



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 14 de Agosto de 2018

Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Instituto Nacional de Ciencias Médicas
y Nutrición "Salvador Zubirán"
Vasco de Quiroga 15
Col. Belisario Domínguez, Sección 16
C:P: 14080 Ciudad de México, CDMX

Presente:

Estimada Dra. Bobadilla, hago de su concimiento que hemos concluido con el protocolo BQ-1289-14/14-1, intitulado Efecto de la combinación de una intervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamaiento de cáncer".

Como consta en el protocolo aprobado por la CINV, el protocolo tenía como objetivo el "determinar el efecto coadyuvante de nutrimentos como los ácidos poliinsaturados Omega-3 y los extractos hidroalcolicos de plantas medicinales Agastache mexicana y Ganoderma lucidum en dosis terapéuticas, ya sea solos o en combinación con el tratamiento convencional (dependiente del fenotpo tumoral) en la inhibición del crecimiento tumoral con diferentes líneas de cáncner humano en un modelo murino." Para este protocolo se emplearon ratones hembra de la cepa Nu/Nu en los que se probó primero que la intervención nutricional no afectara las tazas de ganancia de peso al comparar la dieta rica en ácidos grados poliinsaturados Omega-3 con una dieta normal. Posteriormente se realizó el experiemnto comparativo en donde los ratones recibieron un trasplante subescapular de 2 millones de células de cáncer humano dela línea MDA-MB-231, representante del subtipo Lumnial-A. El hallazgo más relevante fue que la taza de crecimiento del tumor disminuyó de 2.7 mm³/semana a en animales con dieta control a 0.5 mm³/semana en los que recibieron la dieta rica en ácidos grados poliinsaturados Omega-3.

Parte de los resultados de este trabajo se publicaron en un artículo en la Revista de Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria (copia del artículo completo anexa) y la Licenciada en Nutrióloga Erika Alejandra Damasco Ávila obtuvo el grado de

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx




Doctora en Ciencias dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud de la UNAM el 30 de mayo del 2018 (Copias de: acta de examen, constancia de examen, tira de materias y carátula de la Tesis anexas).

Habiendo alcanzado los objetivos planteados y habiendo demostrado un beneficio con la intervención nutricional al enriquecer la dieta con ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 y con una publicación y una tesis de doctorado como productos académicos doy por concluido el protocolo.

Por lo anterior agradezco a la Dirección y al personal del Bioterio del INCMN SZ y a la CINVA por su apoyo en la realización de este protocolo.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo y mi reconocimiento por su labor en la Coordinación de la CINVA.

Atentamente,


Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Investigador en Ciencias Médicas
Jefe de la Unidad de Bioquímica
INCMN SZ





Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Epidemiología Clínica

**“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS ω 3 EN UN MODELO MURINO PARA CA DE
MAMA”**

TESIS

Que para optar por el grado de DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

Erika Alejandra Damasco Avila

Tutor Principal:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

Comité Tutoral:

Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Abril 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

ACTA DE EXAMEN DE GRADO DE DOCTORADO

EXPEDIENTE: 0 CUENTA: 507018445

En la sala de exámenes D-308 de la Unidad de Posgrado de la UNAM, siendo las 12:00 horas del día 30 de mayo del año dos mil dieciocho, se presentó la C. Erika Alejandra Damasco Avila, de nacionalidad mexicana, quien cursó sus estudios en el periodo comprendido de 2010-2 a 2012-1, a fin de sustentar el Examen de Grado de Doctora en Ciencias, (Plan 5007), ante el jurado compuesto por los profesores:

Dr. María Margarita Zapata Ferrés, Dra. Martha Alejandra Cruz y
Dra. Aurora Elizabeth Ferrás Chicra

Fungiendo como presidente el primero de los nombrados y como secretario el último, y habiendo interrogado a la candidata y concluida la réplica del trabajo escrito titulado: *"Efecto de la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados w3 en un modelo murino para ca de mama"* al término del examen el jurado resolvió:

Aprobarla



[Firma manuscrita]
PRESIDENTE

[Firma manuscrita]
SECRETARIO

[Firma manuscrita]
VOCAL



"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Certifico que las firmas anteriores corresponden al Jurado para el examen de Grado de Doctorado

[Firma manuscrita]
DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
COORDINADOR

"POR LA DIRECCIÓN GENERAL
DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR"

Revisión
Jefe del Departamento de Exámenes y Títulos
Expedición
Subdirector de Control Documental



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CONSTANCIA DE EXAMEN DE GRADO DE DOCTORADO

En sala de exámenes D-308 de la Unidad de Posgrado de la UNAM, siendo las 12:00 horas del 30 de mayo del año dos mil dieciocho se presentó la C. Erika Alejandra Damasco Ávila, a fin de sustentar su réplica oral del trabajo de tesis denominado "*Efecto de la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados w3 en un modelo murino para ca de mama*".

El dictamen del jurado es: Aprobada

Se extiende el presente a petición de la interesada a los treinta días del mes de mayo del año dos mil dieciocho.

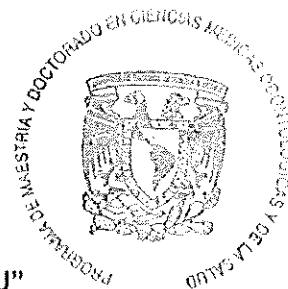
PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

VOCAL

VOCAL



"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
COORDINADOR



Autorización de Examen de Grado

Fecha de emisión: 22-05-2018

Número de cuenta: 507018445

Expediente: S/N

Plan de estudios : 12 - 5007 - 3

Folio de pago: 399484

Calificaciones obtenidas por la alumna: **ERIKA ALEJANDRA DAMASCO AVILA** para obtener el **Grado de Doctora en Ciencias**, en el Programa de Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, que ha cubierto satisfactoriamente a consideración de su Comité Académico

Período	Actividad académica	Calificación	Créditos
2010 - 2	ACTIVIDADES ACADÉMICAS Y DE INVESTIGACIÓN	AC	0
2011 - 1	ACTIVIDADES ACADÉMICAS Y DE INVESTIGACIÓN	AC	0
2011 - 2	ACTIVIDADES ACADÉMICAS Y DE INVESTIGACIÓN	AC	0
2012 - 1	ACTIVIDADES ACADÉMICAS Y DE INVESTIGACIÓN	AC	0
2018 - 2	TESIS DE DOCTORADO	AC	0

Total de créditos reconocidos en el plan de estudios: 0

El alumno ha cubierto el plan de estudios en su totalidad y se le autoriza la presentación del examen para la obtención del grado.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 22 de mayo de 2018

C. P. Agustín Mercado
DIRECTOR DE CERTIFICACIÓN Y CONTROL DOCUMENTAL

Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Supplemented Diet and its preventive effect on tumor growth in nude mice

Damasco Avila, Erika¹; Ventura Gallegos, José Luis²; Guevara Cruz, Martha³; Zentella Dehesa, Alejandro^{2,4}

1 Subdirección de Hematología y Oncología Pediátrica, Instituto Nacional de Pediatría. Ciudad de México, México.

2 Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, Mexico.

3 Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, México.

4 Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México.

Recibido: 20/septiembre/2017. Aceptado: 30/junio/2018.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide according to the WHO. Strong evidence suggests that food and nutrition are important in modification of cancer process. There is increased evidence that specific dietary patterns or constituents such as n-3 PUFAs, may be associated with reduced risk of BC. Female athymic nude mice were fed since weaning to adulthood with a DHA+EPA (4%w/w) diet or with standard diet during 14-week. At week-7, tumor cell implantation with MDA-MB-231 cell line took place, each mice received 5×10^6 tumor cells. When tumors became palpable, maximum length, width, and diameters were measured twice a week. Incidence of tumor development was observed in all mice ($n=4$, 100%) in the control diet group; instead, the n-3 PUFAs diet group, only two mice developed tumor ($n=2$, 50%), and the development time was longer compared to the control group. These differences were significant ($p < 0.001$). This study establish the potential effect as a preventive measure to BC. This evidence is consistent with epidemiological data about high n-3 PUFAs diet patterns in some populations may lower risk of BC, highlighting the importance of these components in our diet since childhood to promote the preventive effect. Being thus necessary, setting up recommendations for n-3 PUFAs supplementation from fish oil or, for a minimal dietary fatty fish intake/week, in

Correspondencia:

Alejandro Zentella-Dehesa
azentella@biomedicas.unam.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd.Mx., a 14 de Agosto del 2018


Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
INCMN SZ
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "Efecto de la combinación de una ntervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncner" con registro **CINVA: BQO-1289-14/14-1**, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, le hago llegar un cordial saludo.

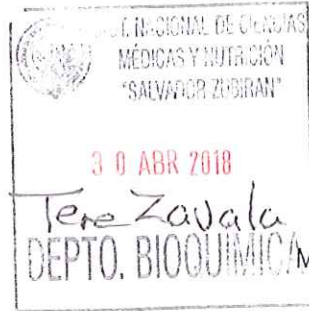
Atentamente,


Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Invetsigador en Ciencias Médicas
Jefe de la Unidad de Bioquímica
INCMN SZ





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



Acceso

México Cd., Mx a 26 de abril de 2018.

No. Oficio CINVA 059-18

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Depto. Unidad de Bioquímica
Presente.

Estimado Dr. Zentella.:

Por este conducto le informo que su proyecto con título "EFECTO DE LA COMBINACION DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL Y AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER", con registro CINVA BQO-1289-14/14-1 finalizó en octubre 2017. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Informe final
2. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



1799 1416
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO
27 ABR 2018

INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN INCMYN "S.Z"

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NABS/nom

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Acuse

"2014, Año de Octavio Paz"



Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Coordinador del Depto. de Bioquímica
Presente.

REF: CINVA 1289, Clave: BQO-1289-14/14-1

Estimado Dr. Zentella:

Habiendo analizado por segunda ocasión el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"EFECTO DE LA COMBINACION DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL Y AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER."

Este comité ha dictaminado APROBAR el protocolo

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Dra. Ma. Elena Flores, Jefe del Bioterio

01/2015

México, D.F. a 18 de septiembre de 2014

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

PRESENTE

Respecto a las consideraciones hechas sobre el estudio como CINVA 1289 y Clave BQO-1289-14/14-1: **“Efecto de la combinación de una intervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer”**. Los autores hemos realizado las siguientes modificaciones acorde con las sugerencias del comité:

- Dosis terapéutica para el uso de agentes antitumorales:
 - Doxorubicina: 1mg/kg
 - Docetaxel: 5mg/kg
- Se ha determinado que el tratamiento será administrado intraperitonealmente 1 vez cada 4 días por un máximo de 5 semanas, en la dosis previamente señalada.
- El cálculo de tamaño de muestra se realizó utilizando fórmula para cálculo de diferencia de medias de dos grupos independientes.
 - Tomando en cuenta un tamaño esperado de tumor de $24.2 \pm 1.1\text{mm}^3$ en el grupo control (sin tratamiento médico o nutricio), esperando una diferencia clínicamente significativa de reducción del 30%, con un alfa de 0.05 y un poder de 0.9; el número total de ratones fue de 6 animales (3 para el grupo control y 3 para el grupo de intervención dietética sin tratamiento médico).
 - Para el estudio de adyuvancia, se tomó en cuenta un tamaño de $3.3 \pm 0.6\text{mm}^3$ en el grupo control (tratamiento médico sin intervención dietética) esperando una diferencia clínicamente significativa de reducción del 30%, con un alfa de 0.05 y un poder de 0.9; el número total de ratones fue de 18 animales. (9 para el grupo control y 9 para el grupo de intervención dietética con tratamiento médico).
 - Se eligió el número de ratones mas grande por grupo mas el 10% de pérdidas = 10 ratones.
 - Se utilizó el programa G*Power3.1.7.
- Se ha completado la información referente a los participantes (posición institucional, teléfono y correo electrónico) en el Formato de Evaluación de Proyectos, 2ª sección.
- Hemos hecho la descripción sobre la alimentación que recibirán los animales:
 - Forma física: bolo.
 - La administración será suministrado en comedero cilíndrico con salida de alimento a nivel del piso.

- El tipo de comedero permite que el desperdicio de alimento sea menor al 5% y pueda cuantificarse apropiadamente el consumo diario. Se realizará la cuantificación del peso total del comedero, antes del inicio de la alimentación y 24hrs después.
- Alojamiento: caja estándar
- Antecedente genético requerido para el estudio: Ratones hembras desnudos blancos (Foxn1nu) de fondo genético Balb/c de la cepa cultivada en el bioterio del INCMNSZ.

Bibliografía utilizada:

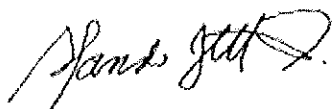
- W. Elaine Hardman, C. P. Reddy Avula, Gabriel Fernandes, et al. Three Percent Dietary Fish Oil Concentrate Increased Efficacy of Doxorubicin Against MDA-MB 231 Breast Cancer Xenografts. Clin Cancer Res 2001;7:2041-2049.
- Russel J. Reiter. A Walnut-Enriched Diet Reduces the Growth of LNCaP Human Prostate Cancer Xenografts in Nude Mice. Cancer Investigation, 31:365–373, 2013

Anexamos la versión 2 del formato de evaluación con fecha del 09 de septiembre de 2014. Agradecemos sus comentarios y nos mantendremos en espera de su respuesta.

Atentamente

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Investigador Principal



C.c.p Dr. Gamba A. Director de Investigación



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014 Año de Octavio Paz"

A case



México, D.F. a 15 de Julio de 2014.

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA.
Investigador Principal
Depto. de Bioquímica
PRESENTE

REF: CINVA 1289, Clave BQO-1289-14/14-1

Habiendo analizado nuevamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"Efecto de la combinación de una intervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer."

Este comité ha dictaminado dejar Pendiente la aprobación hasta que se respondan dos aspectos importantes para el estudio:

1. Dosis terapéutica. No se describe la dosis del tratamiento para las sustancias Doxorubicina y Docetaxel.
2. Ahora se conoce que el tratamiento es intraperitoneal por 8 semanas, pero esto implica 56 pinchazos al abdomen de la ratona, este procedimiento es de gran preocupación para esta comisión debido a que es una vía dolorosa y de riesgo para la vida del animal, por lo que se debe considerar otra vía de administración (bombas miniosmóticas). También se deberá especificar quién aplicará las dosis y con qué entrenamiento cuenta.
3. No se presenta la justificación estadística para el número de animales a utilizar y no se establece el número total de animales.
4. Otros aspectos que deben atenderse en el protocolo son:

- i) Completar en el FORMATO DE EVALUACIÓN DE PROYECTOS, sección 2a. Identificación, la información referente a los participantes (posición institucional, teléfono, correo electrónico).
- ii) Derivado de la información proporcionada sobre la alimentación que recibirán los animales se presentan la siguientes inquietudes:

- Forma física de la presentación del alimento (pellet o bolo, polvo, grumo, etc.).
- Esto tiene relevancia por varios aspectos:
 - . Se especifica que será cuantificado el consumo.
 - . ¿Cómo se suministra? Rejilla, bandeja, pocillo, etc.?
 - . Tipo de alojamiento que se utilizará.
 - . ¿Como se cuantificará el desperdicio?

- iii) Se menciona en el protocolo que el antecedente genético es importante pero no se especifica la línea de origen de la cepa.



15/07/2015



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

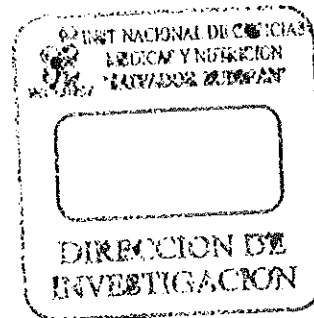
Es importante que las correcciones las haga en el Sistema de Latis y envíe una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba A. Director de Investigación
Dr. Rafael Hernández. Jefe de Investigación Experimental y Bioterio





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

*Quirva 1289
Dr. Zentella*

México, D.F. a 14 de julio de 2014

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Comité de Investigación en Animales
PRESENTE

Respecto a las consideraciones hechas sobre el estudio titulado: "Efecto de la combinación de una intervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer".

Los autores hemos realizado las siguientes modificaciones acorde con las sugerencias del comité:

- Se agregaron los datos sobre las cantidades de células a evaluar para desarrollo de tumor.
- Se modificó el tiempo total del estudio de cuatro meses a un año.
- Se agregó ulceración de tumor y dolor por diferentes situaciones como criterios de punto final.
- Se agregó información sobre la disposición de cadáveres.
- Se agregó más información acerca de la estrategia de análisis estadístico que se realizará.
- Se cambió la redacción para evitar confusión, sobre los criterios de punto final, uso de docetaxel en los ratones inculados con líneas celulares de cáncer de próstata y el uso de machos para experimentos con líneas celulares de cáncer de próstata.
- Se modificó el tiempo de espera para el desarrollo de tumor de ocho semanas a tres semanas.
- Se agregó bibliografía.

Anexamos la versión 2 con fecha del 14 de julio del 2014 del formato de evaluación.

Agradecemos sus observaciones y nos mantenemos en espera de su respuesta.

Atentamente

Erika
Erika Alejandra Damasco Avila
Investigador Asociado



Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales
PRESENTE

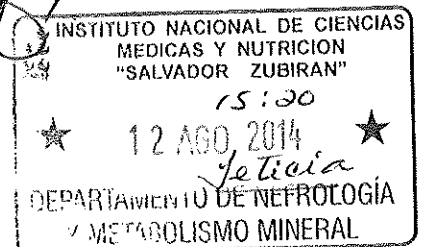
Respecto a las consideraciones hechas sobre el estudio como CINVA 1289 y Clave BQO-1289-14/14-1:
"Efecto de la combinación de una intervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer"
Los autores hemos realizado las siguientes modificaciones acorde con las sugerencias del comité:

- Se ha hecho la complementación bibliográfica, sustentando el proyecto. Anexo 1
- Hemos corregido el tiempo total para la realización del protocolo en el Sistema de Latis, de cuatro meses a dos años.
- Se han especificado las dosis terapéuticas recomendadas para cada compuesto. Y se sustentan con la bibliografía en el Anexo 2. Dieta Suplementada: AIN-93 suplementada + compuesto de interés:
 - Ácidos Grasos Omega-3: 1g/kg, Agastache Mexicana: 250mg/kg, Ganoderma Lucidum: 650mg/kg
- Los rangos celulares han sido especificados, así como el número de animales en los cuales se realizarán las pruebas. Rangos celulares: Se inyectará vía subcutánea un volumen máximo de 100uL de la suspensión celular en solución fisiológica con diferentes densidades de células:
 - 1,500,000 células, 2,500,000 células, 3,000,000 células, 4,000,000 células y 5,000,000 células.Número de animales: 3 animales por densidad celular para probar su capacidad de formar tumor, en dos ensayos consecutivos. Las células a inyectar se mantendrán en condiciones estériles y serán preparadas el mismo día que se practique la inoculación.
- Se incluyeron los criterios de selección:
 - Criterios de inclusión:
 - Ratones desnudos blancos (Foxn1nu) de fondo genético Balb/c
 - Hembras
 - Edad: 19-21 días (al destete)
 - Saludables
 - Criterios de exclusión:
 - Ratones que presenten traumatismos y/o infecciones
 - Criterios de eliminación: El criterio para evaluar el desarrollo de tumor tendrá punto final cuando el ratón presente alguna de las siguientes características:
 - Disminución de masa corporal de >20%.
 - Se observe falta de movilidad, letargia u otros cambios semejantes en el comportamiento.
 - Crecimiento de la masa tumoral sea mayor al 5% del peso corporal del animal (aprox. 17 mm).
 - Presencia de trauma autoinfligido.
 - Cuando la palpación del tumor induce respuesta dolorosa.
 - En el caso de tumores superficiales: presencia de ulceración, necrosis o infección.
 - Ulceración de tumor.
- La estandarización del número de células a inocular se realizará al finalizar la primera etapa, que consiste en determinar el número de células a inocular y el tiempo óptimo para la generación de una masa tumoral de al menos 3mm³ con las diferentes líneas celulares.
- Disposición de cadáveres: Los cadáveres se almacenarán en bolsas sellables y estas dentro de bolsa amarilla para residuos sólidos patológicos, según la normatividad existente.
- Los errores gramaticales han sido corregidos.

Anexamos la versión 2 del formato de evaluación con fecha del 07 de agosto 2014.

Agradecemos sus comentarios y nos mantendremos en espera de su respuesta.

Atentamente
Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Investigador Principal



C.c.p Dr. Gamba A. Director de Investigación



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

**FORMATO DE EVALUACIÓN
DE PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

No. de registro CIIBH: BOO-1289-14/14-1

1. Título del proyecto

Efecto de la combinación de una intervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer.

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
DAMASCO AVILA ERIKA ALEJANDRA	Estudiante Doctorado	Investigador asociado	55 2846 5710	[Redacted]
MARTINEZ CARRERA DANIEL	Profesor e Investigador Titular del Colegio de posgraduados Campus Puebla	Investigador asociado	22 2285 0738. Ext. 2018	[Redacted]
MARTINEZ VÁZQUEZ MARIANO	Investigador Titular C Instituto de Química UNAM	Investigador asociado	5622 4403	marvaz@unam.mx
MENEZES ÁLVAREZ MARÍA EUGENIA	Investigador Postdoctoral	Investigador asociado	22 2661 6342	[Redacted]
POLJANSKAIA EKATERINA	Estudiante Licenciatura	Investigador asociado	55 1899 2361	po.cristina@libero.it
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador asociado	5487 0900 Ext. 2802 y 01	[Redacted]
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador asociado	5487 0900 Ext. 2802 y 01	[Redacted]
VENTURA GALEGOS JOSE LUIS	Técnico académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas	Investigador asociado	5487 0900 Ext. 2606 y 07	venturag@biomedicas.unam.mx
ZENTELLA DEHESA ALEJANDRO	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador responsable	5487 0900 Ext. 2606 y 07	azentell@biomedicas.unam.mx

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

3. Instituciones participantes

- Colegio de Posgraduados Campus Puebla
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán- Unidad de Bioquímica
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán- Fisiología de la Nutrición
- Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
- Instituto de Química UNAM

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su

participación específica en la investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

El cáncer ocupa el segundo lugar en número de muertes entre las enfermedades no transmisibles. El incremento en la incidencia de ésta enfermedad se atribuye a diferentes factores, entre ellos al crecimiento y envejecimiento de la población, la incorporación de nuevos estilos de vida asociados a una alimentación tipo occidental, el consumo de tabaco y sedentarismo, principalmente. El estudio más completo sobre incidencia y mortalidad en cáncer en ambos sexos de manera global, es el reportado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2010), con datos recabados durante el 2008. En dicho trabajo se reportó que en ese año hubo 12.7 millones nuevos de cáncer y 7.6 millones de muertes. Dentro de los cánceres más comunes en general, en primer lugar se encuentra el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de glándula mamaria, el colorrectal, de estómago, próstata e hígado.

Actualmente, existen terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer, dentro de las principales modalidades terapéuticas se encuentra la quimioterapia, que tiene como finalidad alcanzar el control sistémico. Sin embargo, la toxicidad, la cual puede ser hematológica y no hematológica (gastrointestinal, cutánea, neuropatías) muchas veces es un obstáculo importante para alcanzar la dosis requerida para lograr la tasa de curación. Si bien el efecto de la dieta y el medio ambiente en la expresión de los genes es aún controversial, existe certeza que la dieta puede modificar la expresión genética, afectando, tanto en forma positiva como negativa, el desarrollo del cáncer. Se han descubierto sustancias bioactivas en alimentos y en extractos de productos naturales, principalmente plantas y hongos; comparables en dosis terapéuticas a la medicina convencional. También se ha documentado que las intervenciones nutricionales pueden tener un valor adyuvante al tratamiento de quimioterapia.

La riqueza etnobotánica de México ha conducido a la búsqueda de aplicación de una variedad de compuestos nutricionales y extractos naturales de plantas empleadas en la medicina tradicional, para la prevención y tratamiento del cáncer; ya que significan herramientas terapéuticas de mayor accesibilidad, menor costo y seguros para el consumo humano.

Con base en lo anterior proponemos evaluar el efecto protector y/o adyuvante de nutrimentos como los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3, y los extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales como el Agastache mexicana y *Ganoderma lucidum* con propiedades potenciales para la prevención y tratamiento del cáncer en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer colorrectal, tanto en líneas comerciales como en cultivos primarios. Igualmente proponemos probar estos nutrimentos y extractos *in vivo* en un modelo murino de animales inmunosuprimidos que aceptan trasplantes alogénicos de células tumorales humanas.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

Resulta evidente que la mortalidad por Ca en México, mantiene una tendencia ascendente generando una gran demanda sobre los sistemas de salud pública del país y por esto, es hoy en día, uno de los retos más importantes para la investigación enfocada a la salud del adulto y adultos mayores. Las opciones terapéuticas actuales tienen un costo sumamente elevado además de los efectos tóxicos ya mencionados; por tal motivo, la epidemia de Ca representa un nuevo desafío para el financiamiento por parte del sistema de salud, en particular para los países en desarrollo.

En la actualidad se utilizan un número importante de fármacos antitumorales que combinados con

radioterapia e intervenciones quirúrgicas han resultado en esquemas de tratamiento con alta efectividad curativa si se aplican a estadios tempranos, tanto en forma adyuvante como neoadyuvante. También se aplican en el contexto de enfermedad metastásica, aunque ya no con intención curativa. A pesar de su amplia utilización, las dosis empleadas se encuentran limitadas por su perfil de toxicidad que varía según medicamento, el cual puede ser dependiente de la dosis acumulada. Por tanto, resulta de considerable importancia incrementar la capacidad citotóxica de los fármacos antitumorales utilizando combinaciones con agentes no farmacológicos que potencien su efecto sin aumentar la toxicidad.

JUSTIFICACION :

La generación de estrategias para optimizar el tratamiento contra el cáncer se complementa con la incorporación de nutrimentos o principios activos derivados de productos naturales que se presentan como candidatos potenciales para complementar los recursos actuales, por lo que se justifica la realización de estudios formales de su eficacia ya sea solos o en combinación con agentes antitumorales. Esta búsqueda debe ir orientada a la disminución de los efectos tóxicos, además de la reducción de costos, lo que se reflejaría en un mayor apego y tasa de éxitos.

6a. Hipótesis

El empleo de nutrimentos y extractos de productos naturales específicos en dosis terapéuticas como terapia coadyuvante en un modelo murino, potenciará el efecto del tratamiento convencional en la reducción de la masa tumoral.

6b. Objetivos.

General:

Determinar el efecto coadyuvante de nutrimentos como los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3, y los extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales Agastache mexicana y *Ganoderma lucidum* en dosis terapéuticas, ya sea solos o en combinación con el tratamiento convencional (dependiente del fenotipo tumoral) en la inhibición del crecimiento tumoral con diferentes líneas de cáncer humano en un modelo murino.

Específicos:

7. Metodología: Diseño general.

Diseño: Estudio experimental.

Cultivo Celular: El estudio se llevará a cabo con diferentes líneas celulares de cáncer humano de mama MDA MB 231, MCF-7, MDA MB 468 y de próstata PC3. Serán mantenidas en la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ en incubadores a 37 °C, 100% de humedad y 5% de CO₂.

Experimentación in vivo:

La experimentación *in vivo* se llevará a cabo con ratones hembras desnudos blancos (Foxn1mu) de fondo genético Blab/c, que presentan una inmunodeficiencia que permite la implantación de trasplantes alogénicos, sin que se de rechazo. Dicho antecedente genético es importante ya que durante el experimento los animales podrían tener una respuesta variable al tratamiento.

La primera etapa consiste en estandarizar el número de células a inocular y el tiempo óptimo para la generación de una masa tumoral de al menos 3mm³ con las diferentes líneas celulares. Se inyectará vía subcutánea un volumen máximo de 100uL de la suspensión celular

en solución fisiológica con diferentes densidades de células:

- 1,500,000 células
- 2,500,000 células
- 3,000,000 células
- 4,000,000 células
- 5,000,000 células

Número de animales: se inocularán 3 animales por densidad celular para probar su capacidad de formar tumor, en dos ensayos consecutivos. Las células a inyectar se mantendrán en condiciones estériles y serán preparadas el mismo día que se practique la inoculación.

La estandarización del número de células a inocular se realizará al finalizar la primera etapa.

Para su identificación los animales serán marcados con muescas en los pabellones auriculares. Diariamente serán pesados y revisados para registrar la aparición de masas tumorales y llevar un control de los incrementos en sus radios mayores y menores. El desarrollo de tumor se evaluará durante un periodo máximo de 8 semanas. El volumen del tumor será determinado con la fórmula: $0.52 \times (\text{ancho})^2 \times \text{largo}$. En su caso se aplicarán criterios de punto final (ver sección de desenlaces y variable).

Los grupos estarán conformados por 10 animales.

Grupo 1: Dieta Estándar sin Tratamiento (Control 1)

Grupo 2: Dieta Estándar con Tratamiento Antitumoral convencional (Control 2)

Grupo 3: Dieta Suplementada desde el tiempo 0 sin Tratamiento (Experimental 1)

Grupo 4: Dieta Suplementada desde el tiempo 0 con Tratamiento convencional (Experimental 2)

Grupo 5: Dieta Suplementada tras dos semanas de la inoculación del tumor (Experimental 3)

Tratamiento convencional: Para cáncer de mama se utilizará Doxorrubicina y para cáncer de próstata se utilizará Docetaxel.

Intervención dietética:

Dieta Estándar: Se utilizará la dieta AIN-93 diseñada por el American Institute of Nutrition Rodent Diets.

Dieta Suplementada: AIN-93 suplementada con el nutrimento específico en la dosis terapéutica recomendada.

- Ácidos Grasos Omega-3: 1g/kg
- Agastache Mexicana: 250mg/kg
- Ganoderma Lucidum: 650mg/kg

La dieta será preparada en la planta piloto de tecnología de alimentos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, según las indicaciones de la American Institute of Nutrition Rodent Diets para dicha dieta, suplementando o no el compuesto en estudio. Ambas dietas se refrigerarán en

contenedores sellados con el objetivo de reducir cambios organolépticos. Ya lista la mezcla, se procederá a humectar la mezcla y finalmente se dejará secar para que adquiera una consistencia sólida, adecuada para el consumo del ratón y evitar desperdicio.

- o Forma física: bolo.
- o La administración será suministrado en comedero cilíndrico con salida de alimento a nivel del piso.
- o El tipo de comedero permite que el desperdicio de alimento sea menor al 5% y pueda cuantificarse apropiadamente el consumo diario. Se realizará la cuantificación del peso total del comedero, antes del inicio de la alimentación y 24hrs después.
- o Alojamiento: caja estándar

Administración del tratamiento convencional:

Los animales serán observados diariamente y el tratamiento será administrado intraperitonealmente una vez cada cuatro días por un máximo de 5 semanas, en la siguiente dosis:

Doxorrubicina: 1mg/kg

Docetaxel: 5mg/kg

Evaluación de masa tumoral y masa corporal:

Tumor: Los diámetros máximos y mínimos del tumor serán medidos tres veces por semana con un Vernier. El volumen del tumor será determinado con la fórmula: $0.52 \times (\text{ancho})^2 \times \text{largo}$. Llegado al punto final, posterior a la necropsia se registrará el peso húmedo del tumor. Las masas tumorales se fijarán con formalina para realizar estudios histopatológicos con tinción estándar de hematoxilina/eosina.

Masa Corporal: Se registrará diariamente.

Ingesta: Se hará registro de consumo diario.

Cálculo de tamaño de muestra:

El cálculo de tamaño de muestra se realizó utilizando fórmula para cálculo de diferencia de medias de dos grupos independientes.

- o Tomando en cuenta un tamaño esperado de tumor de $24.2 \pm 1.1\text{mm}^3$ en el grupo control (sin tratamiento médico o nutricio), esperando una diferencia clínicamente significativa de reducción del 30%, con un alfa de 0.05 y un poder de 0.9; el número total de ratones fue de 6 animales (3 para el grupo control y 3 para el grupo de intervención dietética sin tratamiento médico).
- o Para el estudio de adyuvancia, se tomó en cuenta un tamaño de $3.3 \pm 0.6\text{mm}^3$ en el grupo control (tratamiento médico sin intervención dietética) esperando una diferencia clínicamente significativa de reducción del 30%, con un alfa de 0.05 y un poder de 0.9; el número total de ratones fue de 18 animales. (9 para el grupo control y 9 para el grupo de intervención dietética con tratamiento médico).

- o Se eligió el número de ratones mas grande por grupo mas el 10% de pérdidas = 10 ratones.
- o Se utilizó el programa G*Power3.1.7.

8. Metodología: Criterios de selección

El estudio se llevará a cabo con ratones desnudos hembras para emular las variaciones del ciclo hormonal femenino. Los animales se recibirán a los 19-21 días de su nacimiento para iniciar inmediatamente la alimentación con el alimento suplementado con los nutrimentos o extractos naturales. A lo largo de las siguientes 4 semanas se realizará la implantación de células tumorales y se iniciará el tratamiento antitumoral correspondiente.

- o Criterios de inclusión:
 - Ratones desnudos blancos (Foxn1nu) de fondo genético Balb/c
 - Hembras
 - Edad: 19-21 días (al destete)
 - Saludables
- o Criterios de exclusión:
 - Ratones que presenten traumatismos y/o infecciones
- o Criterios de eliminación: El criterio para evaluar el desarrollo de tumor tendrá punto final cuando el ratón presente alguna de las siguientes características:
 - Disminución de masa corporal de >20%.
 - Se observe falta de movilidad, letargia u otros cambios semejantes en el comportamiento.
 - Crecimiento de la masa tumoral sea mayor al 5% del peso corporal del animal (aprox.17 mm).
 - Presencia de trauma autoinflingido.
 - Cuando la palpación del tumor induce respuesta dolorosa.
 - En el caso de tumores superficiales: presencia de ulceración, necrosis o infección.
 - Ulceración de tumor.

9. Metodología: Desenlaces y variables

El criterio para evaluar el desarrollo de tumor tendrá punto final cuando el ratón presente alguno de los criterios de eliminación.

La eutanasia se practicará con CO² gaseoso dentro de una cámara dedicada a este procedimiento.

Disposición de cadáveres: Los cadáveres se almacenarán en bolsas sellables y estas dentro de bolsa amarilla para residuos sólidos patológicos, según la normatividad existente.

Para la evaluación de los nutrimentos y extractos se compararán las tasas de crecimiento de las masas tumorales.

Estadística:

1. Volumen de los tumores control comparados con el volumen de los tumores de ratones suplementados en los mismos tiempos: t de Student para muestras no pareadas.
2. El volumen de los tumores del grupo control se comparará en sus diferentes tiempos de desarrollo tumoral mediante el análisis estadístico del test t de Student para muestras pareadas. La misma prueba se utilizará para analizar el volumen de los tumores de los ratones suplementados de cada

grupo experimental.

3. Para valorar el efecto específico del tratamiento se comparará el grupo con tratamiento (QT) y suplementación vs el grupo solo con tratamiento en cuanto al tamaño tumoral y se utilizará la prueba de t de Student. En caso de encontrar diferencias se utilizarán isobogramas y análisis de regresión para valorar si el efecto es el esperado (aditivo) o existe sinergia.

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO DIRECTO:

Se espera un beneficio directo como estudio preclínico.

Comprobar que la suplementación de nutrimentos en la dieta, en conjunto con el tratamiento convencional, potencia el efecto terapéutico.

BENEFICIOS INDIRECTOS:

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : NA

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : NA

EFFECTOS ADVERSOS : NA

EFFECTOS PSICOLOGICOS : NA

METODOS DE SEGURIDAD : NA

PROCEDIMIENTOS : NA

OTRO TIPO DE RIESGO : NA

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN

Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

- Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 11/05/2012.
- World Health Organization. 2011 Noncommunicable diseases country profiles 2011. WHO global report.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011 Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* Mar-Apr;61(2):69-90.
- American Institute of Nutrition Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, 107: 1340–1348, 1977.
- Figueiredo JC, Hsu L, Hutter CM, Lin Y, Campbell PT, et al. (2014) Genome-Wide Diet-Gene Interaction Analyses for Risk of Colorectal Cancer. *PLoS Genet* 10(4): e1004228. doi:10.1371/journal.pgen.100422
- Hardman, W. E., Moyer, M. P., and Cameron, I. L. Efficacy of treatment of colon, lung and breast human carcinoma xenografts with: doxorubicin, cisplatin, irinotecan or topotecan. *Anticancer Res.*, 19: 2269–2274, 1999.
- Hardman WE. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. *J Nutr* 2004;134:3427S–3430S.
- Bradford PG, Awad AB. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:339–350.
- Ju J, Picinich SC, Yang Z, Zhao Y, Suh N, Kong KN, Yang CS. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Car- cinogenesis* 2010;31:533–542.
- Martínez-Carrera D, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora ed. 2010 Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNSCONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. Puebla
- Wang CD, Teng BS, He YM, Wu JS, Pan D, Pan LF, Zhang D, Fan ZH, Yang HJ, Zhou P 2012 Effect of a novel proteoglycan PTPIB inhibitor from *Ganoderma lucidum* on the amelioration of hyperglycaemia and dyslipidaemia in db/db mice. *The British journal of nutrition* 108:2014-2025
- Wachtel-Galor S, Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF 2004 *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *International journal of food sciences and nutrition* 55:75-83
- Kaneda T, Tokuda S 1966 Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats. *The Journal of nutrition* 90:371-376
- Rosalia Rubel HSDS, Luiz Claudio Fernandes, Sandro J. R. Bonatto, Sergio Bello, Bonald C. Figueiredo, Jose Hermenio C. Lima Filho, Cid Aimbire M. Santos, Carlos Ricardo Soccol 2011 Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leyss:Fr) Karst used as a dietary supplement. *World journal of microbiology & biotechnology* 27:1083–1089
- Guoliang Meng HZ, Shengju Yang, Feng Wu, Huihua Zheng, E Chen, Jiliang Xu 2011 Attenuating effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydrate Polymers* 84:180-185
- Yang Q, Wang S, Xie Y, Sun J, Wang J 2010 HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *International journal of biological macromolecules* 46:167-172
- Ti-Qiang Chen Y-BW, Jian-guo Wu, Hong-Yu Wang, Fang-Hua Mao, and Jin-Zhong Wu 2013 Fatty acids, essential oils, and squalene in the spore lipids of *ganoderma lucidum* by gc-ms and gc-fid. *Chemistry of Natural Compounds* 49:143-144
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH 2004 Antioxidant effect of zinc in humans. *Free radical biology & medicine* 37:1182-119.
- Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 11/05/2012.
- World Health Organization. 2011 Noncommunicable diseases country profiles 2011. WHO global report.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011 Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* Mar-Apr;61(2):69-90.
- American Institute of Nutrition Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, 107: 1340–1348, 1977.

- Figueiredo JC, Hsu L, Hutter CM, Lin Y, Campbell PT, et al. (2014) Genome-Wide Diet-Gene Interaction Analyses for Risk of Colorectal Cancer. *PLoS Genet* 10(4): e1004228. doi:10.1371/journal.pgen.1004228
- Hardman, W. E., Moyer, M. P., and Cameron, I. L. Efficacy of treatment of colon, lung and breast human carcinoma xenografts with: doxorubicin, cisplatin, irinotecan or topotecan. *Anticancer Res.*, 19: 2269–2274, 1999.
- Hardman WE. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. *J Nutr* 2004;134:3427S–3430S.
- Bradford PG, Awad AB. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:339–350.
- Ju J, Picinich SC, Yang Z, Zhao Y, Suh N, Kong KN, Yang CS. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis* 2010;31:533–542.
- Martínez-Carrera D, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora ed. 2010 *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNSCONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. Puebla
- Wang CD, Teng BS, He YM, Wu JS, Pan D, Pan LF, Zhang D, Fan ZH, Yang HJ, Zhou P 2012 Effect of a novel proteoglycan PTP1B inhibitor from *Ganoderma lucidum* on the amelioration of hyperglycaemia and dyslipidaemia in db/db mice. *The British journal of nutrition* 108:2014-2025
- Wachtel-Galor S, Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF 2004 *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *International journal of food sciences and nutrition* 55:75-83
- Kaneda T, Tokuda S 1966 Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats. *The Journal of nutrition* 90:371-376
- Rosalia Rubel HSDS, Luiz Claudio Fernandes, Sandro J. R. Bonatto, Sergio Bello, Donald C. Figueiredo, Jose Hermenio C. Lima Filho, Cid Aimbire M. Santos, Carlos Ricardo Soccol 2011 Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leyss:Fr) Karst used as a dietary supplement. *World journal of microbiology & biotechnology* 27:1083–1089
- Guoliang Meng HZ, Shengju Yang, Feng Wu, Huihua Zheng, E Chen, Jiliang Xu 2011 Attenuating effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydrate Polymers* 84:180-185
- Yang Q, Wang S, Xie Y, Sun J, Wang J 2010 HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *International journal of biological macromolecules* 46:167-172
- Ti-Qiang Chen Y-BW, Jian-guo Wu, Hong-Yu Wang, Fang-Hua Mao, and Jin-Zhong Wu 2013 Fatty acids, essential oils, and squalene in the spore lipids of *ganoderma lucidum* by gc-ms and gc-fid. *Chemistry of Natural Compounds* 49:143-144
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH 2004 Antioxidant effect of zinc in humans. *Free radical biology & medicine* 37:1182-119.
- Friedrichs W, Ruparel SB, Marciniak RA, de Graffenried L. Omega-3 fatty acid inhibition of prostate cancer progression to hormone independence is associated with suppression of mTOR signaling and androgen receptor expression. *Nutr Cancer* 2011;63:771–777.
- Hardman WE (2002) Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J Nutr* 132: 3508S–12S.
- Wu M, Harvey KA, Ruzmetov N, Welch ZR, Sech L, et al. (2005) Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway. *Int J Cancer* 117: 340–8.
- Rose DP, Connolly JM (1999) Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther* 83: 217–44.
- Bougnoux, P. n-3 Polyunsaturated fatty acids and cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2: 121–126, 1999.
- Germain, E., Chajes, V., Cognault, S., Lhuillery, C., and Bougnoux, P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int. J. Cancer*, 75: 578–583, 1998.
- Sánchez-Recillas A. et al. Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pac J Trop Med*. 2014 Mar;7(3):179-83.
- Hernández-Abreu O. et al. Dose-dependent antihypertensive determination and toxicological studies of

tilianin isolated from *Agastache mexicana*. *J Ethnopharmacol*. 2013 Mar 7;146(1):187-91.

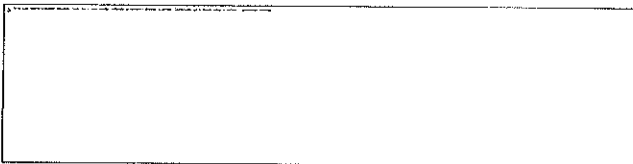
• Ibarra-Alvarado C. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharm Biol*. 2010 Jul;48(7):732-9.

o W. Elaine Hardman, C. P. Reddy Avula, Gabriel Fernandes, et al. Three Percent Dietary Fish Oil Concentrate Increased Efficacy of Doxorubicin Against MDA-MB 231 Breast Cancer Xenografts. *Clin Cancer Res* 2001;7:2041-2049.

o Russel J. Reiter. A Walnut-Enriched Diet Reduces the Growth of LNCaP Human Prostate Cancer Xenografts in Nude Mice. *Cancer Investigation*, 31:365–373, 2013

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

FORMATO DE EVALUACIÓN
DE PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN



No. de registro CIIBH: BQQ-1289-14/14-1

1. Título del proyecto

Efecto de la combinación de una intervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer.

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
DAMASCO AVILA ERIKA ALEJANDRA		Investigador asociado		[Redacted]
MARTINEZ CARRERA DANIEL		Investigador asociado		[Redacted]
MARTÍNEZ VÁZQUEZ MARIANO		Investigador asociado		marvaz@unam.mx
MENECEZ ALVAREZ MARIA EUGENIA		Investigador asociado		[Redacted]
POLIANSKAIA EKATERINA		Investigador asociado		po.cristina@libero.it
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador asociado		
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador asociado		[Redacted]
VENTURA GALLEGOS JOSE LUIS		Investigador asociado	(55) 54870900	venturag@biomedicas.unam.mx
ZENTELLA DEHESA ALEJANDRO	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador responsable	54870900 Ext.2606	azentell@biomedicas.unam.mx

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

3. Instituciones participantes

- Campus Universitario Siglo XXI, Incorporado a la Universidad Autónoma de Estado de México
- Campus Universitario Siglo XXI, Incorporado a la Universidad Autónoma del Estado de México
- Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
- Centro Médico ABC
- Centro Universitario del Sur, UdG
- Clínica Rufz
- Colegio de Posgraduados Campus Puebla
- Colegio de Posgraduados Campus Puebla
- Departamento de Cirugía. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubrian
- Departamento de Infectología
- depto de urología

- Depto. de infectómica, Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV-IPN (México)
- Facultad de Psicología, UNAM
- FES Zaragoza
- FES Zaragoza
- Hospital del Niño de niño DIF Hidalgo
- Hospital del Niño DIF Hidalgo
- Hospital del Niño DIF Hidalgo
- Hospital Gea Gonzalez
- Hospital Gea Gonzalez
- Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez
- Hospital General Dr. Manuel Gea González
- Hospital General Dr. Manuel Gea González
- Hospital general Gea Gonzalez
- Hospital General Tlaxcala Sesa
- Hospital General Tlaxcala Sesa
- Hospital Infantil de Tlaxcala
- Hospital Juárez de México
- Hospital Medica Sur
- Hospital Medica Sur
- Hospital Niño DIF
- INCMNSZ
- INCMNSZ
- INER
- INSITITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
- INSTITUO TECNOLOGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
- INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
- Instituto de Investigaciones Biomedicas
- Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
- Instituto de Química UNAM
- Instituto de Química UNAM
- Instituto Mexicano del Seguro Social
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
- instituto nacional de ciencias medicas y nutricion salvador zubirna
- INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION, S.Z.
- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
- Instituto Nacional de Geriatria
- Instituto Nacional de Rehabilitacion
- ITESM-CCM
- jmedica sur
- Laboratorios Silanes S.A. de C.V.
- Laboratorios Silanes S.A. de C.V.
- Laboratorios Silanes S.A. de C.V.
- National Institutes of Health
- pasante licenciado en nutrición INCMNSZ
- Sin institución
- Sociedad Médica de medicina física y rehabilitación
- UNAM
- UNAM
- UNAM PME
- Unidad de Bioquímica INCMNSZ
- Universidad Autónoma de Guadalajara
- Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- Universidad Autónoma del Estado de México

- Universidad Autónoma del Estado de México
- Universidad Autónoma del Estado de México
- Universidad Autónoma Metropolitana
- Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco
- Universidad de California
- Universidad de Colima
- Universidad de Colima
- Universidad de Colima
- Universidad de Guadalajara
- Universidad de Guanajuato, Campus León
- Universidad de Uppsala
- Universidad de Uppsala
- Universidad de Uppsala
- Universidad Marista de Mérida
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional de Rosario
- Universidad Rey Juan Carlos
- Universidad Rey Juan Carlos
- Universidas de Buenos Aires

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

- Colegio de Posgraduados Campus Puebla
- Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
- Instituto de Química UNAM
- Unidad de Bioquímica INCMNSZ

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

El cáncer ocupa el segundo lugar en número de muertes entre las enfermedades no transmisibles. El incremento en la incidencia de ésta enfermedad se atribuye a diferentes factores, entre ellos al crecimiento y envejecimiento de la población, la incorporación de nuevos estilos de vida asociados a una alimentación tipo occidental, el consumo de tabaco y sedentarismo, principalmente. El estudio más completo sobre incidencia y mortalidad en cáncer en ambos sexos de manera global, es el reportado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2010), con datos recabados durante el 2008. En dicho trabajo se reportó que en ese año hubo 12.7 millones nuevos de cáncer y 7.6 millones de muertes. Dentro de los cánceres más comunes en general, en primer lugar se encuentra el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de glándula mamaria, el colorrectal, de estómago, próstata e hígado.

Actualmente, existen terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer, dentro de las principales modalidades terapéuticas se encuentra la quimioterapia, que tiene como finalidad alcanzar el control sistémico. Sin embargo, la toxicidad, la cual puede ser hematológica y no hematológica (gastrointestinal, cutánea, neuropatías) muchas veces es un obstáculo importante para alcanzar la

dosis requerida para lograr la tasa de curación. Si bien el efecto de la dieta y el medio ambiente en la expresión de los genes es aún controversial, existe certeza que la dieta puede modificar la expresión genética, afectando, tanto en forma positiva como negativa, el desarrollo del cáncer. Se han descubierto sustancias bioactivas en alimentos y en extractos de productos naturales, principalmente plantas y hongos; comparables en dosis terapéuticas a la medicina convencional. También se ha documentado que las intervenciones nutricionales pueden tener un valor adyuvante al tratamiento de quimioterapia.

La riqueza etnobotánica de México ha conducido a la búsqueda de aplicación de una variedad de compuestos nutricionales y extractos naturales de plantas empleadas en la medicina tradicional, para la prevención y tratamiento del cáncer; ya que significan herramientas terapéuticas de mayor accesibilidad, menor costo y seguros para el consumo humano.

Con base en lo anterior proponemos evaluar el efecto protector y/o adyuvante de nutrimentos como los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3, y los extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales como el Agastache mexicana y *Ganoderma lucidum* con propiedades potenciales para la prevención y tratamiento del cáncer en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer colorectal, tanto en líneas comerciales como en cultivos primarios. Igualmente proponemos probar estos nutrimentos y extractos *in vivo* en un modelo murino de animales inmunosuprimidos que aceptan trasplantes alógenos de células tumorales humanas.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

Resulta evidente que la mortalidad por Ca en México, mantiene una tendencia ascendente generando una gran demanda sobre los sistemas de salud pública del país y por esto, es hoy en día, uno de los retos más importantes para la investigación enfocada a la salud del adulto y adultos mayores. Las opciones terapéuticas actuales tienen un costo sumamente elevado además de los efectos tóxicos ya mencionados; por tal motivo, la epidemia de Ca representa un nuevo desafío para el financiamiento por parte del sistema de salud, en particular para los países en desarrollo.

En la actualidad se utilizan un número importante de fármacos antitumorales que combinados con radioterapia e intervenciones quirúrgicas han resultado en esquemas de tratamiento con alta efectividad curativa si se aplican a estadios tempranos, tanto en forma adyuvante como neoadyuvante. También se aplican en el contexto de enfermedad metastásica, aunque ya no con intención curativa. A pesar de su amplia utilización, las dosis empleadas se encuentran limitadas por su perfil de toxicidad que varía según medicamento, el cual puede ser dependiente de la dosis acumulada. Por tanto, resulta de considerable importancia incrementar la capacidad citotóxica de los fármacos antitumorales utilizando combinaciones con agentes no farmacológicos que potencien su efecto sin aumentar la toxicidad.

JUSTIFICACION :

La generación de estrategias para optimizar el tratamiento contra el cáncer se complementa con la incorporación de nutrimentos o principios activos derivados de productos naturales que se presentan como candidatos potenciales para complementar los recursos actuales, por lo que se justifica la realización de estudios formales de su eficacia ya sea solos o en combinación con agentes antitumorales. Esta búsqueda debe ir orientada a la disminución de los efectos

tóxicos, además de la reducción de costos, lo que se reflejaría en un mayor apego y tasa de éxitos.

6a. Hipótesis

El empleo de nutrimentos y extractos de productos naturales específicos en dosis terapéuticas como terapia coadyuvante en un modelo murino, potenciará el efecto del tratamiento convencional en la reducción de la masa tumoral.

6b. Objetivos.

General:

Determinar el efecto coadyuvante de nutrimentos como los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3, y los extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales Agastache mexicana y *Ganoderma lucidum* en dosis terapéuticas, ya sea solos o en combinación con el tratamiento convencional (dependiente del fenotipo tumoral) en la inhibición del crecimiento tumoral con diferentes líneas de cáncer humano en un modelo murino.

Específicos:

7. Metodología: Diseño general.

Diseño: Estudio experimental.

Cultivo Celular: El estudio se llevará a cabo con diferentes líneas celulares de cáncer humano de mama MDA MB 231, MCF-7, MDA MB 468 y de próstata PC3. Serán mantenidas en la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ en incubadores a 37°C, 100% de humedad y 5% de CO₂.

Experimentación in vivo:

La experimentación *in vivo* se llevará a cabo con ratones hembras desnudos blancos (Foxn1nu) de fondo genético Blab/c, que presentan una inmunodeficiencia que permite la implantación de trasplantes alogénicos, sin que se de rechazo. Dicho antecedente genético es importante ya que durante el experimento los animales podrían tener una respuesta variable al tratamiento.

La primera etapa consiste en estandarizar el número de células a inocular y el tiempo óptimo para la generación de una masa tumoral de al menos 3mm³ con las diferentes líneas celulares. Para ello se inyectará un volumen máximo de 100uL de la suspensión celular en solución fisiológica con diferentes densidades de células (rango de 1 a 10 millones de células) vía subcutánea. Las células a inyectar se mantendrán en condiciones estériles y serán preparadas el mismo día que se practique la inoculación.

Para su identificación los animales serán marcados con muescas en los pabellones auriculares. Diariamente serán pesados y revisados para registrar la aparición de masas tumorales y llevar un control de los incrementos en sus radios mayores y menores. El desarrollo de tumor se evaluará durante un periodo máximo de 8 semanas. El volumen del tumor será determinado con la fórmula: $0.52 \times (\text{ancho})^2 \times \text{largo}$. En su caso se aplicarán criterios de punto final (ver sección de

descenlaces y variable).

Los grupos estarán conformados por 10 animales de las siguientes características:

- Hembras
- Al destete (19-21 días)

Grupo 1: Dieta Estándar sin Tratamiento (Control 1)

Grupo 2: Dieta Estándar con Tratamiento Antitumoral convencional (Control 2)

Grupo 3: Dieta Suplementada desde el tiempo 0 sin Tratamiento (Experimental 1)

Grupo 4: Dieta Suplementada desde el tiempo 0 con Tratamiento convencional (Experimental 2)

Grupo 5: Dieta Suplementada tras dos semanas de la inoculación del tumor (Experimental 3)

Tratamiento convencional: Para cáncer de mama se utilizará Doxorubicina y para cáncer de próstata se utilizará Docetaxel.

Intervención dietética:

- Dieta Estándar: Se utilizará la dieta AIN-93 diseñada por el American Institute of Nutrition Rodent Diets.
- Dieta Suplementada: AIN-93 suplementada con el nutrimento específico en la dosis terapéutica recomendada

La dieta será preparada en la planta piloto de tecnología de alimentos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, según las indicaciones de la American Institute of Nutrition Rodent Diets para dicha dieta, suplementando o no el compuesto en estudio. Ambas dietas se refrigerarán en contenedores sellados con el objetivo de reducir cambios organolépticos. Ya lista la mezcla, se procederá a humectar la mezcla y finalmente se dejará secar para que adquiera una consistencia sólida, adecuada para el consumo del ratón y evitar desperdicio.

Administración del tratamiento convencional:

Los animales serán observados diariamente y el tratamiento será administrado

intraperitonealmente diaria por un máximo de 8 semanas a una dosis de 1mg/kg.

Evaluación de masa tumoral y masa corporal:

Tumor: Los diámetros máximos y mínimos del tumor serán medidos tres veces por semana con un Vernier. El volumen del tumor será determinado con la fórmula: $0.52 \times (\text{ancho})^2 \times \text{largo}$. Llegado al punto final, posterior a la necropsia se registrará el peso húmedo del tumor. Las masas tumorales se fijarán con formalina para realizar estudios histopatológicos con tinción estándar de hematoxilina/ eosina.

Masa Corporal: Se registrará diariamente.

Ingesta: Se hará registro de consumo diario.

8. Metodología: Criterios de selección

El estudio se llevará a cabo con ratones desnudos hembras para emular las variaciones del ciclo hormonal femenino. Los animales se recibirán a los 19-21 días de su nacimiento para iniciar inmediatamente la alimentación con el alimento suplementado con los nutrimentos o extractos naturales. A lo largo de las siguientes 4 semanas se realizará la implantación de células tumorales y se iniciará el tratamiento antitumoral correspondiente. Durante el periodo de alimentación de los animales, se seleccionarán para el estudio los que cumplan con las siguientes características:

- Incremento normal de peso
- Ausencia de traumatismos y/o infecciones
- El que hayan sido víctimas a estrés conductual

9. Metodología: Desenlaces y variables

El criterio para evaluar el desarrollo de tumor tendrá punto final cuando el ratón presente alguna de las siguientes características:

-Disminución de masa corporal de $\geq 20\%$.

-Se observe falta de movilidad, letargia u otros cambios semejantes en el comportamiento.

-Hayan transcurrido 8 semanas después de la inoculación.

-Crecimiento de la masa tumoral sea mayor al 5% del peso corporal del animal (aproximadamente 17 mm).

-Presencia de trauma autoinfligido.

-Cuando la palpación del tumor induce respuesta dolorosa.

-En el caso de tumores superficiales: presencia de ulceración, necrosis o infección.

La eutanasia se practicará con CO₂ gaseoso dentro de una cámara dedicada a este procedimiento.

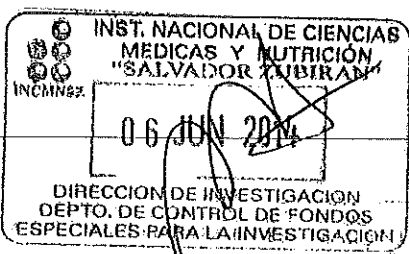
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 30,000.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

- Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 11/05/2012.
- World Health Organization. 2011 Noncommunicable diseases country profiles 2011. WHO global report.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011 Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* Mar-Apr;61(2):69-90.
- American Institute of Nutrition Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, 107: 1340–1348, 1977.
- Figueiredo JC, Hsu L, Hutter CM, Lin Y, Campbell PT, et al. (2014) Genome-Wide Diet-Gene Interaction Analyses for Risk of Colorectal Cancer. *PLoS Genet* 10(4): e1004228. doi:10.1371/journal.pgen.100422
- Hardman, W. E., Moyer, M. P., and Cameron, I. L. Efficacy of treatment of colon, lung and breast human carcinoma xenografts with: doxorubicin, cisplatin, irinotecan or topotecan. *Anticancer Res.*, 19: 2269–2274, 1999.
- Hardman WE. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. *J Nutr* 2004;134:3427S–3430S.
- Bradford PG, Awad AB. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:339–350.
- Ju J, Picinich SC, Yang Z, Zhao Y, Suh N, Kong KN, Yang CS. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Car- cinogenesis* 2010;31:533–542.
- Martínez-Carrera D, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora ed. 2010 Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNSCONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. Puebla
- Wang CD, Teng BS, He YM, Wu JS, Pan D, Pan LF, Zhang D, Fan ZH, Yang HJ, Zhou P 2012 Effect of a novel proteoglycan PTP1B inhibitor from *Ganoderma lucidum* on the amelioration of hyperglycaemia and dyslipidaemia in db/db mice. *The British journal of nutrition* 108:2014-2025
- Wachtel-Galor S, Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF 2004 *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *International journal of food sciences and nutrition* 55:75-83
- Kaneda T, Tokuda S 1966 Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats. *The Journal of nutrition* 90:371-376
- Rosalia Rubel HSDS, Luiz Claudio Fernandes, Sandro J. R. Bonatto, Sergio Bello, Bonald C. Figueiredo, Jose Hermenio C. Lima Filho, Cid Aimbire M. Santos, Carlos Ricardo Soccol 2011 Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leyss:Fr) Karst used as a dietary supplement. *World journal of microbiology & biotechnology* 27:1083–1089
- Guoliang Meng HZ, Shengju Yang, Feng Wu, Huihua Zheng, E Chen, Jiliang Xu 2011 Attenuating effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydrate Polymers* 84:180-185
- Yang Q, Wang S, Xie Y, Sun J, Wang J 2010 HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *International journal of biological macromolecules* 46:167-172
- Ti-Qiang Chen Y-BW, Jian-guo Wu, Hong-Yu Wang, Fang-Hua Mao, and Jin-Zhong Wu 2013 Fatty acids,

essential oils, and squalene in the spore lipids of ganoderma lucidum by gc-ms and gc-fid. Chemistry of Natural Compounds 49:143-144

• Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH 2004 Antioxidant effect of zinc in humans. Free radical biology & medicine 37:1182-119.

	<p style="text-align: center;"> INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRAN Dirección de Investigación </p> <p style="text-align: center;"> FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS </p>
---	--

FECHA DE RECEPCIÓN: 22/05/2014

CLAVE: BQO-1289-14/14-1

TÍTULO: Efecto de la combinación de una intervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: ZENTELLA DEHESA ALEJANDRO

DEPARTAMENTO O SERVICIO: UNIDAD DE BIOQUÍMICA

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad
--------------	----------

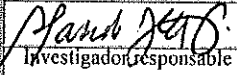
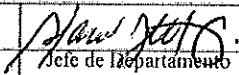

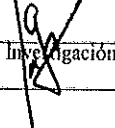
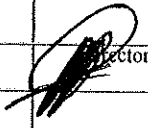
VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 01/07/2014 al 31/10/2014

Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 0.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)		FIRMAS	
Materiales	\$ 0.00		
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)		Investigador responsable	Jefe de departamento
Animales	\$ 0.00		
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)		Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
Estudios	\$ 0.00		
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)		Director de Investigación	Director General
Viaticos	\$ 0.00		
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 0.00	Fecha de resolución	
costo directos de publicación, sobregiro)		23-OCT-2014	

1. Título del proyecto				
Efecto de la combinación de una intervención nutricional y agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer.				
2. Investigadores				
2a. Identificación				
INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
Zentella Dehesa Alejandro	Investigador en Ciencias Médicas F	Investigador responsable		
Tovar Palacio Armando	Investigador en Ciencias Médicas F	Investigador asociado		
Torres y Torres Nimbe	Investigador en Ciencias Médicas F	Investigador asociado		
Mariano Martínez	Investigador Titular C Instituto de Química UNAM	Investigador asociado		
Daniel Martínez Carrera	Profesor e Investigador Titular del Colegio de posgraduados Campus Puebla	Investigador asociado		
José Luis Ventura Gallegos	Técnico académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM	Investigador asociado		
Damasco Avila Erika Alejandra	Estudiante Doctorado UNAM	Investigador asociado		
Poliaskaia Ekaterina	Estudiante Licenciatura	Investigador asociado		
María Eugenia Meneces Álvarez	Investigador Postdoctoral del Colegio de posgraduados Campus Puebla	Investigador asociado		
2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto				
Grupo colaborativo de nutriólogos, químicos del área de productos naturales y biólogos celulares de cáncer.				
3. Instituciones participantes				
Universidad Nacional Autónoma de México - Instituto de Investigaciones Biomédicas - Instituto de Química Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Colegio de Posgraduados Campus Puebla				
4. Patrocinio				
4a. Organismos patrocinadores				
Presupuesto interno Instituto de investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Presupuesto de licitación de la Unidad de Bioquímica. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Donativo PNPC CONACYT. Colegio de Posgraduados Campus Puebla. PAPIIT - Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.				
4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.				
No				
5. Marco teórico				
ANTECEDENTES:				
El cáncer ocupa el segundo lugar en número de muertes entre las enfermedades no transmisibles. El incremento en la				

incidencia de ésta enfermedad se atribuye a diferentes factores, entre ellos al crecimiento y envejecimiento de la población, la incorporación de nuevos estilos de vida asociados a una alimentación tipo occidental, el consumo de tabaco y sedentarismo, principalmente. El estudio más completo sobre incidencia y mortalidad en cáncer en ambos sexos de manera global, es el reportado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2010), con datos recabados durante el 2008. En dicho trabajo se reportó que en ese año hubo 12.7 millones nuevos de cáncer y 7.6 millones de muertes. Dentro de los cánceres más comunes en general, en primer lugar se encuentra el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de glándula mamaria, el colorrectal, de estómago, próstata e hígado.

Actualmente, existen terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer, dentro de las principales modalidades terapéuticas se encuentra la quimioterapia, que tiene como finalidad alcanzar el control sistémico. Sin embargo, la toxicidad, la cual puede ser hematológica y no hematológica (gastrointestinal, cutánea, neuropatías) muchas veces es un obstáculo importante para alcanzar la dosis requerida para lograr la tasa de curación. Si bien el efecto de la dieta y el medio ambiente en la expresión de los genes es aún controversial, existe certeza que la dieta puede modificar la expresión genética, afectando, tanto en forma positiva como negativa, el desarrollo del cáncer. Se han descubierto sustancias bioactivas en alimentos y en extractos de productos naturales, principalmente plantas y hongos; comparables en dosis terapéuticas a la medicina convencional. También se ha documentado que las intervenciones nutricionales pueden tener un valor adyuvante al tratamiento de quimioterapia.

La riqueza etnobotánica de México ha conducido a la búsqueda de aplicación de una variedad de compuestos nutricionales y extractos naturales de plantas empleadas en la medicina tradicional, para la prevención y tratamiento del cáncer; ya que significan herramientas terapéuticas de mayor accesibilidad, menor costo y seguros para el consumo humano.

Con base en lo anterior proponemos evaluar el efecto protector y/o adyuvante de nutrimentos como los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3, y los extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales como el Agastache mexicana y *Ganoderma lucidum* con propiedades potenciales para la prevención y tratamiento del cáncer en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer colorectal, tanto en líneas comerciales como en cultivos primarios. Igualmente proponemos probar estos nutrimentos y extractos *in vivo* en un modelo murino de animales inmunosuprimidos que aceptan trasplantes alogénicos de células tumorales humanas.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

Resulta evidente que la mortalidad por Ca en México, mantiene una tendencia ascendente generando una gran demanda sobre los sistemas de salud pública del país y por esto, es hoy en día, uno de los retos más importantes para la investigación enfocada a la salud del adulto y adultos mayores. Las opciones terapéuticas actuales tienen un costo sumamente elevado además de los efectos tóxicos ya mencionados; por tal motivo, la epidemia de Ca representa un nuevo desafío para el financiamiento por parte del sistema de salud, en particular para los países en desarrollo.

En la actualidad se utilizan un número importante de fármacos antitumorales que combinados con radioterapia e intervenciones quirúrgicas han resultado en esquemas de tratamiento con alta efectividad curativa si se aplican a estadios tempranos, tanto en forma adyuvante como neoadyuvante. También se aplican en el contexto de enfermedad metastásica, aunque ya no con intención curativa. A pesar de su amplia utilización, las dosis empleadas se encuentran limitadas por su perfil de toxicidad que varía según medicamento, el cual puede ser dependiente de la dosis acumulada. Por tanto, resulta de considerable importancia incrementar la capacidad citotóxica de los fármacos antitumorales utilizando combinaciones con agentes no farmacológicos que potencien su efecto sin aumentar la toxicidad.

JUSTIFICACION :

La generación de estrategias para optimizar el tratamiento contra el cáncer se complementa con la incorporación de nutrimentos o principios activos derivados de productos naturales que se presentan como candidatos potenciales para complementar los recursos actuales, por lo que se justifica la realización de estudios formales de su eficacia ya sea solos o en combinación con agentes antitumorales. Esta búsqueda debe ir orientada a la disminución de los efectos tóxicos, además de la reducción de costos, lo que se reflejaría en un mayor apego y tasa de éxitos.

6a. Hipótesis

El empleo de nutrimentos y extractos de productos naturales específicos en dosis terapéuticas como terapia coadyuvante en un modelo murino, potenciará el efecto del tratamiento convencional en la reducción de la masa tumoral.

6b. Objetivos.

General: Determinar el efecto coadyuvante de nutrimentos como los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3, y los extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales Agastache mexicana y *Ganoderma lucidum* en dosis terapéuticas, ya sea solos o en combinación con el tratamiento convencional (dependiente del fenotipo tumoral) en la inhibición del crecimiento tumoral con diferentes líneas de cáncer humano en un modelo murino.

7. Metodología: Diseño general.

Diseño: Estudio experimental.

Cultivo Celular: El estudio se llevará a cabo con diferentes líneas celulares de cáncer humano de mama MDA MB 231, MCF-7, MDA MB 468 y de próstata PC3. Serán mantenidas en la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ en incubadores a 37 °C, 100% de humedad y 5% de CO₂.

Experimentación in vivo:

La experimentación *in vivo* se llevará a cabo con ratones hembras desnudos blancos (Foxn1nu) de fondo genético Balb/c, que presentan una inmunodeficiencia que permite la implantación de trasplantes alogénicos, sin que se de rechazo. Dicho antecedente genético es importante ya que durante el experimento los animales podrían tener una respuesta variable al tratamiento.

La primera etapa consiste en estandarizar el número de células a inocular y el tiempo óptimo para la generación de una masa tumoral de al menos 3mm³ con las diferentes líneas celulares. Para ello se inyectará vía subcutánea un volumen máximo de 100µL de la suspensión celular en solución fisiológica con diferentes densidades de células: 1,500,000, 2,500,000, 3,000,000, 4,000,000, 5,000,000. Cada cantidad se inyectará en 5 ratones para probar su capacidad de formar tumor. Las células a inyectar se mantendrán en condiciones estériles y serán preparadas el mismo día que se practique la inoculación.

Para su identificación los animales serán marcados con muescas en los pabellones auriculares. Diariamente serán pesados y revisados para registrar la aparición de masas tumorales y llevar un control de los incrementos en sus radios mayores y menores. El desarrollo de tumor se evaluará durante un periodo máximo de 3 semanas. El volumen del tumor será determinado con la fórmula: $0.52 \times (\text{ancho})^2 \times \text{largo}$. En su caso se aplicarán criterios de punto final.

Los grupos estarán conformados por 10 animales de las siguientes características:

- Hembras para los experimentos con líneas celulares de cáncer de mama. Y machos para los experimentos con la línea celular de cáncer de próstata.
- Al destete: 19 – 21 días.

Grupo 1: Dieta Estándar sin Tratamiento (Control 1)

Grupo 2: Dieta Estándar con Tratamiento Antitumoral convencional (Control 2)

Grupo 3: Dieta Suplementada desde el tiempo 0 sin Tratamiento (Experimental 1)

Grupo 4: Dieta Suplementada desde el tiempo 0 con Tratamiento convencional (Experimental 2)

Grupo 5: Dieta Suplementada tras dos semanas de la inoculación del tumor (Experimental 3)

Tratamiento convencional: Para cáncer de mama se utilizará Doxorubicina y para el grupo inoculado con la línea celular de cáncer de próstata se utilizará Docetaxel.

Intervención dietética:

- Dieta Estándar: Se utilizará la dieta AIN-93 diseñada por el American Institute of Nutrition Rodent Diets.
- Dieta Suplementada: AIN-93 suplementada + compuesto de interés:
 - Ácidos Grasos Omega-3: 1g/kg
 - Agastache Mexicana: 100 µmol/ml/kg
 - *Ganoderma lucidum*: 6g/kg

La dieta será preparada en la planta piloto de tecnología de alimentos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, según las indicaciones de la American Institute of Nutrition Rodent Diets para dicha dieta, suplementando o no el compuesto en estudio. Ambas dietas se refrigerarán en contenedores sellados con el objetivo de reducir cambios organolépticos. Ya lista la mezcla, se procederá a humectar la mezcla y finalmente se dejará secar para que adquiera una consistencia sólida, adecuada para el consumo del ratón y evitar desperdicio.

Administración del tratamiento convencional:

Los animales serán observados diariamente y el tratamiento será administrado intraperitonealmente diaria por un máximo de 8 semanas, a una dosis de 1mg/kg.

Evaluación de masa tumoral y masa corporal:

Tumor: Los diámetros máximos y mínimos del tumor serán medidos tres veces por semana con un Vernier. El volumen del tumor será determinado con la fórmula: $0.52 \times (\text{ancho})^2 \times \text{largo}$. Llegado al punto final, posterior a la necropsia se registrará el peso húmedo del tumor. Las masas tumorales se fijarán con formalina para realizar estudios histopatológicos con tinción estándar de hematoxilina/ eosina.

Masa Corporal: Se registrará diariamente.

Ingesta: Se hará registro de consumo diario.

8. Metodología: Criterios de selección

El estudio se llevará a cabo con ratones desnudos hembras para emular las variaciones del ciclo hormonal femenino. Los animales se recibirán a los 19-21 días de su nacimiento para iniciar inmediatamente la alimentación con el alimento suplementado con los nutrimentos o extractos naturales. A lo largo de las siguientes 4 semanas se realizará la implantación de células tumorales y se iniciará el tratamiento antitumoral correspondiente.

Durante el periodo de alimentación de los animales juveniles a adultos, se seleccionarán para el estudio los que cumplan con las siguientes características: Incremento de peso normal, ausencia de traumatismos y/o infecciones o que hayan sido víctimas a estrés conductual.

9. Metodología: Desenlaces y variables

El criterio para evaluar el desarrollo de tumor tendrá punto final cuando el ratón presente alguna de las siguientes características:

- Disminución de masa corporal de $\geq 20\%$.
- Se observe falta de movilidad, letargia u otros cambios semejantes en el comportamiento.
- Hayan transcurrido 8 semanas después de la inoculación.
- Crecimiento de la masa tumoral sea mayor al 5% del peso corporal del animal (aproximadamente 17 mm).
- Presencia de trauma autoinflingido.
- Cuando la palpación del tumor induce respuesta dolorosa.
- En el caso de tumores superficiales: presencia de ulceración, necrosis o infección.
- Ulceración de tumor.

La eutanasia se practicará con CO₂ gaseoso dentro de una cámara dedicada a este procedimiento para evitar prologar el dolor en los animales.

Los cadáveres primero se almacenarán en bolsas sellables y bolsa para residuos sólidos patológicos y se entregarán a quien corresponda para su desecho.

Para la evaluación de los nutrimentos y extractos se compararán las tasas de crecimiento de las masas tumorales.

Estadística:

1. Volumen de los tumores control comparados con el volumen de los tumores de ratones suplementados en los mismos tiempos: t de Student para muestras no pareadas.
2. El volumen de los tumores del grupo control se comparará en sus diferentes tiempos de desarrollo tumoral mediante el análisis estadístico del test t de Student para muestras pareadas. La misma prueba se utilizará para analizar el volumen de los tumores de los ratones suplementados de cada grupo experimental.
3. Para valorar el efecto específico del tratamiento se comparará el grupo con tratamiento (QT) y suplementación vs el grupo solo con tratamiento en cuanto al tamaño tumoral y se utilizará la prueba de t de Student. En caso de encontrar diferencias se utilizarán isobogramas y análisis de regresión para valorar si el efecto es el esperado (aditivo) o existe sinergia.

10. Riesgos y beneficios del estudio

Beneficios Directos:

- Se espera un beneficio directo como estudio preclínico.
- Comprobar que la suplementación de nutrimentos en la dieta, en conjunto con el tratamiento convencional, potencia el efecto terapéutico.

Beneficios Indirectos:**Riesgos:**

Molestias Generadas: NA

Complicaciones de procedimiento: NA

Efectos Adversos: NA

Efectos Psicológicos: NA

Métodos de Seguridad: NA

Procedimientos: NA

Otro tipo de riesgo: NA

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viáticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

- Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 11/05/2012.
- World Health Organization. 2011 Noncommunicable diseases country profiles 2011. WHO global report.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011 Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* Mar-Apr;61(2):69-90.
- American Institute of Nutrition Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, 107: 1340–1348, 1977.
- Figueiredo JC, Hsu L, Hutter CM, Lin Y, Campbell PT, et al. (2014) Genome-Wide Diet-Gene Interaction Analyses for Risk of Colorectal Cancer. *PLoS Genet* 10(4): e1004228. doi:10.1371/journal.pgen.100422
- Hardman, W. E., Moyer, M. P., and Cameron, I. L. Efficacy of treatment of colon, lung and breast human carcinoma xenografts with: doxorubicin, cisplatin, irinotecan or topotecan. *Anticancer Res.*, 19: 2269–2274, 1999.
- Hardman WE. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. *J Nutr* 2004;134:3427S–3430S.
- Bradford PG, Awad AB. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:339–350.
- Ju J, Picinich SC, Yang Z, Zhao Y, Suh N, Kong KN, Yang CS. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Car- cinogenesis* 2010;31:533–542.
- Martínez-Carrera D, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora ed. 2010 Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y

Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNSCONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. Puebla

- Wang CD, Teng BS, He YM, Wu JS, Pan D, Pan LF, Zhang D, Fan ZH, Yang HJ, Zhou P 2012 Effect of a novel proteoglycan PTP1B inhibitor from *Ganoderma lucidum* on the amelioration of hyperglycaemia and dyslipidaemia in db/db mice. *The British journal of nutrition* 108:2014-2025
- Wachtel-Galor S, Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF 2004 *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *International journal of food sciences and nutrition* 55:75-83
- Kaneda T, Tokuda S 1966 Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats. *The Journal of nutrition* 90:371-376
- Rosalia Rubel HSDS, Luiz Claudio Fernandes, Sandro J. R. Bonatto, Sergio Bello, Bonald C. Figueiredo, Jose Hermenio C. Lima Filho, Cid Aimbire M. Santos, Carlos Ricardo Soccol 2011 Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leyss:Fr) Karst used as a dietary supplement. *World journal of microbiology & biotechnology* 27:1083–1089
- Guoliang Meng HZ, Shengju Yang, Feng Wu, Huihua Zheng, E Chen, Jiliang Xu 2011 Attenuating effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydrate Polymers* 84:180-185
- Yang Q, Wang S, Xie Y, Sun J, Wang J 2010 HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *International journal of biological macromolecules* 46:167-172
- Ti-Qiang Chen Y-BW, Jian-guo Wu, Hong-Yu Wang, Fang-Hua Mao, and Jin-Zhong Wu 2013 Fatty acids, essential oils, and squalene in the spore lipids of *ganoderma lucidum* by gc-ms and gc-fid. *Chemistry of Natural Compounds* 49:143-144
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH 2004 Antioxidant effect of zinc in humans. *Free radical biology & medicine* 37:1182-119.
- Friedrichs W, Ruparel SB, Marciniak RA, de Graffenried L. Omega-3 fatty acid inhibition of prostate cancer progression to hormone independence is associated with suppression of mTOR signaling and androgen receptor expression. *Nutr Cancer* 2011;63:771–777.
- Hardman WE (2002) Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J Nutr* 132: 3508S–12S.
- Wu M, Harvey KA, Ruzmetov N, Welch ZR, Sech L, et al. (2005) Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway. *Int J Cancer* 117: 340–8.
- Rose DP, Connolly JM (1999) Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther* 83: 217–44.
- Bougnoux, P. n-3 Polyunsaturated fatty acids and cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2: 121–126, 1999.
- Germain, E., Chajes, V., Cognault, S., Lhuillery, C., and Bougnoux, P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int. J. Cancer*, 75: 578–583, 1998.