

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE ALTAS DOSIS DE OLEORRESINA RICA EN
LUTEÍNA, EXTRAÍDA DE LA FLOR DE CEMPASÚCHITL
(*Tagetes erecta*), SOBRE EL CÁNCER DE COLON INDUCIDO
QUÍMICAMENTE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

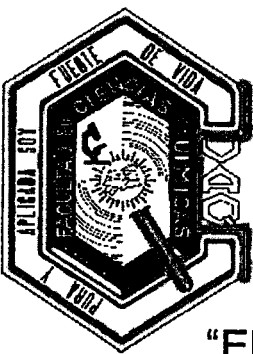
BRICIA CRYSTAL ALVAREZ APODACA

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006.

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE ALTAS DOSIS DE OLEORRESINA RICA EN
LUTEÍNA, EXTRAÍDA DE LA FLOR DE CEMPASÚCHITL
(*Tagetes erecta*), SOBRE CÁNCER DE COLON INDUCIDO
QUÍMICAMENTE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

BRICIA CRYSTAL ALVAREZ APODACA

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SINODALES

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
DIRECTOR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ
SINODAL

Dra. EVA GONZÁLEZ JASSO
SINODAL

M. en C. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ
SINODAL

*La felicidad es a veces una bendición,
pero por lo general es una conquista.*

*El instante mágico del día nos ayuda a cambiar,
nos hace ir en busca de nuestros sueños.*

*Vamos a sufrir, vamos a tener momentos difíciles,
vamos a afrontar muchas desilusiones...,
pero todo es pasajero y no deja marcas.*

*Y en el futuro podemos mirar hacia atrás
con orgullo y fe.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de culminar con esta importante etapa.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho, por darme la oportunidad de aprender un poco mas de ella y dejarme colaborar en su equipo, por brindarme su amistad en todo momento, por su apoyo infinito y sus sabios consejos.

A la Dra. Minerva Ramos Gómez por su gran disponibilidad para ayudarme y ofrecerme su apoyo incondicional, por su amistad y por ser una gran persona.

A la Dra. Eva González Jasso, por su gran disposición para ayudarme en todo momento y por su orientación en el desarrollo de esta tesis.

Al M. en C. Sergio Pacheco Hernández, por sus enseñanzas, consejos y su constante ayuda.

A mi familia, con todo mi amor, en agradecimiento por el apoyo, comprensión y confianza, así como el ejemplo que en cada segundo de mi vida me han brindado. Gracias papi por tus enseñanzas, por sacrificarte día con día y por ayudarme a ser una persona mas fuerte. Gracias mami, por estar siempre a mi lado, por tu inmenso amor y por ser mi mejor amiga.

A mis hermanas Irais y Dany, gracias por todo el tiempo que hemos compartido juntas, por la alegría que me brindan y hacer que nuestra familia sea tan especial.

A Abraham, por formar parte de mi vida, por estar conmigo en los momentos de alegría y de tristeza, por darme tu amor de manera incondicional y ser tan importante en mi vida.

A mis amigas Lulú, Alejandra, Wendy, Fabiola y María Elena, porque juntas logramos cumplir nuestra meta, gracias por compartir inquietudes, éxitos y fracasos, las quiero mucho.

A mis amigos Lalo y Omar por la importante ayuda que me proporcionaron y por brindarme su amistad.

A Sonia y Talia, por aquellos momentos tan divertidos juntas y ser unas amigas tan especiales, las quiero y extraño mucho.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda y apoyo para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de generación por las risas y aquellos momentos especiales que compartimos juntos.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Cáncer	3
II.1.1. Definición	3
II.1.2. Clasificación tumoral	3
II.1.3. Características de las células cancerosas	4
II.1.4. Clasificación de los tipos de cáncer	5
II.1.5. Genética del cáncer	5
II.2. Colon	7
II.2.1. Anatomía y fisiología	7
II.2.2. Histología	8
II.2.3. Cáncer de colon	9
II.2.4. Epidemiología	10
II.2.5. Desarrollo del cáncer de colon y sus aspectos moleculares	10
II.3. Estrés oxidativo y su relación con el cáncer	11
II.4. Los alimentos y prevención del cáncer	14
II.5. Carotenoides	14
II.5.1. Clasificación	15
II.5.2. Funciones biológicas de los carotenoides	15
II.5.3. Los carotenoides como antioxidantes	17
II.5.4. Factores que afectan la biodisponibilidad de los carotenoides	18
II.5.5. Estabilidad de los carotenoides	18
II.5.6. Capacidad prooxidante de los carotenoides	19

II.6. Luteína	19
II.6.1. Luteína y cáncer de colon	20
II.7. Modelos experimentales de carcinogenesis colónicas en animales	21
II.7.1. 1,2-Dihidrocloruro de dimetilhidrazina (DMH) o N,N-dimetilhidrazina	21
II.7.2. Metabolismo de la 1,2-Dihidrocloruro de dimetilhidrazina (DMH)	21
II.8. Evaluación del efecto quimioprotector sobre el cáncer de colon	23
III. HIPOTESIS	25
IV. OBJETIVOS	26
IV.1. General	26
IV.2. Específicos	26
V. METODOLOGÍA	27
V.1. Materiales	27
V.1.1. Material biológico	27
V.1.2. Compuestos químicos	27
V.2. Métodos	27
V.2.1. Estudios de quimioprotección	27
V.2.2. Disección del colon	28
V.2.3. Análisis macroscópico	28
V.2.4. Perfil espectrofotométrico y cromatográfico de la luteína utilizada en los estudios <i>in vivo</i>	29
V.2.4.1 Identificación de la luteína por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés)	29
V.2.5. Análisis estadístico de los resultados	30
VI. RESULTADOS	31
VI.1. Efecto de diferentes dosis de luteína y el carcinógeno DMH	31
VI.1.1. Ganancia de peso corporal	31
VI.1.2. Índice de sobrevivencia	31
VI.1.3. Incidencia de placas y pólipos	34

VI.1.4. Multiplicidad de placas y pólipos	34
VI.1.5. Número promedio de placas y pólipos	36
VI.1.6. Área de placas y pólipos	38
VI.1.7. Distribución de pólipos	39
VI.2. Perfil espectrofotométrico y cromatográfico de la luteína	40
VI.2.1. Perfil espectrofotométrico de la luteína	40
VI.2.2. Perfil cromatográfico de la luteína	40
VII. DISCUSIÓN	43
VIII. CONCLUSIONES	47
IX. BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características de células normales y tumorales	4
2	Clasificación de los diferentes tipos de cáncer con relación al tejido afectado	5
3	Especies reactivas de oxígeno y sus principales características	13
4	Clasificación de tumores inducidos por la dimetilhidrazina	22
5	Área de placas y pólipos de animales tratados con diferentes dosis de luteína	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Segmentos anatómicos del colon	8
2	Corte histológico del tejido del colon	9
3	Desarrollo y metástasis de cáncer colorrectal humano y su base genética	12
4	Estructura química de algunos carotenoides	16
5	Metabolismo de la 1,2-dimetilhidrazina en hígado	24
6	Diseccción del colon de las ratas Sprague-Dawley	29
7	Curva de ganancia de peso corporal de los animales tratados con diferentes dosis de luteína	32
8	Porcentaje de sobrevivencia de los animales tratados con diferentes dosis de luteína	33
9	Porcentaje de Incidencia de placas y pólipos tratados con diferentes dosis de luteína	35
10	Multiplicidad de placas y pólipos de animales tratados con diferentes dosis de luteína	36
11	Número promedio de placas y pólipos de animales tratados con diferentes dosis de luteína	37
12	Distribución de los pólipos en las diferentes zonas del colon de animales tratados con diferentes dosis de luteína	39
13	Espectro de absorción de luteína disuelta en hexano-metanol-acetona (80:10:10%)	41
14	Espectros cromatográficos del estándar de luteína (A) y de la muestra de luteína utilizada como tratamiento en el presente estudio (B).	42

RESUMEN

Estudios epidemiológicos han demostrado que la ingesta alta de alimentos ricos en luteína disminuye el riesgo de padecer cáncer de colon. Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen el efecto de dicho carotenoide para el tratamiento de esta patología. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dosis de luteína más altas a las recomendadas como consumo diario sobre ratas Sprague-Dawley con el carcinógeno 1,2-dihidrocloruro de dimetilhidrazina (DMH). Se utilizaron 4 grupos de animales divididos de la siguiente manera: 1) Control positivo (DMH), 2) DMH-luteína (0.3 mg/kg de peso corporal), 3) DMH-luteína (3.0 mg/kg de peso corporal) y 4) DMH-luteína (15 mg/kg de peso corporal). La inducción de cáncer se realizó administrando vía intraperitoneal DMH (21 mg/kg) semanalmente por un período de 2 meses. Posteriormente se trataron los animales con la luteína disuelta en aceite de maíz dos veces por semana durante tres meses, administrándola por vía intragástrica. Cada semana se registró la ganancia de peso y la mortalidad de los animales. Al finalizar el tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y se les extrajo el colon para evaluar la incidencia, la multiplicidad, el número promedio de tumores, el volumen y su distribución en las diferentes zonas del intestino grueso. No se observó diferencia significativa en cuanto a la ganancia de peso entre los diferentes grupos de tratamiento. Por otro lado, los animales a los que se les administró luteína a la dosis de 3.0 y 15 mg/kg mostraron un mayor porcentaje de sobrevivencia (80-90%) con respecto al control positivo (50%). Se encontró que los grupos tratados con luteína presentaron mayor incidencia de placas (86-100%) y tumores (78-100%), mientras que el grupo tratado con DMH sólo presentó un 67% y 83% de dichas lesiones, respectivamente. Así mismo, el número promedio de tumores de los animales tratados con la dosis de 3 mg/kg (2.2 ± 0.353) mostró una diferencia estadística significativa con respecto al control (0.7 ± 0.430). Esta misma dosis produjo las placas y tumores de mayor tamaño comparado con los demás tratamientos. Por otro lado, se realizó un perfil espectrofotométrico y cromatográfico de la luteína utilizada en el experimento, no encontrando señales adicionales comparadas con un estándar que le pudieran atribuir isómeros oxidados.

En base a los resultados se demuestra que la luteína a altas concentraciones potencia la actividad carcinogénica de la DMH, incrementando la progresión de cáncer de colon.

I. INTRODUCCION

El cáncer es una de las principales causas de muerte en países industrializados. En el mundo mueren cada año aproximadamente 6.6 millones de seres humanos a causa del cáncer. A pesar del gran esfuerzo por mejorar el tratamiento y la cura del cáncer, la mortalidad debida a esta enfermedad no ha disminuido en los últimos 25 años.

El cáncer de colon es la segunda neoplasia más común en los países desarrollados. Al parecer, la mayor parte de los cánceres colon-rectales surge de tumores benignos llamados adenomas, los cuáles forman una masa protuberante del tejido denominado pólipo. Se cree que estos pólipos adenomatosos son los precursores de una gran proporción de los cánceres colon-rectales.

En los últimos años la quimioprotección ha recibido enorme atención como un medio de control para el cáncer. El término quimioprotección se refiere al uso de agentes farmacológicos o naturales como constituyentes que ocurren naturalmente en la dieta o intencionalmente adicionados a los alimentos o en algunos casos como suplemento, los cuales inhiben el desarrollo de cáncer maligno, ya sea por el bloqueo del daño al DNA, que inicia la carcinogénesis, o por la inhibición o reversión de la evolución de células pre-malignas en las cuales el daño ya ha ocurrido.

En nuestro país existe una gran variedad de especies de plantas que constituyen una fuente inexplorada de principios activos. Tal es el caso de la flor de cempasúchitl, la cual ha sido considerada un valioso recurso natural por su uso para la alimentación animal.

La luteína, el principal carotenoide encontrado en la flor de cempasúchitl, tiene funciones biológicas específicas al disminuir el desarrollo del cáncer. Se ha comprobado que la administración de luteína a través de la dieta reduce el

crecimiento y desarrollo de tumores de mama, observándose una alta actividad antitumoral (40% y 45 %) en ratas alimentadas con 0.002% y 0.02% respectivamente de luteína.

Otros estudios en animales sugieren que la luteína en dosis pequeñas puede prevenir potencialmente la carcinogénesis colónica. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios en los cuales se consideren altas dosis de luteína como un tratamiento para el cáncer de colon.

II. ANTECEDENTES

II.1. Cáncer

II.1.1. Definición

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la existencia de células que han sufrido un cambio en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y proliferación, provocando modificaciones en la información genética de las mismas (Flórez, 2000).

II.1.2. Clasificación tumoral

Cuando las células tienen tendencia a proliferar sin responder a la regulación producen una masa de células anormales que crecen inexorablemente denominada *tumor* o *neoplasma* (Lodish y col., 2002). Si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única, es decir, suelen ser observadas a simple vista por que contienen células muy similares a las normales y se comportan como tales, se dice que el tumor es *benigno* y generalmente puede extraerse la masa quirúrgicamente (Alberts y col., 1996).

Un tumor es considerado canceroso sólo si es *maligno*, es decir, si sus células tienen la capacidad de invadir e implantarse en el tejido circundante (metástasis) o implantarse sistémicamente. Estas células tienen la característica de que expresan proteínas del tipo celular que le dió origen (*K-ras*, *β -catenina*, *PKC β II*, etc.), una fracción importante crece y se divide con mayor rapidez que las normales (Alberts y col., 1996).

II.1.3. Características de las células cancerosas

En el transcurso de la proliferación y del crecimiento, en el caso de los tumores malignos, las células desarrollan características distintas de carácter bioquímico, morfológico e inmunológico, probablemente como consecuencia de cambios mutagénicos (Flórez, 2000). En conjunto, las alteraciones que pueden presentar las células cancerosas incluyen modificaciones en su forma y tamaño; cambios en su apariencia (aparecen mas blastoides, menos diferenciadas, frecuentemente con nucleolos); alteraciones en la distribución de la cromatina nuclear (ésta se condensa y deja de aparecer homogénea); variaciones en la forma y número de sus cromosomas: copias en exceso de cromosomas (poliploidía), pérdida de cromosomas (aneuploidía) y cromosomas aberrantes; evitan la apoptosis, pérdida del llamado fenómeno de inhibición por contacto (un mecanismo que detiene la división celular cuando las células normales hacen contacto con otras células) y cambios bioquímicos (ligados a diversas alteraciones y a la aparición, en algunos casos, de antígenos propios de las células cancerosas)(Cuadro 1) (Rojas-Espinosa, 2001).

Cuadro 1. Características de células normales y tumorales (McCance, 1994).

Características de crecimiento	Células normales	Células tumorales
Inhibición dependiente de crecimiento	Presenta	Ausente
Requerimientos de factores de crecimiento	Alto	Bajo
Anclaje	Presenta	Ausente
Proliferación	Muy alto	Indefinido
Adhesividad	Alto	Bajo
Morfología	Muy bajo	Cambios anormales
Fibronectina	Presenta	Reducido
Activador plasminogénico	Presenta	Incrementado

II.1.4. Clasificación de los tipos de cáncer

A menudo las células animales normales se clasifican de acuerdo con su origen embrionario y la denominación de los tumores sigue esta misma nomenclatura (Cuadro 2) (Lodish y col., 2002).

Cuadro 2. Clasificación de los diferentes tipos de cáncer con relación al tejido afectado (Rojas-Espinosa, 2001).

Tipo o grupo de cáncer	Tejido afectado
1. Leucemias	Tejido hematopoyético en médula ósea.
2. Linfomas	Ganglios linfáticos
3. Sarcomas	Tejidos de sostén: tejido conectivo, músculos, vasos sanguíneos y linfáticos.
4. Carcinomas	Piel y anexos, epitelios mucosos, sistema nervioso y vísceras.
5. Adenomas	Glándulas
6. Otros	Tumores de tejido mixtos como ovarios, testículos y los demás que no son fácilmente clasificables.

II.1.5. Genética del cáncer.

El número de células que experimenta el ciclo celular está controlado por una serie de productos génicos (DeVita y col., 1997), estos productos génicos están agrupados en familias. La primera familia está integrada por los protooncogenes (del griego *onkos*, tumor), los cuales dirigen la producción de proteínas como ciclinas, factores de crecimiento, receptores, proteínas de transducción de señales que estimulan la proliferación celular, etc. Cuando éstos genes son mutados (por mutación puntual, amplificación génica o translocación génica), se transforman en oncogenes (Lodish y col., 2002), los cuales son capaces de incrementar la

proliferación de las células, de modo que algunos de ellos promueven la maquinaria celular para que sintetice de forma masiva determinados factores de crecimiento (Bishop, 1991).

La segunda familia está integrada por los genes supresores de tumores, que en el organismo sano controlan negativamente la proliferación celular. Son reguladores negativos de crecimiento y cuando no están presentes en la célula normal o se encuentran inactivos a causa de mutaciones, las células dejan de crecer normalmente y adquieren propiedades proliferativas anormales, característica de las células tumorales (Ríos y Hernández, 2001). La pérdida de uno o más de estos "frenos" contribuye al desarrollo de numerosos cánceres. Se reconocen 5 clases amplias de proteínas codificadas por genes supresores:

- Proteínas intracelulares, que regulan o inhiben la progresión a través de un estadio específico del ciclo celular.
- Receptores de hormonas secretadas que actúan como inhibidores de la proliferación celular.
- Proteínas de control de puntos clave, que detienen el ciclo celular si está dañado el DNA o los cromosomas son anómalos.
- Proteínas que estimulan la apoptosis (Lodish y col., 2002).

Existe otro grupo de productos génicos, los que regulan la reparación del DNA dañado. Estos genes influyen indirectamente sobre la proliferación o la sobrevivencia celular a través de su efecto sobre la capacidad del organismo para reparar la lesión no letal de otros genes, como los protooncogenes, los genes supresores de tumores y los genes que regulan la apoptosis. La alteración de los genes que intervienen en la reparación del DNA puede predisponer a las mutaciones del genoma y, por lo tanto, a la transformación neoplásica (Cotran y col., 2000).

II.2. Colon

II.2.1. Anatomía y fisiología

El colon y el recto forman parte del sistema digestivo. El colon es la primera sección de intestino grueso, es un tubo muscular que en humanos mide aproximadamente metro y medio de largo. En él se siguen absorbiendo nutrientes y agua de los alimentos que han sido ingeridos, como ocurre en el intestino delgado, y sirve de contenedor para el material de desecho. Este material va avanzando hasta el recto, última parte del intestino grueso, hasta que es expulsado al exterior a través del ano (Moffet y col., 1993).

El colon está dividido en cuatro secciones principales:

- La primera sección comienza en el área de unión con el intestino delgado, se extiende desde el ciego, donde el apéndice se une al colon en el lado derecho del abdomen, y se llama colon ascendente o derecho.
- La segunda sección es el colon transversal que se extiende a través del abdomen del lado derecho hacia el lado izquierdo.
- El colon descendente o izquierdo es la tercera sección y continúa hacia abajo por el lado izquierdo del abdomen.
- Por último la cuarta sección se llama colon sigmoide o sigma, se llama así por la forma de S. El colon sigmoide se une al recto y éste se une al ano.

El recto es el último tejido que forma parte del intestino grueso, es un órgano relacionado con la evacuación y se aproxima a la línea media del cuerpo (Figura 1) (Moffet y col., 1993).



Figura 1. Segmentos anatómicos del colon (Moffet y col., 1993)

II.2.2 Histología

El interior del colon tiene una superficie lisa cuando se examina a simple vista, pero puede ser algo irregular de perfil en los cortes debido a la contracción muscular. A pequeños aumentos se puede ver la abertura de las incontables criptas o glándulas de Lieberkutin. En los cortes histológicos, éstas son glándulas tubulares rectas de unos 0.5 mm de longitud. En la Figura 2 se pueden observar las partes que componen el tejido colónico, como son el epitelio, la lámina basal, la lámina propia, la túnica mucosa y la lamina muscular de la mucosa (Moffet y col., 1993).

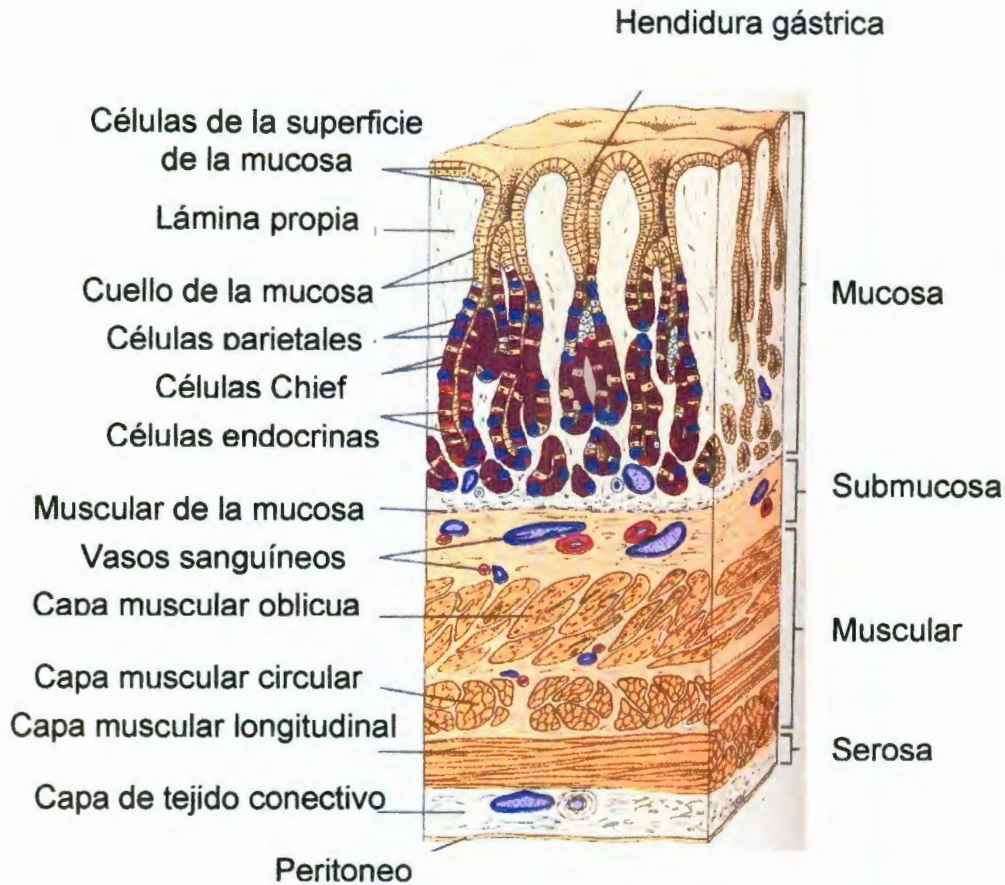


Figura 2. Corte histológico del tejido del colon (Moffet y col., 1993).

II.2.3. Cáncer de colon

El cáncer de colon se presenta como una serie de pasos complejos que involucran la progresiva alteración del control en el mecanismo homeostático de la proliferación celular, diferenciación y el programa de muerte celular (apoptosis) en el epitelio intestinal. Estos cambios pueden estar dados por la dieta y los factores ambientales, modulando las vías de señalización del epitelio celular intestinal, tales como las mutaciones genéticas que transforman oncogenes, las deleciones o mutaciones de las enzimas reparadoras del DNA y de genes supresores de tumores (Murray y col., 1999).

Los cánceres de colon se generan en el epitelio lindante del colon y del recto, a menudo revelan un tumor benigno del epitelio intestinal, de pequeñas dimensiones, o adenoma, que forma una masa protuberante del tejido denominada pólipo. Se cree que estos pólipos adenomatosos son los precursores de una gran proporción de los cánceres colon-rectales (Alberts y col., 1996).

II.2.4. Epidemiología

El cáncer de colon es la segunda neoplasia más común en los países desarrollados, representando aproximadamente de 20 a 30 fallecimientos por 100 mil habitantes (Catalán y col., 2002). Alrededor del mundo esta patología es la 4ª causa de cáncer mas común entre las mujeres después del cáncer de mama, de pulmón y de estómago y la 4ª causa mas común entre los hombres después del cáncer de pulmón, de estómago e hígado (OMS, 2005).

En nuestro país durante el año 2001, la morbilidad por cáncer ocupó el cuarto lugar y fue la segunda causa de muerte en la población con un índice del 12 % superado únicamente por las enfermedades cardiovasculares (INEGI, 2001).

En el estado de Querétaro, en el año 2001, el cáncer colon-rectal ocupó el 9º lugar entre los cánceres mas comunes como el de próstata, tráquea, bronquios, estómago, cérvico uterino y mama (Anuario Estadístico Querétaro de Arteaga, 2001).

II.2.5. Desarrollo del cáncer de colon y sus aspectos moleculares

El proceso de conversión de una célula corporal normal en otra maligna requiere múltiples mutaciones. En el caso del cáncer de colon, éste evoluciona a través de estadios morfológicos diferenciados y bien establecidos (Cotran y col., 2000).

El primer paso de la carcinogénesis de colon generalmente comienza con una mutación en el gen supresor de tumores *APC* (ambos alelos del gen deben portar una mutación inactivante), induciendo la división de los enterocitos hasta formar un tumor benigno o pólipo (Fearon y Volgestein, 1990).

Si una de las células de un pólipo sufre otra mutación y que ésta active el gen *ras*, su progenie se divide en forma aún mas descontrolada y genera un adenoma de mayor tamaño. La pérdida por mutación de otro gen supresor de tumores, denominado *DCC*, seguida por la inactivación de *p53* produce un carcinoma maligno (Figura 3). Por lo general el DNA de distintos carcinomas de colon humanos contiene diferentes mutaciones en todos estos genes (*APC*, *p53*, *K-ras* y *DCC*) lo cual establece que se requieren múltiples mutaciones en la misma célula para que se forme un cáncer (Fearon y Volgestein, 1990).

Posteriormente, esta célula continúa su división y la progenie invade la lámina basal que rodea al tejido (Lodish y col., 2002). Algunas células tumorales pueden entrar al torrente circulatorio cruzando la pared de un vaso sanguíneo o vaso linfático, induciendo su proliferación en sitios distantes (metástasis). Desde el punto de vista clínico, se dice que un paciente que tiene éste tipo de tumor padece cáncer (Alberts y col., 1996).

II.3. Estrés oxidativo y su relación con el cáncer

El oxígeno es un compuesto esencial que cuando se reduce conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (Cuadro 3), que en su mayoría son radicales libres. Estos radicales libres son altamente tóxicos, capaces de provocar daño celular y tisular, y están implicados en el envejecimiento, las enfermedades de tipo neurológico y la carcinogénesis (González-Torres y col., 2000).

La peroxidación de los lípidos es un proceso mediado por radicales libres, dando como resultado la degradación de los ácidos grasos poli-insaturados (RH) de las membranas de los tejidos, como consecuencia del estrés ambiental, como tempe-

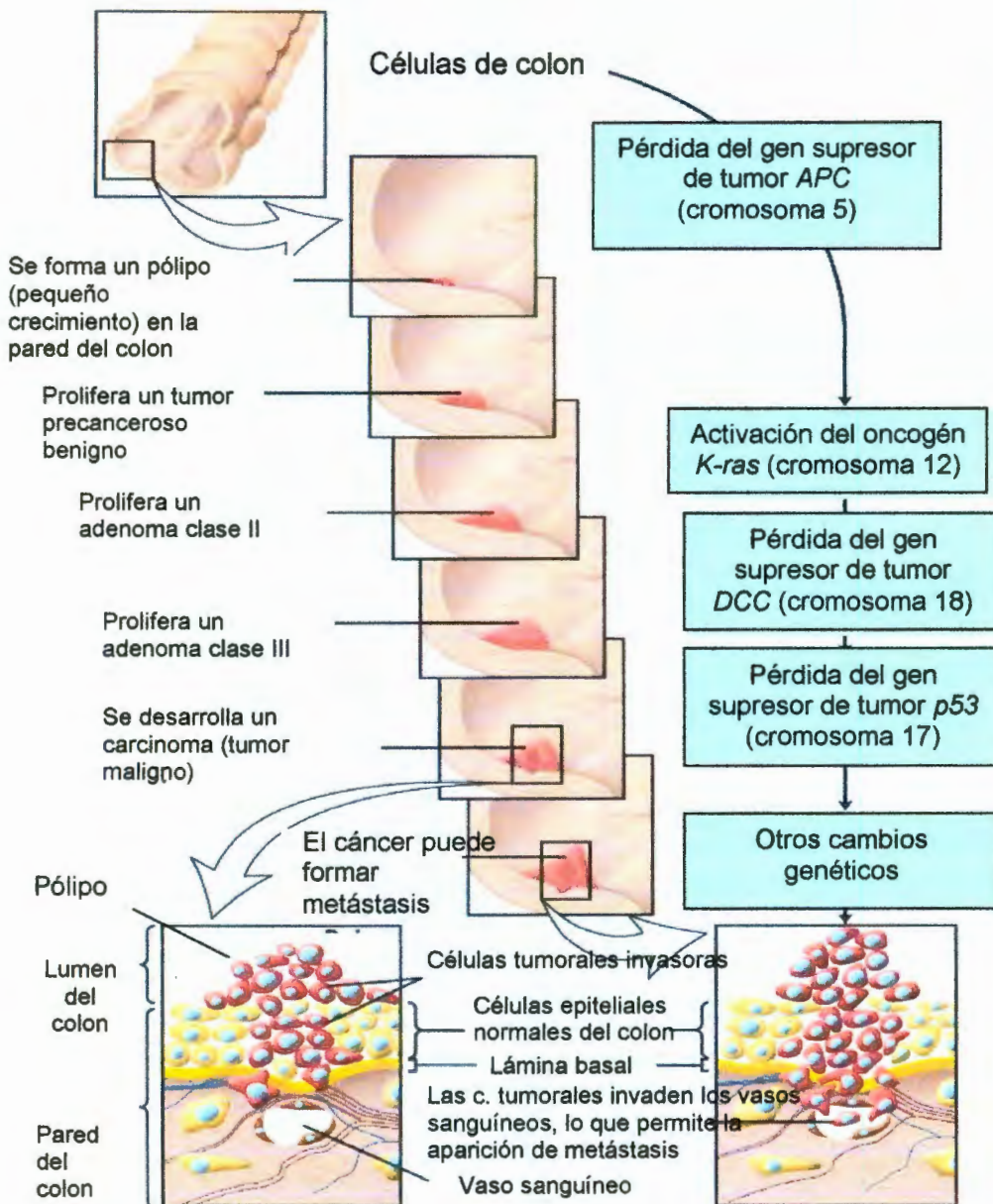


Figura 3. Desarrollo y metástasis de cáncer colorrectal humano y su base genética (Lodish y col., 2002).

Cuadro 3. Especies reactivas de oxígeno y sus principales características
(González –Torres y col., 2000).

RADICAL	NOMBRE	CARACTERISTICAS
O_2^-	Superóxido	Es muy reactivo en medio hidrofóbico, pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas puede transformarse en peróxido de hidrógeno.
$^{\cdot}OH$	Hidroxilo	Es el más reactivo y se le ha relacionado con ataque directo en ADN, proteínas y lípidos.
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno	No es un radical, pero puede generarlos rápidamente al estar en contacto con iones metálicos como el Hierro y el Cobre.
$ONOO^-$	Peroxinitrito	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico. Se le ha relacionado directamente con la patología de varios desórdenes neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer.
O_2	Oxígeno singulete	Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido, y durante la lipoperoxidación. Juega un papel importante en procesos de mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y desórdenes degenerativos.

raturas extremas, luz o exposiciones a compuestos xenobióticos (Leal, 1998), pesticidas, drogas antitumorales, humo del cigarro y algunos medicamentos a los que son sometidos los organismos (González-Torres y col., 2000).

La lipoperoxidación aumenta la rigidez de la membrana disminuyendo la presencia de enzimas unidas a membranas y de receptores hormonales. Es por eso que este fenómeno se ha identificado como el de mayor importancia en el daño membranal. Sin embargo no sólo los lípidos son afectados, sino también las proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos como el DNA (Leal, 1998).

La gran mayoría de estos productos son altamente reactivos y se ha demostrado que interaccionan con el ADN, ya que exhiben actividad mutagénica en cepas de *S. typhimurium* y de *Escherichia coli* (Osawa, 1990). Las reacciones en cadena involucradas en la peroxidación de lípidos pueden ser fuertemente inhibidas por la presencia de pequeñas cantidades de algún compuesto antioxidante como los carotenoides y otros compuestos presentes en los alimentos (Ramos-Gómez, 1995).

II.4. Los alimentos y prevención del cáncer

Se sabe que las frutas y vegetales así como el común de las bebidas de varias hierbas y plantas, tienen amplias propiedades farmacológicas. Además, estos alimentos muestran una diversidad de compuestos con el potencial de prevenir y/o revertir el cáncer en humanos. Entre los fitoquímicos conocidos en la prevención de cáncer se encuentran los carotenoides, la clorofila, los flavonoides, los indoles, los isotiocianatos, los compuestos polifenólicos, los compuestos azufrados, los inhibidores de proteasas y los terpenos (Watson, 2001).

II.5. Carotenoides

Los carotenoides son moléculas de 40 átomos de carbono, dímeros de poliisoprenos unidos simétricamente que poseen dobles enlaces conjugados, teniendo el particular efecto de apagar a los radicales libres (Collins, 2001). Los carotenoides se encuentran naturalmente en tejidos vegetales, microorganismos, insectos, algunos peces y aves (Gross, 1991).

Los carotenoides derivan su nombre del principal compuesto representativo de su grupo, el β -caroteno, el primer pigmento de color naranja aislado a partir de la zanahoria (*Daucus carota*). Actualmente se conocen más de 450 estructuras químicas de carotenoides (Figura 4) (Ramos-Gómez, 1995).

II.5.1. Clasificación

Existen dos clases de carotenoides:

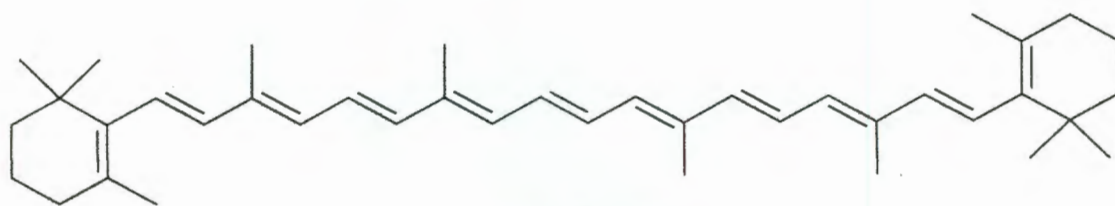
- Los carotenos, los cuales son compuestos hidrocarbonados (α -caroteno y β -caroteno).
- Las xantofilas, las cuales tienen átomos de oxígeno en la molécula (luteína y zeaxantina) (García, 1996).

II.5.2. Funciones biológicas de los carotenoides

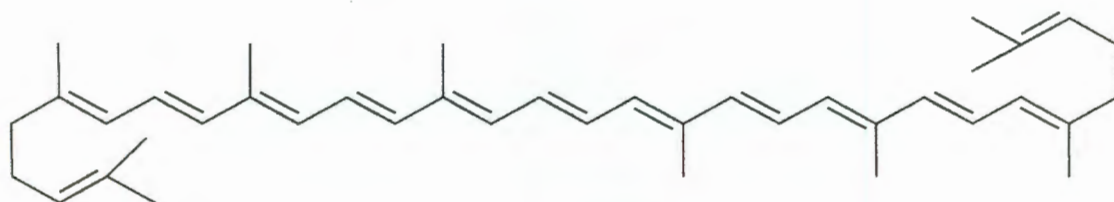
Una de las principales funciones fotosintéticas de los carotenoides es que pueden transferir con mayor eficiencia la energía captada por las clorofilas para la máxima utilización de la luz. Por lo tanto, los carotenoides tienen acción protectora del aparato fotosintético contra el daño potencial de la luz visible, atrapando el exceso de energía de la clorofila excitada o del oxígeno singulete (Gross, 1991).

Los carotenoides tienen diversas funciones fisiológicas muy importantes, entre ellas actuar como precursores de la vitamina A, atrapando las especies de oxígeno reactivo que se forman por radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del cigarro, hiperoxia, ozono, ejercicio excesivo, dióxido de nitrógeno, metales pesados e hidrocarburos halogenados, entre otras (Pérez, 2000); proteger a los lípidos de la oxidación y disminuir los peróxidos

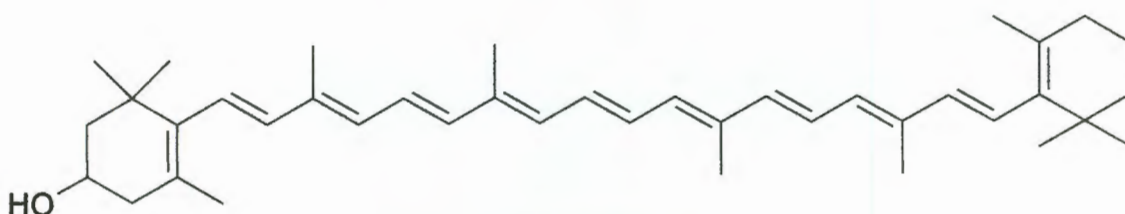
inmunosupresivos mejorando la respuesta inmunológica, mantener la fluidez de la membrana y ayudar a mantener los receptores de la membrana que son esenciales para la función inmune (Zhang y col., 1991).



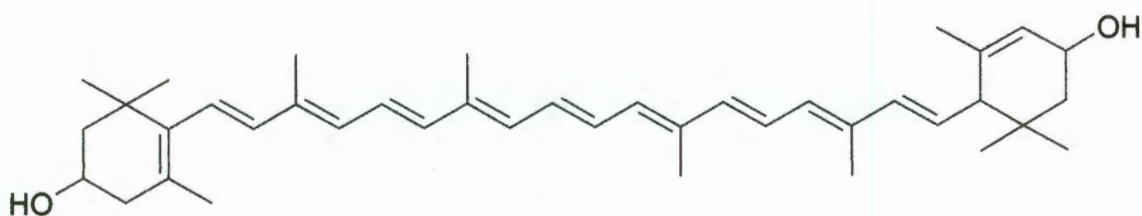
Beta-Caroteno



Licopeno



Criptoxantina



Luteína

Figura 4. Estructura química de algunos carotenoides (Badui, 1993)

Los carotenoides pueden proteger a las células del estrés oxidativo por que son capaces de atrapar los radicales libres que principalmente causan daño a los lípidos insaturados en la membrana celular (Leal, 1998).

Los carotenoides, independientemente de su función provitamina A, tienen actividad antimutagénica en sistemas microbianos, así como actividad anticarcinogénica tanto en sistemas celulares como en individuos completos (Krinski, 1989). Estudios epidemiológicos sugieren que los carotenoides disminuyen la incidencia de cáncer, las enfermedades cardiovasculares y degeneraciones maculares relacionados con la edad (Soon y col., 1998a).

II.5.3. Los carotenoides como antioxidantes

Se ha comprobado que los antioxidantes disminuyen el efecto tóxico de numerosos agentes, atrapando radicales libres durante los procesos de peroxidación que dañan los tejidos suprimiendo actividad nociva en la célula (Leal, 1998; Gonzalez-Torres y col., 2000).

Los carotenoides son capaces de actuar a diferentes niveles durante el proceso oxidativo (Leal, 1998) y entre los varios mecanismos propuestos para explicar la función protectora de los carotenoides, especialmente del β -caroteno contra el proceso de oxidación se encuentran:

- El atrapamiento de sensibilizadores fitoquímicos.
- El atrapamiento del oxígeno singulete.
- La inhibición de las reacciones de radicales libres (Ramos-Gómez, 1995).

II.5.4. Factores que afectan la biodisponibilidad de los carotenoides

La biodisponibilidad de los carotenoides se ve afectada por numerosos factores, incluyendo sus propiedades fisicoquímicas (isomerización), la matriz del alimento, una variedad de componentes en la dieta, el estado nutricional, la salud del epitelio y la susceptibilidad genética. La acumulación de xantofilas y otros componentes bioactivos de los alimentos y suplementos en tejidos periféricos, depende de la absorción intestinal y el metabolismo de primer paso a través del epitelio intestinal y/o hígado. Diversos estudios muestran la controversia de que si la forma esterificada es o no absorbida. La forma esterificada de la luteína no tiene efecto sobre la biodisponibilidad de la misma a dosis de 0.28 a 0.38 mg/kg de peso corporal, por el contrario, a estas concentraciones la biodisponibilidad de la luteína es afectada de manera importante por el tipo de vehículo (Bowen y col., 2002).

II.5.5. Estabilidad de los carotenoides

Los carotenoides son compuestos estables en su ambiente natural, pero cuando los alimentos se calientan, o cuando son extraídos en disolución en aceites o en disolventes orgánicos, se vuelven mucho más lábiles. La inestabilidad de los carotenoides se debe al hecho de que son compuestos altamente insaturados, degradándose fundamentalmente debido a procesos oxidativos. Existen factores que influyen en la degradación de carotenoides en sistemas modelo, como por ejemplo, la estructura del carotenoide, la exposición a la luz, la actividad del agua, la temperatura, la presencia de oxidantes, antioxidantes, sulfitos y metales, el pH, también pueden producir importantes cambios cualitativos en estos compuestos debido a reacciones de isomerización y pueden actuar como pro- o antioxidantes dependiendo del potencial redox de la molécula y del entorno, entre otros factores (Meléndez-Martínez y col., 2004).

II.5.6. Capacidad prooxidante de los carotenoides

El efecto de los carotenoides no es siempre benéfico (García, 1996). El β -caroteno posee un sistema de dobles enlaces conjugados en la molécula que le imparten un carácter prooxidante, haciéndola más susceptible al ataque por adición de radicales libres (radicales peróxido, ROO^\cdot) (Ramos-Gómez, 1995). El radical resultante (1) reacciona rápida y reversiblemente con el oxígeno para formar una nueva cadena acarreadora de radical peróxido:



En este punto, el β -caroteno sufre una rápida autooxidación, que depende de la presión parcial de oxígeno como resultado de la reversibilidad de la reacción (2) ya que el radical del β -caroteno O^\cdot se estabiliza por resonancia. Así cuando la presión parcial de oxígeno es muy baja o disminuye, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la izquierda produciéndose menor concentración de radicales peróxido (β -caroteno O^\cdot), reduciéndose por lo tanto la capacidad autooxidante del sistema. Por lo tanto, a bajas presiones parciales de oxígeno el radical predominante (β -caroteno $^\cdot$) puede ser eliminado del sistema al reaccionar con otro radical peróxido libre (3):



(García, 1996; Leal, 1998).

II.6. Luteína

La luteína es un carotenoide que se encuentra principalmente en espinacas, brócoli, lechuga, tomates, zanahorias, naranjas, cereales, judías, huevos y apio (Slattery y col., 2000). También se ha identificado como la principal xantofila de la

flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), una flor nativa de México que se cultiva principalmente en el norte del estado de Sinaloa y en el bajío del país (Ramos-Gómez, 1995). La flor de cempasúchil es comercialmente cultivada y el extracto de la flor seca es usado como suplemento de alimento para aves, para la directa coloración de sus músculos y la yema del huevo (Naranjo-Modad y col., 2000).

La luteína tiene características más polares que otros carotenoides, debido a la presencia de grupos hidroxilos sobre los anillos de las estructuras cíclicas. A diferencia del β -caroteno, la luteína no se convierte en vitamina A (Mares-Perlman y col., 2002).

II.6.1. Luteína y cáncer de colon

La luteína tiene funciones biológicas específicas, ya que disminuye el desarrollo de cáncer de mama y protege contra la degeneración macular relacionada con la edad (Soon y col., 1998a).

En células cultivadas, la luteína es más efectiva que el β -caroteno en inhibir la autooxidación de lípidos celulares (Zhang y col., 1991) y proteger contra el daño celular inducido por oxidación (Martin y col., 1996). En humanos, una alta concentración de luteína en plasma está correlacionada con el incremento en la expresión de receptores de estrógeno en células de cáncer de mama y, consecuentemente, con altas tasas de sobrevivencia y mejor respuesta a la terapia con hormonas (Soon y col., 1998b).

Las xantofilas pueden ayudar a reducir el riesgo de distintos tipos de cáncer principalmente de mama y de pulmón, así como prevenir enfermedades del corazón (Ribaya-Mercado y col., 2004). A través de estudios epidemiológicos se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en luteína protege contra el cáncer de colón (Slattery y col., 2000).

II.7. Modelos experimentales de carcinogénesis colónicos en animales

Existen varios modelos experimentales de cáncer de colon en animales de laboratorio, con el objetivo de ayudar a la comprensión del cáncer de colon humano y de los factores de riesgo involucrados (Negrete y col., 2000). Estos modelos reproducibles aportan la oportunidad de estudiar la enfermedad y permiten al investigador manipular ciertas variables como la dieta y parámetros inmunológicos que son importantes en la etiología del cáncer colorrectal (Montenegro y col., 2003).

II.7.1. 1,2-Dihidrocloruro de dimetilhidrazina (DMH) o N,N-dimetilhidrazina

La DMH es uno de los carcinógenos químicos más efectivos que inducen cáncer de colon en el 80 al 100 % de las ratas, entre 16 semanas y 7 meses posteriores al inicio del tratamiento, usando dosis que van desde 10 a 21 mg/kg (Negrete y col., 2000).

La DMH es un carcinógeno efectivo y selectivo del colon, debido a su actividad alquilante en los ácidos nucleicos del epitelio intestinal y a sus propiedades mutagénicas que afectan principalmente a las cepas: Fisher, Sprague-Dawley y BD-IX.

En el Cuadro 4 se clasifican los diversos tipos de tumores inducidos por la DMH (Piñols, 1995).

II.7.2. Metabolismo de la 1,2-Dihidrocloruro de dimetilhidrazina (DMH)

La DMH es un procarcinógeno, ya que requiere de activación metabólica dentro del organismo para formar el carcinógeno final. Dicha activación implica la oxidación a azometano. Una segunda oxidación convierte al azometano en azoximetano que

Cuadro 4. Clasificación de tumores inducidos por la dimetilhidrazina (Piñols, 1995).

Tumores	Características
Tumores sesiles	Son masas que protruyen sobre la superficie mucosal y con un diámetro máximo mayor que el de su unión a la mucosa y muy cercanos a la misma.
Tumores pedunculados	Son pólipos con un tallo claramente visible
Tumores exofíticos	Son tumores usualmente polipoides protruyendo hacia la luz. Presentan un margen elevado con cavitación central y una masa subyacente lobulada que generalmente, distiende la serosa subyacente.
Tumores endofíticos	Son tumores en forma de meseta o ulcerativos con tendencia ligera o nula a abultar hacia la luz. A menudo son tumores constrictivos. Han sido denominados también tumores fungoides.
Placas	Son lesiones con una superficie relativamente plana, ligeramente por encima del nivel de la mucosa.

mediante un proceso de N-hidroxilación por varios sistemas enzimáticos en el hígado se convierte en metilazoximetano (Negrete y col., 2000).

El metilazoximetano es químicamente inestable a temperatura corporal por lo que se descompone mediante la acción de la alcohol deshidrogenada en formaldehído, agua y nitrógeno. Durante esta descomposición se forma el agente alquilante metildiazonio, llamado carcinógeno final, siendo este último una sustancia altamente reactiva que forma iones metil-carbono, los cuales son los responsables de las mutaciones de macromoléculas (Figura 5) (Negrete y col., 2000).

El lugar primario de oxidación de la DMH es el hígado y posteriormente es transportado vía torrente sanguíneo al colon y otros tejidos (Piñols, 1995). Sin embargo, las células epiteliales del colon son capaces de activar dicho carcinógeno a través del citocromo P450, sin necesidad del metabolismo intermediario por hepatocitos. Además existe una reactivación del carcinógeno a través de la microflora normal del colon por medio de la enzima β -glucuronidasa, así el carcinógeno que fue conjugado en el hígado mediante la glucuronidación (haciéndola más hidrosoluble para ser eliminado por la orina) es liberado a nivel del colon donde ejerce su acción. El epitelio intestinal tiene una de las más altas tasas de recambio celular, por lo tanto, es probable que al haber un recambio celular se fije la mutación ocasionada por el carcinógeno en este órgano (Piñols, 1995).

II.8. Evaluación del efecto quimioprotector sobre el cáncer de colon

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se adicionó el 0.002 % de luteína en la dieta, lo cual corresponde a 0.97 mg/kg, con base a un estudio realizado sobre cáncer de mama (Soon y col., 1998a). La luteína fue administrada antes, durante y después de la inducción del cáncer con DMH. Los resultados obtenidos muestran que la luteína administrada después de la DMH disminuyen en un 50 % el número de tumores (Villalón, 2004).

Basándonos en esos resultados, se propone que dosis mayores podrían tener un efecto más significativo sobre la incidencia de cáncer de colon. Por lo tanto, se administraron las dosis de luteína de 0.3, 3.0 y 15.0 mg/kg de luteína (0.0006, 0.006 y 0.3%), por vía oral, con el fin de establecerlas como tratamiento intensivo después de la inducción del cáncer de colon en animales.

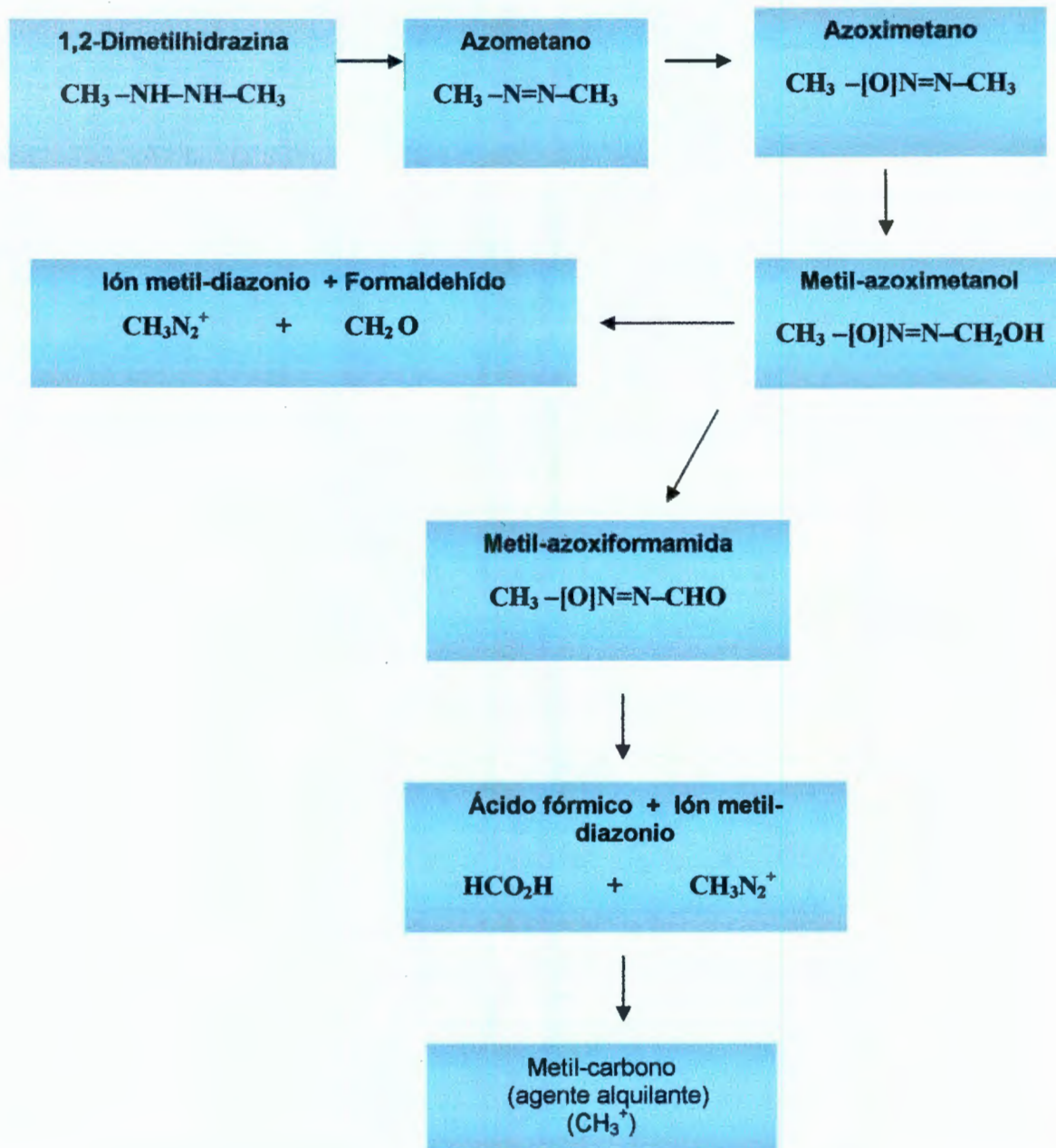


Figura 5. Metabolismo de activación de la 1,2-dimetilhidrazina en hígado (Grunberger y Goff, 1987).

III. HIPÓTESIS

La administración de altas dosis de luteína, extraída de la flor de cempasúchitl, muestra actividad quimioprotectora en un modelo de cáncer de colon inducido con el carcinógeno dimetilhidrazina en ratas Sprague – Dawley.

IV. OBJETIVOS

IV.1. General

- ❖ Evaluar el efecto de altas dosis de luteína, extraída de la flor de cempasúchitl, sobre el cáncer de colon inducido químicamente.

IV.2. Específicos

- ❖ Evaluar el efecto de la luteína sobre la ganancia de peso y sobrevivencia en animales tratados con el carcinógeno DMH.
- ❖ Determinar el efecto de la administración de diferentes dosis de luteína sobre el desarrollo de cáncer de colon en ratas, evaluando la incidencia, la multiplicidad, el número promedio, el tamaño de pólipos y placas, y la distribución de los pólipos en las diferentes zonas del intestino grueso.
- ❖ Evaluar la calidad de la luteína administrada utilizando técnicas espectrofotométricas y cromatográficas.

V. METODOLOGÍA

V.1. Materiales

V.1.1. Material biológico

Se utilizaron ratas machos Sprague – Dawley de 5 semanas de edad, las cuales fueron adquiridas del bioterio Harlan de México.

V.1.2. Compuestos químicos

La luteína libre (no esterificada) fue proporcionada por el Dr. Eleazar Escamilla del Instituto Tecnológico de Celaya. Brevemente, la oleorresina obtenida a partir de la flor de cempasúchitl (*Tagetes erecta*) fue hidrolizada enzimáticamente para la obtención de luteína “libre” o no esterificada (95 % pureza).

La 1-2,Dimetilhidrazina (DMH) fue marca Fluka.

V.2. Métodos

V.2.1. Estudios de quimioprotección

Se trabajó con 45 ratas macho Sprague–Dawley, las cuales se mantuvieron en ciclos de 12 hrs de luz y oscuridad durante todo el experimento. La dieta y el agua fue de acceso continuo para los animales.

Para la inducción del cáncer se administraron por vía subcutánea 21 mg/kg de DMH una vez por semana durante 8 semanas. La DMH se preparó en EDTA (0.37 mg/ml) y NaCl (0.9%).

Como agente quimioprotector se utilizó luteína disuelta en aceite de maíz, la cual se administró por vía intragástrica a una concentración de 0.30, 3.0 y 15.0 mg/kg/día dos veces por semana. El tratamiento con luteína se inició en la primera semana posterior al término de la administración del DMH. Se consideró un grupo control el cual consistió en DMH y aceite.

Todas las ratas fueron sacrificadas a las 20 semanas después de haber iniciado el tratamiento con la DMH.

V.2.2. Disección del colon

Al término de las 20 semanas se realizó la extracción del colon de la siguiente manera:

- Las ratas fueron anestesiadas con éter etílico inhalado. Posteriormente se realizó una incisión en la cavidad abdominal para extraer el colon desde el ciego hasta el recto (Figura 6).
- Se realizó un corte longitudinal para exponer la mucosa interna del colon, la cual se lavó con solución fisiológica (0.9%) estéril y fría. El colon se extendió sobre una superficie de corcho sobre hielo.

V.2.3. Análisis macroscópico

Una vez fijado el intestino sobre el corcho, se identificó su morfología dividiéndolo en 3 zonas: zona proximal, zona media y zona distal. Se analizó el tejido macroscópicamente y se midió el área (cm²) de placas y pólipos con un vernier de 0.1 mm de graduación, midiendo lado por lado.



Figura 6. Disección del colon de las ratas Sprague-Dawley

V.2.4. Perfil espectrofotométrico y cromatográfico de la luteína utilizada en los estudios *in vivo*.

Para confirmar la calidad de la luteína utilizada en el presente trabajo se realizó un barrido espectrofotométrico en las regiones ultravioleta visible de 330 a 550 nm, utilizando como estándar luteína pura. Las muestras fueron disueltas en hexano (80 %), metanol (10 %) y acetona (10 %) (AOAC, 1997).

V.2.4.1 Identificación de la luteína en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

Para la adecuada identificación de los componentes del material administrado, se usó un cromatógrafo de líquidos GBC modelo 9050, equipado con una bomba cuaternaria y sistema desgasificador. Se inyectaron muestras que contenían 100 microlitros del pigmento saponificado. Se llevó a cabo la separación de carotenoides usando una columna de sílica OH (SGE BPX5 de SGE Internacional). Se manejó una fase móvil de 67.5 % de hexano, 1.5 % de isopropanol y 32.5 % de acetato de etilo, con un flujo de 1.0 ml/min bajo condiciones isocráticas. La separación se realizó a temperatura ambiente. Los pigmentos se monitorearon usando un detector UV a 447 nm, con 1 segundo y 2 nm como tiempo y resolución, respectivamente. Los picos en el cromatograma se asociaron a un componente en particular por medio de la

comparación del tiempo de retención. El perfil de concentración de los componentes se obtuvo usando el porcentaje relativo del área de integración para cada señal y el área total de las señales obtenidas en el cromatograma de HPLC (Navarrete-Bolaños y col., 2001).

V.2.5. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante ANOVA utilizando el paquete estadístico JMP versión 4.0.4 para Windows (SAS® Institute Inc., 1989-2001). Las determinaciones se basaron considerando a cada rata como unidad experimental, para las determinaciones de ganancia de peso corporal, multiplicidad de placas y pólipos, número promedio de placas y pólipos y área de placas y pólipos, basándonos en las pruebas de Tukey-Kramer HSD, considerando el valor de $\alpha = 0.05$ o $\alpha = 0.1$. Se utilizó a cada tratamiento como unidad experimental para las determinaciones de % de supervivencia, % de incidencia de placas y pólipos y % de distribución de pólipos aplicando el método de χ^2 considerando un valor de $\alpha = 0.05$ y $\alpha = 0.1$. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM.

VI. RESULTADOS

VI. 1. Efecto de diferentes dosis de luteína sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con DMH

VI.1.1. Ganancia de peso corporal

Para evaluar el efecto de tratamiento de diferentes dosis de luteína sobre el cáncer de colon, se empleó como modelo de carcinogénesis a las ratas Sprague-Dawley administradas con el carcinógeno DMH durante 8 semanas. Se realizó un registro de peso corporal durante este periodo de tiempo, para evaluar el efecto del estrés provocado por dicha inducción en el peso corporal de los animales.

Posteriormente se administraron diferentes dosis de luteína (0.3, 3.0 y 15.0 mg/kg) que se dieron una semana posterior al término de la inducción de cáncer, registrando semanalmente el peso corporal de las ratas durante 12 semanas. Con respecto al peso corporal de los animales de esos tratamientos, en la Figura 7 se muestra un comportamiento similar entre todos los diferentes grupos en la etapa de inducción de cáncer. Sin embargo, después de administrar la luteína se observa que los grupos tratados con 0.30 y 3.0 mg/kg de luteína presentan un ligero incremento en el peso (360.8 ± 17.2 y 379.7 ± 15.4 , respectivamente, para la última semana) comparado con los demás grupos (0 mg/kg y 15.0 mg/kg; 340.2 ± 19.8 y 319.5 ± 16.2 , respectivamente, para la última semana), aunque, no presentan una diferencia estadística significativa ($\alpha = 0.05$).

VI.1.2. Índice de sobrevivencia

Para evaluar la capacidad quimioprotectora del tratamiento de luteína sobre los animales tratados con DMH se registró diariamente el número de animales que no

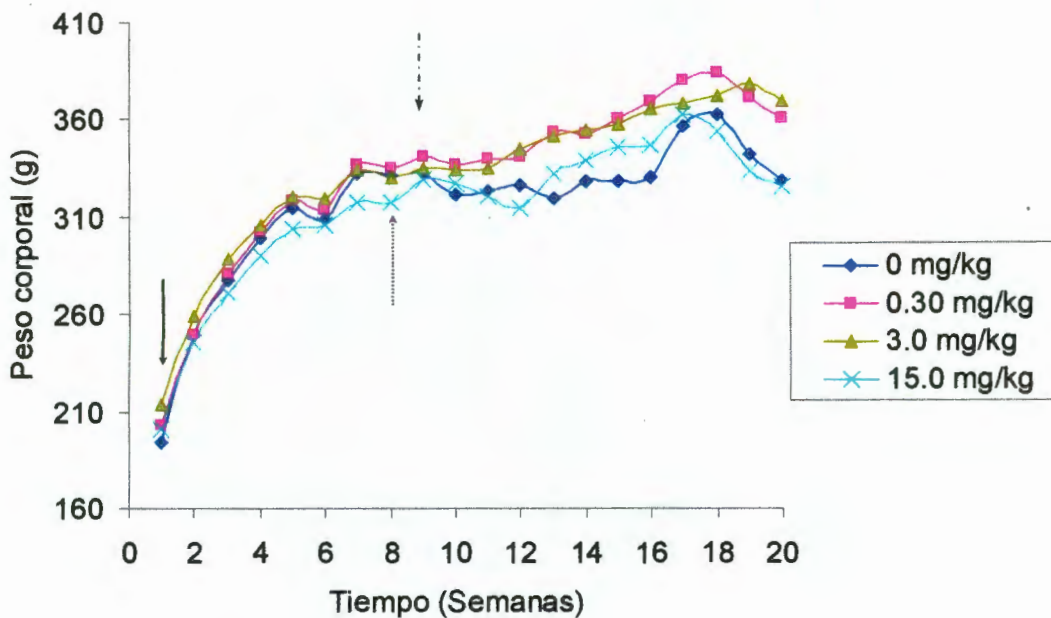


Figura 7. Curva de ganancia de peso corporal de los animales tratados con diferentes dosis de luteína.

La flecha (↓) nos indica la primera administración del carcinógeno DMH.

La flecha (↑) nos indica la última administración del carcinógeno DMH.

La flecha (⋮) nos indica el inicio del tratamiento con las distintas dosis de luteína.

Grupo control positivo (0 mg/kg) (n=12), 0.3 mg/kg de luteína (n=11), 3.0 mg/kg de luteína (n=11), 15.0 mg/kg de luteína (n=11).

sobrevivieron durante el periodo experimental. En la Figura 8 se muestra el porcentaje de sobrevivencia de los diferentes tratamientos. Durante las primeras 8 semanas de inducción de cáncer no hubo mortalidad en ninguno de los grupos de experimentación, por tal motivo sólo se presentan las semanas de tratamiento con las diferentes dosis de luteína. En dicha figura se refleja que las dosis que presentan mayor sobrevivencia son la de 3.0 y 15.0 mg/kg de luteína (de 80 a 100%), debido tal vez al efecto protector del tratamiento. La dosis de 0.3 mg/kg tuvo un 70% de sobrevivencia al finalizar el tratamiento, y por último el grupo control 0 mg/kg fue el que tuvo un mayor número de muertes, resultando

solamente un 50% de sobrevivencia, sin embargo, esto no presentó diferencia estadística significativa. Lo anterior se pudo deber a la toxicidad del carcinógeno y la ausencia de un agente protector. No se encontró diferencia estadística significativa ($\alpha = 0.05$).

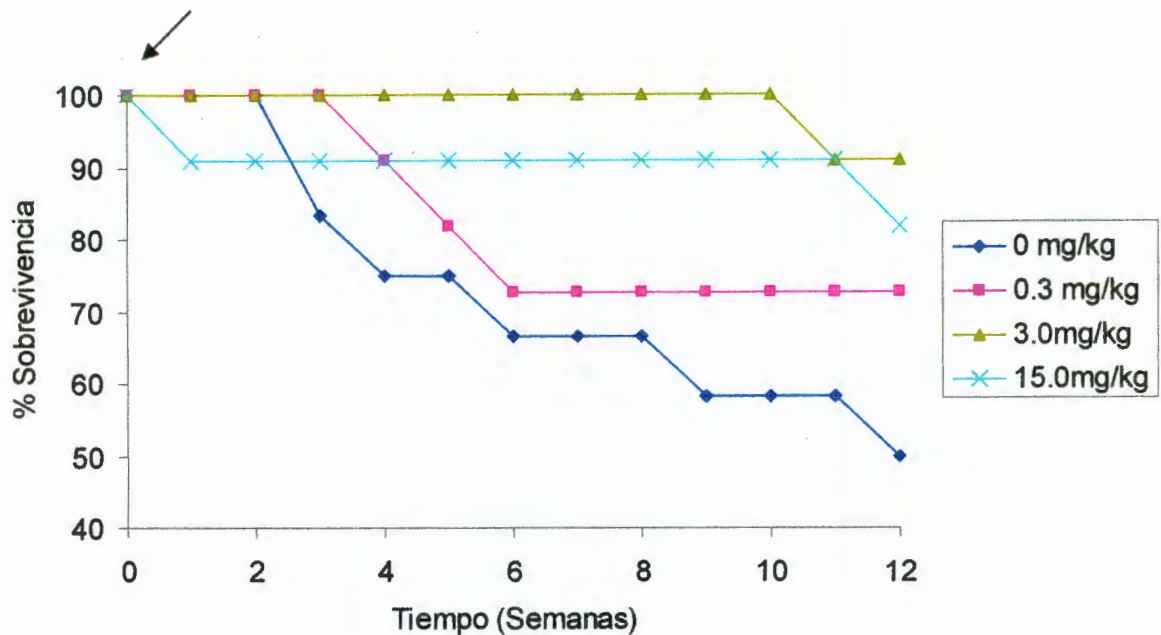


Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia de los animales tratados con diferentes dosis de luteína.

La flecha (↓) indica el inicio de la administración de la luteína.

Grupo control positivo (0 mg/kg de luteína) (n=12), 0.3 mg/kg de luteína (n=11), 3.0 mg/kg luteína (n=11), 15.0 mg/kg de luteína (n=11); (n) significa el número de animales por grupo al inicio del tratamiento con luteína. Grupo control positivo (0 mg/kg) (n=6), 0.3 mg/kg (n=8), 3.0 mg/kg (n=10), 15.0 mg/kg (n=9), donde n es el número de animales por grupo al final del tratamiento con luteína.

VI.1.3. Incidencia de placas y pólipos

La incidencia es un parámetro utilizado para determinar el número de animales que presentaron pólipos (considerándose un estado avanzado del cáncer de colon) o placas (un estado temprano del cáncer de colon en este modelo) del total de animales utilizados en experimentación. Para el caso de pólipos, en la Figura 9 se observa que los tratamientos con luteína presentaron un efecto contrario al esperado, ya que todos los grupos evaluados presentaron un mayor número de animales con pólipos, siendo el grupo control positivo el que obtuvo el menor número de animales con pólipos. El grupo tratado con dosis de 3.0 mg/kg presenta el 100% de incidencia, siendo la dosis de 15.0 mg/kg la que presenta menor porcentaje (78%), y 0 mg/kg solo provoca un 67 % de incidencia. Este resultado tal vez se debe a que la luteína a la concentración administrada favoreció la acción carcinogénica de la DMH.

Otro parámetro evaluado fue la incidencia de las placas, las cuales también muestran un porcentaje mayor los grupos tratados con las diferentes dosis de luteína. Las dosis mayores 3.0 y 15.0 mg/kg provocaron 100% de incidencia, mientras que el de 0.3 mg/kg (86%) fue similar al del control positivo 0 mg/kg (83%), no presentando una diferencia estadística significativa ($\alpha = 0.05$).

VI.1.4. Multiplicidad de placas y pólipos

La multiplicidad determina el número total de pólipos por animal que presenta pólipos, el mismo parámetro se utiliza para placas. Lo que permite evaluar el efecto de cada tratamiento de manera individual.

En la figura 10 se observa que los animales tratados con 0.3, 3.0 y 15.0 mg/kg de luteína presentan 2.0 ± 0.4 , 2.2 ± 0.3 y 1.3 ± 0.4 pólipos por animal, respectivamente, siendo el control positivo (0 mg/kg) el grupo con menor número

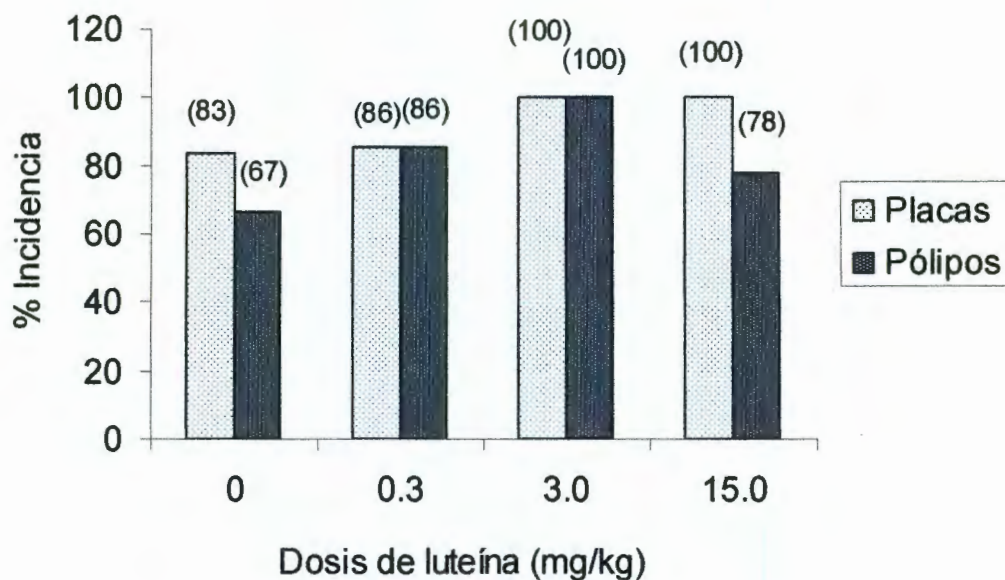


Figura 9. Porcentaje de incidencia de placas y pólipos de los animales tratados con diferentes dosis de luteína.

Los valores entre paréntesis representan los porcentajes de animales de cada grupo de experimentación que presentaron placas y pólipos.

(0 mg/kg, n=6; 0.3 mg/kg, n=8; 3.0 mg/kg, n=10; 15.0 mg/kg, n=9).

de pólipos por animal (1.0 ± 0.5). El análisis estadístico de estos resultados indica que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$). Sin embargo, para la multiplicidad de placas el grupo con mayor número de placas/animal es la dosis de 15.0 mg/kg (1.9 ± 0.3), comportándose de manera similar al control (1.8 ± 0.4); la dosis de 3.0 mg/kg presenta 1.7 ± 0.3 y la dosis de 0.3 mg/kg es la que tiene el menor número de placas/grupo con un valor de 1.3 ± 0.3 , no encontrándose diferencia estadística significativa entre los tratamientos, estos resultados demuestran que los animales que presentan lesiones mas agresivas como el caso de pólipos, tienden a presentar un mayor número de éstas, por lo tanto parece ser que la luteína potencia la acción de la DMH.

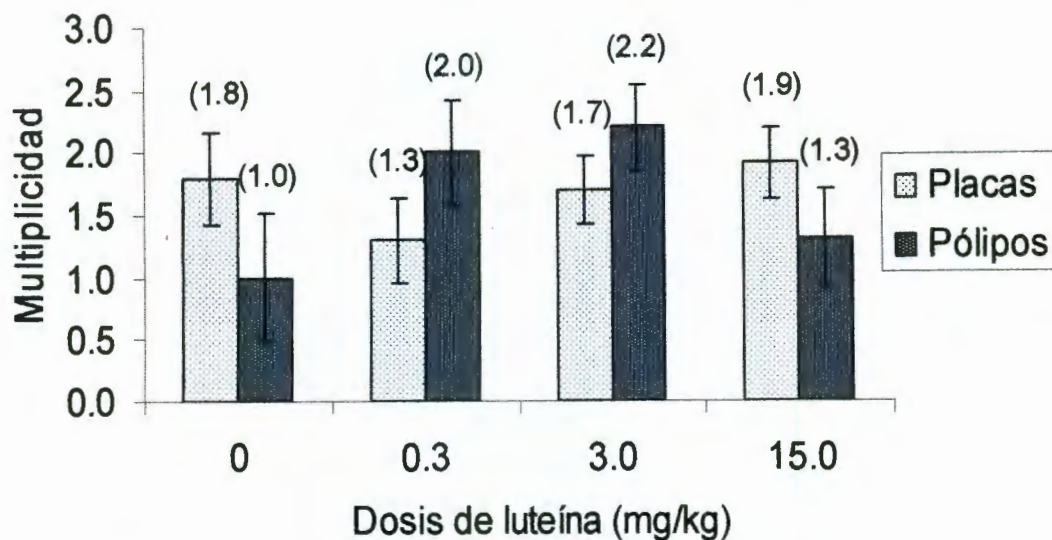


Figura 10. Multiplicidad de placas y pólipos de animales tratados con diferentes dosis de luteína.

Los valores representan el número promedio de placas y pólipos por animal que desarrolló placas o pólipos de cada grupo de experimentación.

(0 mg/kg, n=4; 0.3 mg/kg, n=6; 3.0 mg/kg, n=9; 15.0 mg/kg, n=7).

VI.1.5. Número promedio de placas y pólipos

El número promedio de pólipos o placas se define como la relación entre el número total de pólipos o placas y el total de animales utilizados en el grupo experimental.

En la figura 11 se muestra que la dosis que presenta mayor número de pólipos por animal es la dosis de 3.0 mg/kg (2.2 ± 0.4), siendo el control (0 mg/kg) el grupo que presenta el menor número promedio de pólipos (0.7 ± 0.4), resultando diferentes significativamente, así mismo, también presenta diferencia significativa con la dosis de 15.0 mg/kg (1.0 ± 0.4) (Tukey-Kramer HSD, $\alpha=0.1$). Siendo estos resultados no favorables para las distintas dosis de luteína, mostrando así mismo, el efecto prooxidante ocasionado.

Respecto al número promedio de placas, la dosis de 15.0 mg/kg tiene el mayor número de placas (1.9 ± 0.3), siendo el grupo de 0.3 mg/kg el que tiene el menor número promedio (1.1 ± 0.3), comportándose de manera muy similar la dosis de 3.0 mg/kg (1.7 ± 0.3) y 0 mg/kg (1.5 ± 0.4), sin embargo, esto no fue diferente significativamente ($\alpha = 0.05$). La presencia de mayor número de placas y pólipos en los animales tratados con luteína, sugiere que dicho tratamiento incrementa no sólo lesiones avanzadas (pólipos) sino también lesiones tempranas (placas) que pudieran progresar a pólipos durante la progresión del cáncer.

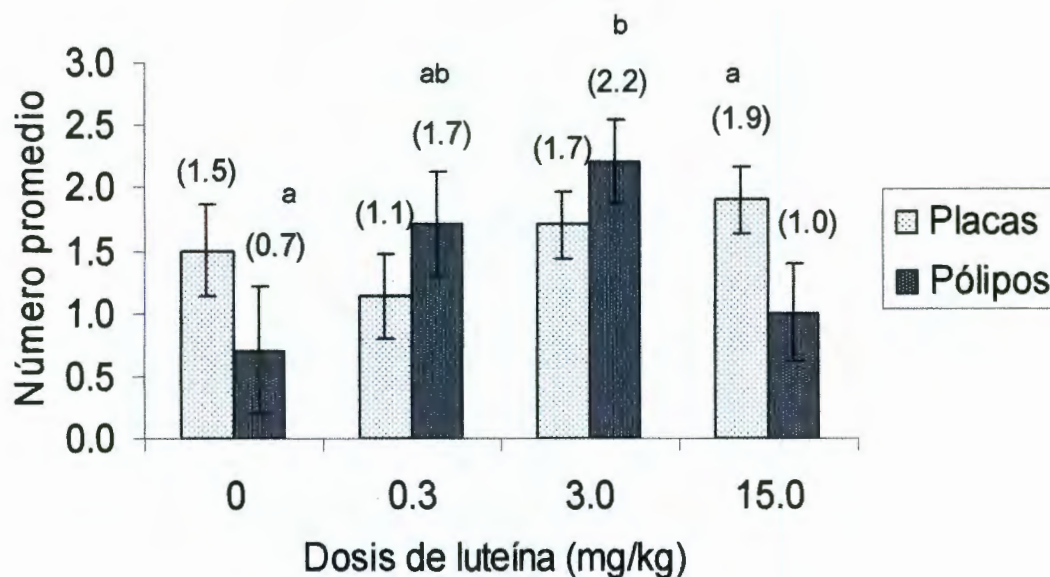


Figura 11. Número promedio de placas y pólipos de animales tratados con diferentes dosis de luteína.

Los valores entre paréntesis representan el número promedio de placas y pólipos por animal de experimentación.

Las letras entre paréntesis indican diferencia estadística significativa para los pólipos (Tukey-Kramer HSD, $\alpha = 0.1$).

(0 mg/kg, n=6; 0.3 mg/kg, n=8; 3.0 mg/kg, n=10; 15.0 mg/kg, n=9).

VI.1.6. Área de placas y pólipos

En la mayoría de los tumores malignos de rata, su tamaño tumoral está relacionado con el incremento del riesgo de mortalidad del 7% por centímetro de longitud tumoral (Piñols, 1995). Por lo tanto, este parámetro es importante considerar en los estudios de quimioprotección.

Se hizo la comparación en los diferentes tratamientos del tamaño de los pólipos y placas desarrolladas, por efecto del tratamiento se considera el área (LxL) para registrar el tamaño del pólipo y/o placa. Las áreas de los pólipos de los animales tratados con luteína (3.0 y 15.0 mg/kg fue 0.25 ± 0.04 y 0.20 ± 0.04 cm², respectivamente) fue ligeramente mayores a los presentados por el grupo 0 mg/kg (0.19 ± 0.05). Sin embargo, estos valores no fueron estadísticamente significativos ($\alpha = 0.05$). Un efecto muy similar fue observado en las placas de los animales tratados con 3.0 mg/kg, siendo esta dosis la que desarrolló las placas mas grandes (0.26 ± 0.03 cm²) comparado con los demás grupos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Área de placas y pólipos colónicos de animales tratados con diferentes dosis de luteína.

Dosis de luteína	Placas (cm ²)	Pólipos (cm ²)
0 mg/kg	0.22±0.06	0.19±0.05
0.3 mg/kg	0.21±0.03	0.19±0.06
3.0 mg/kg	0.26±0.03	0.25±0.04
15.0 mg/kg	0.25±0.03	0.20±0.04

VI.1.7. Distribución de pólipos

La localización de los pólipos a lo largo del colon se consideró como una variable cualitativa importante, ya que pudiera determinar las características de agresividad de los pólipos. La localización de la muestra se realizó de acuerdo a tres categorías: proximal, media y distal. Se eligió esta división del intestino para asemejar la forma en como se reportan los datos de incidencia para humanos.

En la Figura 12 se puede apreciar que el grupo de 0 mg/kg sólo desarrolló pólipos en la zona proximal, mientras que los grupos tratados con luteína a 0.3 y 3.0 mg/kg su distribución cambia, disminuyendo los tumores en la zona proximal en un 42-45% respectivamente, e incrementándose en la zona media y distal. Para los animales tratados con 15.0 mg/kg no se detectaron pólipos en la región distal del colon, no encontrándose diferencia significativa ($\alpha = 0.05$).

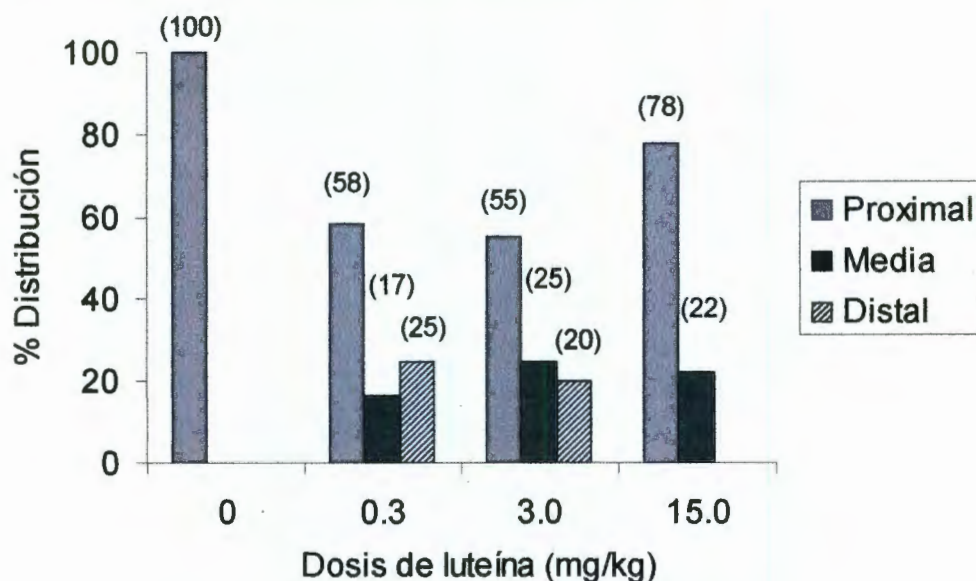


Figura 12. Distribución de los pólipos en las diferentes zonas del colon de animales tratados con diferentes dosis de luteína.

Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de distribución de los pólipos por grupo de experimentación.

(0 mg/kg, n=6; 0.3 mg/kg, n=8; 3.0 mg/kg, n=10; 15.0 mg/kg, n=9).

VI. 2. Perfil espectrofotométrico y cromatográfico de la luteína

VI.2.1. Perfil espectrofotométrico de la luteína

Para descartar que el efecto promotor de la luteína en el cáncer de colon pudiera atribuirse a la presencia de compuestos oxidados, se decidió llevar a cabo una evaluación espectrofotométrica.

El espectro UV-V en hexano-metanol-acetona (80:10:10 %) que se observa en la figura 13, es típico de la luteína según se observa en dicha figura, presentándose las tres señales características de este carotenoide, las cuales se encuentran en 421, 443 y 472 nm, sin ninguna otra señal adicional.

VI.2.2. Perfil cromatográfico de la luteína

Para corroborar el resultado anteriormente mencionado se llevó a cabo una identificación utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En la Figura 14 se presenta el resultado obtenido de un estándar de luteína y una muestra de luteína utilizada como tratamiento en este estudio. Las señales en el cromatograma se asociaron a un componente en particular por medio de la comparación del tiempo de retención. La señal detectada al minuto 7.742 en el estándar (A) y la señal detectada al minuto 7.700 en la muestra de experimentación (B) representan la luteína o *trans*-luteína. No se detectó ninguna señal adicional que pudiera indicar degradación de la luteína en ninguno de los cromatogramas.

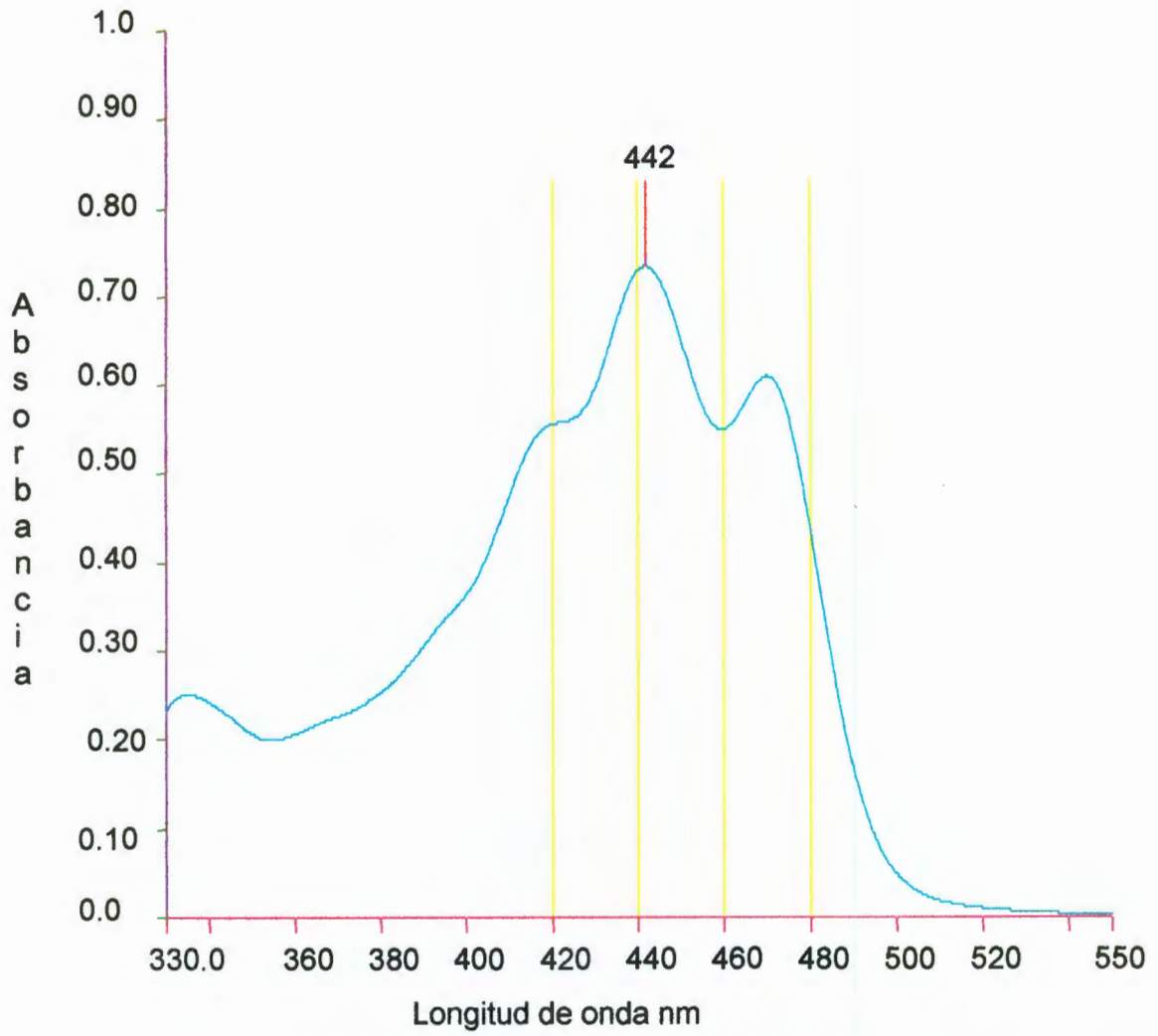
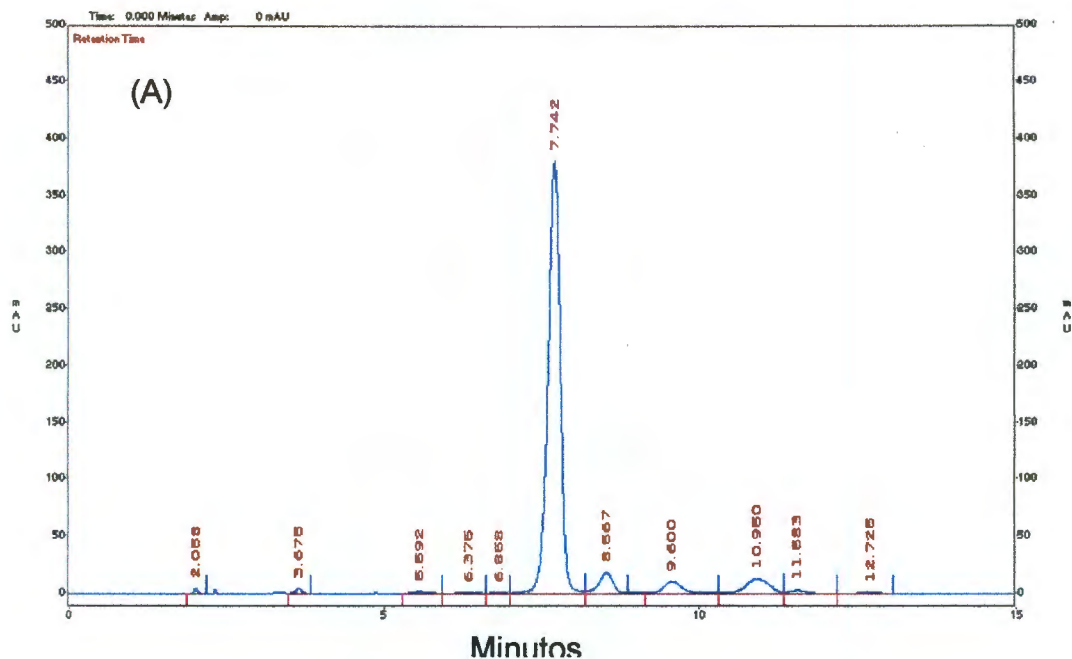
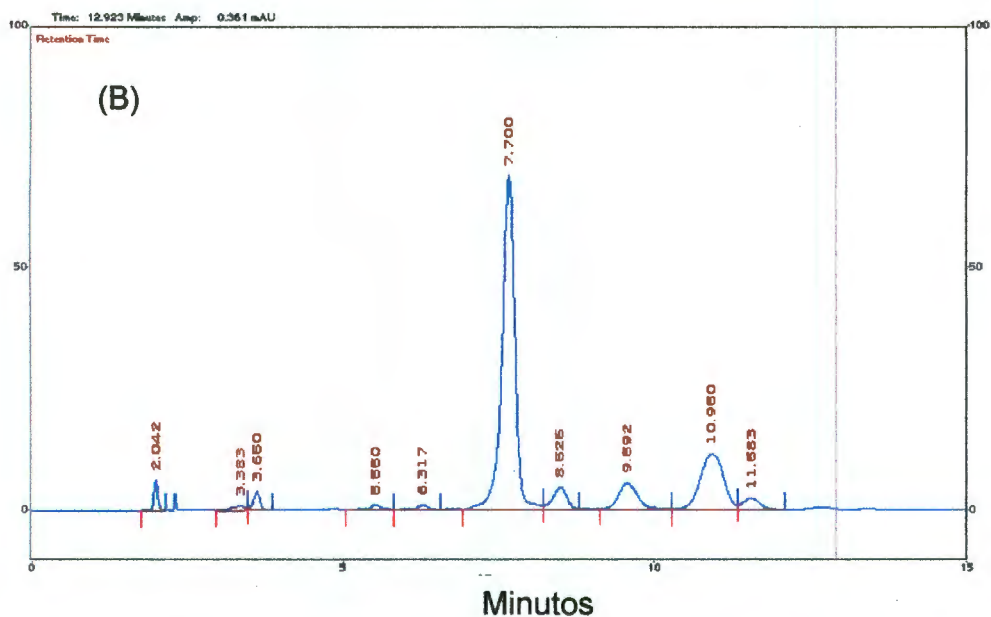


Figura 13. Espectro de absorción de la luteína disuelta en hexano-metanol-acetona (80:10:10 %).



(A). *trans*-luteína (7.742 min), *trans*-zeaxantina (8.567 min), 9 o 9'-*cis*-luteína (9.600 min), 13 o 13'-*cis*-luteína (10.950 min) y 15-*cis*-luteína (11.583 min).



(B). *trans*-luteína (7.700 min), *trans*-zeaxantina (8.525 min), 9 o 9'-*cis*-luteína (9.592 min), 13 o 13'-*cis*-luteína (10.950 min) y 15-*cis*-luteína (11.583 min).

Figura 14. Espectros cromatográficos del estándar de luteína (A) y de la muestra de luteína utilizada como tratamiento en el presente estudio (B).

VII. DISCUSION

El consumo de frutas y vegetales con altas concentraciones de carotenoides está asociado con un menor riesgo de cáncer de colon y dentro de los carotenoides con mayor capacidad de protección está la luteína (Slattery y col., 2000). Se ha demostrado que la incorporación de la luteína en la dieta tiene la capacidad de reducir en un 43% el número de tumores en ratas Sprague – Dawley, en el cáncer de colon inducido con el carcinógeno DMH, en un periodo de 20 semanas (Ferriz, 2005). Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que demuestren el efecto que tiene este carotenoide cuando es utilizado a altas dosis para fines terapéuticos. Los tumores de colon inducidos por DMH es uno de los modelos más utilizados en oncología experimental para estudiar varios aspectos de la morfología, patogénesis, prevención y tratamiento del cáncer (Tsunoda y col., 1994). En este modelo experimental en rata se desarrollan tumores con características histopatológicas muy similares a los tumores de colon observados en humanos. En este estudio se evaluaron diferentes dosis de luteína 0.3, 3.0 y 15.0 mg/kg administrada dos veces por semana, por vía intragástrica, una vez terminada la inducción con el carcinógeno DMH y dichos tratamientos mostraron un efecto protector sobre la ganancia de peso y mortalidad de los animales inducidos con DMH. Visek y col. (1991) realizaron un estudio con ratones los cuales fueron tratados con una sola dosis de 26 mg/kg de DMH para machos y una sola dosis de 60 mg/kg para hembras. Estos animales mostraron un menor consumo de alimento y menor ganancia de peso corporal comparado con los animales que no recibieron DMH. Así mismo, la DMH provocó cambios importantes histopatológicos en el hígado tales como hepatitis y cirrosis, daños en los riñones y el corazón, los cuales finalmente pueden provocar la muerte del animal. El mecanismo especulado se ha relacionado con una saturación de los procesos de destoxificación de la DMH en el hígado seguido por el riñón. En base a esta información la mortalidad producida por la DMH en nuestro estudio se puede atribuir a la toxicidad hepática o renal. La luteína es un pigmento que al ser ingerido es absorbido fácilmente, encontrándose en el plasma y en algunos tejidos tales como hígado y bazo. El

hígado parece ser el principal órgano de almacenamiento de la luteína en los ratones. Una sola administración de luteína en humanos muestra un incremento significativo en el plasma a las 16 horas después de dicha administración (Soon y col., 1998b). Siendo el hígado el principal órgano de almacenamiento de la luteína, se sugiere que éste carotenoide puede proteger contra la toxicidad de la DMH y, por lo tanto, se puede presentar menor mortalidad en los animales tratados con este carotenoide. Sin embargo, la luteína no tiene impacto en el colon.

Nuestros resultados indican que altas concentraciones de luteína incrementan la progresión de cáncer de colon. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Soon y col., (1998a) los cuales muestran que la luteína incorporada en la dieta tiene la capacidad de disminuir el desarrollo de tumores de mama en ratones solamente cuando ésta es adicionada a bajas concentraciones (0.002 % o 0.97 mg/kg). Sin embargo, a concentraciones mayores a 0.02 % disminuye el efecto protector de este carotenoide. Por lo tanto, una de las principales razones por la cual la luteína no mostró un efecto de protección contra el desarrollo del cáncer de colon, puede ser atribuido a la dosis de luteína utilizadas en dicho experimento, la cual incrementó el crecimiento del tumor en vez de inhibirlo.

Cabe aclarar que la dosis de 0.0006 % (utilizada como mas baja en este experimento) aparentemente una dosis mas baja a la de 0.002 % corresponde a 0.3 mg/kg de peso corporal en una sola dosis, por el contrario, Soon (1998a) administra su dosis a lo largo de 24 horas. Esto significa que el animal bajo tratamiento tendría que consumir de una sola vez 1/3 de su dieta total diaria para alcanzar nuestros niveles de luteína.

Algunos estudios sugieren que la actividad de lipoperoxidación podría estar relacionada con el crecimiento tumoral. Altos niveles de luteína en la dieta conlleva a alta concentración de luteína en los tejidos, lo cual puede crear un ambiente prooxidante en lugar de un ambiente antioxidante (Soon y col., 1998a). Se ha demostrado que los carotenoides poseen tanto actividad antioxidante como prooxidante y la diferencia de dichos efectos depende de la concentración de carotenoides utilizados, así como el sistema modelo de estudio. En base a estos reportes se sugiere que la concentración de luteína utilizada en nuestro estudio es

capaz de inducir lipoperoxidación lipídica y por lo tanto, promover el desarrollo de cáncer de colon.

Por otro lado, se ha reportado que la suplementación con β -caroteno conduce a la activación de enzimas de fase I y a la generación de estrés oxidativo. Esto indica que el β -caroteno y algunos carotenoides pueden actuar como co-carcinógenos (sustancia química que promueve la acción de un carcinógeno, pero no induce cáncer por sí misma) y la diferencia entre la actividad antioxidante y pro-oxidante va a depender de la presión parcial del oxígeno celular ya que cuando ésta sea baja actuará como antioxidantes y a altas presiones de oxígeno participara como pro-oxidante. Esta característica puede ser el resultado de la formación de metabolitos oxidados, los cuales incrementarán la peroxidación lipídica y la formación de productos oxidados del DNA. Altas tensiones del oxígeno no se logran en el intestino grueso pero los metabolitos producidos por DMH podrían incrementar la producción de metabolitos oxidados de la luteína (Peto y col., 1981; Burton y col., 1984) y con esto potenciar la prooxidación.

Se ha demostrado que en la mucosa del colon con cáncer existe un incremento de estrés oxidativo, el cual potencialmente conduce a daño en el DNA. Pacientes con concentraciones elevadas de carotenoides en plasma presentan bajos niveles de éstos en las muestras polipoides, lo cual puede ser debido a un incremento en la actividad pro-oxidante en estos pólipos (Mühlhöfer y col., 2003).

En nuestro estudio la luteína utilizada como agente quimioprotector se encontraba no esterificada. Bowen y col. (2002), sugieren que a dosis de 0.28 a 0.38 mg/kg de peso corporal, la biodisponibilidad de la luteína no es afectada ni por la forma esterificada, ni por la formulación (vehículo). Abido a que en nuestro estudio, se emplearon también concentraciones 10 y 15 veces mayores (3 y 15 mg/kg respectivamente), y que la luteína fue administrada por vía intragástrica un porcentaje muy importante podría encontrarse directamente en el colon y favorecer las reacciones de oxidación bajo las condiciones propias del intestino grueso.

En este estudio se escogió una división del intestino como proximal, media y distal, siendo similar a la que se reporta en los datos de incidencia para humanos. En los resultados que reporta Piñols (1995) se observa una similitud con el presente estudio, teniendo también un mayor predominio en la zona proximal. Además de los criterios anatómo-morfológicos por regiones del colon, existen también diferencias fisiológicas y citológicas importantes entre las zonas del intestino grueso. Zhan y col., (1998) estudiaron el metabolismo de los colonocitos durante el proceso de carcinogénesis, reportando una depresión en la producción de energía, lo que provocaba una inhibición en el proceso de reparación del daño al DNA y de la apoptosis. Stralka y Strobel (1991) reportan una distribución mayor del citocromo P450 en la zona proximal, de esta forma existe una mayor activación de la DMH en la zona proximal a través de este citocromo, lo que correlaciona con los datos obtenidos en cuanto al número de pólipos presentes en la zona proximal de este estudio.

La luteína tiene la posibilidad de formar isómeros debido a su inestabilidad, formando señales a 330 nm. Esta señal no fue detectada en la muestra, lo que nos ayuda a descartar que los resultados obtenidos no se debieran a la degradación de la luteína, sino a la concentración administrada. La finalidad de realizar el estudio espectrofotométrico fue hacer una comparación de perfiles entre la luteína estándar y la utilizada en el tratamiento, mostrando señales de isómeros de luteína y así mismo, un comportamiento muy similar. Dichos isómeros se atribuyen al almacenamiento e iluminación de la luteína. En un estudio reportado por Meléndez-Martínez (2004) evalúan α -caroteno, β -caroteno y luteína mantenidos en la oscuridad a diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C y 45 °C), obtenido como isómeros mayoritarios, para el caso de la luteína 13-*cis*-luteína. La iluminación favoreció la formación de 9-*cis*-luteína.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ La luteína administrada a altas concentraciones (3.0 y 15.0 mg/kg) protege contra la toxicidad producida por la DMH, medida como mortalidad.
- ❖ La administración con luteína incrementa la incidencia, multiplicidad, número promedio de pólipos y tamaño de pólipos de manera dependiente a la dosis, para 0.3 y 3.0 mg/kg.
- ❖ La luteína administrada como tratamiento en este estudio no presentó ninguna señal que indicara su oxidación o degradación y que pudiera estar relacionada con el efecto co-carcinogénico presentado en animales tratados con DMH.
- ❖ Altas concentraciones de luteína (0.3, 3.0 y 15.0 mg/kg) no son recomendables para ser utilizadas como tratamiento para el cáncer de colon.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1996.** Cáncer, en: *Biología molecular de la célula*. 3a. ed. Ediciones omega, Barcelona: 1345-1385.
- Anuario Estadístico Querétaro de Arteaga, 2001.** INEGI.
- AOAC, 1997.** Official Methods of analysis of AOAC International. 16 ed. Ediciones AOAC internacional, Cunnif, P. Maryland: 45: 5-6.
- Badui, S. D. 1993.** *Química de los Alimentos*. 3ª Ed. Edit. Pearson educación: 380-385.
- Bishop, J. M. 1991.** Molecular theme in oncogenesis. *Cell*. Vol. 74: 235-248.
- Bowen, P. E., Herbst-Espinosa, S. M., Hussain, E. A., y Stacewocz-Sapuntzakis, M. 2002.** Esterification does not impar lutein bioavailability in humans. *American Society for Nutritional Sciences*. Vol. 132: 3668-3673.
- Burton, G. W., y Ingold, K.U. 1984.** b-Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*. Vol. 224: 569-573.
- Catalán, V., Honorato, F., García, E., Bandrés, N., Zabalegui, R., Zárate, E., Salgado, J. y García-Foncillas, D. 2002.** Carcinogénesis colónica: proceso de transformación neoplásica. *Revista médica universidad Navarra*. Vol. 47: 15-19.
- Collins, A. R. 2001.** Carotenoids and genomic stability. *Mutation research*. Vol. 475: 21-28.
- Cotran, R. S., Kumar, V. y Collins, T. 2000.** *Patología estructural y funcional*. Editorial McGraw Hill-Interamericana. México. Vol. 8: 277-347.
- DeVita, V., Hellman, S. y Rosenberg, S. 1997.** *Cáncer, principios y práctica de oncología*. Editorial Medica Panamericana. Vol. 1: 35-36.
- Fearon, E. R., y Volgestein, B. A. 1990.** A genetic model for colorrectal tumorigenesis. *Cell*. Vol. 61: 759-767.
- Ferriz, M. R. A. 2005.** Efecto de la luteína sobre la expresión de las proteínas K-ras, MAPK, b-catenina y Akt/PKB, durante las fases de prevención y tratamiento de cáncer de colon. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias en Tecnología de los Alimentos: 44-56.

- Flórez, J. 2000.** Farmacología humana. 3ª. ed. Editorial masson, Barcelona: 927-940.
- García G. M. T de J. 1996.** Efecto de carotenoides sobre la citotoxicidad y genotoxicidad de dietilnitrosamina en cultivo de hepatocitos. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias en Tecnología de los Alimentos: 13-17.
- González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., Ortiz-Muñiz, R. 2000.** Daño oxidativo y antioxidantes. Bioquímica. Vol. 25: 3-9.
- Gross, J. 1991.** Pigments in vegetables. Chlorophylls and carotenoids. Editorial Avi. Book, New York: 175-270.
- Grunberger, D., y Goff, S. 1987.** Mechanisms of cellular transformation by carcinogenic agents. 1ra. Ed., Pergamon press, New York: 1 – 25, 39 – 57.
- INEGI, 2001.** Estadísticas del sector salud y seguridad social. Cuaderno No. 17: 29-67, 143-164.
- Krinsky, N. 1989.** Carotenoids and cancer in animal models. Journal of Nutrition. Vol. 119: 123-126.
- Leal, P. M. 1998.** Mecanismo de acción de la luteína, el licopeno y el ester apocarotenoico sobre el efecto citotóxico y genotóxico de la toxina T-2 en pollos en engorda. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias en Tecnología de los Alimentos: 18-24.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. 2002.** Biología celular y molecular. 4a Ed. Editorial Medica Panamericana: 1054-1081.
- Mares-Perlman, J; Millen, A; Ficek, T. y Hankinson, S. 2002.** The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in deleying chronic disease. Journal of Nutrition. Vol. 132: 518S-524S.
- Martin, K. R., Eaila, M. L. y Smith, J. C. 1996.** b-Carotene and lutein Project HepG2 human liver cells against oxidant-induced damage. Journal of Nutrition. 126: 2098-2106.
- McCance, K. L., y Huether, S. E. 1994.** Pathophysiology, en: The biologic basic for disease in adults and children. 2a. Edición. Editorial Mosby, Missouri, EUA: 334.

- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., Heredia, F. J. 2004.** Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *ALAN*. Vol. 54 (2): 9-12.
- Moffett, D. F., Moffett, S. B. y Schauf, C. L. 1993.** Human physiology. 2a. ed. Editorial Wm. C. Brown Publishers, USA: 592-623.
- Montenegro, M. A., Negrete, S., Lértora, W. J. y Catouigno, M. S. 2003.** Focos de criptas displásicas inducidas con 1,2-dimetilhidrazina en intestino grueso de ratas tratadas con molibdeno y tungsteno. *Revista Veterinaria*. Vol. 14 (1): 14-19.
- Mühlhöfer, A., Bühler-Ritter, B., Frank, J., Zoller, W. G., Merkle, P., Bosse, A., Heinrich, F., y Biesalski, H. J. 2003.** Carotenoids are decreased in biopsies from colorectal adenomas. *Clinical Nutrition*. Vol. 22: 65-70.
- Murray, N. R., Davidson, L. A., Chapkin, R. S., Gustafson, W. C., Schattenbrg, D. G. y Fields A. P. 1999.** Overexpression of protein kinase C β_{II} induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *Journal of Cell Biology*. Vol. 145: 699-711.
- Naranjo-Modad, S., López-Munguía, A., Vilarem, G, Gaset, A., y Bárzana, E. 2000.** Solubility of purified lutein obtained from *Tagetes erecta* in supercritical O₂ and the effect of solvent modifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 48: 5640-5642.
- Navarrete-Bolaños, J. L., Jiménez-Islas, H., Rico-Martínez R., Domínguez-Domínguez, J. y Regalado-González, C. 2001.** A statistically based strategy for obtaining equilibrium data in xanthophylls lixiviation. *Food engineering and physical properties*. Vol. 66: 1143-1146.
- Negrette, S., Montenegro, M., Borda, J. T. y Burna, A. N. 2000.** Lesiones neoplásicas tempranas (LNT) y tumores del colon inducidos con 1,2-dimetilhidrazina (DMH) en ratas. *Revista Veterinaria*. Vol. 1: 1-4.
- OMS, 2005.** Organización mundial de la salud.
- Osawa, T., Kumon, H., Namiki, M., Kawakishi, S. y Fukuda, Y. 1990.** Antimutagenic heat stable antioxidants. *Prog. Clin. Biol. Res.* Vol. 347: 223-38.
- Pérez, P. L. M. 2000.** Estrés oxidativo: la paradoja del oxígeno. *Revista Cubana de Endocrinología*. Vol. 11 (3): 139-142.

- Peto, R., Doll, P., Buddey, J. D., y Sporn, M. B. 1981.** Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*. Vol. 19: 201-8.
- Piñols, C. 1995.** Estudios de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-dimetilhidracina. Barcelona, España. Universidad de Lleida. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias: 31-95.
- Ramos-Gómez, M. 1995.** Efecto antimutagénico de xantofilas presentes en la flor de cempasuchil (*Tagetes erecta*) y mecanismo de inhibición de luteína sobre 1-nitropireno y aflatoxina B1. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias en Tecnología de los Alimentos: 17-23, 32-34.
- Ríos, M., y Hernández, M. 2001.** Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Revista Cubana de Oncología*. Vol. 17: 65-71.
- Ribaya-Mercado, D., y Blumberg, B., 2004.** Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *American College of Nutrition*. Vol. 23: 567S-587S.
- Rojas-Espinosa. 2001.** Inmunología. 2a. ed. Medica Panamericana, México: 288-294.
- Slattery, M. L., Benson, J., Curtin, K., Ni Ma, K., Schaeffer, D., y Potter, J. D. 2000.** Carotenoids y colon cancer. *Am J Clin Nutr*. Vol. 71: 575 – 82.
- Soon, P. J., Chew, B., y Wong, T. 1998a.** Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/c mice. *Journal of Nutrition*. Vol. 128 (10): 1650-1656.
- Soon, P. J., Chew, B., y Wong, T. 1998b.** Dietary lutein absorption from marigold extract is rapid in BALB/c mice^{1,2,3}. *Journal of Nutrition*. Vol. 128 (10): 1802-1806.
- Stralka, D. y Strobel, H. W. 1991.** Characterization of cytochrome P450-dependent dimethylhydrazine metabolism in human colon microsomes. *Cancer*: 68: 2363-2369.
- Tsunoda, A., Shibusawa, M., Tsunoda, Y., Yasuda, N., Nakao., K., y Kusano, M. 1994.** A model for sensitivity determination of anticancer agents against chemically-induced colon cancer in rats. *Anticancer Research*. Vol. 14: 2637-2642.

- Villalón, B. C. 2004.** Efecto de la luteína sobre los genes K-ras y b-catenina durante la quimioprotección del cáncer de colon en ratas sprague-dawley. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias en Tecnología de los Alimentos: 29-34, 41-65.
- Visek, W. J., Clinton, S. K., Imrey, P. B., Thursh, D. R., Truex, C. R., Alster, J. M., Anderson, P. A., Mabry, F. J., Nandkumar, S., y Simon, J. 1991.** Dietary protein and chronic toxicity of 1,2-dimethylhydrazine fed to mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Vol. 32: 383-413.
- Watson, R. 2001.** Vegetables, fruits, and herb in health promotion. CRC: 4-5.
- Zhang, L. X., Cooney, R. V., Bertram, J. S. 1991.** Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their chemopreventive. *Carcinogenesis*. Vol. 12: 2109-2114.
- Zhang, J., Wu, G., Chapkin, R. S. y Lupton, J. R. 1998.** Energy metabolism of rat colonocytes changes during the tumorigenic process and is dependent on diet and carcinogen. *Journal of Nutrition*. Vol. 128: 1262-1269.