0,989$).

Figura 1. Variación semanal promedio de los pesos de los especímenes según grupo, durante el tiempo de inducción.

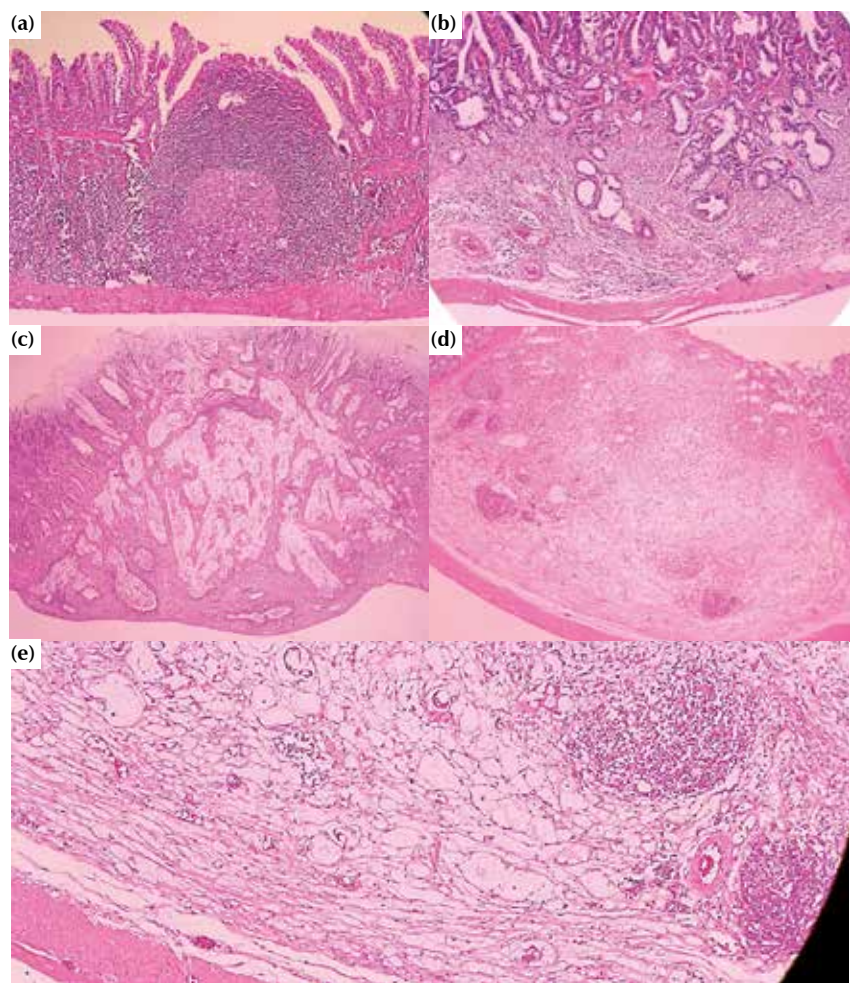


Figura 2. Tipos histológicos de lesiones tumorales cancerosas identificadas en los intestinos de los especímenes expuestos a 1,2-dimetilhidrazina. Cortes representativos de las lesiones intestinales identificadas con coloración H&E: **(a)** Intestino normal (20x), **(b)** Adenocarcinoma (20x), **(c)** Adenocarcinoma mucinoso (20x), **(d)** Carcinoma de células en anillo de sello (20x) y **(e)** Células en anillo de sello (40x).

cepa y un tiempo menor (22 semanas). Este hallazgo evidenciaría la dependencia de largos periodos de inducción carcinogénica para lograr una mayor efectividad. Sin embargo, la efectividad obtenida pudo atribuirse a un análisis patológico limitado a la identificación de lesiones tumorales cancerosas tardías como el adenocarcinoma y demás tipos tumorales hallados, parámetro que pudo incrementarse con un análisis basado en la identificación de adenomas con altos grados de displasia, focos de criptas aberrantes y otras lesiones pre-neoplásicas, que aparecen tras 8 a 12 semanas de inducción carcinogénica^(15,22). No obstante, dichos métodos podrían repercutir sobre los costos.

Otros factores como la dosis/vía de administración de la DMH y la cepa/edad de los especímenes también pudieron haber influenciado en la efectividad obtenida. Así Perše *et al.*⁽²³⁾ señalan que existen diversos protocolos de inducción de CC cuya reproducibilidad está basada en la aplicación de distintas dosis de DMH (entre 15 a 40 mg/kg), administradas por diferentes vías (subcutánea, intraperitoneal, oral), utilizando diversas cepas de ratas (Fisher, Sprague-Dawley, Wistar) y con diferentes edades iniciales (de 6 a 10 semanas).

Cuantitativamente, comparando la proporción de ausencia de lesión del grupo control positivo C₁ (expuesto solo a DMH) versus las de los grupos experimentales E₁ y E₂ (alimentados con ASI), se pudo evidenciar un efecto protector no significativo en el grupo E₁ que recibió la dosis de 150 µL/kg/día y ningún efecto sobre el grupo E₂ con la dosis de 300 µL/kg/día. Estos hallazgos se correlacionan en parte con lo planteado por Ren *et al.*⁽²⁴⁾ y Zhao *et al.*⁽²⁵⁾, referente al potencial efecto antiinflamatorio del ALA (48% del ASI utilizado), mediante a la inhibición de la expresión del Factor Nuclear κB y la disminución de proteínas quinasas activadas por mitógenos, resultando en la disminución de la producción de IL-6, IL-1β y TNF-α, efecto que produciría la inhibición de las vías asociadas a factores crecimiento dependientes de la activación de la señalización inflamatoria, las cuales son responsables del desarrollo de lesiones adenomatosas precursoras del CC⁽²⁶⁾. Sin embargo, estos hallazgos parecen contrastarse en mayor proporción con lo planteado por Cockbain *et al.*⁽²⁷⁾ y Chapkin *et al.*⁽²⁸⁾, respecto a la restricción del efecto anticancerígeno de los ácidos grasos omega-3, a los de cadena larga: EPA y DHA (ausentes en el ASI). Efecto atribuido a la modulación de la actividad de la COX-2, la alteración de la dinámica de membrana y receptores celulares implicados en la regulación de la proliferación/apoptosis, la alteración del equilibrio REDOX e incremento del estrés oxidativo, y la producción de mediadores lipídicos antiinflamatorios. Mecanismos que han podido contrastarse en diversos estudios experimentales, a diferencia de los atribuidos al ALA, que, si bien puede ser convertido mediante elongación y desaturación

a EPA y luego a DHA, no obstante, la eficiencia de esta conversión en mamíferos es muy baja (cerca de 0,2%) y la vía enzimática utilizada es compartida competitivamente con la conversión de LA a AA⁽²⁹⁾. Mecanismos que permiten comprender el limitado efecto anticancerígeno evidenciado con la alimentación con ASI. Por otro lado, uno de los componentes del ASI que pudo haber influido en tal efecto, es el LA (36% del ASI utilizado) que ha demostrado poseer ciertos efectos proinflamatorios mediados por su conversión a AA y posterior metabolismo a PGE₂, LTB₄ y derivados del ácido Epoxieicosatrienoico, que producen un incremento de citoquinas inflamatorias⁽⁴⁾. Vías que sugerirían un efecto opuesto de los ácidos grasos omega-6, que podría haber interferido con el efecto antiinflamatorio/anticancerígeno de los omega-3, tal como parecen indicar los resultados.

Así mismo, estos hallazgos podrían estar en relación a la administración de dosis no adecuadamente suficientes de ASI para alcanzar un efecto anticancerígeno. Debido a los pocos estudios realizados para evaluar dicho efecto con el uso de ASI, entre los cuales, Mesía *et al.*⁽³⁰⁾, refieren una mayor actividad antiinflamatoria a 200 µL/kg; y Pinedo⁽³¹⁾, una mayor activación de la respuesta inmune a 400 µL/kg. Lo que parece concordar con Valenzuela *et al.*⁽³²⁾, respecto a que aún no están establecidas las dosis específicas y los tiempos de administración adecuados de las diversas fuentes de omega-3 disponibles.

Cualitativamente, se identificaron lesiones tumorales únicamente del tipo adenocarcinoma en el grupo expuesto solo a DMH (Grupo C₁), tipo histopatológico que suele aparecer en estadios iniciales del CC y que preservan cierto grado de diferenciación celular; a diferencia de las encontradas en los grupos alimentados con ASI, que fueron del tipo adenocarcinoma mucinoso (Grupo E₁) y carcinoma de células en anillo en sello (Grupo E₂), que aparecen de manera tardía, presentan menor grado de diferenciación y están asociadas a altos niveles de inestabilidad de microsátélites y mayor propensión a desarrollar metástasis⁽¹⁶⁾. Estos hallazgos corroboran el limitado efecto protector evidenciado tras la administración de dos dosis de ASI y sugerirían cierta dificultad para limitar la potencia de la carcinogénesis inducida por DMH, que podría correlacionarse en parte a cierto efecto proinflamatorio asociado a los ácidos grasos omega-6, previamente descrito.

Topográficamente, se identificaron lesiones tumorales en la región proximal del intestino grueso en por lo menos un espécimen de cada grupo expuesto a DMH (Grupos C₁, E₁ y E₂). Localización anatómica que suele afectarse de manera tardía en los modelos de CC experimentales, cuyo mecanismo de origen se ha relacionado con la activación del oncogén K-Ras, describiéndose un tiempo medio de 22 semanas de

inducción con DMH para la aparición de lesiones en esta región⁽²³⁾. Estos hallazgos corroboran la potencia inductora de CC de la DMH, que se evidenció en el modelo experimental aplicado, cuya localización coincide con el tiempo de inducción utilizado, lo cual no parece indicar una limitación cronológica del protocolo aplicado, sino que podría asociarse al tipo de análisis patológico previamente discutido. Así mismo, estos hallazgos sugerirían cierta dificultad para limitar la progresión del desarrollo de CC, que concuerda con el limitado efecto protector evidenciado con las dos dosis de ASI.

En relación a las lesiones tumorales extracolónicas (metastásicas), se identificaron en el intestino delgado, lesiones tales como adenocarcinoma y adenocarcinoma mucinoso, en por lo menos un espécimen de cada grupo expuesto a DMH (Grupos C₁, E₁ y E₂). Estos hallazgos evidenciarían el potencial de diseminación por contigüidad desarrollado en el modelo de CC aplicado, asociado también a estadios avanzados en la progresión del CC, pero que no corresponde a los sitios de metástasis más habituales (en roedores), tales como ganglios linfáticos y peritoneo⁽³³⁾; regiones que no fueron objeto de estudio en la presente investigación. No obstante, estos hallazgos corroboran a una vez más el potencial inductor de la DMH y concuerdan con el limitado efecto protector del ASI en las dosis administradas, al sugerir cierta dificultad para evitar la diseminación tumoral.

Finalmente, es necesario mencionar que la trascendencia de los hallazgos discutidos parece estar limitada en parte por el tipo de análisis patológico y por el mínimo número de especímenes utilizados para replicar el modelo CC propuesto. No obstante, estos hallazgos concuerdan con los aún heterogéneos resultados de los estudios sobre el efecto anticancerígeno de los omega-3 de origen vegetal. Por otro lado, con la presente investigación se concreta uno de los primeros ensayos para poner a prueba el efecto sobre la carcinogénesis de uno de los aceites vegetales que ha adquirido mayor relevancia por poseer uno de los mejores perfiles de ácidos grasos esenciales, ante la ausencia de antecedentes específicos en este ámbito. Sin embargo, aún no queda claro la posibilidad de optimizar o corroborar la presencia de un efecto protector restringido del ASI, por lo que se recomienda realizar nuevos estudios utilizando diferentes dosis de ASI, mayor número de especímenes y métodos diagnósticos alternativos, que permitan contrastar lo evidenciado.

En conclusión, en el modelo experimental aplicado, el ASI no logró evidenciar un efecto protector significativo sobre el desarrollo de CC inducido con DMH en ratas Holtzman.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Jorge Arroyo por su apoyo con la suministro del insumo químico necesario para el desarrollo del modelo experimental aplicado. Además, se agradece al personal del laboratorio de Bioquímica, Fisiología, Farmacología y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, así como al personal del laboratorio de Patología del Hospital Belén de Trujillo, por su apoyo técnico en la ejecución de las distintas etapas en el desarrollo del presente trabajo.

Fuente de financiamiento: El trabajo no contó con ningún tipo de financiamiento.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haggard FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009;22(4):191.
2. Ramos WC, Venegas DR. Análisis de la Situación del Cáncer en el Perú, 2013. Lima: Ministerio de Salud; 2013.
3. Vargas AJ, Thompson PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. *Nutr Clin Pract.* 2012;27(5):613-23.
4. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008;47(2):147-55.
5. Daniel CR, McCullough ML, Patel RC, Jacobs EJ, Flanders WD, Thun MJ, *et al.* Dietary intake of omega-6 and omega-3 fatty acids and risk of colorectal cancer in a prospective cohort of US men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):516.
6. Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Lett.* 2008;269(2):363-77.
7. Venegas-Calerón M, Sayanova O, Napier JA. An alternative to fish oils: metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2010;49(2):108-19.
8. Fanali C, Dugo L, Cacciola F, Beccaria M, Grasso S, Dachà M, *et al.* Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *J Agric Food Chem.* 2011;59(24):13043-9.
9. Oikarinen SI, Pajari A-M, Salminen I, Heinonen S-M, Adlercreutz H, Mutanen M. Effects of a flaxseed mixture and plant oils rich in α -linolenic acid on the adenoma formation in multiple intestinal neoplasia (Min) mice. *Br J Nutr.* 2005;94(04):510-8.
10. Moreno Altamirano L, Valle FC, Romero HG. *Epidemiología Clínica.* 2a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 1994.
11. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, *et al.* SEER cancer statistics review, 1975–2010. 2013. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2013.
12. Gigola G, Melatini G, Ullua N, Cardozo C, Arrieta GM, Perez JE. Comparación de dos protocolos de inducción de cáncer colorrectal en ratas Wistar-Lewis con 1,2-Dimetilhidrazina. *Oncol Clínica.* 2011;16(1):1-4.
13. Clark JD, Baldwin RL, Bayne KA, Brown MJ, Gebhart GF, Gonder JC, *et al.* Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996.
14. Chirinos R, Zuloeta G, Pedreschi R, Mignolet E, Larondelle Y, Campos D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chem.* 2013;141(3):1732-9.
15. Perse M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced

- colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:473964.
16. Boivin GP, Washington K, Yang K, Ward JM, Pretlow TP, Russell R, *et al*. Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology*. 2003;124(3):762-77.
 17. Hamilton SR, Aaltonen LA. WHO Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Vol. 48. Lyon: IARC press; 2000.
 18. Viciña A, Izquierdo EJ, Huamán JJ. Gemfibrozilo versus aceite de Sacha Inchi en la reducción de niveles de triglicéridos séricos en *Rattus rattus* var *albinus*. *Acta Med Per*. 2012;29(2):85-8.
 19. Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, *et al*. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Lab Anim*. 1997;31(1):1-32.
 20. Vaish V, Tanwar L, Sanyal SN. The role of NF- κ B and PPAR γ in experimentally induced colorectal cancer and chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibitors. *Tumor Biol*. 2010;31(5):427-36.
 21. Hijová E, Chmelárová A, Bomba A. Effectiveness of bioactive food components in experimental colon carcinogenesis. *Acta Vet Brno*. 2009;78(4):661-6.
 22. Jucá MJ, Bandeira BC, Carvalho DS, Leal AT. Comparative study of 1, 2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. *J Coloproctology Rio Jan*. 2014;34(3):167-73.
 23. Perše M, Cerar A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis. *Radiol*. 2005;39(1):61-70.
 24. Ren J, Chung SH. Anti-inflammatory effect of α -linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Agric Food Chem*. 2007;55(13):5073-80.
 25. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. Dietary α -linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(2):385-91.
 26. Markowitz SD, Bertagnoli MM. Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2449-60.
 27. Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut*. 2012;61(1):135-49.
 28. Chapkin RS, McMurray DN, Lupton JR. Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(1):48-54.
 29. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med*. 2008;233(6):674-88.
 30. Mesía JM, Sinti WD. Evaluación del efecto antiinflamatorio del aceite de *Plukenetia volubilis* L. mediante el método de granulona en ratas albinas machos-IMET-EsSalud-Iquitos-2011 [Tesis]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2011.
 31. Pinedo-Pérez TE. Evaluación de la actividad inmunoestimulante del aceite y semillas de *Plukenetia volubilis* L. en ratas albinas [Tesis]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2010.
 32. Valenzuela R, Bascuñan K, Chamorro R, Valenzuela A. Ácidos grasos omega-3 y cáncer, una alternativa nutricional para su prevención y tratamiento. *Rev Chil Nutr*. 2011;38(2):219-26.
 33. Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. *J Carcinog*. 2009;8(1):5.

Correspondencia

César Abel Centurión Rodríguez
Av. Salvador Lara R-4, Urb. Miraflores. Trujillo, Perú.
E-mail: abelcent@gmail.com