



Efecto preventivo del CAPE en el desarrollo de carcinoma hepatocelular en ratas

Olga Beltrán Ramírez,* María Isabel Rivas Martínez,* Gloria Bruno Carrasco,** Saúl Villa Treviño***

RESUMEN

Introducción. El éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE), un componente del propóleo, muestra propiedades anticarcinogénicas en el modelo modificado del hepatocito resistente cuando es administrado antes de la etapa de iniciación. Sin embargo, se desconoce si ejerce su efecto protector en etapa de promoción. En este trabajo se caracterizó su efecto, administrándolo en etapa de promoción, midiendo lesiones preneoplásicas causadas por el tratamiento carcinogénico. **Hipótesis.** El CAPE reduce las lesiones preneoplásicas cuando se administra en etapa de promoción del proceso de hepatocarcinogénesis. **Material y métodos.** Ratas Fischer-344, machos, tratadas de acuerdo con el modelo modificado del hepatocito resistente como grupo control. Para el grupo problema se administraron adicionalmente dosis intragástricas de CAPE (20 mg/kg). Los animales se sacrificaron el día 25, se extrajo el hígado para histoquímica con GGT. Se utilizó ANOVA de una vía y $p < 0.05$. **Resultados.** El CAPE disminuyó significativamente las lesiones preneoplásicas, tanto en número de focos por cm^2 en 75% como en el área GGT positiva en 62.3%. **Conclusiones.** El CAPE disminuye significativamente la aparición de lesiones preneoplásicas cuando es administrado en la etapa intermedia de hepatocarcinogénesis, mostrando ser un quimioprotector potencial que en el futuro pudiera utilizarse en seres humanos.

Palabras clave: Carcinoma hepatocelular, lesiones preneoplásicas, quimioprotección, CAPE.

ABSTRACT

Introduction. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a propolis component, has shown anticarcinogenic properties in the modified resistant hepatocyte model, when is administered before initiation. However, is unknown if has the same protector effect on promotion stage. In this work was characterized its effect when is administered during promotion stage, measuring preneoplastic lesions originated by the carcinogenic treatment. **Hypothesis.** CAPE reduce the preneoplastic lesions when is administered during promotion stage of the hepatocarcinogenesis process. **Material and methods.** Male Fischer-344 rats were treated like in the modified resistant hepatocyte model as control group. As problem group, were administered several doses by gavage of CAPE (20 mg/kg). The animals were sacrificed on day 25th, the liver was extracted for GGT histochemical analysis. Statistical analysis was done using one way ANOVA and a p value < 0.05 . **Results.** CAPE diminished the preneoplastic lesions, 75% in foci number per cm^2 and 62.3% in GGT positive area. **Conclusions.** CAPE reduced the induction of preneoplastic lesions when is administered in the middle of hepatocarcinogenesis, demonstrating been a potential chemoprotector that could be used on humans in future.

Key words: Hepatocellular carcinoma, preneoplastic lesion, chemoprotector, CAPE.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial. En Latinoamérica, incluyendo a México, ocupa el tercer lugar de las causas de muerte. En Norteamérica, uno de cada dos hombres y una de cada tres mujeres desarrollarán

algún tipo de cáncer en algún momento de su vida. Cerca de 75% de los casos son diagnosticados en personas de 55 años de edad o mayores, cuando ya la enfermedad se encuentra en etapas avanzadas, por lo que es difícil tratarla y curarla.

El desarrollo de un tumor maligno en un individuo no es un evento aislado, involucra interacciones complejas,

* Adscrita a la Dirección de Investigación, Hospital Juárez de México.

** Adscrita al Servicio de Oncología Hospitalización, Hospital Juárez de México.

*** Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional.

entre diversos factores endógenos y exógenos (ambientales, genéticos, hormonales, inmunológicos, etc.). La carcinogénesis conlleva múltiples etapas y en el área experimental se ha dividido en tres: iniciación, promoción y progresión.

- **Iniciación.** Consiste en la formación de una célula mutada (preneoplásica) por un evento genotóxico.
- **Promoción.** Consiste en la expansión clonal de la célula iniciada a través del incremento de la tasa de división celular, debido a la proliferación, disminución de la capacidad de reparar el DNA y disminución de la apoptosis.
- **Progresión.** Involucra cambios moleculares y celulares que conducen al paso del estado preneoplásico al neoplásico, esta etapa es irreversible e involucra inestabilidad genética, cambios en la ploidía celular y disruptión de la integridad de los cromosomas.¹

El cáncer hepático es uno de los cánceres más comunes y sólo tiene cura si se detecta antes de que las células cancerosas comiencen a expandirse por el organismo. Las opciones de cura o tratamiento dependen del tipo de tumor y su estadio en el momento de comenzar la terapia.²

Millones de personas viven con cáncer o se han tratado a causa de esta enfermedad, pero su prevención siempre será la mejor opción. El término de quimioprevenCIÓN se acuñó para describir una nueva disciplina en oncología, que consiste en el uso de compuestos sintéticos o naturales para inhibir, retardar o revertir la carcinogénesis.³

La quimioprevención se basa en la hipótesis de que la interrupción de los eventos biológicos involucrados en el desarrollo de la carcinogénesis reducirá la incidencia de cáncer. Esta hipótesis provee un punto de partida para el diseño y evaluación de esquemas de quimioprevención, incluyendo la selección de los agentes para inhibir el proceso biológico,⁴ los cuales pueden aplicarse en cualquiera de las tres etapas del proceso de carcinogénesis:

- **Iniciación.** Cuando las células reciben los primeros daños y se forman células iniciadas.
- **Promoción.** Donde las células iniciadas sufren una expansión clonal, formando lesiones preneoplásicas, y
- **Progresión.** Donde se acumulan más alteraciones que llevan a las células a adquirir un fenotipo maligno.

Los quimioprotectores se han identificado en algunos fármacos de uso común como los antinflamatorios no esteroidales y otros se han encontrado frecuentemente

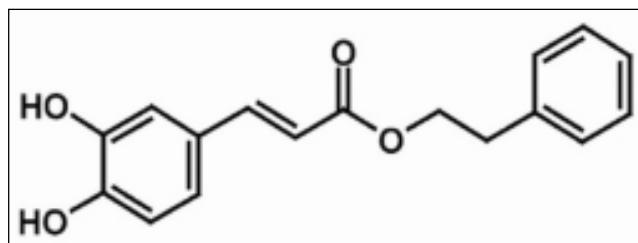


Figura 1. Estructura química del CAPE.

mente cuando se estudia el efecto de sustancias purificadas de extractos de productos naturales a los cuales la medicina alternativa ha atribuido propiedades terapéuticas. Este es el caso del propóleo y de sus componentes.⁵⁻⁷

El propóleo es una resina cérea, de composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. Ha sido ampliamente utilizado desde la antigüedad con diversas finalidades, actualmente se investigan las acciones, efectos y posibles usos del propóleo en biología y medicina, destacando como suplemento dietético y aplicado en la industria farmacéutica.⁸

Uno de los componentes del propóleo más estudiados en los últimos 20 años es el éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE) (Figura 1), compuesto fenólico que posee un amplio espectro de actividades biológicas.

Algunas de las actividades biológicas descritas para este compuesto son las siguientes:

- Efecto antiviral, antibacteriano, antifúngico y antiprotozoario.^{9,10}
- Antinflamatorio y analgésico.¹¹
- Inmunoestimulante.¹²
- Tóxico para células cancerosas e inocuo para células no cancerosas.¹³
- Antioxidante.¹⁴
- Suprime la producción de eicosanoides (COX-2).¹⁵
- Induce apoptosis en células transformadas e inhibe la síntesis de DNA.¹⁶
- Regenera las uniones GAP entre células transformadas.¹⁷
- Disminuye la actividad enzimática de los citocromos P450 (CYP) 1A1/2.^{6,18}

Las diferentes propiedades atribuidas a este compuesto se han estudiado en varios modelos con diversos objetivos, donde –aún variando las condiciones de estudio– el resultado siempre ha sido favorable. Uno de los modelos utilizados recientemente para probar el efecto de este com-



puesto es el modelo modificado del hepatocito resistente de Semple-Roberts.¹⁹

En este modelo se induce carcinoma hepatocelular en ratas y se puede estudiar el proceso carcinogénico en sus tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión. En la etapa de iniciación se ha administrado el CAPE antes del tratamiento carcinogénico para probar si funciona como preventivo y se encontró que disminuye las lesiones preneoplásicas con una sola dosis, modifica la expresión de genes y, específicamente, actúa como modulador de los citocromos del hígado para prevenir dichas lesiones.^{6,7} En la etapa de progresión se realizaron pruebas en ratas Wistar, las cuales son muy resistentes a los tratamientos. Sin embargo, la rata más usada actualmente es la Fischer-344, pero se desconoce si funcionará el CAPE como quimioprotector previniendo la etapa de promoción de la hepatocarcinogénesis.

El objetivo de este trabajo fue verificar el efecto quimioprotector en la etapa de promoción del modelo del hepatocito resistente, pero esta vez utilizando ratas Fischer-344 para continuar con el estudio del mecanismo de protección de este compuesto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo experimental

Para el estudio del efecto quimioprotector del CAPE durante la iniciación de la hepatocarcinogénesis química se siguió el protocolo modificado de Semple-Roberts de 1987. Se utilizaron ratas Fisher-344 machos de 180-200 g de peso, proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), el cual cumple con la normatividad nacional e internacional necesaria para su manejo.

Como grupo control del modelo carcinogénico se les administró una dosis intraperitoneal de dietilnitrosamina (DEN) de 200 mg/kg el día 0. Los días 7, 8, 9 se les administró una dosis diaria intragástrica de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) y finalmente el día diez se les practicó una hepatectomía parcial ($n = 9$). Como grupo problema se utilizó el mismo tratamiento anterior, pero se les adicionó una dosis intragástrica de 20 mg/kg de CAPE disuelto en aceite de maíz, 12 h antes de las dos primeras dosis de 2-AAF y 72 h después de la hepatectomía parcial ($n = 6$). Un tercer grupo de control de vehículo recibió el tratamiento carcinogénico y en lugar de CAPE, se le administró solamente el aceite ($n = 8$). Se sacrificaron el día 25 por desangramiento bajo anestesia con

éter, se extrajo el hígado, se congeló y se almacenó a -70 °C.

Tinción histoquímica para GGT

Del hígado congelado se hicieron cortes de 20 μm de grosor y se tiñeron para ver la actividad de gamma-glutamiltranspeptidasa (GGT) de acuerdo con la técnica de Rutenburg.²⁰ Las imágenes de las lesiones preneoplásicas GGT positivas se capturaron con una cámara digital (Color View 12, Soft Imaging System GmbH, Germany) y se cuantificaron con el programa AnalySIS (AnalySIS, Soft Imaging System GmbH). Se seleccionaron solamente las áreas $> 0.01 \text{ mm}^2$ y se eliminó el background.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando ANOVA de una vía y se aplicó la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples. El análisis se realizó con el programa SigmaStat 3.1.1 software (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA). En todas las pruebas, el nivel de significancia usado fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

El tratamiento con CAPE reduce las lesiones preneoplásicas.

Las lesiones GGT positivas se han considerado como lesiones preneoplásicas y el número máximo se observan alrededor de los 30 días después de iniciar el tratamiento carcinogénico. El CAPE ha demostrado reducir las lesiones preneoplásicas cuando es administrado en la etapa de promoción usando ratas Wistar,⁵ pero no se ha verificado su efecto protector en ratas Fischer-344 en las mismas condiciones, razón por la que se llevó a cabo este trabajo. Al comparar el grupo control con tratamiento carcinogénico (TC) con el tratado con CAPE (TC + CAPE) se observó una disminución significativa de las lesiones preneoplásicas de 75% de los focos GGT positivos/cm² (Figura 2) y 62.3% menos de área GGT positiva (Figura 3). Al administrar el vehículo, aceite de maíz sin CAPE (TC + aceite), las lesiones preneoplásicas aumentan por arriba de las producidas por el tratamiento carcinogénico solo. Estos resultados muestran que el CAPE administrado en la etapa de promoción del proceso carcinogénico reduce la aparición de lesiones preneoplásicas en ratas Fischer-344 (Figura 4), mostrando que este compuesto es un buen candidato para utilizarse como quimioprotector en seres humanos en un futuro.

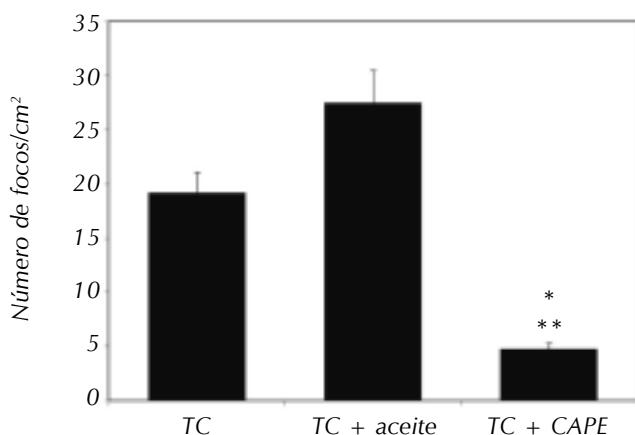


Figura 2. Efecto de CAPE en la aparición del número de focos/cm². Se analizaron tres grupos: TC (tratamiento carcinogénico), TC + aceite (tratamiento carcinogénico más el vehículo, que es aceite de maíz), TC + CAPE (tratamiento carcinogénico más CAPE en la etapa de promoción). *Significativo estadísticamente comparado con TC. **Significativo estadísticamente comparado con TC + aceite. Se utilizó anova de una vía, con prueba post hoc de Bonferroni, se seleccionó una $p < 0.05$.

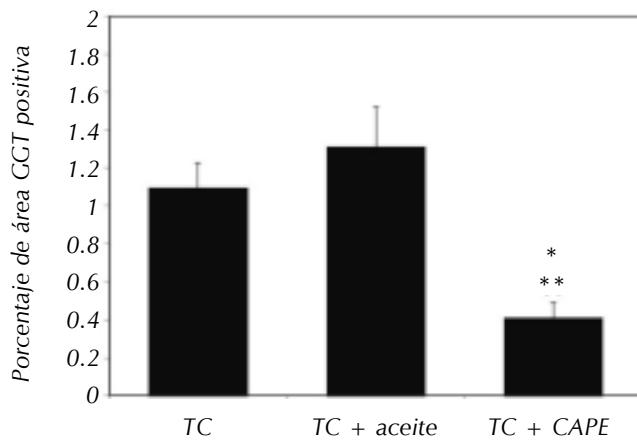


Figura 3 Efecto del CAPE en la aparición de área CGT positiva. Se analizaron tres grupos: TC (tratamiento carcinogénico), TC + aceite (tratamiento carcinogénico más el vehículo, que es aceite de maíz), TC + CAPE (tratamiento carcinogénico más CAPE en la etapa de promoción). *Significativo estadísticamente comparado con TC. **Significativo estadísticamente comparado con TC + aceite. Se utilizó anova de una vía, con prueba post hoc de Bonferroni, se seleccionó una $p < 0.05$.

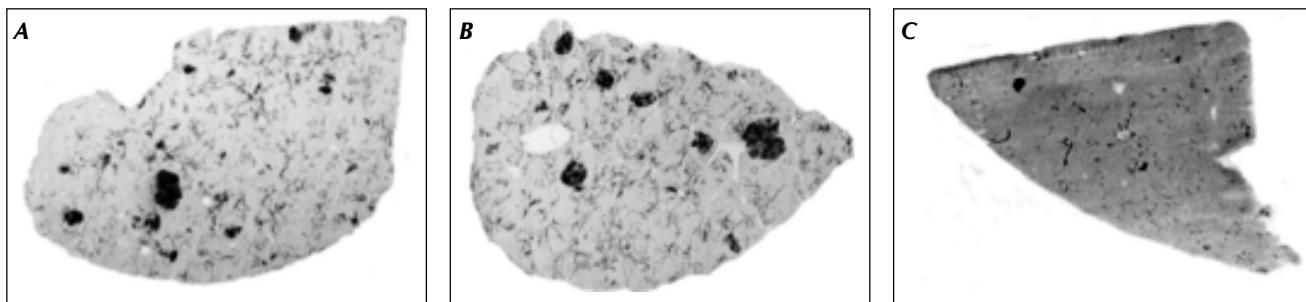


Figura 4. Efecto de CAPE en la aparición de lesiones preneoplásicas. **A.** Tejido con tratamiento carcinogénico (TC). **B.** Tejido con tratamiento carcinogénico más aceite (TC + aceite). **C.** Tejido con tratamiento carcinogénico más CAPE (TC + CAPE).

DISCUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte; desafortunadamente, las estadísticas indican un incremento en la incidencia de esta enfermedad, debido a la complejidad de los estilos de vida actual. La incidencia del cáncer depende del ambiente familiar, social, laboral, ambiental; el carcinoma hepatocelular no es la excepción. Es consenso que una herramienta más importante que la detección es la quimioprevisión de la enfermedad, evitando el proceso de carcinogénesis o logrando la reversión del mismo. Sin darse cuenta, la quimioprevisión es utilizada desde hace cientos o miles de años, protegiendo a comunidades de la inciden-

cia de enfermedades, pero hoy gracias a la metodología de la investigación y la posibilidad de probar el efecto de sustancias protectoras en diferentes modelos nos proporciona una ventaja muy importante para la salud.

Existe una lista enorme de quimioprotectores entre los que podemos mencionar a los flavonoides, vitaminas C y E; componentes del ajo, chile, brócoli, cúrcuma, té verde, café y propóleo, entre otros, la mayoría de ellos, presentes en nuestras dietas y estilos de vida. El CAPE es otro de los quimioprotectores comunes utilizado en la investigación básica y también en la dietas por medio del consumo de miel de abeja y sus derivados. El efecto quimioprotector del CAPE en el modelo



modificado del hepatocito resistente se ha comprobado al administrarse en la etapa de iniciación, antes de DEN, donde se observó que una sola dosis reduce la aparición de lesiones preneoplásicas, modifica el metabolismo de DEN, modifica la expresión de genes y lo más importante es que disminuye en 43% la aparición de tumores.^{6,21}

El efecto del CAPE también se ha probado en la etapa de promoción utilizando ratas Wistar,⁵ una cepa resistente que desarrolla pocas lesiones, por lo que el uso de la cepa Fischer-344 es más útil e indicado para este modelo. Debido a esto, el objetivo principal de este estudio fue determinar el efecto del CAPE administrado en la promoción carcinogénica, en una cepa de rata donde el modelo funciona mejor y los efectos de los tratamientos son más claros, pues es más susceptible a los carcinógenos.

En este trabajo el CAPE demostró ser un buen quimio-protector capaz de revertir el proceso carcinogénico desde la etapa de promoción, lo que abre una nueva ventana de investigación básica, donde ahora se deberá estudiar el mecanismo de acción para extrapolar los resultados a investigación clínica.

En la etapa de iniciación, el CAPE modula la bioactivación de DEN y es así como protege al hígado. En la etapa de promoción pudiera suceder algo muy similar, pues el 2-AAF también necesita ser bioactivado por citocromos como CYP1A1/2, el cual –se ha comprobado– es afectado por este compuesto.⁶

CONCLUSIÓN

El CAPE puede inhibir el proceso de la hepatocarcinogénesis química con tres dosis en la etapa de promoción, lo cual resulta en una disminución de las lesiones preneoplásicas. Este compuesto quimioprotector es un excelente candidato para administrarlo en personas de alto riesgo de desarrollar cáncer. Estudios posteriores determinarán si es posible su uso en los seres humanos, ya sea para inhibir, prevenir o revertir la carcinogénesis.

REFERENCIAS

- Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2004; 44: 239-67.
- Parikh S, Hyman D. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. Am J Med 2007; 120(3): 194-202.
- Weinstein IB. Cancer prevention: recent progress and future opportunities. Cancer Res 1991; 51(18 Suppl.): 5080s-5085s.
- Tsao AS, Kim ES, Hong WK. Chemoprevention of cancer. CA Cancer J Clin 2004; 54(3): 150-80.
- Carrasco-Legleu CE, et al. Chemoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on promotion in a medium-term rat hepatocarcinogenesis assay. Int J Cancer 2004; 108(4): 488-92.
- Beltran-Ramirez O, et al. Evidence that the anticarcinogenic effect of caffeic acid phenethyl ester in the resistant hepatocyte model involves modifications of cytochrome P450. Toxicol Sci 2008.
- Beltran-Ramirez O, et al. An approach to the study of gene expression in hepatocarcinogenesis initiation. Transl Oncol 3(2): 142-8.
- Farré R, Frasket I, Sánchez A. Propolis and human health. Ars Pharmaceutica 2004; 45(1): 21-43.
- Abdel-Latif MM, et al. Caffeic acid phenethyl ester modulates Helicobacter pylori-induced nuclear factor-kappa B and activator protein-1 expression in gastric epithelial cells. Br J Pharmacol 2005; 146(8): 1139-47.
- Fitzpatrick LR, Wang J, Le T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. J Pharmacol Exp Ther 2001; 299(3): 915-20.
- Tan J, et al. Caffeic acid phenethyl ester possesses potent cardioprotective effects in a rabbit model of acute myocardial ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 289(5): H2265-71.
- Park JH, et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. Int Immunopharmacol 2004; 4(3): 429-36.
- Chen YJ, et al. Caffeic acid phenethyl ester preferentially sensitizes CT26 colorectal adenocarcinoma to ionizing radiation without affecting bone marrow radioresponse. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005; 63(4): 1252-61.
- Hsu LY, et al. Evaluation of polyphenolic acid esters as potential antioxidants. Biol Pharm Bull 2005; 28(7): 1211-5.
- Michaluart P, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. Cancer Res 1999; 59(10): 2347-52.
- McEleny K, et al. Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. BJU Int 2004; 94(3): 402-6.
- Na HK, et al. Restoration of gap junctional intercellular communication by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in a ras-transformed rat liver epithelial cell line. Cancer Lett 2000; 157(1): 31-8.



18. Jeng SN, et al. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. *Food Chem Toxicol* 2000; 38(10): 893-7.
19. Semple-Roberts E, et al. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. *Int J Cancer* 1987; 40(5): 643-5.
20. Rutenburg AM, et al. Histochemical and ultrastructural demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J Histochem Cytochem* 1969; 17(8): 517-26.
21. Beltran-Ramirez O, et al. An approach to the study of gene expression in hepatocarcinogenesis initiation. *Transl Oncol* 2010; 3(2): 142-8.

Solicitud de sobretiros:

Dra. en C. Olga Beltrán Ramírez
Dirección de Investigación
Hospital Juárez de México
Av. Instituto Politécnico Nacional, Núm. 5160
Col. Magdalena de las Salinas
Del. Gustavo A. Madero
C.P. 06770, México D.F.
Tel.: 5747-7560, Ext. 7475
Correo electrónico: obeltranr@gmail.com