

Premios y Becas

Informe Final Beca SEOM 2005 a Proyectos de Investigación

Dra. Rut Porta Balanyá, del Hospital Dr. Josep Trueta (ICO) de Girona

TÍTULO PROYECTO

Efectos de la dieta sobre la evolución del cáncer de mama

Introducción

Desde el inicio del estudio hasta el mes de febrero del 2009 se incluyeron en el estudio 55 pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos en el Hospital Universitario Dr. Josep Trueta de Girona y 56 controles (mujeres voluntarias socias de la Asociación Española Contra el Cáncer). Todas las pacientes y controles firmaron el consentimiento informado antes de participar en el estudio. Y en todo momento la información fue tratada con la máxima confidencialidad. De las 55 pacientes incluidas inicialmente en el estudio 6 decidieron no participar por razones varias por lo que no se incluyeron en los análisis.

De todas las pacientes y controles incluidos se obtuvo información de sus hábitos dietéticos, estilo de vida, medidas antropométricas, antecedentes ginecológicos y muestras de sangre en estado basal. También se analizaron distintas variables clínicas de las pacientes. En las pacientes,

se consideró estado basal antes de realizarse la cirugía del tumor de mama. Algunas pacientes fueron incluidas después de la intervención quirúrgica por lo que se consideró el estado basal en este momento. Además, se obtuvieron muestras de sangre antes de la cirugía, antes de iniciar el tratamiento de quimioterapia, durante el tratamiento de quimioterapia y a los 2 meses de haber finalizado todo el tratamiento.

Finalmente, se analizaron todos los cuestionarios de hábitos dietéticos y estilo de vida, las medidas antropométricas, las variables clínicas, las variables ginecológicas, el estado de estrés oxidativo en el ADN de los linfocitos, la capacidad antioxidante total en plasma y la expresión de la proteína de membrana HER2 y la enzima sintasa de ácidos grasos (FASN) en suero. Todas las variables de interés fueron introducidas en una base de datos SPSS especialmente creada para este estudio.

Resultados y Discusión

3.1. ESTADO NUTRICIONAL

La valoración del estado nutricional se llevó a cabo mediante el empleo de cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y registros de ingesta de 4 días de duración, basados en el modelo utilizado por "The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)". El análisis y la evaluación de los datos derivados de los cuestionarios se llevó a cabo mediante el software "Alimentación y Salud v2" creado por la Universidad de

Granada. A partir de este software se obtuvieron valores de ingesta de calorías, de grasas, proteínas, glúcidos, vitaminas y minerales.

Se analizaron las diferencias entre las variables dietéticas de las pacientes en situación basal respecto a los controles. Para ello se utilizó el test estadístico de la t de Student para muestras independientes, (tabla 1).

VARIABLES DE ESTUDIO	CONTROLES	PACIENTES EN ESTADO BASAL	VALOR P
KCalorías	1680.6096	1771.7346	0.280
Gramos de aceite de oliva virgen	10.8125	9.7394	0.481
Gramos de aceite de oliva	3.7068	4.4533	0.486
Gramos de grasas	67.2513	71.1839	0.322
Gramos de grasas poliinsaturadas	9.6334	10.7319	0.251
Gramos de grasas monoinsaturadas	26.3875	27.7983	0.395
Gramos de grasa saturada	19.5309	19.6395	0.940
Gramos de proteínas	77.0027	94.2981	0.001
Gramos de glúcidos	182.2829	192.5980	0.317
µg de vitamina A	708.3284	1079.3371	0.092
mg de vitamina C	147.1168	171.8723	0.187
mg de vitamina E	9.5405	10.9787	0.325
µg de selenio	64.1170	79.1236	0.023

Tabla 1: Análisis estadístico del estudio nutricional entre las pacientes en estado basal (media entre las pacientes antes y después de la cirugía) y los controles. Se compararon las medias de las distintas variables mediante el test de la t de Student para los grupos a comparar.

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la media de los gramos de proteínas ingeridas en un día entre los controles y las pacientes en estado basal ($p=0.001$), siendo superior la ingesta de pro-

teínas en las pacientes. También se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de la media de microgramos de selenio ingeridos en un día ($p=0.023$), siendo también superior en las pacientes.

3.2. ESTILO DE VIDA

El estudio del estilo de vida se realizó mediante la utilización de un cuestionario sobre distintos hábitos de las pacientes y los controles. Se recogió información sobre el hábito tabáquico y el número de cigarrillos consumidos

por día, en las pacientes y en los controles (tabla 2). También se estudió el consumo de bebidas alcohólicas en ambos grupos y su evolución a lo largo del tratamiento de las pacientes (tabla 3).

HÁBITO	CONTROLES n (%)	PACIENTES n (%)	VALOR P
Tabáquico actual			
Si	11 (19,6%)	6 (12,2%)	0.098
Nunca	26 (46,4%)	33 (67,3%)	
Exfumadora	19 (33,9%)	10 (20,4%)	
Rango N° cigarrillos			
Ninguno	26 (46,4%)	33 (67,3%)	0.04
< 10 cigarrillos	2 (3,6%)	4 (8,2%)	
10-20 cigarrillos	9 (16,1%)	2 (4,1%)	
Fumo hace tiempo	19 (33,9%)	10 (20,4%)	

Tabla 2: Análisis estadístico descriptivo del hábito tabáquico actual de las pacientes y los controles. Para detectar diferencias se compararon las distintas valores mediante el test de la Chi cuadrado de Pearson.

Los resultados del análisis del hábito tabáquico actual muestran como el hábito de fumar es independiente del hecho de ser control o paciente. Mientras que en el análisis

del número de cigarrillos consumidos, por persona y día, es superior entre los controles.

Variables	Controles	Pacientes antes cirugía	Pacientes después de la cirugía	Pacientes 6° ciclo QT	Pacientes final tratamiento	Valor p
Gr. Alcohol ingeridos /día	5,29902	2,47603	-	-	-	0,048
Gr. Alcohol ingeridos /día	5,29902	-	0,57806	-	-	0,000
Gr. Alcohol ingeridos /día	5,29902	-	-	0,33391	-	0,000
Gr. Alcohol ingeridos /día	5,29902	-	-	-	1,49063	0,004
Gr. Alcohol ingeridos /día	-	2,47603	0,57806	-	-	0,025
Gr. Alcohol ingeridos /día	-	2,47603	-	0,33391	-	0,013
Gr. Alcohol ingeridos /día	-	2,47603	-	-	1,49063	0,308

Tabla 3: Análisis estadístico del consumo de los gramos de alcohol ingeridos en un día entre las pacientes y los controles. Se compararon las medias de gramos de alcohol/ día mediante el test de la t de Student para los grupos a comparar.

En el análisis estadístico del consumo de alcohol, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de la media de los gramos de alcohol consumidos por día entre los controles y las pacientes antes de la cirugía ($p=0.048$), después de la cirugía ($p=0.000$), al sexto ciclo de quimioterapia ($p=0.000$) y al final del tratamiento ($p=0.004$). También se obtuvieron diferencias significativas entre las pacientes antes y después de la cirugía ($p=0.025$) y entre

las pacientes antes de la cirugía y al sexto ciclo de quimioterapia ($p=0.013$). Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de las pacientes antes de iniciar el tratamiento y a los dos meses de haber finalizado el tratamiento. Estos resultados sugieren que tanto el tratamiento de la cirugía como el de quimioterapia influyen en el consumo de alcohol en las pacientes.

3.3. ESTUDIO DE LAS VARIABLES GINECOLÓGICAS

Se compararon las medias de las distintas variables ginecológicas entre los controles y las pacientes en estado basal, concretamente: la edad de la menarquia, el número de embarazos, la edad del primer embarazo, y la edad de aparición de la menopausia (tabla 4).

En este caso no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas entre ambos grupos.

Variables de estudio	Controles	Pacientes	Valor p
Edad de la menarquia	12,3	12,83	0,094
Numero de embarazos	1,36	1,73	0,089
Edad del primer embarazo	25,2	24,84	0,724
Edad de la menopausia	50,04	49,32	0,529

Tabla 4: Análisis estadístico del estudio de las variables ginecológicas de los controles y las pacientes en estado basal. Se compararon las medias de las distintas variables mediante el test de la t de Student para los grupos a comparar.

3.4. ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO

También se realizaron estudios antropométricos en las pacientes y en los controles. Se analizaron el peso, la talla, la circunferencia de la cadera y de la cintura (índice cadera – cintura), la circunferencia del codo y de la muñeca (índice muñeca – codo), el índice de masa corporal (peso/talla²) y los pliegues cutáneos del bíceps, tríceps, subescapular y suprailíaco. Mediante el

valor de los pliegues cutáneos se calculó el porcentaje de grasa corporal.

Se compararon las medias de las variables antropométricas entre las pacientes y los controles, y se analizaron los posibles cambios que pudiera haber a lo largo del tratamiento de las pacientes (tabla 5).

Variables de estudio	Controles	Pacientes antes cirugía	Pacientes antes de la QT	Pacientes 6º ciclo QT	Pacientes final tratamiento	Valor p
Peso	63.9518	67.2395	-	-	-	0.179
Peso	63.9518	-	67.0005	-	-	0.192
Peso	-	67.2395	-	68.2985	-	0.743
Peso	-	-	67.0005	68.2985	-	0.672
Peso	-	67.2395	-	-	69.8448	0.399
Peso	-	-	67.0005	-	69.8448	0.329
Índice masa corporal	24.8486	25.9982	-	-	-	0.244
Índice masa corporal	24.8486	-	25.8728	-	-	0.271
Índice masa corporal	-	25.9982	-	26.3371	-	0.783
Índice masa corporal	-	-	25.8728	26.3371	-	0.691
Índice masa corporal	-	25.9982	-	-	27.0712	0.372
Índice masa corporal	-	-	25.8728	-	27.0712	0.288
Porcentaje de grasa corporal	6.5854	8.8674	-	-	-	0.048
Porcentaje de grasa corporal	6.5854	-	8.5747	-	-	0.066
Porcentaje de grasa corporal	-	8.8674	-	8.3162	-	0.656
Porcentaje de grasa corporal	-	-	8.5747	8.3162	-	0.828
Porcentaje de grasa corporal	-	8.8674	-	-	8.5176	0.753
Porcentaje de grasa corporal	-	-	8.5747	-	8.5176	0.957
Índice cintura cadera	0.87546	0.87605	-	-	-	0.978
Índice cintura cadera	0.87546	-	0.88294	-	-	0.695
Índice cintura cadera	-	0.87605	-	0.89315	-	0.177
Índice cintura cadera	-	-	0.88294	0.89315	-	0.362
Índice cintura cadera	-	0.87605	-	-	0.8807	0.734
Índice cintura cadera	-	-	0.88294	-	0.8807	0.853
Índice muñeca codo	0.63969	0.64429	-	-	-	0.754
Índice muñeca codo	0.63969	-	0.64362	-	-	0.764
Índice muñeca codo	-	0.64429	-	0.65432	-	0.271
Índice muñeca codo	-	-	0.64362	0.65432	-	0.201
Índice muñeca codo	-	0.64429	-	-	0.64272	-0.856
Índice muñeca codo	-	-	0.64362	-	0.64272	0.910

Tabla 5: Análisis estadístico del estudio antropométrico. Se analizaron las medias de distintas variables antropométricas entre los controles y las distintas determinaciones de las pacientes (antes de la cirugía, antes del tratamiento de quimioterapia, al sexto ciclo de quimioterapia y al final del tratamiento). Se realizó el test de la t de Student para las distintas variables y grupos de sujetos a comparar.

Los resultados indicaron que las pacientes en estado basal presentan un mayor porcentaje de grasa corporal comparado con los controles y que estas diferencias eran esta-

dísticamente significativas ($p=0.048$). Respecto a las otras variables no observamos diferencias estadísticamente significativas.

3.5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS

La evaluación de las variables clínicas se realizó mediante el estudio de distintos datos clínicos y patológicos procedentes de la historia clínica de cada paciente. Se recogieron variables tales como la edad, las principales características histológicas del tumor, el estadio y el tipo de quimioterapia. En la tabla 6 se muestran los resultados observados mediante un análisis descriptivo de medias o de frecuencias.

En el estudio de las variables clínicas de las pacientes se observó que la mayoría de ellas (75,5%) presentan tumores con histología de carcinoma ductal infiltrante y en un 47.5% son tumores moderadamente diferenciados (GH II).

El estadio tumoral más frecuente en dichas pacientes fueron los estadios I y IIA (con un porcentaje del 36.7% y 32.7% respectivamente), con el 59.2% de las pacientes sin afectación ganglionar. El 83.7% de las pacientes presentaron receptores de estrógenos positivos y el 81.6% receptores de progesterona positivos. El estudio de Her2 (incluyendo FISH) nos indica que un 16.3% de las pacientes presentan una expresión positiva para HER2.

Finalmente se analizaron los distintos tipos de quimioterapia administrados resultando ser el más frecuente (44.9%) el esquema FEC seguido de docetaxel.

Variable clínica	Número (n)	Media (rango) / %
EDAD		
Pacientes	49	51.02 (35-69)
Controles	56	48.80 (19-71)
HISTOLOGÍA		
Carcinoma ductal infiltrante	37	75.5
Carcinoma Lobulillar	9	18.4
Carcinoma intraductal	3	6.1
GRADO HISTOLÓGICO		
I	8	20.0
II	19	47.5
III	13	32.5
ESTADIO TUMORAL		
0	1	2
I	18	36.7
IIA	16	32.7
IIB	6	12.2
IIIA	5	10.2
IIIB	3	6.1
AFECTACIÓN GANGLIONAR		
No	29	59.2
Si	20	40.8
RECEPTORES ESTRÓGENOS		
Positivos	41	83.7
Negativos	8	16.3
RECEPTORES PROGESTERONA		
Positivos	40	81.6
Negativos	9	18.4
HER2 (INCLUIDO FISH)		
Positivos	8	16.3
Negativos	41	83.7
ESQUEMA DE QUIMIOTERAPIA		
FEC	4	8.2
FEC + DOCETAXEL	22	44.9
FEC + DOCETAXEL + herceptin	6	12.2
TAXOTEREx6	1	2
Otros (Docetaxel+capecitabina x 6)	1	2
No quimioterapia	14	28.6
Abandona el tratamiento	1	2

Taula 6: Análisis descriptivo de las edades de las pacientes y controles y de las variables clínicas de las pacientes.

3.6. DAÑO CELULAR: ESTRÉS OXIDATIVO DEL ADN

La valoración del estado oxidativo se realizó mediante el análisis de la oxidación del ADN de los linfocitos.

La oxidación del ADN o genotoxicidad se determinó mediante el ensayo COMET a partir de las muestras de linfocitos de las pacientes y controles. El ensayo COMET o electroforesis en gel de células individuales (single-cell gel electrophoresis assay) mide el daño oxidativo en el ADN de células eucarióticas individuales. Los resultados se expresan en forma de índice: Olive Tail Moment (OTM). Los valores normales de referencia del Índice OTM resultan de la relación del % de ADN en la cola de la imagen que se genera con el ensayo COMET y el % de ADN de la cabeza. Nuestros valores de referencia se sitúan alrededor de $0,3 + 0.080$, basándonos en

estudios previos realizados por el Instituto de Nutrición de Granada, con larga experiencia en esta técnica.

Se analizaron si existen diferencias estadísticamente significativas en la oxidación del ADN entre los controles y las pacientes antes de la cirugía y después de la cirugía del tumor y dentro del grupo de pacientes entre las pacientes antes de la cirugía y después de la cirugía (tabla 7).

Los resultados nos indican que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la oxidación del ADN entre los controles y las pacientes después de la cirugía ($p=0.043$), lo que sugiere un posible efecto estresante de la cirugía.

3.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

La capacidad antioxidante total del plasma se determinó mediante el ensayo con el radical catiónico 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS+) según Re et al (1999) que mide valores de absorbancia a 600nm. Los antioxidantes presentes en la muestra reaccionan con el ABTS causando la supresión del color proporcional a su concentración.

Se analizó la relación entre en la capacidad antioxidante total del plasma de los controles y de las pacientes antes y después de la cirugía, y dentro del grupo de pacientes entre las pacientes antes y después de la cirugía (tabla 7).

Variables de estudio	Controles	Pacientes antes cirugía	Pacientes después cirugía	Valor de la p
OTM	0.37174	0.48351	-	0.223
OTM	-	0.48351	0.66891	0.301
OTM	0.37174	-	0.66891	0.043
ABTS ($\mu\text{mol/L Trolox}$)	6.72494	6.70332	-	0.607
ABTS ($\mu\text{mol/L Trolox}$)	-	6.70332	6.86903	0.000
ABTS ($\mu\text{mol/L Trolox}$)	6.72494	-	6.86903	0.000

Tabla 7: Análisis estadístico de las medias de la oxidación del ADN (OTM) y de la capacidad antioxidante total del plasma (ABTS). Se estudiaron los controles y las pacientes antes de la cirugía y después de la cirugía. Se compararon las medias de las distintas variables mediante el tests de la t de Student para los grupos a comparar.

En este caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad antioxidante total entre los controles y las pacientes después de la cirugía ($p=0.000$). Y

entre las pacientes antes y después de la cirugía ($p=0.000$). Sugiriendo la capacidad que tiene el organismo de reaccionar ante una situación de estrés.

3.8. EXPRESIÓN DE HER2 Y FANS EN SUERO

En el análisis de la expresión proteica en suero se estudiaron la expresión de la enzima FASN y de la proteína de membrana HER2 mediante la técnica de ELISA.

Las ELISAs de FASN se realizaron mediante el kit "FAS-detect ELISA" de la casa comercial Fasgen. Para las ELISAs de HER2 se utilizaron los kits "Human sHER2 Instant ELISA" de la casa LabClínicos.

Se analizaron los niveles de expresión sérica de FASN y HER2 de los controles y de las pacientes a lo largo del tratamiento, incluida la cirugía y la quimioterapia (tabla 8). El análisis estadístico de los resultados de los niveles de expresión de FASN no detectó diferencias es-

tadísticamente significativas entre los niveles séricos de los controles comparados con los de las pacientes en estado basal ni en cualquier otro momento a lo largo del tratamiento. Mientras que, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles séricos de HER2 entre las pacientes en estado basal y durante el tratamiento del tercer ciclo de quimioterapia y del sexto ciclo ($p=0.010$ y $p<0.0001$ respectivamente). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles séricos de HER2 de las pacientes entre el tercer ciclo y el sexto ciclo de quimioterapia ($p<0.001$), con una tendencia a niveles séricos de HER2 más elevados en las pacientes en estado basal respecto a los controles ($p=0.052$).

Variables de estudio	Controles	Pacientes antes cirugía	Pacientes 3r ciclo QT	Pacientes 6è ciclo QT	Valor p
FAS	9.00615	4.80910	-	-	0.185
FAS	-	4.80910	4.19078	-	0.769
FAS	-	4.80910	-	8.06172	0.327
FAS	-	-	4.19078	8.06172	0.245
HER2	4.18773	5.74987	-	-	0.052
HER2	-	5.74987	4.02068	-	0.010
HER2	-	5.74987	-	2.47351	<0.001
HER2	-	-	4.02068	2.47351	<0.001

Tabla 8: Análisis estadístico de los niveles medios de expresión de FASN y de HER2. Se estudiaron los controles y las pacientes antes de la cirugía, después del 3r ciclo de quimioterapia (QT) y antes del sexto ciclo de QT. Se compararon las medias de las distintas variables mediante el tests de la t de Student para los grupos a comparar.

Conclusiones

En este estudio se analizaron los hábitos dietéticos, el estilo de vida, los antecedentes ginecológicos, los parámetros antropométricos, los datos clínicos, parámetros de daño celular y de capacidad antioxidante y los niveles séricos de FASN y HER2 en pacientes intervenidas de cáncer de mama y en un grupo control de mujeres con un rango de edad similar.

Los resultados sugieren que existen diferencias estadísticamente significativas en cuando a los hábitos dietéticos. Se hallaron diferencias en la cantidad de gramos de proteínas ingeridas en un día y los gramos de selenio/día entre los controles y las pacientes en estado basal, siendo superiores entre las pacientes. En el estudio del estilo de vida entre las pacientes y controles se obtuvo que hay una relación entre el número de cigarrillos consumidos por día y el hecho de ser paciente o control, siendo los controles los que consumen un mayor número de cigarrillos diarios. También se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al consumo de gramos de alcohol diarios entre las pacientes a lo largo del tratamiento observándose una disminución del consumo de alcohol a lo largo del tratamiento, que vuelve a los niveles basales tras dos meses de haber finalizado el tratamiento de quimioterapia. En el estudio de las variables ginecológicas, no se observó ninguna diferencia estadística

significativa entre las pacientes y los controles. En cuanto al estudio de las medias antropométricas, se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de grasa corporal entre las pacientes en situación basal y controles, siendo superior el porcentaje de grasa corporal entre las pacientes. El estudio de las variables clínicas reveló que un 75.5% de las pacientes presentaron un carcinoma ductal infiltrante y un 47.5% eran tumores moderadamente diferenciados (GH II). También se observó que un 59.2% de las pacientes no presentaron afectación ganglionar y un 16.3% presentaron expresión positiva de HER2. En cuanto al parámetro OTM (daño oxidativo en el ADN) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y las pacientes después de la cirugía y también se observó un incremento en la capacidad antioxidante total entre las pacientes antes de ser intervenidas y después de ser intervenidas lo que sugiere el posible papel estresante de la cirugía. Sin embargo los niveles de ABTS que reflejan la capacidad antioxidante aumentaron a lo largo del tratamiento de las pacientes, sugiriendo su papel compensador ante una situación de estrés como puede ser la cirugía. Por último destacar que los niveles séricos de HER2 en las pacientes que realizaron quimioterapia disminuyeron a lo largo del tratamiento independientemente de su expresión tisular.