

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Ki67 Y DE LOS REGULADORES DEL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR CICLINA D1, p53 Y Bcl-2, EN LA MUCOSA GÁSTRICA DE RATONES DE LA CEPA MUS MÚSCULOS SOMETIDOS AL CONSUMO CRÓNICO DE HABAS Y, HABAS Y SAL

Harold Jofre Bolaños Bravo*, Sofía Isabel Freyre Bernal**,
Jeison Harvey Carlosama Rosero***

RESUMEN

El carcinoma gástrico es una neoplasia maligna de amplia distribución a nivel mundial, no obstante, su incidencia es muy variable. En Colombia se observa una mayor incidencia en la región sur-occidente, especialmente los Departamentos del Cauca y Nariño. Los estudios epidemiológicos relacionan varios factores medioambientales como la dieta, entre ellos se citan el consumo de alimentos ahumados y salados, así como de algunos cereales, con un bajo aporte de antioxidantes. Este trabajo de investigación establece, a partir de un modelo experimental de casos y controles, usando ratones de la cepa Mus músculos, expuestos de manera crónica (15 meses), al consumo de habas (Vicia fava) y habas y sal (NaCl), las alteraciones histopatológicas que este tipo de alimentos producen sobre la mucosa gástrica y sobre el ciclo de división celular utilizando la técnica de inmunohistoquímica. Como marcador de proliferación celular se uso Ki67 y como marcadores para los reguladores del ciclo de división celular ciclina D1, p53 y Bcl-2. Esta investigación demuestra una asociación directa entre el consumo crónico de habas y la presencia de atrofia de la mucosa gástrica con una disminución de la proliferación celular en comparación con el grupo control. El grupo experimental expuesto al consumo crónico de habas y sal presentó, al cabo de 15 meses de tratamiento, áreas displásicas en la mucosa gástrica con un

Recibido para evaluación: agosto 30 de 2007. Aprobado para publicación: noviembre 3 de 2007.

* Médico especialista en anatomía patológica. Docente de Patología, Director grupo AMEC

** Química, especialista en Docencia Universitaria. Docente de Bioquímica y Biología molecular. Investigadora grupo AMEC

*** Estudiante de Internado del programa de Medicina Universidad Cooperativa de Colombia. Investigador grupo AMEC.

Correspondencia: Harold Jofre Bolaños Bravo. Carrera 3 No.1- 39 Popayán Cauca. Teléfono celular 3117493813. E mail: haroldbolanos@unicauca.edu.co.

aumento considerable de la proliferación celular y alteraciones de los reguladores del ciclo de división celular determinados por la sobreexpresión de ciclina D1 y p53. No se encontró sobre-expresión para Bcl-2. Esto parece estar relacionado con el alto efecto oxidativo que tienen los nitrosocompuestos que están presentes en las habas (Vicia fava) el cual es potencializado por el consumo crónico de sal (NaCl).

Palabras clave: *Dieta, cáncer gástrico, ciclo celular.*

ABSTRACT

*The gastric carcinoma is a wicked neoplasia of wide distribution at world level, nevertheless, its incidence is very variable. In Colombia a bigger incidence is observed in the region south-occident, especially the Departments of the Cauca and Nariño. The epidemic studies relate several environmental factors as the diet, among them they make an appointment the consumption of smoky and salted allowances, as well as of some cereals, with a first floor it contributes of anti-rust. This investigation work settles down, starting from an experimental model of cases and controls, using mice of the stump *Mus musculus*, exposed in a chronic way (15 months), to the consumption of beans (*Vicia fava*) and beans and salt (NaCl), the alterations histopathological that this type of allowances takes place on the gastric mucosa and on the cellular division cycle using the immunohistochemistry technique. As marker of cellular proliferation use Ki67 and markers for the regulators of the division cycle cellular ciclina D1, p53 and Bcl-2. This investigation demonstrates a direct association between the chronic consumption of beans and the presence of atrophy of the gastric mucosa with a decrease of the cellular proliferation in comparison with the group control. The exposed experimental group to the chronic consumption of beans and salt presented, after 15 months of treatment, displasics areas in the gastric mucosa with a considerable increase of the cellular proliferation and alterations of the regulators of the cellular division cycle determined by the ciclina sobreexpresion D1 and p53. It was not on-expression for Bcl-2. This seems to be related with the high effect oxidative of Nitrous composed that are present in the beans (*Vicia fava*) which is promoted for the chronic consumption of salt (NaCl).*

Key words: *Diet, gastric carcinoma, cellular cycle*

INTRODUCCIÓN

La observación que el carcinoma gástrico puede ser precedido de cambios lesionales en la mucosa gástrica, tanto de naturaleza hiperplásica como inflamatoria, se remonta a finales del siglo XIX. Ya en 1888 Ménétrier publica dos casos de carcinoma gástrico, uno de ellos asociado a hipertrofia difusa de la mucosa gástrica. En 1898 Dielafoy atribuye a la inflamación y ulceración de la mucosa gástrica, descrita previamente por Cruveilhier, el riesgo de transformación en carcinoma gástrico. (1)

El reconocimiento de la metaplasia intestinal data de 1883, cuando Kupffer describe islotes de glándulas intestinales en la mucosa gástrica.(2) En 1938 ya se relaciona con el carcinoma gástrico, la gastritis atrófica que presenta "metaplasia de células caliciformes". A mediados del siglo XX, Lauren por un lado y Morson por otro, describen casos de carcinoma gástrico de "parecido intestinal" originados sobre mucosa gástrica con metaplasia intestinal.(2)

El eslabón más próximo al carcinoma es la displasia, que además de ser poco frecuente, es la lesión con menor grado de acuerdo diagnóstico a pesar de los intentos de consenso de las conferencias de Viena y Padova.(3) Cuadros histológicos que patólogos occidentales interpretan como displasia, son considerados por patólogos japoneses como carcinomas (4), y la displasia de bajo grado se confunde fácilmente con cambios hiperplásicos.

Desde que Pelayo Correa y su grupo publicasen en "Lancet" su hipótesis sobre el modelo patogénico de carcinogénesis gástrica(5), que incluye la secuencia inflamación-atrofia-metaplasia-displasia-carcinoma, se han intentado identificar nuevos parámetros lesionales con mayor o menor riesgo de evolución a carcinoma gástrico. Se ha definido con mayor precisión la metaplasia intestinal y se ha aclarado el misterio del "factor Haenszel".

Guillermo Haenszel, mediante estudios epidemiológicos de migración, postuló la existencia de un factor ambiental vin-

culado a las áreas de mayor riesgo de carcinoma gástrico, que incidiendo en la temprana infancia, condicionaría el riesgo de carcinoma gástrico en la vida adulta.(6) Este aspecto clave en la cronología de la exposición medioambiental también es recogido en la hipótesis de Correa(5), apuntándose a un factor iniciador del proceso de carcinogénesis en las primeras etapas de la vida, relacionado con la ingesta. Pensando en la sal o algún mineral en el suelo o la comida, incluso se postuló que este factor "iniciador" debía ser común a las distintas áreas de alto riesgo de carcinoma gástrico, a pesar de las diferencias en el entorno ambiental de las mismas.(7)

Este factor no es otro, que la bacteria *Helicobacter pylori* (Hp), descubierta en la década siguiente por Marshall y Warren, y que ha revolucionado el panorama actual de la gastroenterología.(8) La infección por *Helicobacter pylori* es de lejos, la causa más frecuente de gastritis crónica en actividad en todo el mundo y el *Helicobacter pylori* figura en la lista de carcinógenos de la clase I de la IARC (9). La infección gástrica por *Helicobacter pylori* es aceptada como factor etiológico necesario, aunque no suficiente, para el desarrollo del carcinoma gástrico.

En un estudio analítico de casos y controles tendiente a explorar los factores medioambientales relacionados con la aparición de gastritis crónica atrófica, de una población nariñense, encontró que el consumo crónico de *Vicia faba* y otro tipo de alimentos, constituyen un riesgo para la adquisición de gastritis crónica atrófica.(10)

Hasta hace 20 años el carcinoma gástrico era el más común en el mundo, pero las ratas de mortalidad han caído en países industrializados. En Colombia representa el tumor gastrointestinal más frecuente y es la primera causa de muerte por neoplasia maligna en el país.(11) El *Helicobacter pylori* es un factor de riesgo establecido, pero no causa suficiente para el desarrollo del cáncer gástrico, y ha representado un factor importante de confusión en los estudios de esta neoplasia.(12) Hay substancial evidencia que sugiere que el riesgo es mayor con la ingesta alta de alimentos salados, carnes curadas, (nitradas) y la sal por sí misma. También se ha observado una disminución del riesgo con ingesta alta de frutas y vegetales por su contenido de vitamina C, y algunas observaciones sugieren la disminución del riesgo con la suplementación de micronutrientes y antioxidantes (betacaroteno y alfatocoferol).(13)

Los trabajos de investigación que relacionan la dieta y el cáncer en grupos poblacionales presentan algunas dificultades en cuanto al manejo de las variables, pobre reproducibilidad, corto periodo de observación y limitaciones éticas.

El uso de animales de experimentación en la investigación en cáncer permite de alguna manera reproducir, con un mejor control de las variables y en un menor periodo de observación, los efectos que se producen sobre la mucosa gástrica de los animales expuestos a ciertos regimenes alimentarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos propuestos se diseñó un estudio de corte experimental de tipo casos y controles, prospectivo-descriptivo con dos grupos experimentales y un grupo control. El grupo control fue alimentado con concentrado para conejos, antioxidantes y agua mineral. Los dos grupos experimentales se repartieron en dos cohortes, una de ellas expuesta a el consumo durante 15 meses de habas y agua mineral y la otra cohorte se sometió al consumo durante 14 meses de habas, sal y agua mineral. En ninguno de los grupos experimentales se utilizaron antioxidantes.

Los animales de los tres grupos experimentales fueron sacrificados de manera aleatoria cada mes hasta completar 15 meses de seguimiento. El estómago se fijó en formol al 10% tamponado y posteriormente se realizaron estudios histopatológicos en bloques de parafina mediante la técnica de hematoxilina-eosina. Esta técnica permitió, con la ayuda de un microscopio óptico, identificar las áreas problema de los grupos experimentales. Posteriormente, se usó la técnica de inmunohistoquímica para la determinación de un marcador de proliferación celular conocido como Ki67 y de los reguladores del ciclo celular como p53, bcl-2 y ciclina D1 mediante la técnica de avidina-biotina-peroxidasa.

La detección de la sobreexpresión de la proteína p53 en lesiones premalignas de la mucosa gástrica ha demostrado tener utilidad en la carcinogénesis gástrica de tipo intestinal.(14)

Un bajo índice de expresión de Bcl-2 y alta expresión de P53 y C- myc se encontró en cáncer de gástrico de tipo intestinal, por lo tanto estos resultados indican que los mecanismos patogénicos pueden ser diferentes entre el tipo de cáncer gástrico difuso y de tipo intestinal.(15)

La detección de la sobreexpresión de la proteína ciclina D1 mediante inmunohistoquímica puede ser usada en los diagnósticos tempranos del cáncer gástrico y esta relacionada con un peor pronóstico. (16)

RESULTADOS

Los hallazgos mas significativos se encontraron al cabo de 14 meses de exposición al consumo de habas y agua mineral consistentes en severa atrofia del epitelio de revestimiento glandular (figura 1) acompañado de dilatación quística de las luces glandulares, en comparación con el grupo control en los cuales el epitelio de revestimiento no mostró ninguna alteración durante todo el tiempo que duró la investigación (figura 2).

En la lámina propia de la mucosa gástrica de esta misma cohorte muestra la presencia de un infiltrado inflamatorio mixto compuesto por linfocitos y algunos PMN neutrófilos (figura 1. Nótese además la presencia de células en apoptosis en la luz glandular.

El marcador de proliferación celular Ki67 muestra células en ciclo celular limitadas a algunas glándulas en respuesta al proceso de lesión celular causado por la exposición crónica al efecto oxidativo de las habas (figura 3).

Figura 1. Cambios asociados a atrofia que muestra glándulas dilatadas y células apoptóticas en la luz glandular. 40x.

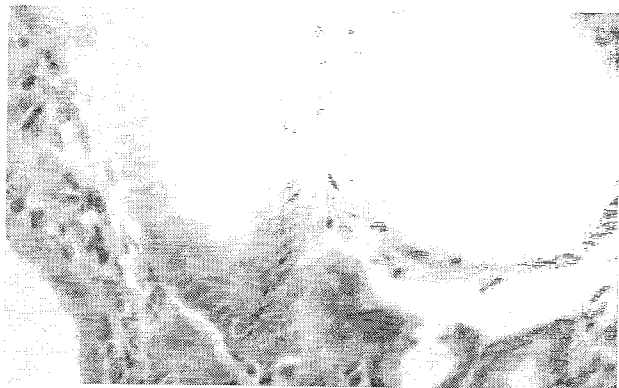


Figura 2. Mucosa gástrica de ratones expuestos al consumo crónico de habas. Se muestra las áreas de atrofia. 10x.



Al cabo de 15 meses de seguimiento se suspende la investigación al encontrar cambios displásicos de alto grado en la cohorte de ratones expuestos de manera crónica al consumo crónico de habas y sal mas agua mineral (figura 4). En esta imagen, además de la distorsión arquitectural y la presencia de núcleos de características atípicas, llama la atención la presencia de abundantes mitosis asociado a una ausencia de una respuesta inflamatoria.

La técnica de inmunohistoquímica para determinar la proliferación celular con el Ki67 permite una valoración mas objetiva de la cantidad de células que se encuentran en ciclo celular (figura 5).

Durante este trabajo de investigación se realizaron estudios de inmunohistoquímica para ciclina, p53, Bcl-2, con el fin de determinar alteraciones en los reguladores del ciclo de división celular (figuras 6 y 7).

DISCUSIÓN

Si bien es cierto que hoy se reconoce al la infección por *Helicobacter pylori* como un agente carcinogénico de primer orden por su asociación con la aparición de lesiones premalignas y cáncer gástrico, los hábitos alimentarios también desempeñan un papel importante en la aparición de cierto tipo de cánceres humanos.

Este estudio de corte experimental utilizando modelos animales logró establecer, mediante el estudio microscópico de las mucosas gástricas de ratones de la cepa *Mus musculus*, expuestos al consumo crónico de habas y habas y sal, una asociación directa, que relaciona el tipo de dieta que recibió el animal, el tiempo de exposición con el tipo de lesión encontrada. Es así como se observa que el consumo crónico de habas (*Vicia faba*) esta relacionado con la aparición de procesos inflamatorios agudos y cambios de atrofia de la mucosa gástrica. En el momento en que se asocia sal y habas (*Vicia faba*) la respuesta inflamatoria en la lámina propia de la mucosa gástrica es mayor y con el tiempo se encuentra una evolución hacia cambios displásicos.

Como se demostró en una publicación anterior, el consumo crónico de habas y sal genera a nivel intragástrico la formación de nitrosocompuestos los cuales son moléculas con potencial mutagénico sobre el DNA.

La técnica de inmunohistoquímica permite valorar el porcentaje de células que se encuentran en el ciclo celular (G1, S, G2, Mitosis), usando el anticuerpo monoclonal Ki67. En el grupo expuesto al consumo de habas (*Vicia faba*) se

Figura 3. Expresión del marcador de proliferación celular Ki67 en la mucosa gástrica de ratones con cambios asociados a atrofia. 40x.

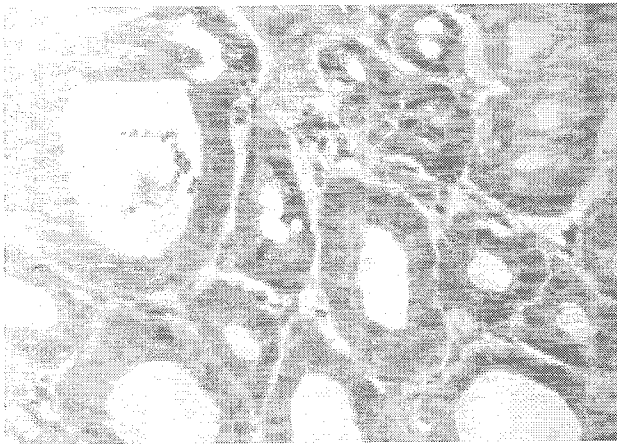


Figura 4. Áreas de displasia de alto grado de la mucosa gástrica de ratones expuestos al consumo crónico de habas y sal. Observe la presencia de múltiples mitosis. 40x.

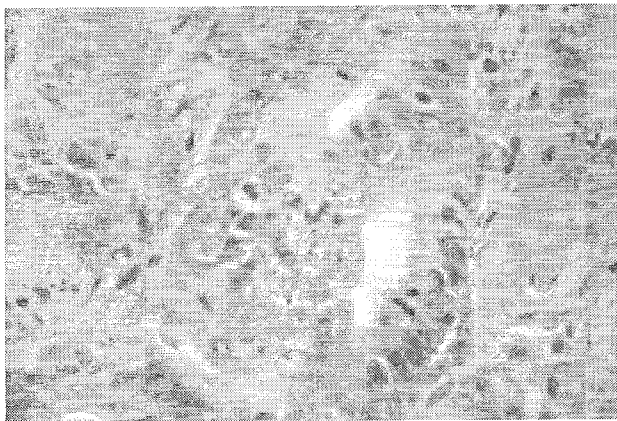


Figura 5. Expresión del marcador de proliferación celular Ki67 mostrando las células que están en ciclo celular en áreas de displasia de alto grado. 40x.

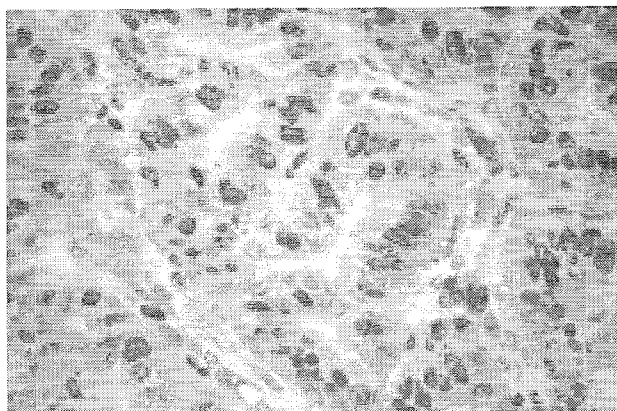


Figura 6. Sobreexpresión nuclear de las células displásicas para ciclina D1

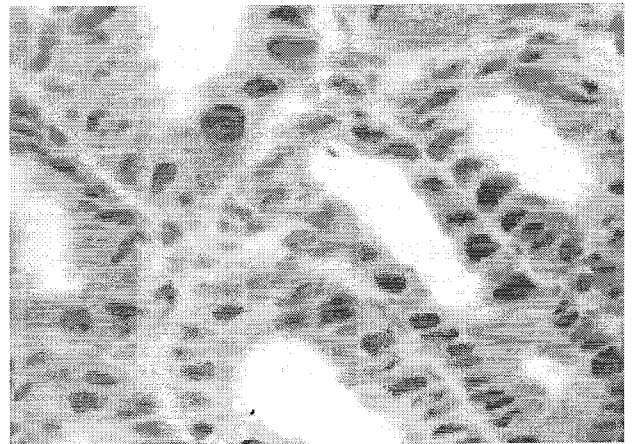
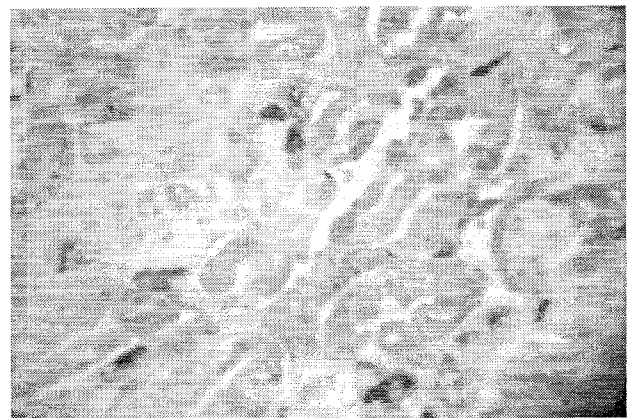


Figura 7. Expresión nuclear y citoplasmática para p53 en las células atípicas.



observa una disminución marcada en el número de células que están en ciclo celular (figura 3), por el contrario en el grupo expuesto al consumo crónico de habas (*Vicia faba*) y sal (NaCl) y que desarrollaron cambios displásicos de alto grado se encontró un marcado aumento de la proliferación celular (figura 5); así mismo se encontró una sobreexpresión de ciclina D1 (figura 6) y de la proteína p53, (figura 7). En este estudio no se encontró sobreexpresión de Bcl-2.

Estos hallazgos demuestran que los nitrosocompuestos presentes en las habas (*Vicia faba*), cuando están asociados al consumo crónico de sal, son capaces de producir alteraciones en los reguladores del ciclo celular (ciclina D1 y p53) conllevando a una pérdida del control del ciclo que puede conducir a la aparición de mutaciones a nivel de

DNA que con el tiempo generan la aparición del cáncer, siendo especialmente vulnerables la fase G1 y S del ciclo de división celular.

Estos hallazgos están en concordancia con las teorías de la carcinogénesis química(17) según la cual las neoplasias malignas aparecen como una lesión genética no letal, que en este caso esta relacionada con patrones de alimentación, los nitrosocompuestos y la sal pueden actuar como procarcinógenos que sumados a un aumento de la proliferación celular, determinado por la respuesta inflamatoria de la lámina propia o de algunos metabolitos activos, conllevarían a la acumulación de mutaciones que inducen la pérdida de los reguladores del ciclo de división celular induciendo la aparición de cambios displásicos y cáncer.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este estudio demuestra una asociación directa entre el consumo crónico de habas y habas y sal con la aparición de lesiones premalignas como gastritis crónica atrófica y displasia gástrica de alto grado y cáncer.

El efecto del consumo crónico de habas (*Vicia faba*) esta relacionado con la aparición de cambios de atrofia de la mucosa gástrica y con una disminución de la tasa de proliferación celular e inducción a la muerte celular por apoptosis.

La combinación de habas y sal favorece de manera directa la aparición de lesiones displásicas de la mucosa gástrica con un evidente aumento de la tasa de proliferación celular y alteración de los reguladores del ciclo celular como ciclina D1 y p53, permitiendo que las células mas proclives a progresar al cáncer.

Se recomienda continuar con este modelo de investigación del cáncer y su asociación con alimentos propios de la región, debido a que se estima que los factores dietarios participan en el 30% de los cánceres en los países industrializados y en el 20% de los países en desarrollo.

REFERENCIAS

1. **Ramírez V.** Estudio de Lesiones Precursoras de Cáncer Gástrico en la Provincia de Soria. Tesis Doctoral Universidad de Zaragoza, junio-1994.
2. **Correa P.** Precursors of gastric and esophageal cancer. *Cancer* 1982; 1;50(11 Suppl):2554-65.
3. **Kapadia CR.** Gastric atrophy, metaplasia, and dysplasia: a clinical perspective. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36(5 Suppl):S29-36; discussion S61-2.
4. **Schlemper RJ, Kato Y, Stolte M.** Review of histological classifications of gastrointestinal epithelial neoplasia: differences in diagnosis of early carcinomas between Japanese and Western pathologists. *J Gastroenterol* 2001;36(7): 445-56.
5. **Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M.** A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975;2(7924): 58-60.
6. **Haenszel W, Correa P.** Developments in the epidemiology of stomach cancer over the past decade. *Cancer Res* 1975; 35 (11 Pt. 2): 3452-9.
7. **Stemmermann G, Haenszel W, Locke F.** Epidemiologic pathology of gastric ulcer and gastric carcinoma among Japanese in Hawaii. *J Natl Cancer Inst* 1977;58(1): 13-20.
8. **Fox JG, Wang TC.** Helicobacter pylori—not a good bug after all! *N Engl J Med* 2001;345(11): 829-32.
9. **Rugge M, Genta RM.** Staging and grading of chronic gastritis. *Hum Pathol* 2005; 36(3): 228-33.
10. **Bedoya A.** Hábitos alimentarios y gastritis crónica atrófica en el departamento de Nariño. *Revista Colombiana de Gastroenterología* 2000; 15(3).
11. **Boletín Epidemiológico Nacional.** Semana 14-20 septiembre de 2003. Ministerio de Protección Social de Colombia –INAS. <http://www.col.ops-oms.org/sivigila>. Atlas de Mortalidad por Cáncer en Colombia. Instituto Nacional de Cancerología. Julio 24 de 2005.
12. **Eslick GD.** Association of Helicobacter pylori Infection with Gastric carcinoma: A meta-analysis. *Am J Gastroenterology* 1999; 94: 2373-2379.
13. **Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC.** The future of Gastric Cancer Prevention. *Gastric Cancer* 2004; 7(1): 9-16.
14. **Fukunaga M, Monden Y, Nakanishi H, Ohue M, Fukuda K, Tomita N, Shimano T, Mori T.** Immunohistochemical study of p53 in gastric carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology* 1994; 101(2): 177-80.
15. **An Gao Xu, Shao Guang Li, Ji Hong Liu, Ai Hua Gan.** Function of apoptosis and expression of the proteins BCL-2, P53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World Journal of gastroenterology* 2001; 7(3): 403-406.
16. **Pen Gao, Geng-Yin-Zhou, Yuan Liu, Jim-Song Li, Jun-Hui Zhen, Yin-Ping Yuan.** Alteration of cyclin D1 in gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *World Journal of gastroenterology.* 2004; 10(20): 2936–9.
17. **Tennant R.** “Chemical carcinogenesis”, An introduction to the cellular and molecular biology of cancer, 3 ed., Oxford, Oxford University Press, p. 106. 1997.