

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSTGRADO



**EFFECTO DE DIETAS RICAS EN SELENIO SOBRE
LA TRANSFORMACIÓN CELULAR INDUCIDA CON BENZO ALFA PIRENO
(BaP) EN *mus musculus* CEPA BALB/C53**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD**

AUTOR: Br. Lennis Antonio Reyna López

ASESOR: Dr. José González Cabeza

Trujillo, Septiembre 2015

DEDICATORIA

A la memoria de ASUNCIÓN, MAGDA Y CÉSAR; por ser cada uno ellos ejemplo de Trabajo, Humildad y Superación.

A Karín Nicole Mendoza Castillo y María Fernanda Reyna Mendoza, quienes son mi motivo de superación.

A mis hermanos Teresa, Rosa Jorge, Giovanna y Christian Reyna López; y a todos mis sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

Blgo. Dr. José González Cabeza, por su asesoramiento durante la ejecución del proyecto de tesis.

Blgo. Roberto Mejía Farro, fundamental participación durante mi tiempo de capacitación y motivación constante antes y durante el planteamiento del Proyecto de tesis en INEN- LIMA

Al equipo de colegas profesionales que conforman el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Privada Antenor Orrego. **Mblgo. Elio Ávila Vereau y MsC Armando Araujo Jiménez.**

Mblga. Sara Valverde García por su apoyo en la ejecución del trabajo de investigación.

Al QF. Francisco Funegra LLanos por sus sabios consejos.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE.....	iv -v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Formulación del problema.....	7
Objetivo General:	7
Objetivos específicos.....	8
Hipótesis:	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Material de estudio.....	9
1.1 Población.....	9
1.2 Muestra.....	9
2. Método.....	12
2.1 Tipo de investigación.....	12
2.2 Diseño de investigación	12
2.3 Procedimiento y análisis estadístico de datos.....	13
Evaluación del desarrollo del tumor sobre la base del incremento del peso.....	14
III. RESULTADOS.....	16
VI. DISCUSIÓN.....	21
V. CONCLUSIONES.....	23
VI. RECOMENDACIONES.....	24
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

ANEXOS	27
--------------	----

INDICE DE TABLAS

TABLA 1	16
TABLA 2	16
TABLA3	17
TABLA 4	17
TABLA 5	18
TABLA6	19
TABLA7	20

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO 1	18
GRAFICO 2	19
GRAFICO 3	20

RESUMEN

Se determinó el efecto de dietas ricas en selenio sobre la transformación celular inducida con benzo alfa pireno (BaP) en *mus musculus* cepa Balb /C53 inoculado a ratones hembras. Se evaluó el incremento de peso del tumor de un total de 60 ratones sometidos en la experimentación. La dieta rica en selenio se administró por vía oral en cantidades de 7,36 ug/Kg/día de selenio. Los resultados evidenciaron que las dietas ricas en selenio sólo incrementaron en 147 días el tiempo de supervivencia de los ratones experimentados.(n=60) En el promedio de ratones inoculados con BaP y que ingerían dieta ricas en selenio resultó estadísticamente significativa a la dosis ingerida y al juzgar por la evaluación histocitopatológica la dieta rica en selenio ha demostrado tener efecto protector contra la transformación celular inducida con BaP teniendo efecto significativo en prolongar el periodo de supervivencia de los animales de experimentación.

Palabras clave: Dieta, selenio, transformación celular, Benzo alfa Pireno.

ABSTRACT

It was determined the effect of diets rich in selenium on benzo Alpha –pyrene (BaP) induced cell transformation in Mus musculus strain balb / C 53 inoculated mice females, We assed the increase in weight of the tumor in 60 mouse. The diet rich in selenium was administered orally in amounts of 7,36 ug/Kg of weight per day . The results showed that the period of survival of single 147 days (n=60) in mice inoculated with BaP average and they ate selenium –rich in selenium has shown to have a protective effect against the BaP.induced cell transformamtion having significant effect on prolonging the period of survival of experimental animals.

Keywords: Diet, selenium, cell transformation, alpha benzo pyrene.

Blgo. MsC. Lennis Antonio Reyna López.

Especialidad en Genética y Biología Molecular

Docente en Ciencias de la Salud.

Universidad Privada Antenor Orrego.

I. INTRODUCCIÓN

El crecimiento rápido de la población humana en el mundo significa un desafío para la agricultura y los diferentes sectores de la sociedad, el suministro adecuado de los alimentos depende de buenos resultados continuos en investigaciones agrícolas y disciplinas relacionadas a ellas, así como la aplicación de nuevos conocimientos para la solución de problemas en la producción de alimentos nutritivos, seguros y sanos. El químico francés Antonie Lavoiser (1743- 1794) fundó la ciencia de la nutrición para contribuir al establecimiento de la química moderna. Los estudios iniciales en alimentos fueron efectuados en el siglo XVIII y el progreso fue relativamente lento en el siglo XIX; pero se reconoció las necesidades de proteínas, grasas y de carbohidratos (Hu F, 2002).

Desde el punto de vista sanitario; los alimentos, las hierbas y plantas medicinales, se emplean en todo el mundo desde hace siglos para tratar muchas enfermedades y actualmente el 80 % de la población mundial utiliza preparaciones botánicas como medicinas para su salud. Se cree que la actividad biológica de un producto natural es el resultado de la acción combinada de varios de sus componentes, sin embargo; en la mayoría de los casos el ingrediente activo del producto natural todavía no ha sido caracterizado y aproximadamente 15 millones de estadounidenses consumen hierbas medicinales en bebidas preparadas junto con los medicamentos que se les prescriben. Las observaciones referentes a la nutrición de las poblaciones se conocen como epidemiología nutricional o nutritiva. Lo que más frecuentemente estudia la epidemiología nutritiva son las relaciones de uno o muy pocos alimentos con una enfermedad (Hu F, 2002).

Los estudios epidemiológicos nutritivos han demostrado que los factores ambientales y la composición de los alimentos, ejercen impacto en la prevención del cáncer relacionado con el estatus hormonal, y la ingesta escasa de frutas y hortalizas se asocia a una mortalidad alta

por enfermedades cardiovasculares (Rissanen T, Voutilainen, Virtanen J, Venho, & Vanharanta, 2003). Una clase de sustancias que se atribuyen efectos protectores frente al cáncer son los fitoquímicos y fitoestrógenos que abundan en los productos de las semillas de soya. Muchas hierbas medicinales, alimentos y especias contienen flavonoides, fitoestrógenos y fotoquímicos no identificados que tienen actividad estrogénica en pacientes con cáncer de próstata. (Mehta R & Pezzuto J, s/f), la quimioprevención por el consumo de nutraceuticos, por ejemplo el resveratrol de las uvas, el licopeno del tomate y la genisteína de los productos de soya podrían reducir tanto la morbilidad como la mortalidad por cáncer.

Actualmente, se conoce más de 40 nutrientes necesarios para la dieta de un animal, en contraste de las tres clases de nutrientes que se aceptaban a principios del siglo XIX existiendo aún dudas sobre el requerimiento dietético nutricional de algunos elementos minerales (Pond W & Church D, 2009). El selenio es un mineral que se ubica en el grupo IV-A de la tabla periódica de los elementos químicos juntamente con el oxígeno y azufre; está presente en los tejidos animales, principalmente como selenocisteína, un aminoácido con esqueleto hidrocarbonado idéntico a la serina y cisteína (Fennema Owen , Parkin Kirk, & Srinivasan, 2010).

El selenio es un constituyente esencial de varias proteínas importantes del organismo (Combs G, S/F). Las proteínas que contienen selenio en una proporción estequiométrica son llamadas selenoproteínas. La selenocisteína es la forma activa del selenio en los animales. Éstas incluyen la glutatión peroxidasa, selenoproteína P plasmática, selenoproteína W del músculo y selenoproteínas encontradas en la próstata y placenta. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción de hidroxiperóxidos, pero que juega un importante rol antioxidante. Esta función explica las observaciones iniciales sobre la función del selenio para promover el recambio de vitamina E en humanos y animales; los requerimientos de vitamina E se incrementan cuando hay déficit de selenio y disminuyen cuando la ingesta de selenio es adecuada. El requerimiento

dietético alimentario (RDA) para el selenio se encuentran entre 14 ug/día para niños y 70 ug/día para mujeres gestantes (Fennema Owen , Parkin Kirk, & Srinivasan, 2010).

En 1997, el Comité Permanente de la Evaluación Científica de Referencia de Ingesta Diaria del Panel para la Alimentación y la Nutrición del Instituto de Medicina, elevó un informe describiendo una nueva aproximación al establecimiento de una ingesta apropiada de nutrientes para la población sana de Estados Unidos y Canadá. Estas nuevas recomendaciones de ingestas son denominadas Referencias de Ingesta Dietética (DRI) y reemplazan a las RDA que fueron publicadas por primera vez en 1941 (Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, 1997).

Las deficiencias de selenio causan problemas de salud, tanto en animales como en el hombre, su prevalencia varía según las regiones del mundo; las más altas prevalencias se dan en áreas donde los niveles de selenio en el suelo son bajos y en las que las poblaciones subsisten por la producción local de alimentos. La enfermedad de Keshan y la de Kaschin-Beck se presentan en áreas rurales de china y este de Siberia, donde los niveles de selenio en los suelos son extremadamente bajos (Combs G, S/F). La enfermedad de Keshan es una miocarditis (una inflamación de la lámina muscular media de la pared cardíaca), se manifiesta con insuficiencia cardíaca, hipertrofia del corazón, arritmias y otros problemas cardíacos. La suplementación con pastillas de selenito sódico (Na_2SeO_3) ha provocado una importante reducción de la prevalencia de esta enfermedad en áreas pobres en selenio de la China, pero ahora se reconoce que es una enfermedad multifactorial y posiblemente esté involucrada una infección viral que es más virulenta en pacientes con deficiencias de selenio (Combs G, S/F). La enfermedad de Kaschin - Beck es una forma de osteoartritis que presenta deformidades en las articulaciones y en los casos severos, enanismo. Está claramente asociada con la deficiencia de selenio, pero como en el caso de la enfermedad de Keshan, otros factores parecen estar involucrados en su origen (Fennema Owen , Parkin Kirk, & Srinivasan, 2010). Además de su papel como nutriente

esencial en la prevención de los desórdenes anteriormente mencionados, evidencias emergentes sugieren que el selenio ingerido por encima de las dosis necesarias para prevenir deficiencias, puede también prevenir el cáncer. Algunos estudios epidemiológicos han encontrado una relación inversa entre el estatus de selenio y cáncer. Como complemento, una intervención de doble ciego placebo-control, donde el grupo experimental recibía un suplemento diario de 200 ug de selenio, mostró una reducción del 37 % en el número total de cánceres respecto al grupo con placebo (Clark L, Combs , Turnbull, & et al, 1993). Hay que hacer notar que 200 ug es una cantidad mayor que la recomendada por la RDA (55 ug para varones adultos) (Fennema Owen , Parkin Kirk, & Srinivasan, 2010).

La principal fuente de selenio en la dieta humana son los productos cereales, carnes y alimentos marinos (Allaway W, 1975). La concentración de selenio en estos alimentos es muy variable en función de la región del mundo, dada la amplia variación en los niveles de biodisponibilidad de selenio en los suelos; por ejemplo, el trigo que crece en Dakota en U.S.A; puede contener más de 2 mg Se/Kg, mientras que las concentraciones en trigo que se cultiva en Nueva Zelanda pueden ser tan bajas como 0,005 mg Se/Kg. El selenio que contienen los productos animales es también variable, debido a que los niveles en la alimentación animal están influenciados por los niveles en el suelo. En décadas recientes, se está incrementando la práctica de adicionar selenio en los suplementos alimentarios para prevenir la deficiencia en selenio (Combs G, S/F). La ingesta de selenio en el Reino Unido desciende entre 1978 y 1995, éste descenso ha sido atribuido a una sustitución de la harina panaria procedente de U.S.A. por la producida en el Reino Unido debido a que el trigo cultivado en USA procede de áreas donde los suelos son ricos en selenio (Reily C, 1998).

Un daño genético o mutación puede adquirirse por la acción de agentes ambientales, como productos químicos, radiaciones, virus, o heredarse en la línea germinal. La hipótesis genética del cáncer implica que una masa tumoral es consecuencia de la expansión clonal de una célula

progenitora que ha sufrido un daño genético. La clonalidad de los tumores se determina en mujeres heterocigotas a los marcadores polimórficos ligados al cromosoma X, como la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa o los polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción ligados al cromosoma X (Kumar, Abl K, Fausto,, Mitchell, & Robbins, 2008).

La masa resultante de tejido en crecimiento se denomina tumor, aunque los tumores han escapado de los controles normales de la proliferación celular, el asunto crucial no es la velocidad de la división celular, sino el equilibrio entre la división celular y la diferenciación celular, esto significa el proceso por el cual las células adquieren sus propiedades especiales que distinguen a tipos celulares diferentes uno de otros, a medida que las células adquieren estos caracteres especiales, generalmente pierden la capacidad de dividirse, por ejemplo: la división celular y la diferenciación de la piel, donde las células nuevas sustituyen continuamente a las células envejecidas que se están perdiendo por la superficie corporal externa. Las nuevas células de reemplazo se generan en la capa basal de la piel por división celular. Cada vez que una célula basal se divide, da lugar a dos células con destinos diferentes. Una de las células se queda en la capa basal y retiene la capacidad de división mientras que la otra célula pierde la capacidad de dividirse y diferenciarse a medida que deja la capa basal y se desplazan hacia la superficie externa de la piel. En los tumores se rompe esta organización finamente equilibrada y la división celular se desacopla de la diferenciación celular. Como resultado de esto, algunas divisiones celulares dan lugar a dos células que a su vez continúan dividiéndose, alimentando por tanto un incremento progresivo del número de células en división, Si las células se dividen rápidamente, el tumor crecerá rápidamente; si las células se dividen más despacio, el tumor crecerá más lentamente. Pero independientemente de lo rápido o lento que se dividan las células, el tumor continuará creciendo dado que se están produciendo nuevas células en mayor número del necesario (Becker, Kleinstmh, & Hardin, 2007).

El Benzo alfa Pireno (BaP) es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), su fórmula química es $C_{20}H_{12}$, peso molecular de 252.3, su punto de ebullición es de 310 – 312 ° C, punto de fusión es de 178° C, y una densidad de 1.35, es insoluble en agua pero es soluble en benceno, tolueno, xileno y poco soluble en alcohol y metanol (Budavari S, O'Neil , & A, 1989). El BaP se encuentra en productos de combustión incompleta y combustibles guardados, ha sido identificado en aguas superficiales, aguas profundas, aguas de lluvia, aguas residuales, aguas negras, aguas servidas; el promedio de vida estimada para BaP es de 1 a 6 días en la atmósfera, 1 a 8 horas en el agua, 5 a 10 años en sedimentos y 14 a 16 meses en suelos. El BaP es principalmente liberado al aire y removido de la atmósfera por oxidaciones fotoquímicas y sedimentan en agua y tierra. (Rosmarie A. & et al, 1994). El Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y la Salud Animal aprobó la propuesta de la Comisión Europea por la que se fijarán a escala comunitaria los contenidos de HAP, entre los cuales el más conocido es el BaP. Las nuevas normas se aplicarán a determinados alimentos que contengan grasas o aceites, así como los sometidos a tratamientos de ahumado o secado, susceptibles de contener niveles de éstas sustancias que puedan suponer algún problema para la salud. También se aplicarán a los pescados, que pueden contener por alguna contaminación ambiental, como las mareas negras. Los HAPs son a determinados niveles tienen efectos cancerígenos, por lo que se propusieron nuevas normas. El humo de tabaco es la principal fuente cotidiana de BaP, así como las carnes ahumadas ó carnes a las parrillas muy cocida y aceites recalentados (Legislación Reglamento (Unión Europea), 2006).

La Población de una misma especie descendiente de un mismo origen; se le denomina cepa; por ejemplo: Ratones (*Mus musculus*): Balb/C, AKR , ICR y NIH. Todas estas cepas se usan ampliamente en estudios de toxicología, farmacología y en pruebas de seguridad. La importación de animales de laboratorio cumple los requisitos zoo-sanitarios del Servicio

Nacional de Sanidad Animal (SENASA) del Perú y del Instituto Nacional de Salud (Instituto Nacional de Salud, 2008).

En la última década, se ha incrementado el interés en estudiar los compuestos que contienen selenio debido a su importancia toxicológica, ambiental, biológica y en particular por su actividad antitumoral; y considerando que el número de casos de individuos con cáncer gastrointestinal aumentan cada año en el mundo, teniendo como uno de los factores el consumo de alimentos con aceites recalentados, alimentos ahumados y preparados a la parrilla, así como problemas de cáncer pulmonares por exposición indirecta al compuesto químico BaP (formado durante la elaboración de estos alimentos) es razón del presente trabajo estudiar el efecto dietas ricas en selenio sobre la transformación celular explorando la actividad del selenio, para luego sugerir el uso de suplementos de selenio en la elaboración de alimentos de consumo diario como por ejemplo panaderías u otros alimentos elaborados a base de harinas de trigo con la finalidad de ayudar a prevenir casos de cáncer gastrointestinales y respiratorios: comenzando esta tarea de prevención anticancerígena en dietas suplementadas con selenio en nuestros hogares.

Formulación del problema:

¿Cuál será el efecto de las dietas ricas en selenio en la transformación celular inducidas por Benzo alfa Pireno (BaP) en *mus musculus* cepa BALB C / 53?.

Objetivo General:

Determinar el efecto de las dietas ricas en selenio frente al Benzo alfa pireno (BaP) evaluando el desarrollo del tumor sobre la base del incremento del peso del ratón.

Objetivos específicos:

- a) Analizar la relación existente entre las dietas ricas en selenio y la transformación celular mediante resultados histocitopatológicos.
- b) Determinar el tiempo de supervivencia de los ratones en experimentación.

Hipótesis:

Las dietas ricas en selenio disminuyen la transformación celular inducidas con benzo alfa pireno (BaP) en *mus musculus* cepa BALB / C53.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

1.1 Población

Constituido por ratones criados en el Bioterio INS-Lima.

1.2 Muestra

Muestra biológica: *mus musculus*

Características de la muestra: *Mus musculus* cepa Balb C53 albinos.

Criterios de inclusión:

Ratones hembras albinos cepa Balb C53 con tres a cuatro semanas de nacidos.

Criterios de exclusión:

Ratones machos

Cepas diferentes a Balb C53

Para determinar el tamaño de muestra se aplicó la fórmula que corresponde a experimentos de laboratorio.

$$n = (z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \sigma^2$$

Donde:

$z_{\alpha/2} = 1,96$ para una seguridad del 95 %

$z_{\beta} = 0,84$ para un poder de la prueba del 80 %

$\sigma =$ Variabilidad relativa de las diferencias ($1 \leq f \leq 3$)

Asumiendo una variación de $\sigma = 2.5$ obtenemos:

$$n = (1,96 + 0,84)^2 (2,5)^2 = 49 \text{ ratones}$$

Para incrementar la representatividad de la muestra el experimento se realizará en 60 ratones disponibles, correspondiendo a cada grupo un total de 15 ratones.

Procedimiento

Obtención de la Cepa

Se compró 60 ratones del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Salud (INS) Lima-Perú

Distribución de la muestra biológica

Se realizó de acuerdo a las consideraciones del INS en su Guía de Manejo y Cuidados de ratones de Laboratorio. Cada muestra biológica fue colocada en jaulas de vidrio individuales para ser sometidos a tres estudios (A) (B) y (C) en la cual se describe y se detalla a continuación:

Estudio “A”: Para evaluar el desarrollo del tumor sobre la base del incremento del peso del ratón. Cada grupo tiene 05 ratones y se realizó el siguiente proceso:

N° RATONES	INOCULACIÓN	DIETA
05	NO	Normal
05	SI	Normal
05	NO	Dieta rica en selenio
05	SI	Dieta rica en selenio

Fuente: Elaboración propia

Estudio “B”: Para analizar la relación existente entre las dietas ricas en selenio y la transformación celular mediante resultados histopatológicos.

Cada grupo tiene 05 ratones y se realizó el siguiente proceso:

N° RATONES	INOCULACIÓN	DIETA
05	NO	Normal
05	SI	Normal
05	NO	Dieta rica en selenio
05	SI	Dieta rica en selenio

Fuente: Elaboración propia

Estudio “C”: Para determinar el tiempo de supervivencia de los ratones en experimentación.

Cada grupo tiene 05 ratones y se realizó el siguiente proceso:

N° RATONES	INOCULACIÓN	DIETA
05	NO	Normal
05	SI	Normal
05	NO	Dieta rica en selenio
05	SI	Dieta rica en selenio

Fuente: Elaboración propia

Dieta normal: Consistió en una mezcla de soya, harina de trigo, nicovita, maíz molido, avena, quinua.

Dieta con suplemento de selenio: Se administró la dosis de selenio vía oral predeterminada (7,36 ug/Kg/día)

2. Método

2.1 Tipo de investigación:

Según la evolución del fenómeno en estudio: Longitudinal

Según la interferencia del investigador en el estudio: Experimental

Área de estudio: La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo.

2.2 Diseño de investigación

X → O

X → P

Y → O

Y → P

X: Ratones inoculados con BaP

Y: Ratones no inoculados con BaP

O: Dieta Normal

P: Dieta rica en selenio

Se empleó el diseño experimental puro con cuatro grupos:

02 grupos de ratones con dieta normal y con dieta rica en selenio previa inoculación del (BaP)

02 grupos de ratones con dieta normal y con dieta rica en selenio sin inoculación del (BaP)

Cada grupo estuvo constituido por 15 ratones, haciendo un total de 60 ratones para el experimento.

2.3. Procedimiento y análisis estadístico de datos

Los datos fueron recolectados en una hoja de registro elaborada en base a los objetivos propuestos; y fueron procesados aplicando el programa SPSS versión 20.00.

Los resultados se presentaron en cuadros de doble entrada con número de casos y porcentajes que corresponden a las características de estudio.

Para la variable peso corporal se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar por grupo. Asimismo para facilitar la comprensión de los resultados se elaboraron y presentaron gráficos de líneas.

Para determinar si existen diferencias entre las proporciones de ratones con y sin transformación celular con inducción de BaP y sin inducción con BaP se aplicó la prueba Z para diferencia de proporciones reportados en los grupos. Si $P < 0,05$ indicó que existe diferencia significativa entre grupos con transformación y sin transformación celular, y luego se confirmó la hipótesis planteada.

Inoculación del BaP

Se inoculó 280 ug/kg de BaP diluido en agua destilada estéril en volúmenes de 0.1 ml. con jeringa tuberculina vía intraperitoneal.

Determinación de la dosis de selenio

Se determinó de acuerdo a las recomendaciones sugeridas de los Requerimientos Diarios Alimentarios (RDA) para una mujer adulta de 60 Kg que debe ser de 55 ug/día. La dosis se administró por vía oral en 5 ml de agua destilada estéril. (Promedio diario de agua que consume un ratón).

Evaluación del desarrollo del tumor sobre la base del incremento del peso.

Se analizaron dos factores: Dieta e Inoculación.

Estudio “A”

05 días antes de la inoculación se determinó el peso de los ratones de los grupos en estudio. Cada 10 días posterior a la inoculación, se determinó el peso de los ratones de los grupos en estudio. El incremento del peso del tumor se determinó por diferencia entre los pesos registrados.

Evaluación histopatológica.

Estudio “B”

Los ratones fueron sacrificados por desnucación y se realizó la disección del animal para extraer el hígado que fueron colocados en frascos conteniendo 10 ml de formol al 10 % y finalmente realizar el estudio histocitopatológico.

Evaluación del tiempo de supervivencia.

Estudio “C”.

La ocurrencia del evento (muerte) en función del tiempo t, se registró en la curva de supervivencia. Esto registró el evento de manera continua desde un máximo de 1 cuando t sea

igual a cero. La diferencia entre los promedios de los tiempos de supervivencia se determinó mediante la prueba de significación aplicando los métodos de comparación global de supervivencia. Se empezó a administrar el selenio desde el momento de la inoculación y se prosiguió con la evaluación de la supervivencia registrando el tiempo en que ocurre la muerte del material en estudio.

III. RESULTADOS

TABLA N° 1: Evaluación del desarrollo del tumor considerando pesos del ratón en ESTUDIO “A”

Dieta-Inoculación	Promedio	Desviación Standard	Valor T	Valor P
1.- Dieta Normal				
Inoculados	30.2119	4.74087		
No inoculados	37.3368	41.23594	1.113	0.269
2.- Dieta rica en selenio				
Inoculado	29.3560	4.59862		
No inoculado	32.5680	1.77243	4.56	0.000

TABLA N° 2: Evaluación del desarrollo del tumor considerando pesos del ratón en ESTUDIO “B”

Dieta-Inoculación	Promedio	Desviación Standard	Valor T	Valor P
1.- Dieta Normal				
Inoculados	29.7195	4.27064		
No inoculados	32.0756	1.53064	3.64	0,000
2.- Dieta rica en selenio				
Inoculado	28.9937	3.91758		
No inoculado	32.9786	2.19650	6.12	0.000

TABLA N° 3: Evaluación del desarrollo del tumor considerando pesos del ratón en ESTUDIO “C”

Dieta-Inoculación	Promedio	Desviación Standard	Valor T	Valor P
1.- Dieta Normal				
Inoculados	28.5339	3.34536		
No inoculados	32.1816	2.07273	6.44	0,000
2.- Dieta rica en selenio				
Inoculado	28.8102	2.92235		
No inoculado	28.6362	2.39116	0.319	0.756

Tabla N° 4.- Pesos promedios por Dieta según Inoculación.

RATONES	Estudio A		Estudio B		Estudio C	
	Dieta Normal	Dieta Rica en Selenio	Dieta Normal	Dieta Rica en Selenio	Dieta Normal	Dieta Rica en Selenio
Inoculados	30.2	29.3	29.7	28.9	28.5	28.8
No Inoculados	37.3	32.5	32.1	32.9	32.1	28.6

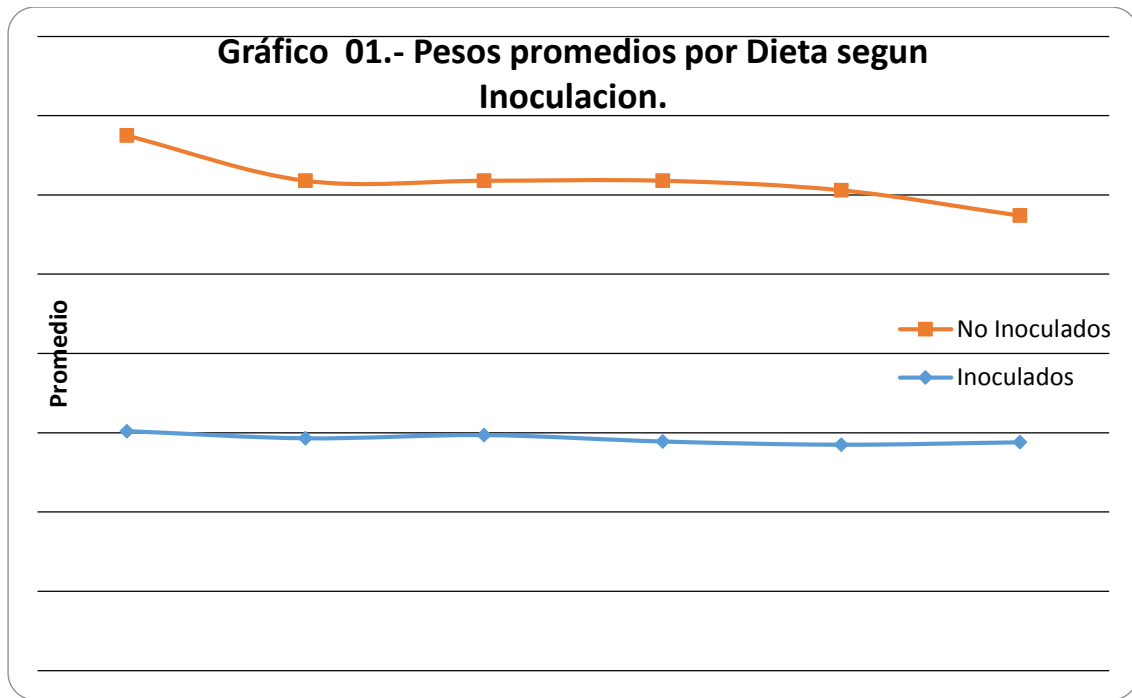


TABLA N° 5: Tiempo de supervivencia en ratones inoculados.

N°	INOCULADOS	
	Dieta Normal	Dieta Rica en selenio
1	147	147
2	147	147
3	147	147
4	89	147
5	147	147
6	147	87
7	96	147
8	147	147
9	147	147
10	147	147
11	147	147
12	147	147
13	147	147
14	121	147
15	147	147
PROMEDIO	138	143

Gráfico 02.- Tiempo de supervivencia en ratones inoculados

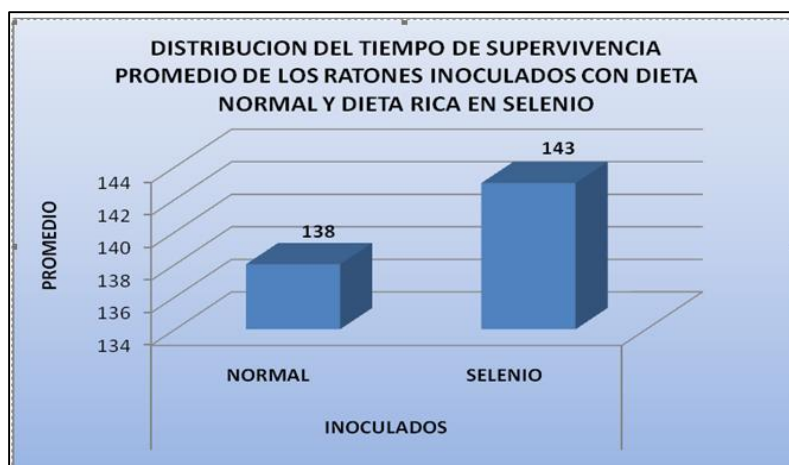


TABLA N° 6 : Tiempo de supervivencia en ratones no inoculados

N°	NO INOCULADOS	
	Dieta Normal	Dieta rica en selenio
1	162	162
2	162	162
3	162	162
4	162	162
5	162	162
6	162	162
7	162	162
8	162	162
9	162	162
10	162	162
11	162	162
12	162	162
13	162	162
14	162	162
15	162	162
PROMEDIO	162	162

Gráfico 03: Tiempo de supervivencia en ratones no inoculados

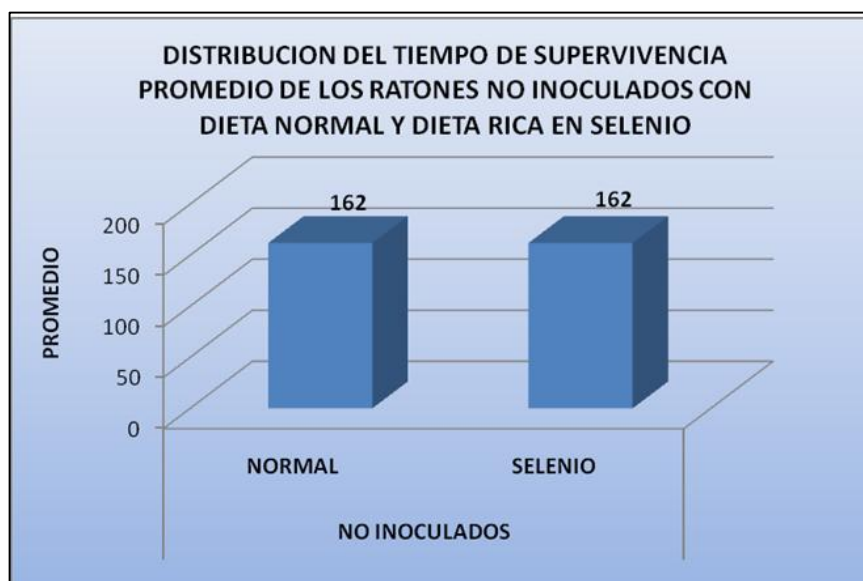


Tabla N° 7: Estudio histocitopatológico de características morfológicas de células hepáticas en ratones inoculados.

Características morfológicas	Ratones inoculados y dieta normal					Ratones inoculados y dietas ricas en selenio				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Células epiteliales normalmente cohesivas se encuentran aisladas.	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+
Células epiteliales cilíndricas agrupadas tridimensionalmente.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Relación del volumen del núcleo y del citoplasma aumentada.	++	++	+++	++	++	++	++	++	+	+
Membrana nuclear Irregular	++	++	+	+	++	+	+	+	+	+
Cromatina nuclear densa	++	++	++	++	+++	++	++	+	+	+
Cromatina nuclear con gránulos más o menos irregulares.	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+
Nucleólo prominente e irregular.	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+
Tamaño de células aumentada.	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+

LEYENDA:

Leve : + / +++
Moderado: ++ / +++
Severo : +++ / +++

IV. DISCUSIÓN

La tabla N° 1; pertenece al grupo de estudio “A” en donde se determinó el efecto de las dietas ricas en selenio frente al BaP evaluando el desarrollo del tumor sobre la base del incremento del peso del ratón; no existiendo diferencias significativas entre los pesos de los ratones inoculados y no inoculados con dieta normal y al aplicar a los ratones dietas ricas en selenio se obtuvo diferencias altamente significativas entre los pesos de los ratones inoculados y no inoculados correspondiendo el menor peso a ratones inoculados.

En la tabla N° 2; corresponde al grupo de estudio “B” en donde se le administró dieta normal a los ratones inoculados y no inoculados se encontró que existió diferencia altamente significativa correspondiendo el menor peso al grupo de ratones inoculados; asimismo al dar una dieta rica en selenio a los ratones inoculados y no inoculados se encontró que existe una diferencia altamente significativa entre los pesos promedios de los ratones inoculados y no inoculados correspondiendo el menor peso al grupo de ratones inoculados; sin embargo al proporcionar dietas ricas en selenio al grupo de inoculados y no inoculados se encontró que no existe una alta diferencia entre los pesos promedios correspondiendo el menor promedio al grupo de inoculados.

Con los resultados de la Tabla N° 3; se determinó que al proporcionar una dieta normal a los ratones inoculados y no inoculados no existía una diferencia altamente significativa entre el tiempo de supervivencia en los grupos de ratones inoculados y no inoculados, correspondiendo en este caso el menor peso promedios a los inoculados, pero al proporcionar una dieta rica en selenio a los ratones inoculados y no inoculados no se obtuvo

diferencia significativa entre los tiempos de supervivencia de los ratones inoculados y no inoculados.

El BaP es fácilmente absorbido por vía oral, respiratoria y dérmica. En ratas se administraron dietas con BaP en solución de almidón de 250 mg, absorbiéndose 40 % a 60 % respectivamente del compuesto administrado. (Chang, 1943)

En la tabla N° 4 ; se determinó los pesos promedios por dieta según inoculación y se corrobora con estudios realizados que se ha demostrado que BaP produce tumor en varios sitios y formas de inoculación. Una incidencia del 94 % de adenomas pulmonares fueron reportados en ratones recién nacidos inyectados con 280 ug/Kg (Busby et al., 1984). En ratas recién nacidas tratadas con una sola inyección de 0.59 umol/Kg se observaron el desarrollo de tumores hepáticos. La incidencia de tumores fue de 37 % en machos y 57 % en hembras (Peraino et al., 1984).

V. CONCLUSIONES

1. Las dietas ricas en selenio tienen un efecto frente al BaP, retardando el crecimiento y desarrollo en la transformación celular.
2. Existe una relación entre la transformación celular inducida por BaP y las dietas ricas en selenio incidiendo dicha transformación a nivel del núcleo celular en aquellas muestras que no fueron tratadas con dietas ricas en selenio.
3. El tiempo de supervivencia es mayor en aquellas muestras inoculadas y tratadas con dietas ricas en selenio que en las muestras que fueron inoculadas y no tratadas con dietas ricas en selenio.
4. En el promedio de ratones inoculados con BaP y que ingerían dieta ricas en selenio resultó estadísticamente significativa a la dosis ingerida y al juzgar por la evaluación histocitopatológica la dieta rica en selenio ha demostrado tener efecto protector contra la transformación celular inducida con BaP teniendo efecto significativo en prolongar el periodo de supervivencia de los animales de experimentación.

VI. RECOMENDACIONES

Se necesitan análisis auxiliares de laboratorio para determinar:

- A. Niveles de concentración de vitamina E en especies tratadas con dietas ricas en selenio y dieta normal para comparar la proporción de relación directa o inversa de selenio con la vitamina E; considerando que esta vitamina tiene propiedades antioxidantes que protege las membranas celulares de la oxidación y la destrucción.

- B. Los niveles de concentración de selenio en suelos cultivables de arroz y trigo en la región La Libertad para comparar la biodisponibilidad de selenio en proporción directa en suelos y plantas.

AGRADECIMIENTO: Al equipo de Investigación del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de UPAO. Pabellón J-307.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Pond, W.G., Church D.C.** Fundamentos de Nutrición y Alimentación de animales. 2a ed. Limusa Wiley, S.A.; 2009. p. 14-16
2. **Hu, F. B.** Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr. Opin. Lipidol.* 2002. 13:3-9
3. **Rissanen, T.H. Voutilainen, S., Virtanen, J.K., Venho B., Vanharanta, M.,** Low Intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men : study. *J. Nutr.*, 2003.133:199-204.
4. **Mehta, R. G. and pezzuto, J.M.** Phytochemicals as potential cancer chemopreventive agent. In *Phytopharmaceuticals in Cancer chemoprevention*, CRC Press, Boca Raron, FL, pp. 237-246.
5. **Fennema Owen R.; Parkin Kirk L.; Damoran Srinivasan.** *Química de los Alimentos.* 3ª edic. Acribia S.A.; 2010 pp.544-545
6. **Combs, G.F.** Selenium in global food systems .*Br. J. Nutr.* 85: 517- 547.
7. **Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes.** Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorous, Vitamina D and Flouride.* National Academy Press. Washington. D.C. 1997.
8. **Clark, L.C.,GF. Combs Jr., B.W. Turnbull,** et al. The nutritional prevention of cancer with selenium 1983-1993: a randomized clinical trial. *J. Am Med Ass.*1993. 276: 1957-1963.
9. **Allaway, W.H.** The effects of soils and fertilizers on human and animal nutrition. *Agriculture Information Bulletin N° 378.* U.S. Department of Agriculture. Washington D.C. 1975.

10. **Reily . C. Selenium:** a new entrant into the functional food arena. *Trend Food Sci Technol.* 1998., 9: 114-118
11. **Vinay Kumar, Abl K. Abbas, Nelson Fausto, Richard N. Mitchell.** *Robbins Patología Humana.* 8a ed. Edit. Elsevier Saunders. 2008: 189-193
12. **Wayne M. Becker, Lewis J, Kleinstmh, Jeff Hardin.** *El Mundo de la Célula.* 6 a ed. Person Addison Wesley. 2007. pp. 834-835.
13. **Budavari, S., M.J. O'Neil and A. Smith.** . *The Merck Index.* Merck & Co., Rahway, NJ, 1989. p. 172.
14. **Rosmarie A. Faust et al.** Toxicity Summary for benzo[a]pyrene . Prepared for: OAK Ridge Reservation Environmental Restoration Program. 1994.
15. **Legislación Reglamento (Unión Europea) 835/2011,** que modifica el R(CE)1881/2006 por lo que respecta al contenido de HAP (vigente hasta el 31 de agosto de 2012)
16. **Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud.** Centro Nacional de Producción de Biológicos. Guía de Manejo y Cuidados de Animales de Laboratorio: Ratón. 2008 pp. 8 - 33
17. **Chang, L.H. 1943.** The fecal excretion of polycyclic hydrocarbons following their administration to the rat. *J. Biol. Chem.* 151: 93-99. (Cited in U.S. EPA, 1984; U.S. EPA, 1991)
18. **Busby, W.F., Jr., M.E. Goldman, P.M. Newberne and G.N. Wogan.** Tumorigenicity of fluoranthene in a newborn mouse lung adenoma bioassay. *Carcinogenesis* 1984., 5: 1311-1316.
19. **Peraino, C., E.F. Staffeldt, B.A. Carnes, et al.** Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with diethylnitroamine or benzo[a]pyrene within one day after birth. *Cancer Res.* 1984.44: 3340-3347.

ANEXOS

PRINCIPIOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN

El tema ético compete a todos los individuos pero, con mayor razón, a los involucrados en la investigación biológica, desde el auxiliar a cargo de los animales hasta el directivo de la institución productora o usuaria. La primera condición del científico que trabaja con animales de laboratorio es el respeto por la vida, el dolor o el sufrimiento a que éstos pueden ser sometidos en los trabajos de experimentación bajo su responsabilidad. Siempre que se usen animales en investigación, se debe considerar que un objetivo tan importante como el de obtener resultados experimentales, será el de minimizar cualquier dolor o angustia que dichos animales puedan sufrir. El refinamiento de los procedimientos para conseguir que estos no causen sufrimiento debe ser parte integrante de toda investigación científica. Esto es importante tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria como para cumplir con los requisitos de la legislación sobre animales de investigación. Los investigadores que trabajen y experimenten con animales están moralmente obligados a manifestarles tres tipos de actitudes: respeto, afecto y gratitud.

› **Respeto:** por tratarse de seres vivos y sensibles, que están experimentando sufrimiento y podrían terminar perdiendo la vida, tratárseles con todas las consideraciones que el caso merece.

› **Afecto:** considerándolos partícipes con nosotros, del misterio de la vida.

› **Gratitud:** reconocimiento por la importante ayuda al constituirse nuestros más íntimos colaboradores.

Así mismo, se puede decir que la investigación biomédica en animales es éticamente aceptable, si se sigue el principio de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales, propuesta por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959: Reducir, Reemplazar y Refinar.

- › **Reducir**, al máximo el número de ellos y, por ende, el total de animales utilizados en investigación.
- › **Reemplazar**, siempre que sea posible el animal de experimentación por otro modelo experimental, cuando no resulte imprescindible el uso de animales.
- › **Refinar**, los métodos y técnicas utilizados de modo que produzcan al animal el menor sufrimiento posible.

1.- JAULAS INDIVIDUALES USADAS PARA LA INVESTIGACIÓN



2- INOCULACIÓN DE RATONES DURANTE LA INVESTIGACIÓN



3.- OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DURANTE LA DISECCIÓN DEL RATONES DURANTE LA INVESTIGACIÓN.



4.- OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE TEJIDO HEPÁTICO

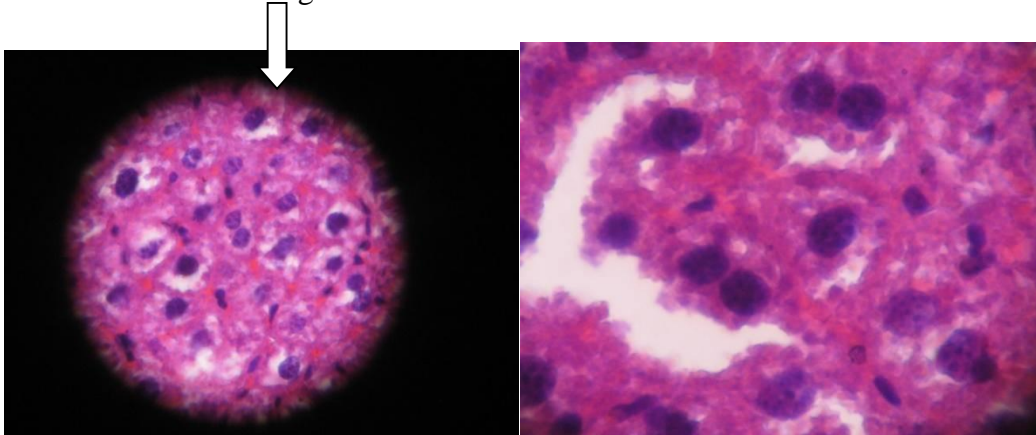


5.- CORTES HISTOLÓGICOS DE TEJIDO HEPÁTICO

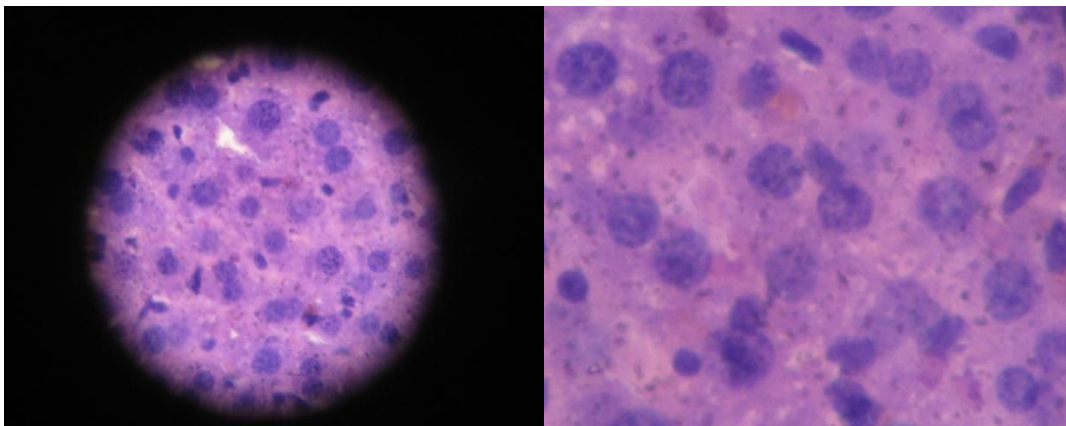


6.- EVALUACIÓN HISTOCITOPATOLOGICA EN TEJIDO HEPÁTICO.

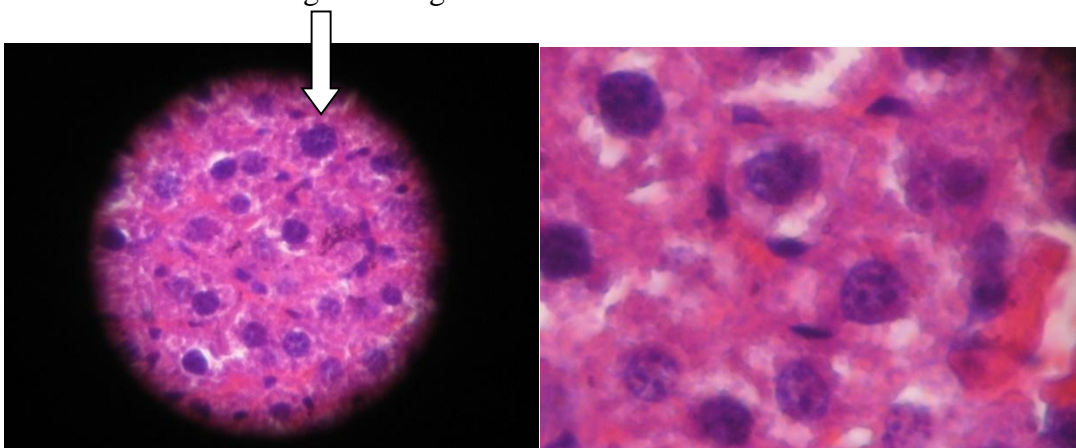
Características Morfológicas a nivel de adhesión celular.



Características morfológicas de células normales. Tamaño del núcleo y adhesión en células normales.

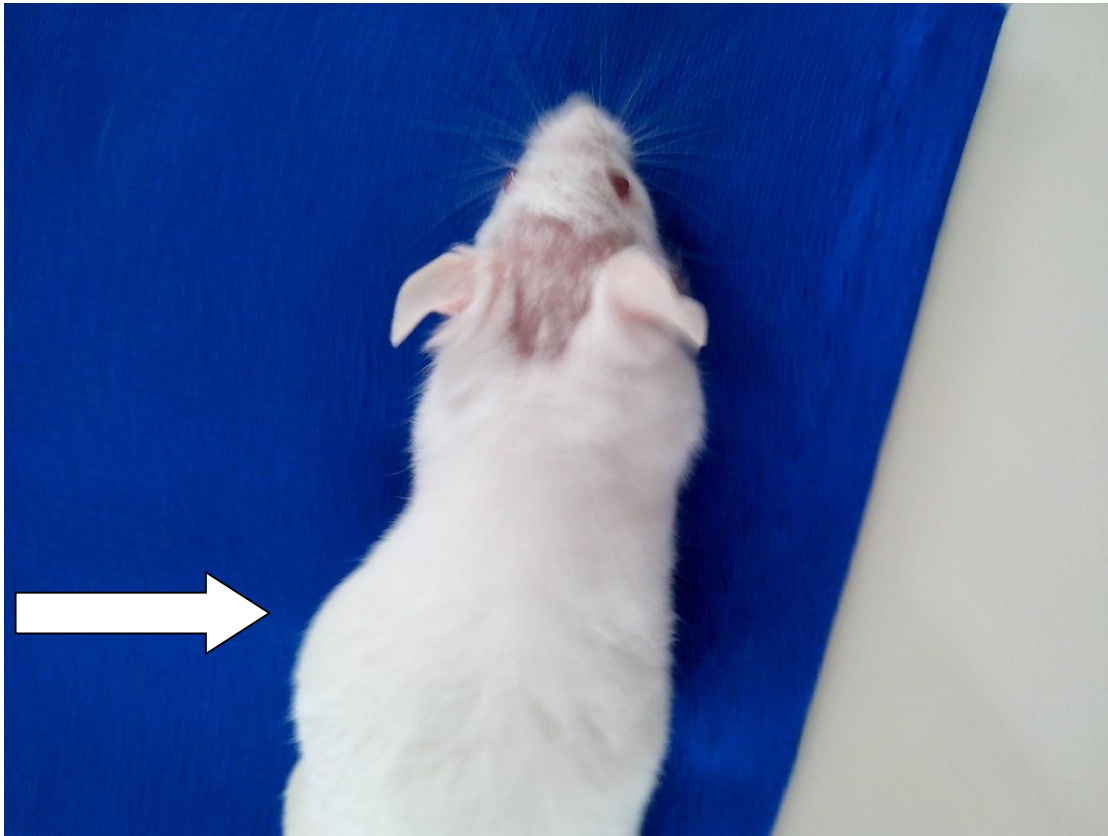


Características morfológicas de agrandamiento del núcleo.

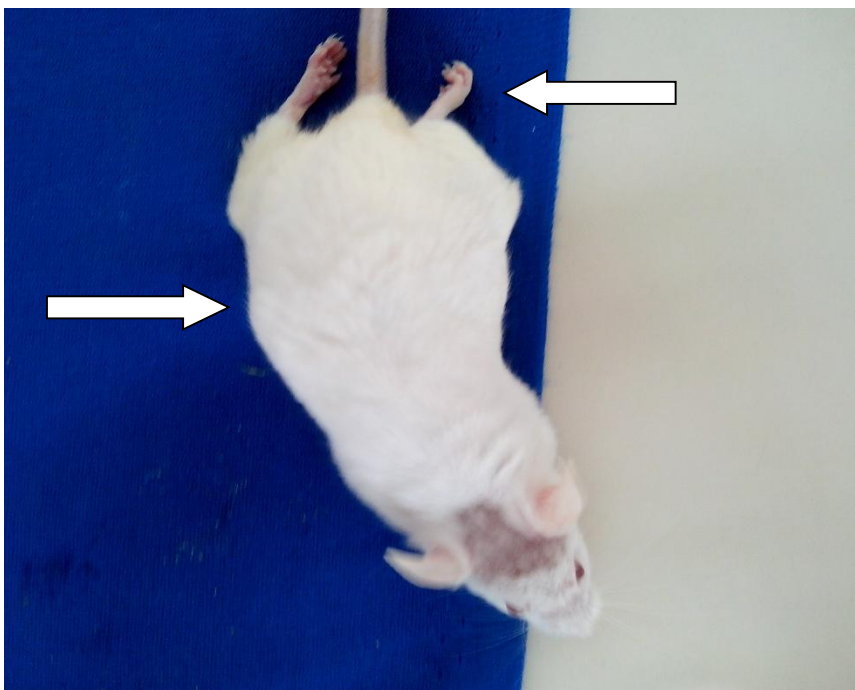


5.- RATONES EN EVALUACIÓN DE TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

Transformación celular en región abdominal y compromiso de extremidades posteriores



Extremidades disfuncionales por distensión abdominal y crecimiento de tumoral



Transformación celular

