

## Disminución del número de tumores intestinales inducidos por 1,2–dimetilhidrazina en ratas alimentadas con leche descremada \*

Sánchez Negrette, M.; Montenegro, M.A.; Lértora, W.J.; Catuogno, M.S.

Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE,  
Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. Tel/Fax: 03783–425753,  
E–mail: patgral@vet.unne.edu.ar

### Resumen

**Sánchez Negrette, M.; Montenegro, M.A.; Lertora, W.J.; Catuogno, M.S.: Disminución del número de tumores intestinales inducidos por 1,2–dimetilhidrazina en ratas alimentadas con leche descremada.** Rev. vet 16: 1, 28–31, 2005. Estudios epidemiológicos en seres humanos y experimentales en animales de laboratorio, sugieren que la leche y productos lácteos pueden ejercer efectos inhibitorios sobre el desarrollo de varios tipos de tumores. La leche de vaca contiene esfingomielina, ácido butírico, ácido linoleico conjugado, calcio y vitaminas A y D, componentes con capacidad potencial de inhibir el proceso de la carcinogénesis en diversos modelos experimentales. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar el efecto de la ingestión de leche descremada, sobre el desarrollo de neoplasias del colon en un modelo de carcinogénesis experimental en ratas, inducida con 1,2–dimetilhidrazina (DMH). Los tumores intestinales fueron inducidos mediante la inoculación semanal por vía subcutánea de la droga DMH a la dosis de 20 mg/kg durante 10 semanas. Todas las ratas fueron sacrificadas 15 semanas después de la última inoculación. En cada uno de los animales se determinó el número, tamaño, aspecto macroscópico y localización de los tumores en los diferentes segmentos del intestino grueso. Los resultados demostraron menor número de tumores en el lote tratado con leche descremada (n = 75), con respecto al lote tratado únicamente con DMH (n = 137). Macroscópicamente en el lote que recibió dieta láctea predominaron los tumores polipoides (78,66%), mientras que en el lote que no consumió leche predominaron los tumores planos (46,71%). En ambos grupos se observó mayor porcentaje de tumores localizados en el colon distal. El menor número de tumores en el lote alimentado con leche en polvo descremada se atribuye a la menor ingestión de componentes grasos provenientes de la misma, así como a los componentes anticancerígenos propios de la leche.

**Palabras clave:** rata, cáncer de colon, 1,2–dimetilhidrazina, leche.

### Abstract

**Sánchez Negrette, M.; Montenegro, M.A.; Lertora, W.J.; Catuogno, M.S.: Decrease in the number of intestinal tumors induced by 1,2–dimethylhydrazine in rats fed with skimmed milk powder.** Rev. vet 16: 1, 28–31, 2005. Epidemiological studies in human beings and experimental laboratory animals suggest that milk and dairy products can produce inhibitory effects on development of some kinds of tumors. Cow's milk contains sphingomyelin, butyric acid, conjugated linoleic acid, calcium, vitamin A, carotene and vitamin D, all of them having potential capacity to inhibit the process of carcinogenesis. The objective of the present work consisted in determining the effect of skimmed milk powder on the development of colon neoplasias in a model of experimental carcinogenesis in rats, induced with 1,2–dimethylhydrazine (DMH). Intestinal tumors were induced by DMH given subcutaneously as 10 weekly doses at 20 mg/kg body weight. All rats were sacrificed 15 weeks after the last inoculation. In each animal the number, size, macroscopic aspect, and location of tumors in different segments of the large intestine, were determined. Results demonstrated a significant decrease in the number of tumors in the group treated with skimmed milk powder (n = 75) in contrast to the group treated with DMH alone (n = 137). Macroscopically, the group that received milk diet presented a higher percentage of polipoides tumors (78.66%) compared with the group treated with DMH alone (46.71%). Both groups presented a great percentage

of tumors in distal colon. The lesser number of tumors in the lot treated with skimmed milk powder could be due to the minor intake of milk fat, as well as to other milk components which have anticarcinogenic properties.

**Key words:** rat, colon cancer, 1,2-dimethylhydrazine, milk.

## INTRODUCCIÓN

Investigaciones epidemiológicas en seres humanos relacionan al cáncer intestinal, principalmente al cáncer colorrectal, con la ingestión de alimentos ricos en grasa de origen animal y escaso consumo de fibra<sup>15, 18, 21, 23</sup>. En Japón, donde se consume una dieta con mínimo contenido graso, el riesgo de cáncer de colon es bajo<sup>19</sup>. En Argentina, estudios realizados sobre pacientes con diagnóstico de cáncer de colon, demuestran la estrecha relación existente entre el riesgo de cáncer de colon y el consumo de huevos y productos lácteos, principalmente queso<sup>7, 8</sup>.

Trabajos experimentales en animales de laboratorio y estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones, mantienen la hipótesis que la composición de ácidos grasos de la dieta es uno de los factores determinantes en la carcinogénesis del colon. Se ha demostrado que la incidencia de tumores de colon es reducida en ratas alimentadas con dieta de alto contenido en dos tipos de ácidos grasos: omega-3 y omega-6<sup>14</sup>. Estos resultados refuerzan los estudios epidemiológicos realizados en poblaciones del Mediterráneo y en esquimales, cuyo índice de cáncer de colon es bajo y cuyas principales fuentes de lípidos son los aceites de oliva y de pescado, que contienen ácidos omega-3<sup>9</sup>.

Entre sus componentes grasos, la leche de vaca contiene esfingomiélna, ácido linoléico conjugado (ALC) y ácido butírico, potentes agentes capaces de inhibir la carcinogénesis en diversos modelos experimentales<sup>26</sup>. Los efectos de la dieta láctea sobre la carcinogénesis experimental del intestino grueso inducida por el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) en ratas, fueron estudiados por nuestro grupo de investigación<sup>17</sup>. En dicha experiencia las ratas tratadas con leche en polvo entera presentaron mayor incidencia de tumores que el lote que no consumió leche. Esta mayor incidencia de tumores podría deberse a la mayor ingestión de componentes grasos provenientes de la misma.

El objetivo del presente trabajo consistió en determinar el efecto de la administración de leche descremada a fin de corroborar el posible rol de las grasas lácteas en el desarrollo de tumores intestinales inducidos experimentalmente en ratas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron utilizadas 60 ratas Wistar, machos, de 3 meses de edad, con un peso promedio de 190 g. Aleatoriamente los animales fueron divididos en 4 lotes. El lote 1 (n = 10) no recibió DMH ni leche. El lote 2 recibió leche pero no fue inoculado con DMH (n = 10). El lote

3 fue inoculado con DMH sin administración de leche (n = 20). El lote 4, además de recibir DMH, también dispuso de leche (n = 20).

Las ratas fueron mantenidas en jaulas individuales, en ambiente con temperatura controlada de 21°C. La leche fue administrada como sustituto del agua, utilizándose leche en polvo descremada, reconstituida diariamente. La administración de leche comenzó 2 semanas antes de la inoculación con DMH, continuando durante las 10 semanas de tratamiento con la droga cancerígena y finalizando 2 semanas posteriores a la última inoculación; en total las ratas recibieron leche durante 14 semanas. Los componentes de la leche en polvo descremada utilizada fueron, por cada 100 g: proteínas 35 g, lactosa 48 g, grasa 1 g, vitamina B<sub>2</sub> 1,8 mg, vitamina B<sub>12</sub> 1,5 mcg, calcio 1.150 mg y fósforo 950 mg.

Los tumores intestinales fueron inducidos mediante una inyección subcutánea semanal de DMH durante 10 semanas, a la dosis de 20 mg/kg de peso corporal. La solución de DMH fue preparada 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 hidróxido de sodio.

Todos los animales fueron sacrificados 15 semanas después de la última inoculación de DMH. En todos los casos el intestino grueso en su totalidad fue extraído, abierto longitudinalmente, colocado sobre una plancha de cartón y fijado en formol bufferado al 10%. Se determinó el número, tamaño y localización de los tumores en los diferentes segmentos anatómicos del intestino grueso (recto, colon distal, colon proximal y ciego). Los tumores fueron clasificados según su aspecto macroscópico en polipoide, con sus variedades pedunculados y de base sesil, y no polipoide, con sus variedades planos con aspecto de placas y ulceroinfiltrantes. Para el estudio del tamaño, los tumores fueron agrupados en 5 categorías o rangos: de 1 a 5, 6 a 10, 11 a 15, 16 a 20 y más de 20 mm.

## RESULTADOS

Las ratas que dispusieron de leche en polvo descremada la consumieron diariamente sin rechazos, durante las 14 semanas en las que el agua fue sustituida en forma total por la leche. Todos los animales se adaptaron a las condiciones del bioterio y fueron ganando peso a lo largo de la experiencia, tanto en los lotes tratados con DMH, así como en los alimentados únicamente con leche en polvo descremada. No se observaron alteraciones físicas ni cambios del comportamiento durante el tiempo que duró la experiencia en ninguna de las ratas tratadas con la droga cancerígena.



**Figura 1:** Colon de rata tratada con DMH. Se observan múltiples tumores de gran tamaño, localizados principalmente en colon distal.

Al final de la experiencia, las necropsias revelaron que los animales del lote 4 (leche + DMH) presentaron menor número de tumores (3,75 tumores por rata), al ser comparados con los animales del lote 3 (DMH), en los cuales el promedio fue de 6,85 tumores por rata. La Figura 1 muestra los tumores encontrados en el intestino grueso de una rata del grupo tratado con el cancerígeno.

En el lote 4, la mayor frecuencia de tumores correspondió al tipo polipoide sesil, y en segundo lugar al tipo polipoide pediculado. En estos animales no se desarrollaron tumores ulceroinfiltrantes, siendo los tumores planos los de más baja presentación en este lote. En el lote 3 predominaron los tumores planos, seguidos del tipo polipoide sesil (Tabla 1).

En ambos lotes experimentales (3 y 4) el colon distal fue asiento de la mayor concentración de tumores, seguido por el recto. En el lote 4 hubo una marcada disminución de tumores en el ciego (Tabla 2).

En ambos lotes tratados con DMH, la mayor frecuencia de tumores se concentró en el rango de tamaño que va de 1 a 5 mm, seguido por el rango de 6 a 10 mm (Tabla 3). El lote que consumió leche presentó mayor frecuencia de tumores en el rango de tamaño de 1–5 mm con respecto al lote 3. No se observaron tumores de tamaño mayores a 20 mm en el lote 4.

## DISCUSIÓN

La leche de vaca y ciertos productos lácteos ejercen efectos inhibitorios sobre el desarrollo de tumores en varios modelos de carcinogénesis experimental en ratas y ratones, por poseer componentes potencialmente inhibidores de tal proceso<sup>9,16,20</sup>. En una experiencia en la que se suplementó a ratas Wistar con esfingomielina, ácido linoleico conjugado (cis-9–trans-11) y ácido butírico durante 7 semanas, se observó en intestino disminución de focos de criptas aberrantes (lesiones precancerosas) inducidas experimentalmente con el cancerígeno azoximetane<sup>12</sup>. También en ratones CF1, alimentados con una dieta a la cual se adicionó esfingomielina, se observó reducción del número de tumores de colon inducidos experimentalmente<sup>2</sup>. La actividad anticancerígena del

ALC se puso en evidencia al provocar disminución del número de papilomas en piel<sup>3</sup>, de tumores gástricos<sup>4</sup>, así como tumores de mamas inducidos experimentalmente con dimetilbenzantraceno (DMBA)<sup>13</sup>. Además, recientes experimentos en roedores indican que la actividad antitumoral de los productos lácteos se encuentra también en la fracción proteica y más específicamente en la proteína sérica de la leche<sup>1</sup>.

Si bien el consumo de dietas con alto contenido graso es relacionado con una mayor incidencia de cáncer colónico, tanto en estudios epidemiológicos en seres humanos como en estudios experimentales en animales de laboratorio, no todos los componentes grasos actúan de la misma manera. Así, ciertos ácidos grasos como el omega3, omega6, butírico y ALC, además de la esfingomielina, son considerados como potentes agentes anticancerígenos, principalmente con relación al cáncer de colon<sup>12–14</sup>.

En la presente experiencia, observamos que las ratas tratadas con leche descremada en polvo, presentaron disminución significativa en el desarrollo de tumores, tanto en número como en tamaño. Estos resultados no son coincidentes con una experiencia anterior<sup>17</sup>, en la que utilizamos leche entera con alto contenido graso y en la que el desarrollo de tumores intestinales fue significativamente mayor. Por otra parte, se observó un predominio de tumores polipoides en el lote alimentado con leche, en contraste con el lote tratado únicamente

**Tabla 1.** Frecuencia de los diferentes tipos macroscópicos de tumores en ambos lotes tratados con DMH.

tipo	lote 3 (DMH)	lote 4 (DMH + leche)
polipoide sesil	58 (42,33%)	32 (42,66%)
polipoide pediculado	6 (4,38%)	27 (36,00%)
plano	70 (51,11%)	16 (21,34%)
ulceroinfiltrante	3 (2,18%)	–
tumores totales	137	75

**Tabla 2.** Localización y porcentaje de tumores en ambos lotes tratados con DMH.

localización	lote 3 (DMH)	lote 4 (DMH + leche)
recto	32 (23,35%)	30 (40,00%)
colon distal	68 (49,64%)	31 (41,34%)
colon proximal	15 (10,95%)	11 (14,66%)
ciego	22 (16,06%*)	3 (4,00%)
tumores totales	137	75

**Tabla 3.** Tamaño de los tumores en ambos lotes tratados con DMH.

tamaño	lote 3 (DMH)	lote 4 (DMH + leche)
1–5 mm	58 (42,33%)	47 (62,66%)
6–10 mm	58 (42,33%)	24 (32,00%)
11–15 mm	17 (12,40%)	3 (4,00%)
16–20 mm	1 (0,72%)	1 (1,34%)
+ 20 mm	3 (2,18%)	–
tumores totales	137	75

te con DMH, donde predominaron los tumores planos. Este resultado coincide con otras investigaciones en las que se observaron variaciones en el desarrollo de determinados tipos de tumores<sup>11,17</sup>. En una investigación en la que se trabajó con alta concentración de molibdeno en la dieta, el estudio macroscópico e histológico de los tumores demostró que las neoplasias polipoides fueron generalmente adenomas o adenocarcinomas con mínimo grado de infiltración y metástasis, comparados con los tumores planos y ulceroinfiltrantes que en su mayoría se correspondieron con carcinomas en células de anillo de sello, o carcinomas mucinosos con alto grado de infiltración y metástasis<sup>11</sup>.

En conclusión, los resultados indican que la alimentación con leche en polvo descremada provocó no sólo disminución del número y tamaño de los tumores, sino también predominio de neoplasias polipoides, consideradas como de mejor pronóstico por su comportamiento histológico. No se descarta que otros componentes de la leche tales como calcio, vitaminas, ácido butírico, ALC y esfingomielina puedan haber actuado como anticancerígenos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores que administraron leche en polvo descremada y obtuvieron un menor desarrollo de tumores mamarios inducidos experimentalmente con el carcinógeno DMBA en ratas<sup>10</sup>.

Futuros estudios deberían ser realizados a fin de determinar los efectos de los distintos componentes de la leche y de sus propiedades anticancerígenas, tanto en forma individual, así como también considerando las posibles interacciones y efectos sinérgicos en el proceso de la carcinogénesis.

## REFERENCIAS

1. **Bounous G, Papanburg R, Kongshavn PA, Gold P, Fleischer D.** 1988. Dietary whey protein inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. *Clin Invest Med* 11: 213–217.
2. **Dillehay DL, Webb SK, Schmelz EM, Merrill AH.** 1994. Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice. *J Nutr* 124: 615–620.
3. **Ha YL, Grimm NK, Pariza MW.** 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881–1887.
4. **Ha YL, Storkson JM, Pariza MW.** 1990. Inhibition of benzol(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50: 1097–1101.
5. **Imaizumi K, Tominaga A, Sato M, Sugano M.** 1992. Effects of dietary sphingolipids on levels of serum and liver lipids in rats. *Nutr Res* 12: 543–548.
6. **Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW.** 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118–6124.
7. **Iscovich JM, L'Abbe KA, Castelleto R, Calzona A, Bernedo A, Chopita NA, Jmelnitzsky AC, Kaldor J.** 1992. Colon cancer in Argentina. I: Risk from intake of dietary items. *Int J Cancer* 51: 851–857.
8. **Iscovich JM, L'Abbe KA, Castelleto R, Calzona A, Bernedo A, Chopita NA, Jmelnitzsky AC, Kaldor J, Howe GR.** 1992. Colon cancer in Argentina. II: Risk from fibre, fat and nutrients. *Int J Cancer* 51: 858–861.
9. **Kinsella JE.** 1986. Food components with potential therapeutic benefits in n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. *Food Tech* 40: 89–97.
10. **Klurfeld DM, Weber MM, Kritchevsky D.** 1983. Comparison of semipurified and skim milk protein containing diets on DMBA induced breast cancer in rats. *Kiel Milchwirtschaft Forschung* 35: 421–422.
11. **Montenegro MA, Sánchez Negrette M, Gimeno EJ, Borda JT.** 2002. Effects of high molybdenum intake on 1,2-dimethylhydrazine induced intestinal tumors in rats. *Biocell* 26: 339–345.
12. **Nichenametla SN, South EM, Exon JH.** 2004. Interaction of conjugated linoleic acid, sphingomyelin, and butyrate on formation of colonic aberrant crypt foci and immune functions in rats. *J Toxicol Environ Health A* 67: 469–481.
13. **Parodi PW.** 1996. Milk fat components: possible chemopreventive agents for cancer and other diseases. *Austrian J Dairy Tech* 51: 24–32.
14. **Reddy BS, Burill C, Rigotty J.** 1991. Effects of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 51: 487–491.
15. **Reddy BS, Wynder EL.** 1973. Large bowel carcinogenesis: fecal constituents of populations with diverse incidence rates of colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 50: 1437–1442.
16. **Roble NM, Bird RP.** 1994. Effects of high corn oil on preneoplastic murine colon: prostanoid production and lipid composition. *Lipids* 29: 67–71.
17. **Sánchez Negrette M, Montenegro MA, Burna AN, Cattuogno MS.** 2005. Efectos de la dieta láctea sobre la carcinogénesis experimental del colon en ratas. *Vet Arg* 22: 91100.
18. **Suzuki K, Mitsuoka T.** 1992. Effect of low-fat, high-fat, and fiber-supplemented high-fat diets on colon cancer risk factors in feces of healthy subjects. *Nutr Cancer* 18: 63–71.
19. **Tajima K, Hirse K, Nakagawa N, Kuroshishi T, Tomi-naga S.** 1985. Urban-rural differences in the trend of colorectal cancer in Japan. *Jpn J Cancer Res* 76: 717–728.
20. **Ustarroz E.** 2003. Un ácido graso benéfico para la salud humana. *Vet Arg* 20: 46–48.
21. **Weisburger JH, Wynder EL.** 1991. Dietary fat intake and cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 5: 7–23.
22. **Wynder EL, Reddy BS.** 1973. Studies of large bowel cancer: human leads to experimental application. *J Natl Cancer Inst* 50: 1099–1106.
23. **Wynder EL, Shigematsu T.** 1967. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 20: 1520–1561.