



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Efecto protector de la *Moringa oleifera* sobre un modelo de cáncer-inflamación en ratones ICR.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ADRIANA OJEDA CÁSTOL

Centro Universitario
Querétaro, Querétaro.
Junio, 2007
México



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Efecto protector de la *Moringa oleifera* sobre un modelo de cáncer-inflamación en ratones ICR.”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PRESENTA:

IBP. Adriana Ojeda Cástol

DIRIGIDO POR:

Dra. Minerva Ramos Gómez

SINODALES:

Dra. Minerva Ramos Gómez
Presidente

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Secretario

Dr. Thomas W. Kensler
Vocal

Dra. Eva González Jasso
Suplente

Dr. Guillermo Elizondo Azuela
Suplente

Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad

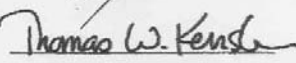
Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado



Firma



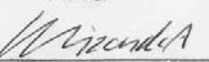
Firma



Firma



Firma



Firma

Centro Universitario
Querétaro, Querétaro.
Junio, 2007
México

“Of science and the human heart
There is no limit
There is no failure here sweetheart
Just when you quit...”

U2
Miracle Drug

AGRADECIMIENTOS

- Al CONACYT por la oportunidad y el apoyo brindados a través del Programa de Becas Nacionales, así como también del Programa de Becas Mixtas.
- A la Universidad Johns Hopkins por permitirme desarrollar mi proyecto como visitante científico en sus instalaciones.
- A la Dra. Minerva Ramos Gómez por su dirección, ejemplo e instrucción que contribuyeron a mi formación durante esta etapa académica y profesional.
- A mis sinodales: Dra. Eva González Jasso, Dra. Rosalía Reynoso Camacho y al Dr. Guillermo Elizondo Azuela por dedicarme su tiempo y atención para mostrarme el camino del conocimiento científico.
- Al Dr. Thomas W. Kensler por su orientación y por brindarme la oportunidad de participar en sus proyectos científicos y aprender de su experiencia.
- A los directivos, maestros y a todo el personal del posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro por sus todas sus enseñanzas y por impulsarme a lograr esta meta.
- A mis compañeros de la maestría que compartieron conmigo esta experiencia.
- A todos mis amigos que saben, desde lo más profundo de su corazón, cuanto valoro su ayuda, apoyo y cariño incondicionales que me brindaron durante esta etapa de mi vida.
- A Bill Osbourne, por ser mi Sen Sei, por su asertiva ayuda y asesoría tan atinada que me brindó a pesar del abismo cultural que existe entre los dos.
- A cada uno de los integrantes del laboratorio del Dr. Kensler: Melinda, Noubanou, Junko, Xiang, Pat Egner, Pat Dollan, Elin y Brian.

DEDICATORIA

- Reconozco el valor de mis padres, Enrique y Norma, y el de mis hermanos Patricia, Enrique, Angélica y Blanca María; es a ellos a quienes dedico este trabajo realizado con empeño y cariño.
- A la memoria de Don Delfino, Don José y Doña Ramoncita, quienes siempre me han acompañado con su ejemplo y testimonio de vida.

RESUMEN

El riesgo a padecer cáncer de colon se ve disminuido con el consumo de vegetales en la dieta, debido al efecto quimioprotector de ciertos fitoquímicos a través de la inducción de enzimas de fase 2 (EF2). La **moringa** es una planta con alto valor nutricional y con propiedades medicinales, cuyas hojas contienen glucosinolatos con elevado poder inductor de EF2. Sin embargo, aún no existen estudios que describan el efecto protector de la moringa en modelos animales. El objetivo del trabajo fue describir la contribución de la moringa en la inducción de EF2, así como evaluar su efecto protector contra el desarrollo del cáncer de colon. Para caracterizar el modelo de cáncer-inflamación del colon, ratonas **ICR** fueron tratadas con el carcinógeno **azoximetano** (7.5mg/kg, vía *i.p.*, 1 dosis, al día 0) y con **dextrán sulfato de sodio** (1 y 1.5% en agua de beber, del día 7 al 14), alimentadas con dieta control y dieta con el anti-inflamatorio **nimesulide** (0.04 p/p) y fueron sacrificadas a los 10, 13 y 35 días. Al evaluar el **proceso inflamatorio** a los 13 días, se encontraron **linfocitos** infiltrados, pocos **neutrófilos** y zonas con inflamación en los cortes histopatológicos de la mucosa del colon. Además, el número de fosas crípticas aberrantes (**FCA**) no se redujo en ratonas tratadas durante 35 días con la dieta con nimesulide. Para evaluar el efecto protector, primeramente se observó que los animales **aceptaron** la dieta con moringa (33% y 50% p/p) y no presentaron una pérdida significativa de **peso**. En el modelo de cáncer-inflamación del colon se presentó una disminución del nivel de **peroxidación de lípidos** (75%) y de la actividad de **TNF α** (85%) en ratones tratados durante 13 días con moringa (40% p/p). Sin embargo, la presencia de neutrófilos y linfocitos en la mucosa del colon, así como un incremento en la actividad enzimática de la **mieloperoxidasa** (2.5 veces), demostraron un mayor daño en los animales tratados con moringa. A los 35 días, la moringa aumentó significativamente la actividad hepática de **EF2**, pero no se observó una reducción significativa en el número de FCA. A pesar del efecto inductor de la Moringa sobre EF2, la disminución del daño oxidativo y de **biomarcadores de inflamación**, aún es necesario realizar más estudios para determinar la dosis correcta de moringa en modelos animales.

Palabras Clave: Moringa, enzimas de fase 2, cáncer de colon, inflamación, azoximetano, dextrán sulfato de sodio, fosas crípticas aberrantes, daño oxidativo, biomarcadores de inflamación, nimesulide.

ABSTRACT

Eating vegetables might substantially reduce colon cancer risk because of the chemoprotective effect through phase 2 enzyme (P2E) induction by natural compounds called phytochemicals. **Moringa** (*Moringa oleifera*) is a plant with a high nutritional value and medicinal properties; its leaves contain glucosinolates with a potent P2E induction activity. However, there are no studies that describe the chemoprotective effect of moringa in animal cancer models. This project was focused on describing the moringa's contribution on the P2E induction and its effect against the colon cancer development. To characterize the initiated-inflammation promoted mouse colon carcinogenesis model, **ICR** female mice were treated with the carcinogen **azoxymethane** (7.5 mg/kg b.w., via *i.p.*, 1 single dose at day 0) and with **dextran sodium sulfate** (1 and 1.5% in drinking water, at days 7-14). Animals were fed with control diet and 0.04% w/w **nimesulide** diet and sacrificed at 10, 13 and 35 days. Evaluation of the **inflammatory process** at day 13, the nimesulide and control groups showed infiltration of **lymphocytes** and a few **neutrophils**, as well as inflammation marks on histopathological slides of mouse colon mucosa. In addition, no significant decrease on aberrant crypt foci (**ACF**) number was found in mice treated with nimesulide diet (0.04% w/w), an anti-inflammatory agent, for 35 days. In order to determine the chemopreventive effect in a colon cancer model, moringa diet acceptance was first evaluated, demonstrating that animals **accepted** the moringa diet (33% and 50% w/w) and showed no significant **weight** loss. In the inflammation-colon carcinogenesis mouse model, **lipid peroxidation** level was reduced (75%), as well as **TNF α** activity (85%), in mice treated with moringa diet (40% w/w) during 13 days. However, neutrophil and lymphocyte infiltration, as well as, the increase in **myeloperoxidase** activity (2.49-fold) in colon mucosa, revealed a major damage in moringa-treated animals. At day 35, hepatic **P2E** induction was promoted by moringa, but there was no ACF reduction in mouse colon. Although, moringa significantly induced P2E, while diminishing oxidative damage and **inflammation markers**, further work is necessary in order to investigate the correct dose-response of moringa in animal models.

Key Words: Moringa, phase 2 enzymes, colon cancer, inflammation, azoxymethane, dextran sodium sulfate, aberrant crypt foci, oxidative damage, inflammation markers, nimesulide.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS.	9
ÍNDICE DE FIGURAS.	10
ABREVIATURAS.	13
1. INTRODUCCIÓN.	14
2. ANTECEDENTES.	16
2.1. CÁNCER.	16
2.1.1 Biología celular del cáncer.	17
2.1.2 Factores etiológicos del cáncer.	18
2.1.3 Cáncer de colon.	20
2.1.4 Modelos de cáncer de colon en animales.	21
2.2. CARCINÓGENOS COLÓNICOS.	22
2.2.1 Metabolismo de activación e inactivación del azoximetano (AOM).	22
2.2.2 Fosas crípticas aberrantes: lesiones inducidas por el AOM.	24
2.3 INFLAMACIÓN Y CÁNCER.	25
2.3.1 La asociación entre el cáncer y la inflamación crónica.	26
2.3.2 Respuesta inmunológica a la inflamación.	27
2.3.3 Marcadores de inflamación.	28
2.3.4 Daño oxidativo ocasionado por la inflamación.	28
2.3.5 Nimesulide: droga antiinflamatoria.	30
2.3.6 Dextrán sulfato de sodio: promotor de inflamación.	31
2.4 ESTRATEGIAS DE PROTECCIÓN CONTRA EL CÁNCER.	32
2.4.1 La 3H-1,2-ditiol-3-tiona: potente agente inductor de enzimas de fase 2.	33
2.4.2 Enzimas de fase 2 de desintoxicación de carcinógenos.	34
2.4.3 Mecanismos de regulación de enzimas de fase 2.	34
2.4.4 Rol de las enzimas de fase 2 en la susceptibilidad al cáncer.	36
2.4.5 Dieta: estrategia de protección.	36
2.4.6 Moringa: posible alimento quimioprotector.	37

3. JUSTIFICACIÓN.	40
4. HIPÓTESIS.	40
5. OBJETIVOS.	41
5.1 General.	41
5.2 Específicos.	41
6. METODOLOGÍA.	42
6.1 MATERIALES.	42
6.1.1 Material Químico.	42
6.1.2 Material Biológico.	43
6.2 MÉTODOS.	45
6.2.1 Caracterización del modelo de cáncer-inflamación del colon.	45
6.2.2 Evaluación del efecto quimioprotector de la moringa.	47
6.2.3 Actividades enzimáticas.	52
6.2.4 Conteo de FCA o lesiones preneoplásicas.	53
6.2.5 Análisis histopatológico.	53
6.2.6 Niveles de TNF α .	54
6.2.7 Peroxidación de lípidos.	54
6.2.8 Análisis estadístico.	55
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	56
8. CONCLUSIONES.	87
9. BIBLIOGRAFÍA.	88
10. ANEXO 1: Información sobre reactivos.	95
11. ANEXO 2: Información sobre técnicas y protocolos empleados.	98
12. ANEXO 3: Gráficas y cuadros con resultados de los experimentos.	108

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
6.1	Composición de dietas especiales administradas a ratones macho ICR durante 6 días.	47
6.2	Composición de dietas especiales administradas a ratones hembra ICR durante 13 y 35 días.	49
7.1	Número de FCA encontradas en el colon de ratones tratados durante 35 días.	60
7.2	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de NQO1 en hígado de ratones ICR.	75
7.3	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de GST en hígado de ratones ICR.	76
7.4	Efecto de las dietas especiales sobre el desarrollo de las lesiones preneoplásicas en ratones ICR.	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos según sexo, 2002.	16
2.2	Imagen de células malignas de un cáncer de colon.	18
2.3	Proceso de la carcinogénesis química.	20
2.4	Mecanismo de activación y conjugación del AOM <i>in vivo</i> .	23
2.5	Estructura de una fosa críptica aberrante en comparación con el tejido normal.	24
2.6	Imagen de neutrófilos teñidos con la técnica H&E.	27
2.7	Modelo propuesto sobre la asociación entre la inflamación y el cáncer.	29
2.8	Estructura química de la droga antiinflamatoria nimesulide (NIM).	30
2.9	Estructura química del dextrán sulfato de sodio (DSS).	31
2.10	Estructura química de la 3H-1,2-ditiol-3-tiona (D3T).	33
2.11	Participación de las enzimas de fase 2 en la desintoxicación de carcinógenos.	35
2.12	Principales zonas productoras de moringa y países con problemas de desnutrición.	38
2.13	La moringa: a) hojas; b) flor; c) semilla; d) árbol.	38
6.1	Cuarto de animales con regulación de temperatura, luz y humedad.	44

6.2	Aspecto físico de las hojas deshidratadas de moringa y del comedero de aluminio.	44
6.3	Diseño experimental sobre la caracterización del modelo animal de cáncer-inflamación del colon, mostrando los diferentes tratamientos y tiempos de sacrificio.	46
6.4	Diseño experimental sobre la evaluación de la aceptación de la dieta con moringa a los 6 días.	48
6.5	Diseño experimental sobre la evaluación del efecto quimioprotector de la moringa.	50
6.6	Conteo al microscopio de FCA en el colon de ratón ICR.	53
7.1	Cortes histológicos del A) recto y B) colon de ratones ICR tratados con 1% DSS y sacrificados a los 13 días.	57
7.2	Cortes histológicos del colon de ratones ICR tratados con 1.5% DSS y sacrificados a los A) 10 días y B) 13 días.	59
7.3	Cambios en el porcentaje de ganancia o pérdida de peso de ratones ICR tratados durante 6 días.	63
7.4	Consumo de alimento en gramos por ratón durante 6 días de tratamiento con diferentes dietas.	64
7.5	Actividad enzimática de NQO1 en diferentes órganos de ratones ICR tratados con dietas especiales durante 6 días.	65
7.6	Cambios en el porcentaje de ganancia o pérdida en peso de ratones ICR tratados con A) 1% DSS y B) 1.5% DSS.	68
7.7	Consumo de alimento en gramos por ratón durante 35 días.	70
7.8	Aspecto físico de las heces de ratones ICR tratados durante 35 días.	71
7.9	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de NQO1 en hígado de ratones ICR.	72
7.10	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de GST en hígado de ratones ICR.	74

7.11	Cortes histológicos del colon de ratones ICR tratados durante 13 días.	78
7.12	Actividad colónica de MPO en ratones ICR tratados durante 13 días.	79
7.13	Niveles de TNF α en el colon de ratones ICR tratados durante 13 días.	80
7.14	Peroxidación de lípidos en colon de ratones ICR tratados durante 13 días.	81
7.15	Resumen propuesto sobre los mecanismos de inflamación involucrados en el desarrollo de cáncer	86

ABREVIATURAS

AOM	Azoximetano
D3T	3 <i>H</i> -1,2-ditiol-3-tiona
DE	Desviación estándar
EE	Error estándar
FCA	Fosas crípticas aberrantes
GSH	Glutación reducido
GST	Enzima glutación-S-transferasa
MPO	Enzima mieloperoxidasa
NQO1	Enzima quinona reductasa
PBS	Buffer salino de fosfatos
TNF α	Factor de necrosis tumoral α

1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer ha sido objeto de estudio y de intensas investigaciones durante muchos años, encaminadas a encontrar una posible cura, es considerado una enfermedad con gran impacto sobre la salud humana. En nuestro país, según datos epidemiológicos sobre mortalidad, los tumores malignos son la segunda causa de muerte (INEGI, 2002).

En específico, el cáncer de colon ha tomado gran importancia pues es uno de los cánceres más comunes en los países de occidente por su alta incidencia. En México, particularmente en el estado de Querétaro, durante el año 2003, 3 de cada 100 defunciones que ocurrieron por neoplasia fueron atribuidas al cáncer de colon, de acuerdo a lo reportado por Servicios de Salud del Estado de Querétaro.

Un gran número de las enfermedades malignas se desarrollan a partir de las zonas infectadas e inflamadas de los tejidos u órganos (Kuper y col., 2000; Shacter y Weitzman, 2002). La mayoría de las enfermedades con padecimientos de inflamación crónica están asociadas con un elevado riesgo a padecer cáncer, por ejemplo la colitis ulcerativa con el cáncer de colon (Itzkowitz y Yio, 2004).

En el padecimiento del cáncer de colon, los factores que resultan determinantes en su desarrollo son los cambios en el estilo de vida, las exposiciones a diferentes sustancias que pueden causar daño al ADN, la predisposición genética y los factores ambientales asociados a la dieta (alto consumo de grasa y bajo consumo de fibra) (Chen y col., 2005).

El daño oxidativo es otro factor que puede desencadenar el desarrollo del cáncer de colon. Este fenómeno ocurre cuando la producción de oxidantes sobrepasa los mecanismos de protección de los antioxidantes y que puede verse incrementado por la disminución de los movimientos peristálticos del intestino a causa del bajo consumo de fibra. El cáncer de colon es 30 veces más alto que el cáncer del intestino delgado debido a que el colon está más expuesto a niveles altos de bacteria fecales (Chadwik y col., 1992). La microflora intestinal es una fuente importante de especies reactivas del oxígeno y del óxido nítrico, especies causantes del estrés o daño oxidativo y del daño al ADN (Stone y col., 2002).

Entre los carcinógenos empleados en modelos animales con gran similitud con la carcinogénesis de colon en humanos, se encuentra el azoximetano (AOM), metabolito reactivo intermediario proveniente del pro-carcinógeno dimetilhidrazina. Además, este modelo se utiliza para determinar el efecto de las diferentes dietas quimioprotectoras y de los agentes que pudieran prevenir o intervenir en el desarrollo del cáncer de colon. Su administración en los roedores induce la formación de fosas crípticas aberrantes (FCA). Estas últimas son lesiones precursoras del cáncer de colon y su determinación predice la formación de tumores en estudios con roedores. Las FCA se han empleado como biomarcadores del cáncer de colon porque presentan una rápida y simple forma de rastrear compuestos en la dieta que puedan causar o inhibir el cáncer de colon (Wargovich, 2001).

En el área de quimiopreención del cáncer es evidente que la terapia antiinflamatoria es eficaz contra la progresión de neoplasias y la conversión de estas lesiones en malignas. Gracias a la habilidad que poseen para disminuir la inflamación, las drogas no esteroideas antiinflamatorias (NSAIDs), como por ejemplo la nimesulide, son consideradas como posibles factores que intervienen en los mecanismos de quimioprotección del cáncer. Los químicos inductores de proteínas antioxidantes y de enzimas de fase 2 son potenciadores de la desintoxicación de los carcinógenos, por lo que resultan agentes protectores contra el desarrollo de cáncer, como por ejemplo la 3H-1,2-ditioil-3-tiona (D3T) presente en los vegetales crucíferos.

Diversas investigaciones demuestran las propiedades protectoras que poseen los fitoquímicos a través del bloqueo de uno o más pasos que desencadenan al cáncer. En este sentido, se ha estudiado el efecto quimioprotector de los glucosinolatos, fitoquímicos contenidos en las plantas como la moringa. La *Moringa oleifera* es un árbol originario de la India y es fuente natural de antioxidantes y glucosinolatos. Tradicionalmente, se le considera como una panacea para la cura de alrededor de 300 enfermedades. Por sus propiedades popularmente conocidas y por su potencial como agente protector, es crítico realizar estudios para investigar el efecto medicinal de esta planta (Fahey, 2005).

2. ANTECEDENTES.

2.1. CÁNCER.

El cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células, provocada por modificaciones en la información genética de las mismas. Debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales (Karp, 2003).

En los análisis de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se indica que, desde la edad madura hasta la vejez, una de las principales causas de muerte en las mujeres es el cáncer y las cardiopatías en los hombres. En cuanto a la mortalidad, los tumores malignos son la segunda causa de muerte en México (SSA, 2005). En 2002 fallecieron 58,599 personas por cáncer, lo cual representa un 12.7% del volumen total de las defunciones registradas (Figura 2.1) (INEGI, 2002).

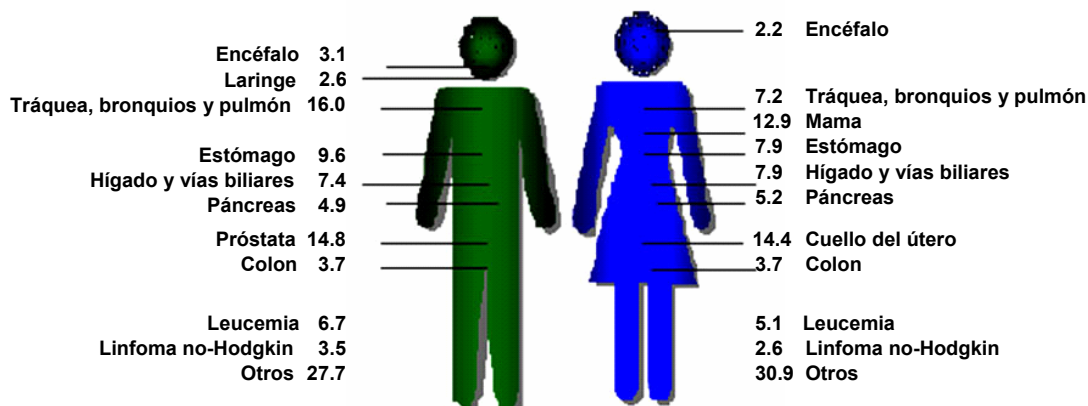


Figura 2.1. Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos según sexo, 2002 (Fuente: INEGI. Estadísticas vitales 2002. Base de datos).

2.1.1 Biología celular del cáncer.

Una célula cancerosa se distingue del resto de las células normales porque posee un crecimiento sin control. En cambio, las células normales crecen y responden a influencias inhibitorias del ambiente que detienen su proliferación. Por lo tanto, las células cancerosas son incapaces de detectar estas señales y continúan creciendo hasta formar un tumor, convirtiéndose en una amenaza dentro del cuerpo (Karp, 2003). La malignidad de las células cancerosas se debe a que tienden a producir metástasis, proceso en el cual las células tienen la capacidad de invadir tejido circundante al liberarse y viajar a través del torrente sanguíneo o vasos linfáticos para formar tumores secundarios en otros órganos o lugares del cuerpo (Doll y Peto, 1987).

En comparación con las células normales, las células cancerosas:

- Se pueden multiplicar en ausencia de factores estimuladores del crecimiento requeridos para la proliferación de células normales, y son resistentes a señales que normalmente programan la muerte celular, es decir, a la apoptosis (Lodish y col., 2003).
- Presentan alteración cromosómica aberrante, alteración denominada aneuploidia (uno o más cromosomas).
- Sufren cambios morfológicos en el citoesqueleto, el cual se encuentra desorganizado y reducido (Figura 2.2).
- Pierden la capacidad de adherirse, por lo tanto son capaces de emigrar y moverse dentro del cuerpo.
- Pierden la inhibición por contacto con otras células, por lo que continúan creciendo en capas formando la masa tumoral.
- Son inmortales porque continúan dividiéndose de manera indefinida (Karp, 2003).

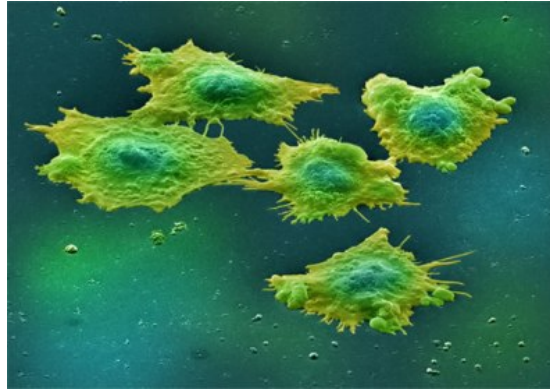


Figura 2.2. Imagen de células malignas de un cáncer de colon (García, 2007).

2.1.2 Factores etiológicos del cáncer.

Los datos actuales indican que cambios en el estilo de vida y exposiciones a diferentes sustancias pueden modificar el riesgo de cáncer en humanos. Algunos factores genéticos (síndromes de cáncer hereditario, genes de susceptibilidad hereditaria, entre otros) también influyen en el riesgo de cáncer. Por lo que, la mayoría de los cánceres humanos no son tan sólo una secuela genéticamente determinada del envejecimiento, sino más bien una manifestación de la conducta personal y cultural, superpuesta a la susceptibilidad hereditaria de cada individuo (De Vita y col., 2000).

Se cree que la mayoría de los cánceres se originan a partir de una célula que ha experimentado una mutación somática. Pero para que la progenie de esta célula se transforme en cancerosa, ésta ha de sufrir cambios, los cuales requieren de varias mutaciones adicionales a las dadas por factores exógenos o ambientales y endógenos o hereditarios (Toroella y Villa Treviño, 1998; Karp, 2003). La elevada incidencia de cáncer en ciertos grupos profesionales (deshollinadores, ladrilleros) hizo sospechar el origen químico de los cánceres humanos (De Vita y col., 2000).

A las sustancias carcinogénicas que pueden provocar cambios en el genoma se les llama agentes genotóxicos. Ejemplos de estas sustancias químicas son: el hollín y el humo del cigarro (causan simples cambios puntuales en la

secuencia de los nucleótidos). Por otro lado, otros factores capaces de inducir cáncer son las radiaciones ultravioleta (provocan rupturas y translocaciones de cromosomas), los virus tumorales (introducen en las células ADN extraño), los hábitos alimenticios y las exposiciones laborales (Toroella y Villa Treviño, 1998; Karp, 2003).

El desarrollo de un cáncer requiere de la presencia de varias mutaciones causada por agentes carcinogénicos (**iniciación**), los cuales transforman una célula normal a una célula cancerosa, y de un proceso de selección clonal. Este proceso consiste en que la o las mutaciones le confieren a la célula una ligera ventaja de proliferación sobre las otras células. Una célula proveniente de la progenie mutada sufre una segunda mutación que permitirá a sus descendientes proliferar de forma más descontrolada y formar un pequeño tumor benigno (**promoción**). Una tercera mutación en este tumor permitirá formar una masa de células o tumor maligno (**progresión**), que a su vez, al ser mutadas las células podrán emigrar y formar colonias hijas en otros sitios (**metástasis**) (Figura 2.3) (Lodish y col., 2003).

Numerosas fuentes evidenciales concluyen que, además de los factores genéticos, los factores nutrimentales tienen un papel importante en la etiología de ciertos cánceres, como ejemplos notables tenemos al cáncer de mama y al cáncer de colon. En 1983, Wynder y colaboradores demostraron que la reducción de los niveles de grasa en la dieta de un 20% a un 10% por peso, produce una inhibición significativa de la tumorigénesis en mama, debido al efecto positivo que tiene la grasa sobre la proliferación de las células transformadas. Así mismo, se han encontrado en experimentos sobre la carcinogénesis que existen varios nutrientes que pueden actuar como promotores o con efectos protectores (Wynder y col., 1983).

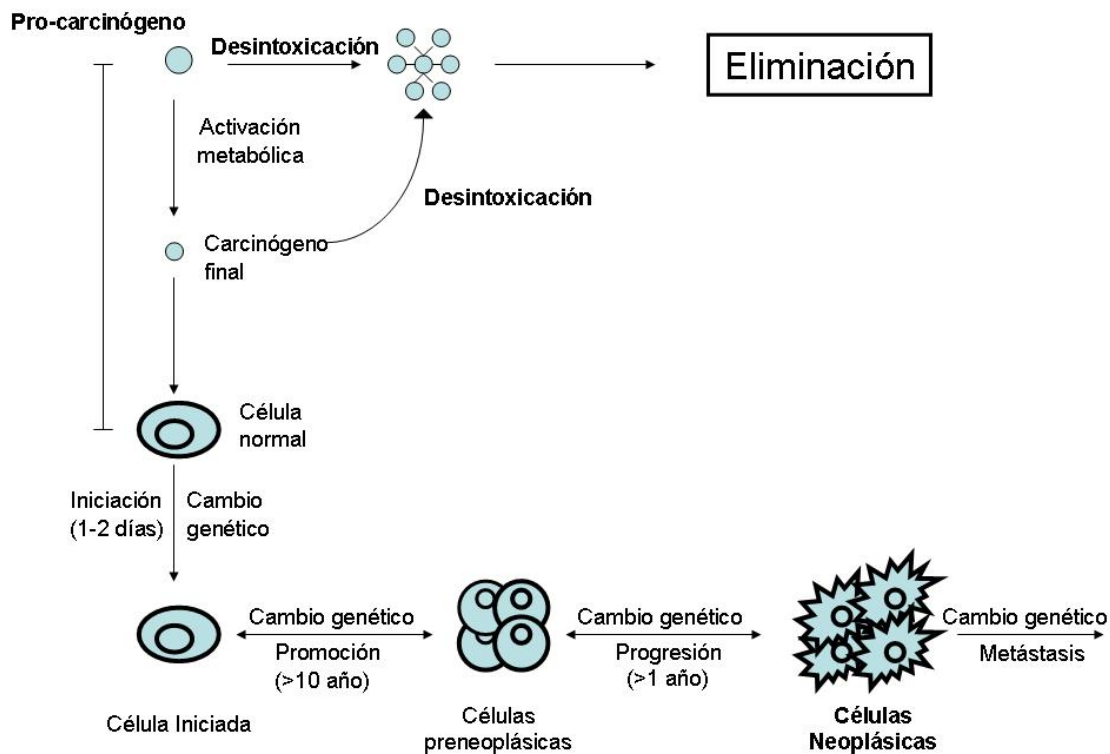


Figura 2.3. Proceso de la carcinogénesis química (modificada de Surh, 2003).

2.1.3 Cáncer de colon.

El colon o intestino grueso es la parte del intestino comprendido desde el ciego hasta el recto. Su función principal es extraer agua de las heces. En los mamíferos, el colon está dividido en cinco regiones: colon ascendente, el cual se encuentra en el lado derecho del abdomen; el colon transversal, el colon descendente del lado izquierdo; el colon sigmoideo y el recto.

El intestino grueso es el responsable de almacenar los desechos del organismo, de retener y de mantener el balance de agua y de absorber algunas vitaminas, como la vitamina K. Es en esta parte anatómica donde los residuos de los alimentos no aprovechados se convierten en heces y son eliminados del organismo gracias a los movimientos peristálticos del intestino. Cuando estos movimientos son anormales o escasos, las heces se acumulan provocando que

las células colónicas estén en contacto constante con las toxinas contenidas en los desechos del sistema digestivo. Por su exposición prolongada a tóxicos o carcinógenos, el colon es un órgano susceptible al cáncer.

El cáncer de colon es uno de los cánceres más comunes y son varios los factores que afectan su progreso. Se considera que en el desarrollo del cáncer de colon están involucrados los factores ambientales asociados a la dieta (consumo alto de grasa y bajo consumo de fibra), al estilo de vida, a la predisposición genética y a la susceptibilidad de cada individuo (Chen y col., 2005). Sin embargo, casi el 75% de los cánceres colorrectales ocurren en personas mayores de 50 años con ningún otro riesgo que el de la edad (Sociedad Americana para el Estudio del Cáncer, 2003).

En países desarrollados como: Estados Unidos, Nueva Zelanda, Canadá, Australia y el noroeste de Europa, el cáncer de colon es la segunda causa de muerte, después del cáncer de pulmón en el hombre y del cáncer de mama en la mujer (Pinols-Felis, 1995).

Según las estadísticas del INEGI 2002, la morbilidad hospitalaria (egresos por tumores durante un año) en el 2002 fue de 70,745 mujeres y 54,228 hombres quienes se atendieron por algún tumor maligno. En los varones, el 44.4% de los egresos se debe al de leucemia, 23.9% al de tráquea, bronquios y pulmón, 14.3% al de estómago y 10% por el de colon. En México, específicamente en el estado de Querétaro durante el año del 2003, 3 de cada 100 defunciones que ocurrieron por neoplasia fueron atribuidas al cáncer de colon, de acuerdo a lo reportado por Servicios de Salud del Estado de Querétaro.

2.1.4 Modelos de cáncer de colon en animales.

Estudios donde se emplean modelos animales proveen la oportunidad de probar y definir el papel de los factores exógenos y endógenos en la etiología del cáncer de colon. A este respecto, la inducción de cáncer de colon en roedores mediante la administración de los compuestos azoximetano (AOM) y

dimetilhidrazina (DMH), ha sido ampliamente utilizada. Este tipo de modelos bien establecidos muestran una gran similitud con la carcinogénesis de colon en humanos (Corpet y Taché, 2002). Entre los carcinógenos que se emplean de manera menos frecuentemente que el AOM y la DMH, se encuentran las aminas heterocíclicas y las nitrosaminas (metilnitrosourea y la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina). Las aminas heterocíclicas se encuentran en nuestra dieta diaria, pues son producidas al calentar a altas temperaturas la carne, el pan o el aceite. Son modelos más representativos de la realidad, en comparación al AOM, pero son menos específicas y menos potentes como agentes carcinogénicos en modelos experimentales. Debido a la especificidad del AOM como carcinógeno de colon en animales (ratas o ratones), este modelo es también utilizado para determinar el efecto de las diferentes dietas quimioprotectoras y de los agentes que pudieran prevenir o intervenir en el desarrollo del cáncer de colon.

2.2 CARCINÓGENOS COLÓNICOS.

Un carcinógeno es un agente que cuando se administra a los animales sin tratamiento, o bien, en condiciones normales, incrementa significativamente la incidencia de neoplasmas de uno o más tipos histogenéticos, comparado con la incidencia en animales sin tratamiento o controles (Klaassen y col., 1996).

2.2.1 Metabolismo de activación e inactivación del azoximetano (AOM).

El AOM es un metabolito reactivo intermediario proveniente del pro-carcinógeno dimetilhidrazina (DMH). Después de ser activado metabólicamente dentro del organismo, la DMH es biotransformada al AOM, a los radicales con centros de carbono (ión metilcarbonio) y a las especies reactivas del oxígeno por los diferentes sistemas enzimáticos (Gamberini y Leite, 1997).

La DMH es rápidamente absorbida a través del torrente sanguíneo y, una vez en el hígado o en el intestino, es biotransformada por enzimas de fase 1 (principalmente por el sistema de citocromo CYP450 o flavín monooxigenasas) a AOM, éste a su vez es metabolizado por el citocromo CYP2E1 a

metilazoximetanol (MAOM). Posteriormente, este metabolito es biotransformado por las enzimas de fase 2 (UGT, GST, NQO1) a metilazoximetanol glucoronidado y es eliminado del organismo. Cuando no es eliminado, en el intestino, éste es convertido de nuevo por la enzima Beta-glucuronidasa, presente en los colonocitos, a metilazoximetanol. Este último metabolito da lugar al ión metilcarbonio, el cual se cree es el carcinógeno final con capacidad para unirse covalentemente con proteínas, ADN y ARN para formar aductos y así ejercer su efecto genotóxico a nivel del colon (Jackson y col., 2000).

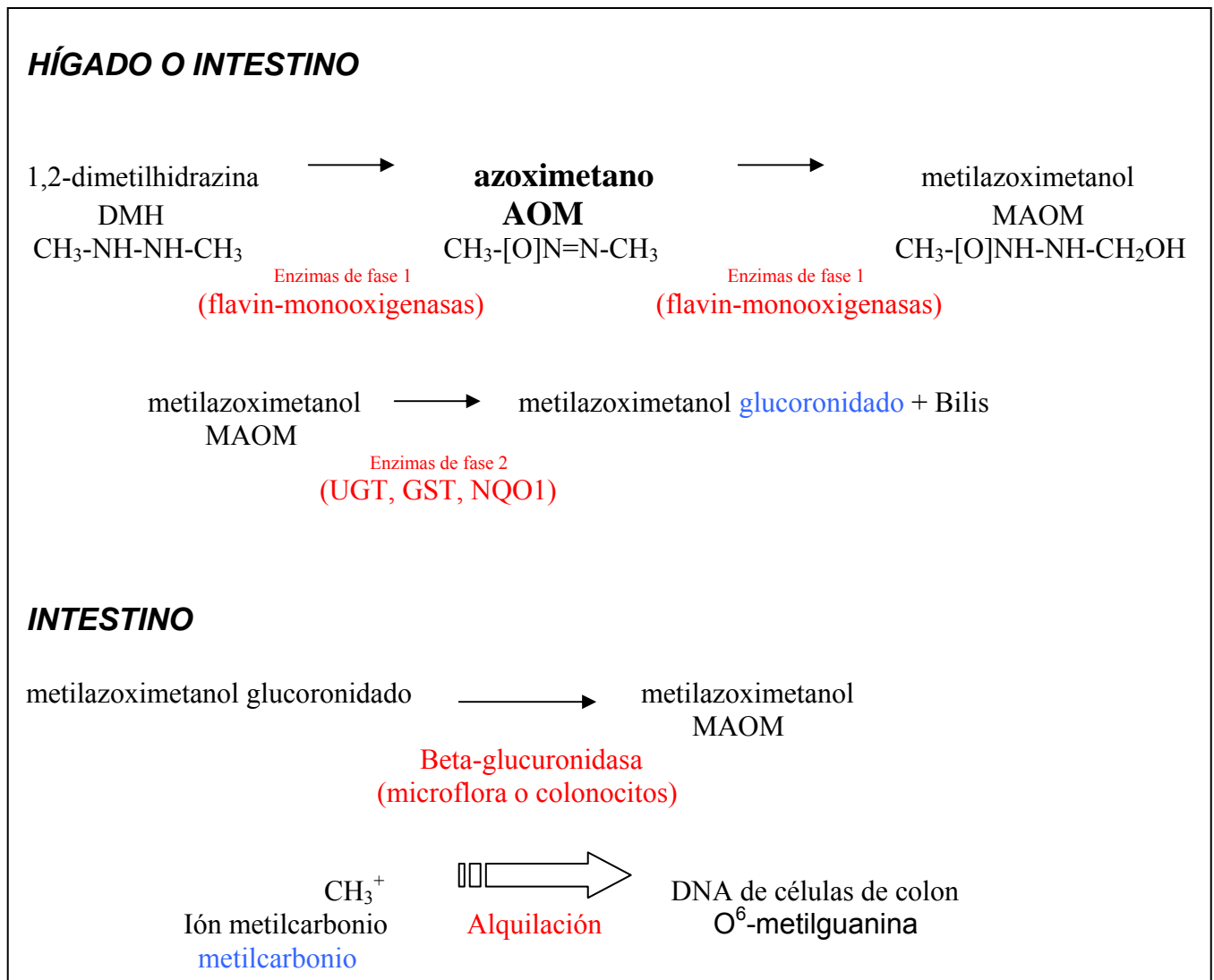


Figura 2.4. Mecanismos de activación y conjugación del AOM *in vivo* (Corpet y Taché, 2002).

Sin embargo, varios de los metabolitos intermediarios de la DMH y del AOM son conjugados por enzimas de desintoxicación de fase 2, como la UDP-glucuronosil transferasa (UGT) o la glutatión-S-transferasa (GST), o desactivados por reacciones de reducción catalizadas por la enzima quinona reductasa (NQO1), facilitando de esta manera su eliminación o excreción del organismo (Figura 2.4).

Estudios *in vivo* muestran que la administración de AOM (10 mg/kg p.c., 1 sola dosis *i.p.*) en ratones ICR induce la formación de fosas crípticas aberrantes (Kohno y col., 2005).

2.2.2 Fosas crípticas aberrantes: lesiones inducidas por el AOM.

Las fosas crípticas aberrantes (FCA) son lesiones precursoras del cáncer de colon. En 1987, Ranjana Bird fue el primero en detectar FCA en roedores a las 4 semanas después de la administración del carcinógeno AOM. Las FCA son fáciles de identificar en el colon, poseen las siguientes características histológicas:

- Son dos o tres veces más grandes que las fosas crípticas normales.
- Son elevadas cuando se observan al microscópico.
- Tienen una hendidura en la parte superior (Figura 2.5).
- Tienen una capa gruesa de células epiteliales que se tiñen con azul de metileno y colorean un tono más oscuro que las criptas normales.



Figura 2.5. Estructura de una fosa críptica aberrante en comparación con el tejido normal. a) fosas crípticas del tejido normal; b) fosas crípticas aberrantes en tejido dañado (Suzuki y col., 2004).

Se ha demostrado que las FCA:

- Son inducidas por los carcinógenos colónicos, como por ejemplo el AOM, de forma de dosis-especie dependientes.
- Su número y crecimiento se ven modificados por moduladores de la carcinogénesis del colon y predicen la formación de tumores en varios estudios en roedores.
- Tienen una correlación directa con el riesgo a padecer cáncer, el tamaño y el número de adenomas en humanos.
- Los cambios genotípicos y morfológicos de las FCA en colon humano son similares a aquellos en colon animal, así como también las alteraciones presentes en los tumores.

En estudios realizados sobre la prevención del cáncer, las FCA se han utilizado como un biomarcador del cáncer de colon porque presentan una rápida y simple forma de rastreo de compuestos en la dieta que puedan causar o inhibir el cáncer de colon. La determinación de las FCA se considera como un modelo de quimioprotección sumamente interesante porque en estudios preclínicos en roedores inducidos químicamente, permite encontrar agentes potenciales, dietas y tratamientos que puedan proteger contra el desarrollo de tumores intestinales (Wargovich, 2001).

En el 2005, Kohno demostró que mediante el uso de drogas antiinflamatorias se podía reducir el número de FCA inducidas por la administración de AOM y, en consecuencia, se disminuía la incidencia de neoplasmas en el colon.

2.3 INFLAMACIÓN Y CÁNCER.

La inflamación se define como la primera respuesta del sistema inmune a las infecciones o a la irritación. La inflamación se caracteriza por la presencia de enrojecimiento, sensación de calor, hinchazón, dolor y disfunción del órgano

afectado. En respuesta al daño del tejido u órgano, se inicia la activación de una cascada de señales químicas que preparan al organismo para curar la zona afectada. En este proceso están involucradas la activación y migración de los leucocitos (células del sistema inmunológico entre las que se incluyen neutrófilos, monocitos y eosinófilos) desde el sistema circulatorio al sitio o zona afectada (Coussens y Werb, 2002).

2.3.1 La asociación entre el cáncer y la inflamación crónica.

Un gran número de las enfermedades malignas se desarrollan a partir de las zonas infectadas e inflamadas de los tejidos u órganos (Kuper y col., 2000; Shacter y Weitzman, 2002). Las infecciones persistentes que atacan a un organismo pueden inducir a la inflamación crónica. Los leucocitos liberados durante la inflamación producen especies reactivas de oxígeno para luchar en contra de una infección (Maeda y Akaike, 1998). Estas especies reaccionan con óxido nítrico para formar peroxinitrito, un compuesto altamente mutagénico. Por lo tanto, el constante daño y regeneración del tejido, en presencia de especies altamente reactivas del nitrógeno y del oxígeno liberadas por las células inflamatorias, interactúan con el ADN del epitelio en proliferación y dan como resultado alteraciones permanentes, deleciones o rearrreglos del genoma. Se ha observado que las mutaciones en el gen *p53* se presentan con la misma frecuencia en los tumores tanto como en las enfermedades de inflamación crónica, como por ejemplo la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria del intestino (cuyas siglas en inglés son IBD) (Yamanishi , 2000).

La mayoría de las enfermedades con padecimientos de inflamación crónica están asociadas con un elevado riesgo a padecer cáncer. Como ejemplos de esta asociación, inflamación-cáncer, se encuentran la hepatitis con el hepatoma, la gastritis con el cáncer gástrico y la colitis ulcerativa con el cáncer del colon. El riesgo a desarrollar cáncer de colon aumenta dependiendo de la duración de la colitis (condición inflamatoria o ulcerativa del colon). Este tipo de cáncer es

difícil diagnosticarlo antes de los 7 años en personas que padecen colitis. Así mismo, es importante considerar que a mayor sea la superficie del colon afectada por la colitis, mayor será el riesgo a padecer cáncer de colon (Itzkowitz y Yio, 2004).

2.3.2 Respuesta inmunológica a la inflamación.

Los neutrófilos son las células características de la inflamación, se presentan cuando el tejido es atacado o infectado por bacterias y en consecuencia, se produce inflamación. Estas células pertenecen a la clase de los glóbulos blancos del sistema inmune, se originan en la médula ósea y realizan importantes funciones como la fagocitosis y la liberación de mensajeros químicos extracelulares, con la finalidad de matar y degradar a las bacterias. Al teñir secciones del tejido inflamado con la técnica de la hematoxilina y eosina, los neutrófilos son células fáciles de identificar al microscopio, pues poseen un núcleo poli lobulado y un citoplasma granulado (Figura 2.6). Estas células miden de 12 a 15 micrómetros, son el tipo más frecuente de leucocito (50-75% de leucocitos). Además, participan en la eliminación de parásitos de gran tamaño y en la modulación de la respuesta inmune. Los gránulos de los neutrófilos contienen en su estructura a las enzimas mieloperoxidasa, la alfa-glucoronidasa y la peroxidasa, entre otras (Coussens y Werb, 2002).

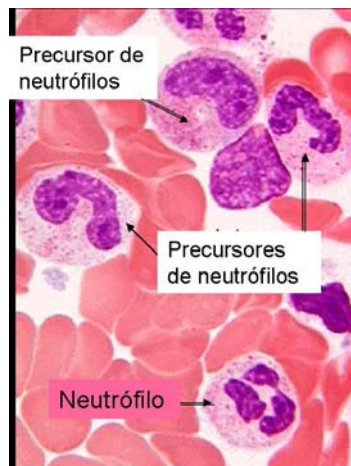


Figura 2.6. Imagen de neutrófilos teñidos con la técnica H&E.

2.3.3 Marcadores de inflamación.

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima contenida en los neutrófilos y es un indicador de la infiltración de neutrófilos, un nivel alto de actividad de MPO nos indica una mayor acumulación de neutrófilos en el tejido. La determinación de la MPO, junto con la determinación del factor de necrosis tumoral (TNF α), se consideran biomarcadores de la inflamación, los cuales nos indican las condiciones inflamatorias en las que se encuentra el tejido a analizar. Ambos marcadores se pueden determinar en la mucosa o en el músculo del colon (Kinoshita y col., 2006).

TNF α juega un papel importante en la inflamación de la mucosa del colon, directamente induce disfunciones motoras en el músculo colónico. Este factor es producido principalmente por los macrófagos, los monocitos y los neutrófilos y su función es regular la respuesta del sistema inmune ante la inflamación. TNF α también estimula la producción de citoquinas propias de la inflamación. Kinoshita y colaboradores (2006), mediante el uso de animales modificados genéticamente y deficientes en este factor, demostraron que TNF α está relacionado con la inflamación de la mucosa del colon ya que es una pieza clave como mediador en la inflamación, además, participa activamente en los eventos tempranos de la formación de tumores.

2.3.4 Daño oxidativo ocasionado por la inflamación.

El cáncer de colon es 30 veces más alto que el cáncer del intestino delgado. En contraste al intestino delgado, el colon está expuesto a niveles altos de bacteria fecales (Chadwik y col., 1992), cuyo contenido es del 50% en la materia seca de las heces. La actividad respiratoria de la microflora en las heces es una fuente importante de radicales superóxido (O₂⁻) (Babbs, 1990). Además de las especies reactivas del oxígeno (ROS), el óxido nítrico también es generado en el colon, especialmente en la enfermedad inflamatoria del intestino y también estas especies son producidas por los neutrófilos durante el proceso inflamatorio.

Esto demuestra que el colon está expuesto a altos niveles de estrés o daño oxidativo. A causa de este estrés, se propicia el daño al ADN y la rápida división de las células epiteliales del colon (Figura 2.7). Este daño puede escaparse de los mecanismos de reparación del ADN y convertirse en mutaciones somáticas (Stone y col., 2002).

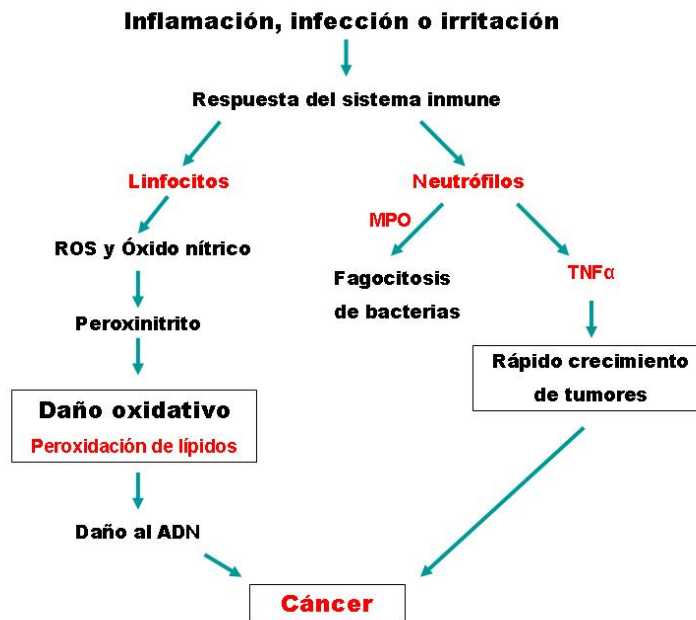


Figura 2.7. Modelo propuesto sobre la asociación entre la inflamación y el cáncer (Modificado de Coussens y Werb, 2002).

El daño oxidativo ocurre cuando la producción de oxidantes sobrepasa los mecanismos de protección de los antioxidantes. La falta de ejercicio físico, fumar, la dieta estilo occidente y el consumo excesivo de alcohol, son factores que modulan el estrés o daño oxidativo y, en consecuencia, son importantes en la etiología del cáncer de colon (Kune, 1992; Richter, 1995; Chao, 2000; Thune, 2001). En cambio, el consumo de vegetales y frutas, los cuales tienen un alto contenido de antioxidantes, pueden prevenir las mutaciones somáticas en las células colónicas causadas por la generación de radicales libres o por subproductos de la peroxidación de lípidos que podrían desencadenar al cáncer (Stone y col., 2002) (Figura 2.7). La peroxidación de lípidos es la incorporación de

oxígeno en aquellos lípidos que contienen uno o más dobles enlaces entre sus átomos de carbono. Este proceso determina, en sistemas biológicos, el daño en membranas. Es por ello que la determinación de peroxidación de lípidos en un tejido, nos indica el daño oxidativo que éste ha sufrido a causa de la inflamación.

2.3.5 Nimesulide: droga antiinflamatoria.

Tal vez la mejor evidencia sobre la importancia de la inflamación durante la progresión de neoplasmas proviene del estudio sobre el riesgo a padecer cáncer entre los pacientes y usuarios constantes de la aspirina y de las drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs). Este tipo de estudios indican que el uso de estas drogas puede reducir el riesgo a padecer cáncer de colon en un 40-50% y que incluso puede ser un tratamiento preventivo para el cáncer de pulmón, esófago y estómago (Coussens y Werb, 2002). Dentro del grupo de las drogas no esteroideas se encuentra la nimesulide (Figura 2.8), droga con propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias.

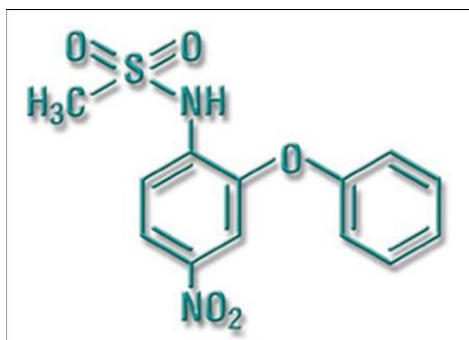


Figura 2.8. Estructura química de la droga antiinflamatoria nimesulide.

Esta droga pertenece a la familia de las sulfonamidas y se emplea en el tratamiento de ciertos padecimientos como la osteoartritis y los desórdenes propios de las articulaciones. La nimesulide se utiliza para disminuir los efectos de la colitis en modelos de carcinogénesis en roedores, es una droga con acción inhibitoria de la proteína COX-2, la cual convierte al ácido araquidónico para producir prostaglandinas, las responsables de inducir inflamación en tejidos dañados. Su importancia en este tipo de modelos radica en que tiene la capacidad

de eliminar la formación de fosas crípticas aberrantes inducidas por AOM en animales (Kohno y col., 2005).

2.3.6 Dextrán sulfato de sodio: promotor de inflamación.

Los procesos de inflamación aguda y crónica son de gran importancia entre los factores involucrados en los eventos de oxidación, implicados a su vez, en el daño del ADN del epitelio del colon (Maeda y Akaike, 1998). El dextrán sulfato de sodio (DSS) (Figura 2.9) es un polímero sintético de polisacárido con la capacidad de inducir procesos de inflamación aguda o crónica, como por ejemplo la colitis, al irritar la membrana de la mucosa del colon (Tanaka y col., 2001, 2003). Cuando el DSS es administrado por periodos largos (660 días o 22 semanas) promueve el desarrollo del cáncer de colon, al incrementar la proliferación celular durante la promoción de la inflamación (Hirono y col., 1992), mientras que por periodos cortos de exposición promueve la formación de FCAs y potencia el desarrollo de este tipo de cáncer (Whiteley y col., 1996). Es por esto que el modelo del DSS en animales es útil para el estudio de la colitis relacionada con la neoplasia del colon (Cooper, 2000; Tanaka, 2000).

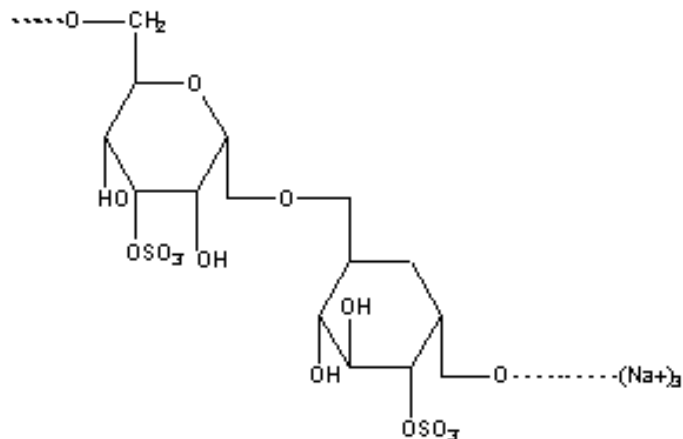


Figura 2.9. Estructura química del dextrán sulfato de sodio.

2.4 ESTRATEGIAS DE PROTECCIÓN CONTRA EL CÁNCER.

Es evidente que la terapia antiinflamatoria es eficaz contra la progresión de neoplasias y contra la conversión de estas lesiones en malignas. El reto en el futuro será encontrar terapias adecuadas que permitan regular la respuesta inflamatoria y la respuesta inmunológica del organismo. Tales terapias deberán contar con la capacidad de disminuir las propiedades promotoras de tumores de las células de infiltración (linfocitos y citoquinas pro-inflamatorias) y, por otro lado, aumentar las propiedades supresoras de tumores de las citoquinas antiinflamatorias (Coussens y Werb, 2002).

Dado que el factor TNF α es una de las varias vías en que la inflamación actúa como promotor de tumores, el empleo de anticuerpos con eficacia terapéutica en las enfermedades inflamatorias podría tener útiles aplicaciones en la terapia contra el cáncer (Shanahan y St. Clair, 2002).

Por otro lado y gracias a la habilidad que poseen las NSAIDs (como la nimesulide) para disminuir la inflamación, estas drogas son consideradas como posibles factores que intervienen en los mecanismos de quimioprotección del cáncer porque inhiben a la proteína COX-2, productora de prostaglandinas, las responsables de inducir inflamación en los tejidos dañados (Kohno y col., 2005).

Se han identificado diversos mecanismos moleculares que regulan respuestas de quimioprotección contra el cáncer a través de activadores de transcripción de genes, como lo es el elemento de respuesta a antioxidantes (AREs). Diversos estudios reportan que factores de transcripción de genes, tales como c-Jun, Jun-B, Jun-D, c-Fos, Fra1, Nrf1 y Nrf2 se unen a los AREs e inducen la transcripción de genes de enzimas de desintoxicación de carcinógenos y de proteínas antioxidantes (Venugopal y Jaiswal, 1996; Itoh y col., 1997), las cuales forman parte del sistema de defensa celular y cuya inducción responde principalmente a químicos inductores monofuncionales (Kwak y col., 2001).

Los químicos inductores de proteínas antioxidantes y de enzimas de fase 2 (EF2) son potenciadores de la desintoxicación de los carcinógenos y, por tanto, protegen contra las mutaciones y la iniciación de las neoplasias (Kensler y col., 1992). Se han identificado a dos grupos importantes de químicos inductores presentes en los vegetales crucíferos: los isotiocianatos y las ditioltionas (Zhang y col., 1992). El sulfurofano (SFN) y la 3*H*-1,2-ditiol-3-tiona (D3T) son compuestos representativos de cada uno de estos grupos, respectivamente, y han sido ampliamente estudiados como agentes quimioprotectores del cáncer.

2.4.1 La 3*H*-1,2-ditiol-3-tiona: potente agente inductor de enzimas de fase 2.

La 3*H*-1,2-ditiol-3-tiona (D3T) (Figura 2.10) es un compuesto sintético considerado como un potente agente de protección contra el cáncer (Roebuck y col., 2003). Este químico posee la capacidad para inducir enzimas de fase 2 en roedores (Ansher y col., 1983) y su administración los protege contra la carcinogénesis química. Aún no se sabe si el efecto inductor del D3T es tejido-específico, es decir, si tiene un mayor nivel de inducción enzimática en cierto órgano o tejido. En diversos estudios en ratas, se ha demostrado que el D3T disminuye la formación de cambios preneoplásicos inducidos por aflatoxina B₁ en hígado (Maxuitenko y col., 1996), además reduce la frecuencia de mutaciones en el colon de ratas tratadas con 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-*b*]piridina (Yang y col., 2001), e inclusive disminuye la formación de aductos del DNA y la tumorigénesis de mama inducidos por 7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno (Izzotti y col., 1999). Sin embargo, aún no existe suficiente información para sustentar la dosis útil de D3T para humanos (Roebuck y col., 2003).

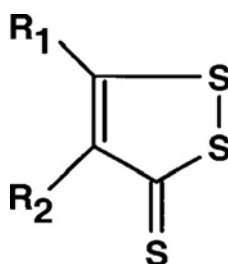


Figura 2.10. Estructura química del la 3*H*-1,2-ditiol-3-tiona (D3T).

2.4.2 Enzimas de fase 2 de desintoxicación de carcinógenos.

La mayoría de los carcinógenos presentes en los alimentos, en el humo del tabaco y en el lugar de trabajo son indirectos, es decir, requieren de una activación metabólica por medio de sistemas enzimáticos endógenos para ejercer su efecto tóxico biológico. La bioactivación de carcinógenos generalmente involucra dos etapas, las cuales se les ha denominado como reacciones de fase 1 y de fase 2. Las reacciones de fase 1 son llevadas a cabo principalmente por el sistema enzimático de mono-oxigenasas del citocromo P450 e involucran la introducción de grupos funcionales en la molécula del carcinógeno. Generalmente, las reacciones de fase 1 dan como resultado la bioactivación de carcinógenos a intermediarios electrofílicos mutagénicos, denominados carcinógenos finales (Miller y Miller, 1966). Por otro lado, las reacciones de fase 2 incluyen reacciones de conjugación catalizadas por las enzimas glutatión-S-transferasa (GST) y UDP-glucuronosil transferasa (UGT); así como también reacciones de reducción catalizadas por la enzima quinona reductasa (NQO1) y reacciones de hidrólisis catalizadas por la enzima époxido hidrolasa (EH), las cuales en la mayoría de los casos conducen a la desintoxicación de los carcinógenos del organismo (Pitot y Dragan, 1996). Por lo tanto, la cantidad del último carcinógeno disponible para interactuar con el ADN representa, en parte, un balance competitivo entre las reacciones de bioactivación (fase 1) y de desintoxicación (fase 2).

2.4.3 Mecanismos de regulación de enzimas de fase 2.

Aunado a la presencia de polimorfismos genéticos, existen mecanismos adicionales o exógenos que controlan positiva o negativamente las actividades de las enzimas de la fase 2 (EF2) y que pueden contribuir o incrementar el desarrollo de cáncer.

Prochaska y Talalay (1988) definieron a los inductores monofuncionales como aquellos compuestos electrofílicos que selectivamente inducen enzimas de desintoxicación de fase 2, sin ocasionar efecto alguno en la inducción de enzimas de fase 1. Por otro lado, los inductores bifuncionales tienen la capacidad de elevar

las actividades de enzimas de fase 2 (EF2), así como enzimas de fase 1. En el área de la quimioprotección del cáncer, aquellos compuestos que inducen preferentemente EF2 son generalmente considerados benéficos ya que estimulan la desintoxicación de carcinógenos del organismo (Figura 2.11).

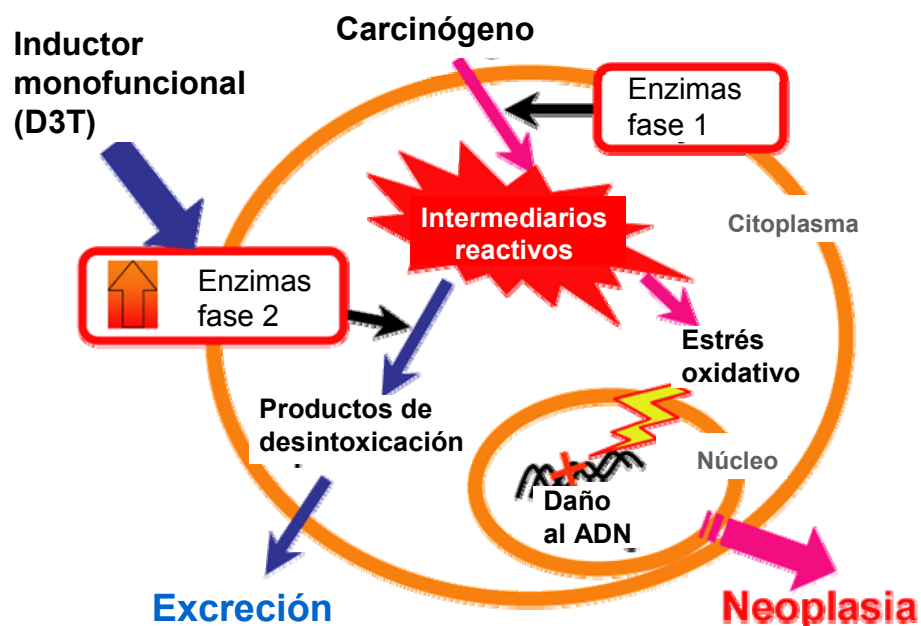


Figura 2.11. Participación de las enzimas de fase 2 en la desintoxicación de carcinógenos (Modificado de Ariga, 2005).

Entre los compuestos que inducen genes que codifican enzimas de desintoxicación de carcinógenos (EF2), se encuentra el agente quimioprotector 3H-1,2-ditio-3-tiona (D3T). En estudios donde se emplearon análisis de microarreglos de ADN, se demostró que el D3T promovió la participación del factor de transcripción Nrf2 para la inducción de aproximadamente 200 genes, entre los cuales se incluyen los genes que codifican para EF2 (Kwak y col., 2003). En 1997, Itoh y colaboradores demostraron por primera vez el papel esencial de Nrf2 (en inglés: **Nuclear Factor-E2-Related Factor 2**) en la regulación de la expresión basal e inducible de los niveles de mRNA de GST y NQO1, mediante el empleo de animales genéticamente deficientes en el factor Nrf2 (animales *knockout*). Los resultados muestran que los diferentes órganos de los ratones *knockout* presentan niveles de expresión basal (o constitutiva) e inducible de GST, NQO1, UGT, entre

otras enzimas, menores a los observados en los animales silvestres (Itoh y col., 1997; Ramos-Gómez y col., 2001).

2.4.4 Rol de las enzimas de fase 2 en la susceptibilidad al cáncer.

Las enzimas GSTs, la N-acetiltransferasa (NAT2) y la UGT, son enzimas biotransformadoras encargadas de la defensa y desintoxicación de los químicos endógenos y exógenos con potencial carcinogénico. Estudios epidemiológicos muestran la existencia de la relación entre las variantes alélicas de estas enzimas y un incremento en el riesgo al desarrollo de cáncer colorrectal (Ates y col., 2005).

La mayoría de las enzimas biotransformadoras poseen diversos polimorfismos genéticos, los cuales pueden afectar directamente sus actividades (Kiss y col., 2000). De tal forma que la presencia de alelos diferentes de las enzimas biotransformadoras contribuyen directamente a la susceptibilidad al cáncer colorrectal (Kiyohara, 2000). Actualmente, se considera que el desarrollo del cáncer colorrectal está determinado por una compleja interacción entre los polimorfismos genéticos de las enzimas, el estilo de vida, la dieta, los factores ambientales, el historial familiar y del proceso inflamatorio (Marugame y col., 2000).

2.4.5 Dieta: estrategia de protección.

En diversos estudios se ha encontrado que las personas que consumen una dieta a base de vegetales, leche fermentada, huevos y rica en celulosa, presentan una menor incidencia del cáncer de colon (Phillips, 1975).

Graham (1978) reportó una disminución en el riesgo a padecer cáncer de colon asociado con la ingesta de vegetales. Basadas en estudios epidemiológicos, se pueden establecer tres hipótesis sobre el cáncer de colon y el rectal: una asociación causal del total de la grasa saturada consumida, el efecto protector de la fibra dietética y el efecto protector de las plantas y de los vegetales (Wynder y

col., 1983). Por lo tanto, consumir una dieta que permita al organismo purificarse y eliminar las toxinas acumuladas por el consumo de ciertos alimentos, y en la que se reduzca el consumo de alimentos grasos, puede resultar como una alternativa de protección contra el cáncer. La evidencia sobre la capacidad de los vegetales y las plantas para alterar las rutas de la carcinogénesis se ha obtenido a través de estudios con animales con cáncer inducido por carcinógenos químicos.

En diversos estudios se ha reportado que los fitoquímicos, los metabolitos secundarios contenidos en las plantas, interfieren con etapas específicas del proceso de la carcinogénesis e inhiben, retardan o revertien la tumorigénesis (Surh, 2003).

2.4.6 Moringa: posible alimento quimioprotector.

La *Moringa oleifera* es un árbol originario de la India, perteneciente a las especies tropicales. En diversos reportes científicos, a lo largo de dos décadas, se han descrito las propiedades medicinales y nutricionales de este árbol. Precisamente, estas bondades han sido aprovechadas en los países donde se presentan notables niveles de desnutrición, como es el caso de México en donde se produce (Figura 2.12). De esta planta se acostumbra consumir las flores, frutos, semillas y hojas (Figura 2.13). Por otro lado, la moringa es ampliamente aprovechada también a nivel industrial (clarificación del agua, aceite lubricante, etc.).

La moringa es fuente natural de antioxidantes y glucosinolatos. Estos últimos son fitoquímicos con efecto protector contra el cáncer porque inducen EF2 y en la moringa, específicamente está contenido el 4 α -L-ramnosiloxi benzil isotiocianato. Esta planta, también medicinal, es de uso popular y es empleada de manera empírica para el tratamiento de la colitis, de problemas digestivos y la anemia. Tradicionalmente, se le considera como una panacea para la cura de alrededor de 300 enfermedades. Por sus propiedades popularmente conocidas y por su potencial como agente protector, es crítico realizar estudios para investigar el efecto nutracéutico de esta planta (Fahey, 2005).

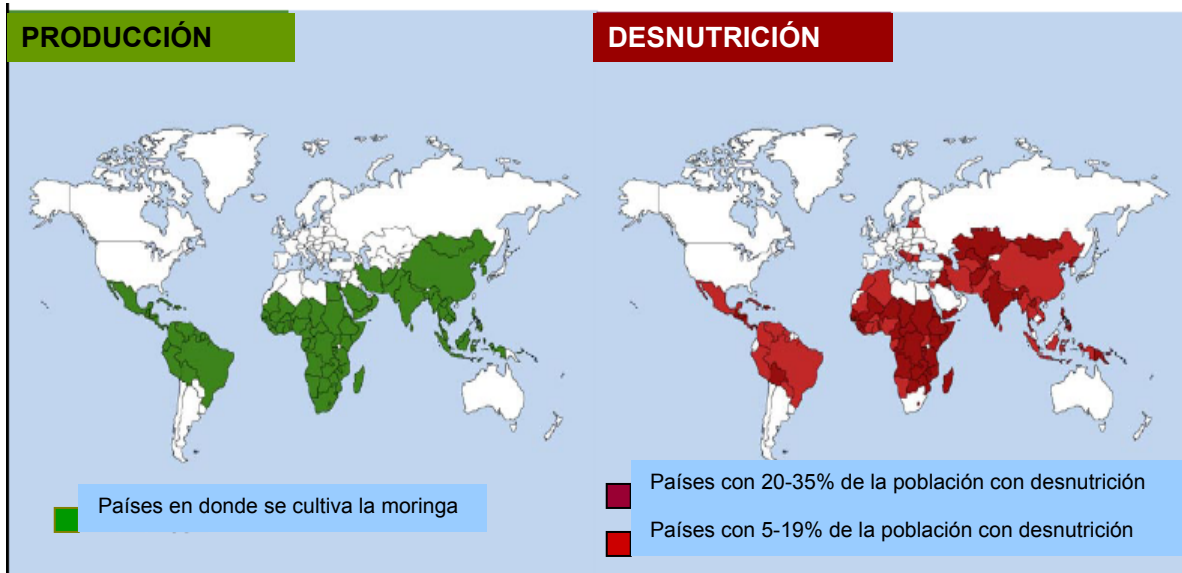


Figura 2.12. Principales zonas productoras de moringa y países con problemas de desnutrición.

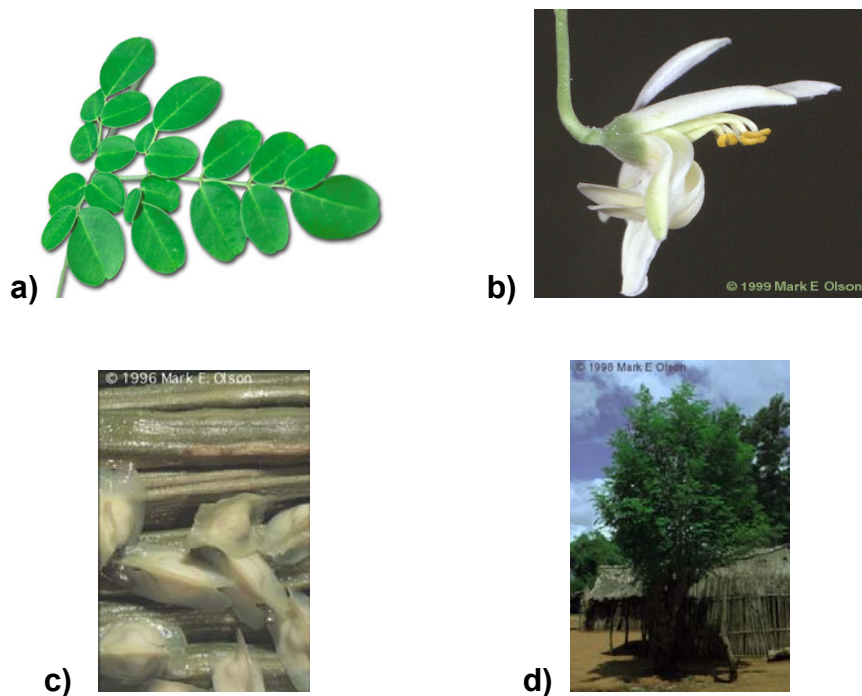


Figura 2.13. La moringa: a) hojas; b) flor; c) semilla; d) árbol.

El contenido nutricional de la moringa según Fuglie (1999) es:

- 7 veces más vitamina C que las naranjas (en 100 g de hoja fresca).
- 4 veces más vitamina A que las zanahorias (en 100 g de hoja seca).
- 4 veces más calcio que la leche (en 100 g de hoja seca).
- 3 veces más potasio que los plátanos (en 100 g de hoja seca).
- 2 veces más proteína que el yogurt (en 100 g de hoja seca).

A pesar de que se ha demostrado que induce EF2 en cultivos celulares, aún no se conocen los beneficios de la administración de la moringa en sus diferentes preparaciones (extractos, infusiones, cremas, aceites, emolientes, polvos y potajes) para el tratamiento o la protección contra el cáncer (Palada, 1996).

3. JUSTIFICACIÓN.

El cáncer ha sido objeto de estudio y de esfuerzos intensos de investigación durante muchos años, encaminados principalmente a encontrar una posible curación, pues es considerado una enfermedad con gran impacto sobre la salud humana. En específico, el cáncer de colon ha tomado gran importancia en los países de occidente en vías de desarrollo por su alta incidencia y por su asociación al tipo de dieta. Además, se ha encontrado que la inflamación crónica juega un papel determinante en esta patología.

Es por esto que es de gran interés diseñar estrategias para reducir el desarrollo del cáncer de colon a través de agentes quimioprotectores. Entre estos agentes se encuentra la gran diversidad de fitoquímicos, los metabolitos secundarios contenidos en las plantas. Diversas investigaciones demuestran las propiedades protectoras que poseen estos compuestos, a través del bloqueo de uno o más pasos que desencadenan al cáncer. En este sentido, se ha estudiado el efecto quimioprotector de los glucosinolatos, fitoquímicos contenidos en las plantas como la moringa. Debido a su alto valor nutricional y a sus conocidas propiedades medicinales, se ha propuesto a la moringa como un alimento protector. No obstante, aún no existen estudios que describan el efecto quimioprotector de la moringa en modelos de cáncer de colon. Por lo que este trabajo está encaminado a describir la contribución de la moringa en la inducción de enzimas desintoxicantes de carcinógenos, así como su potencial como agente quimioprotector contra el desarrollo del cáncer de colon en ratones.

4. HIPÓTESIS.

La moringa tiene mayor capacidad de reducir la inflamación y el cáncer de colon, al disminuir la incidencia de las lesiones preneoplásicas inducidas por el AOM y promovidas por el DSS, a través de la inducción de enzimas de fase 2 y la inhibición de biomarcadores de inflamación en comparación con el D3T y la nimesulide, respectivamente.

5. OBJETIVOS.

5.1 General.

- Evaluar el efecto protector de la *Moringa oleifera* en un modelo de cáncer-inflamación del colon iniciado con AOM y promovido con DSS en ratones de la cepa ICR/CD-1.

5.2 Específicos.

- 1) Caracterizar el modelo de cáncer-inflamación del colon en ratones de la cepa ICR inducido químicamente con el carcinógeno AOM y el promotor de colitis DSS, mediante la:
 - Evaluación de las alteraciones histológicas y la presencia de células inflamatorias.
 - Modulación del proceso de inflamación al detectar el daño ocasionado en la estructura de la mucosa del colon.
 - Conteo e incidencia de las lesiones preneoplásicas.
- 2) Evaluar el efecto protector de la dieta a base de moringa sobre el modelo animal de cáncer-inflamación del colon mediante la:
 - Aceptación de la dieta a base de moringa.
 - Inducción de enzimas de fase 2 en comparación con el D3T.
 - Determinación de biomarcadores de inflamación y modulación del proceso de inflamación en la mucosa del colon en comparación con la nimesulide.
 - Conteo e incidencia de lesiones preneoplásicas.

6. METODOLOGÍA.

El proyecto de investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Johns Hopkins, como parte del programa de intercambio académico del CONACYT. Se trabajó como visitante científico en el laboratorio del Dr. Thomas W. Kensler, del Departamento de Toxicología, en la Escuela de Salud Pública de la universidad (615 N. Wolfe St., Room E7201, Baltimore, MD, 21205, EUA).

6.1 MATERIALES.

6.1.1 Material Químico.

Carcinógeno.

El **azoximetano (AOM)** ($C_2H_6N_2O$) fue adquirido a través de Midwest Research Institute (#Lote: 8864-23-26) y se preparó a una concentración final de 7.5 mg/Kg de peso corporal en solución salina fisiológica al 0.9% de NaCl (Sigma Chemical Co., St Louis MO, EUA.).

Reactivos.

Los reactivos para la determinación de la actividad enzimática de **GST** y **NQO1**, Tris-HCl, $MgCl_2$, KCl, sacarosa ultrapura, $NaHPO_4$, Na_2HPO_4 , GSH, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), albúmina bovina (BSA), flavín-adenín-dinucleótido (FAD), nicotín-adenín-difosfato (NADP), glucosa-6-fosfato (G6P), tetrazolio (MTT), glucosa-6-fosfato deshidrogenada (G6PD), menadiona, dicumarol, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Tween 20 se adquirieron en Sigma Chemical Co (St Louis MO, EUA.). El acetonitrilo se adquirió en J. T. Baker Chemical Co. (Phillisburg, NJ, EUA).

Los reactivos para determinar **proteína** por el método del ácido bicínico (BCA), se adquirieron en Pierce (Rockford, IL, EUA).

Los reactivos para las **tinciones** con azul de metileno y por hematoxilina y eosina (H&E), xileno, hematoxilina, eosina, formalina, etanol y azul de metileno también se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, EUA).

Los reactivos para la determinación de los niveles de **TNF α** , la actividad enzimática de **MPO** y la determinación de **peroxidación de lípidos** se adquirieron de igual manera en Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, EUA).

6.1.2 Material Biológico.

Anticuerpos.

Los anticuerpos para **TNF α** se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EUA).

Animales.

Se utilizaron ratones (20-21 g) hembras de 5-6 semanas de edad de la cepa **ICR/CD-1** silvestres del bioterio Harlan, Baltimore, MD, EUA. Para la caracterización del modelo y para la evaluación del efecto de la moringa, se emplearon ratones hembras porque son escasamente utilizadas en el laboratorio de la universidad; no son tan agresivas como los machos que se matan entre sí y porque en el modelo de cáncer-inflamación se ha observado que los parámetros a medir en los experimentos no se ven afectados por el efecto de las hormonas femeninas (Kohno y col., 2005). Los ratones macho sólo se emplearon para evaluar la aceptación de la dieta de moringa, debido a su disponibilidad para este experimento de corto plazo. Se empleó la cepa de ratones ICR/CD-1, originaria de Suiza, ya que es una cepa útil para realizar estudios en modelos de cáncer y es apta también para estudios anatómicos (estudios del colon). En todos los experimentos, los animales se alojaron en jaulas de acrílico (5 animales por jaula como máximo) en ambiente controlado de temperatura, luz y humedad (Figura 6.1). Se aclimataron por una semana con una dieta control o dieta basal libre de antioxidantes (AIN 76) antes del tratamiento y se mantuvieron con agua *ad libitum*.



Figura 6.1. Cuarto de animales con regulación de temperatura, luz y humedad.

Hojas de moringa.

Se emplearon las hojas del árbol de la moringa, deshidratadas y molidas (Figura 6.2). En todos los experimentos se empleó el mismo lote de producción, el cual contenía 30 $\mu\text{mol/g}$ del glucosinolato 4 α -L-ramnosiloxi benzil isotiocianato. Dicho lote fue producido y caracterizado por el Dr. Jed W. Fahey del Laboratorio “Brassica Chemoprotection” de la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins. La moringa fue dosificada en comederos de aluminio, uno por cada jaula.



Figura 6.2. Aspecto físico de las hojas deshidratadas de moringa y del comedero de aluminio.

6.2 MÉTODOS.

Con el fin de probar la hipótesis planteada, el proyecto fue dividido en dos partes, la primera parte consistió en la caracterización del modelo animal de cáncer-inflamación del colon y la segunda parte consistió en la evaluación del efecto quimioprotector de la moringa sobre el cáncer de colon.

6.2.1 Caracterización del modelo de cáncer-inflamación del colon.

En esta primera parte del proyecto se realizaron diferentes experimentos para caracterizar el efecto del carcinógeno **AOM**, del promotor de inflamación **DSS** y del agente antiinflamatorio nimesulide (**NIM**) sobre el colon de los ratones ICR/CD1 tratados a diferentes tiempos.

Tratamientos.

Se emplearon 76 ratones hembra ICR en estos experimentos. Después de ser aclimatados por una semana, los animales fueron divididos en grupos de 3 a 10 ratones de acuerdo a la Figura 6.3. Cada 5 días se registró el aumento de peso en gramos de cada ratón. Al día cero de experimentación a todos los ratones se les administró, como dosis de iniciación del cáncer, **AOM** a una concentración de 7.5 mg/kg de peso corporal, en una sola dosis vía intraperitoneal (*i.p*). La dosis se eligió en base a estudios previamente realizados en el Laboratorio de Toxicología, a cargo del Dr. Thomas Kensler, observándose el 100% de incidencia de FCA en ratones ICR con dicha concentración. El aserrín dentro de las jaulas fue removido a las 48 horas después de la inducción del cáncer para evitar el riesgo de contaminación con los metabolitos secundarios del **AOM** excretados por los animales. Con el objeto de evaluar el efecto del **DSS** como agente promotor de inflamación, al día 7 se les administró el 1% y 1.5% de **DSS** en el agua de beber a diferentes tiempos (Figura 6.3) (Suzuki, y col., 2005). Los grupos 3 y 5 fueron alimentados con **NIM** al 0.04% p/p mezclado en la dieta basal (control) en polvo a partir del día 3 hasta el día 35 de experimentación (Kohn y col., 2005). El resto de los grupos (1,2 y 4) fueron tratados con dieta basal en polvo (control). Cada una de las dietas fue dosificada en un comedero de aluminio por jaula (Figura 6.2),

cuya capacidad es de 100-110 g de alimento molido, agregándose diariamente alimento fresco a cada comedero.

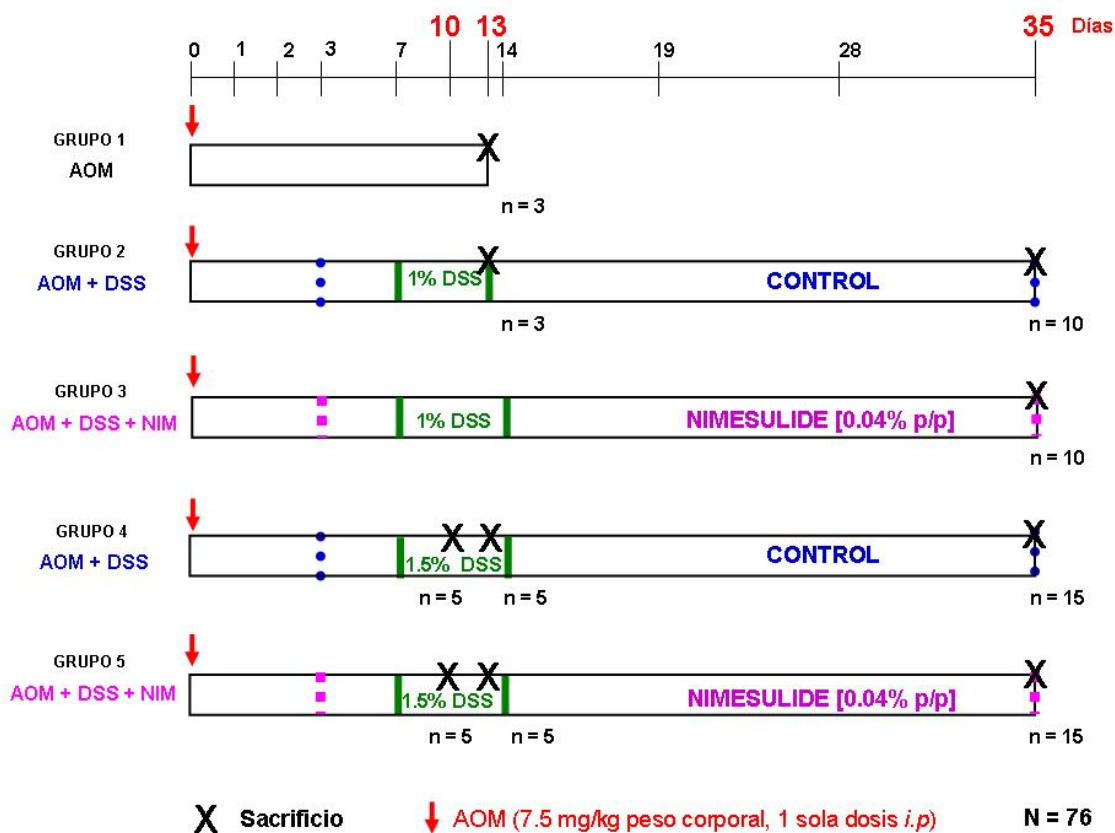


Figura 6.3. Diseño experimental sobre la caracterización del modelo animal de cáncer-inflamación del colon, mostrando los diferentes tratamientos y tiempos de sacrificio.

Sacrificio y toma de muestras.

Los animales fueron sacrificados a los 10, 13 y 35 días después de la inducción con **AOM** de acuerdo al método de sacrificio descrito en el Anexo 2. Posterior a la apertura de la cavidad abdominal del ratón, se extrajo el colon y se fijó en 10% de formalina. A las 48 horas se realizaron cortes del recto y del colon distal para ser evaluados histológicamente con la finalidad de determinar la presencia de células inflamatorias (**neutrófilos**) y de células de infiltración (**linfocitos**) en el tejido en animales tratados por 10 y 13 días. Por otro lado, el

colon extraído de los animales con **35** días de experimentación fue destinado para el conteo de lesiones preneoplásicas (**FCA**).

6.2.2 Evaluación del efecto quimioprotector de la moringa.

Esta segunda parte del proyecto correspondió al estudio del efecto protector de la moringa, en comparación con el agente quimioprotector del **D3T** y la droga antiinflamatoria **NIM**, en el modelo de iniciación-promoción del cáncer de colon.

Tratamientos, sacrificio y toma de muestras.

Primeramente y con la finalidad de ***evaluar la aceptación de las hojas deshidratadas de moringa*** por parte de los ratones macho ICR, los animales fueron tratados durante **6** días con diferentes dietas después de ser aclimatados y divididos en 3 grupos de 3 ratones. El criterio a seguir para determinar la aceptación de la moringa quedó establecido al variar el porcentaje en la dieta durante los seis días hasta encontrar la dosis aceptada por los ratones, según se describe en el Cuadro 6.1. Cabe aclarar que en este experimento no hubo inducción de cáncer ni de colitis.

Cuadro 6.1. Composición de dietas especiales administradas a ratones macho ICR durante 6 días.

	Dieta control	D3T	Moringa	Duración del tratamiento
Grupo 1	100%			Días 1-6
Grupo 2	99.97%	0.03%*		Días 1-6
Grupo 3	0%		100%	Día 1
	67% en pellet		33%	Días 2-3
	50% en polvo		50%	Días 4-6

* (Kwak y col., 2003)

Se usaron como grupos comparativos a los ratones alimentados con la dieta control al 100% y los alimentados con la dieta de **D3T** al 0.03% p/p (Kwak y col., 2003). Cada una de las dietas especiales fue mezclada con dieta control y dosificada en un comedero de aluminio por jaula (Figura 6.2), cuya capacidad fue de 100-110 g de alimento molido, agregándose diariamente alimento fresco a cada comedero. Diariamente se registró el aumento de peso corporal y el consumo de alimento de cada ratón (Figura 6.4).

3

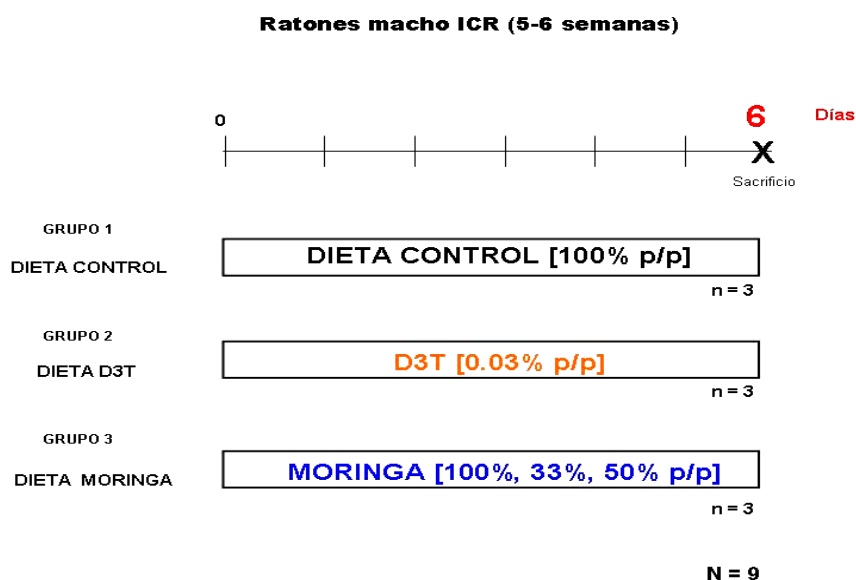


Figura 6.4. Diseño experimental sobre la evaluación de la aceptación de la dieta con moringa a los 6 días.

Los 9 ratones fueron sacrificados por asfixia con CO₂ (Anexo 2) **6** días después de iniciar el tratamiento con las dietas especiales. Se extrajo el hígado de cada uno de los ratones, se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su análisis. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática de la **NQO1** en hígado como modelo para probar la capacidad inductora de la moringa sobre enzimas de fase 2 en comparación con el potente agente quimioprotector, el **D3T**. La actividad enzimática se expresó en nivel de inducción, es decir, la actividad enzimática normalizada con respecto al control. Así mismo, se extrajo el

colon y el intestino delgado, los cuales fueron lavados con PBS y cortados longitudinalmente sobre una superficie de vidrio sobre hielo para poder conservar los órganos mientras se obtenía la mucosa intestinal al raspar el tejido con una espátula. Esta muestra también fue destinada al análisis de la actividad enzimática de la **NQO1**.

Una vez evaluada la aceptación de las hojas de moringa y su capacidad inductora bajo condiciones normales, se procedió a la determinación del **efecto de la moringa sobre el proceso inflamatorio y su efecto sobre las enzimas de fase 2 comparada con las dietas especiales**. Para ello, los animales, después de ser aclimatados y divididos en grupos por jaula, fueron tratados con **AOM** (7.5 mg/kg peso corporal, 1 sola dosis vía *i.p.*) y **DSS** (1.5%) en el agua de beber. El aserrín dentro de las jaulas fue removido a las 48 horas después de la inducción del cáncer para evitar el riesgo de contaminación con los metabolitos secundarios del **AOM** excretados por los animales. Posteriormente, los ratones hembra ICR fueron tratados con las dietas especiales como se describe en el Cuadro 6.2:

Cuadro 6.2. Composición de dietas especiales administradas a ratones hembra ICR durante 13 y 35 días.

	Dieta control	D3T	Moringa	Nimesulide
Grupo 1	100%			
Grupo 2	99.97%	0.03% ^a		
Grupo 3	60%		40%	
Grupo 4	99.96%			0.04% ^b

^{a)} Kwak y col., 2003; ^{b)} Kohno y col., 2005.

Cada una de las dietas especiales fue mezclada con dieta control y dosificada en un comedero de aluminio por jaula (Figura 6.2), cuya capacidad fue 100-110 g de alimento molido, agregándose diariamente alimento fresco a cada comedero. Se registró el aumento de peso corporal y el consumo de alimento por cada ratón (Figura 6.5).

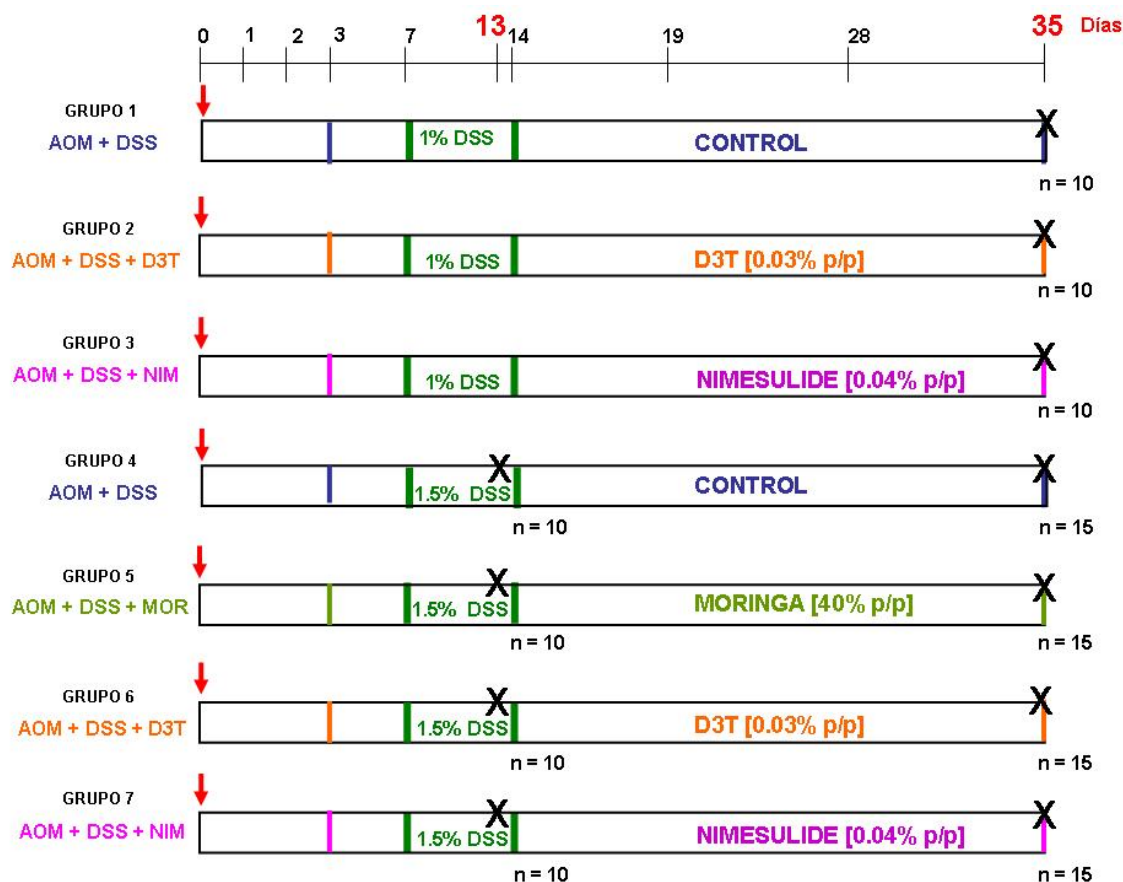


Figura 6.5. Diseño experimental sobre la evaluación del efecto quimioprotector de la moringa. X = Sacrificio, ↓ = AOM (7.5 mg/kg peso corporal, 1 sola dosis *i.p.*), N = 130.

Con la finalidad de evaluar las condiciones del tejido colónico, se buscó por medio de análisis histopatológicos, la presencia de células inflamatorias y de infiltración (**neutrófilos** y **linfocitos**) en la mucosa del colon de 10 animales (5 de cada grupo) sacrificados a los **13** días de experimentación (Figura 6.5). Se les extrajo el colon desde el ciego hasta el recto, se lavó con PBS, se fijó en formalina y después de 48 horas se realizaron cortes transversales del recto y colon distal, los cuales se fijaron en parafina para la tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

Las condiciones inflamatorias del colon se confirmaron con la evaluación de marcadores de inflamación y del daño oxidativo a los **13** días de experimentación. El colon fue cortado longitudinalmente sobre una superficie sobre hielo para coleccionar la mucosa interna para la determinación de marcadores

de inflamación, como la enzima mieloperoxidasa (**MPO**) y el factor necrótico tumoral (**TNF α**), también se midió la peroxidación de lípidos (**PL**) como un indicador del daño oxidativo.

El hígado extraído de los 10 animales sacrificados (n=5) a los **13** días de experimentación, según el protocolo descrito en el Anexo 2 (Figura 6.5), se congeló en nitrógeno líquido y fue almacenado a -80°C hasta el momento de la determinación de la actividad enzimática de **NQO1**. La actividad enzimática se expresó en nivel de inducción, es decir, la actividad enzimática normalizada con respecto al control.

Finalmente y con el objeto de evaluar **el efecto protector de la moringa en el modelo de cáncer-inflamación**, los ratones hembra ICR fueron inducidos con **AOM** (7.5 mg/kg peso corporal, 1 sola dosis vía *i.p.*) y **DSS** al 1% y al 1.5% en el agua de beber. El aserrín dentro de las jaulas fue removido a las 48 horas después de la inducción del cáncer para evitar el riesgo de contaminación con los metabolitos secundarios del **AOM** excretados por los animales. Los animales fueron tratados con las dietas especiales (Cuadro 6.2) 4 días antes del **DSS** para contrarrestar la inflamación inducida (Figura 6.5). Se registró el aumento de **peso** corporal y el **consumo** de alimento por cada ratón.

Al día **35** de experimentación, los 90 animales de todos los grupos fueron sacrificados por asfixia con CO₂. Se extrajo el hígado para la evaluación de la inducción enzimática de **GST** y **NQO1**. También se extrajo el colon desde el ciego hasta el recto, se midió su **longitud**, se lavó con PBS, se congeló y se tiñó con azul de metileno, para el conteo de lesiones preneoplásicas (**FCA**).

Las muestras de todos los experimentos fueron sometidos a las técnicas descritas brevemente a continuación. Estos análisis se encuentran detallados en el **ANEXO 2**. Así mismo, la información sobre cada uno de los reactivos empleados se especifica en el **ANEXO 1**.

6.2.3 Actividades enzimáticas.

Se midió la actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa (**GST**) en hígado y la quinona reductasa (**NQO1**) en diferentes órganos (hígado, mucosa del intestino delgado y del intestino grueso). Las muestras se lisaron directamente con una solución amortiguadora de homogenización que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7), MgCl₂ 10 mM y sacarosa 0.25 M a 4°C. El homogenizado se centrifugó a 10,000 x *g* por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se ultracentrifugó a 100,000 x *g* durante 1 h a 4°C.

Las actividades de **GST** y **NQO1** se midieron en la fracción citosólica o sobrenadante. La actividad total de la enzima **GST** se determinó mediante la conjugación del compuesto CDNB con GSH en presencia de 0.1% de BSA. El producto se monitoreó a una longitud de onda de 340 nm a 25°C durante 2 minutos de reacción (Habig y col., 1974).

La determinación de la actividad de **NQO1** se basa en la reducción enzimática del colorante tetrazolium (MTT), dando como resultado un precipitado azul-café, el cual se midió a una longitud de onda de 610 nm después de 5 min de reacción (Prochaska y col., 1992).

El contenido de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinónico (BCA, Pierce Inc.), empleando BSA como estándar, a una longitud de onda de 562 nm. La actividad específica para cada enzima se expresó como Unidades / mg proteína, siendo una unidad equivalente a nmol/ ml/ min.

La actividad de la enzima mieloperoxidasa (**MPO**) se midió en el colon homogenizado en solución PBS 1X. La determinación se basa en solubilizar a la enzima en el detergente bromuro de hexadeciltrimetilo de amonio (HTAB) al 0.5% (Bradley y col., 1982). Dicha enzima está contenida en los neutrófilos y una mayor actividad enzimática nos indica una mayor acumulación de neutrófilos en el tejido, es decir, se comprueba la presencia de inflamación en el colon. La actividad

enzimática se monitoreo a una absorbancia de 650 nm por 5 min y se expresó en mU/ mg de proteína.

6.2.4 Conteo de FCA o lesiones preneoplásicas.

Una vez extraído y lavado con PBS, el colon se tiñó con azul de metileno y se procedió al conteo de las **FCA** o lesiones preneoplásicas con la ayuda del microscopio (aumento 10x). Se determinó el promedio de lesiones por ratón por grupo, así como el tamaño del colon y la distribución del tamaño de las lesiones en el mismo. Este procedimiento se realizó con la ayuda del candidato a doctorado Baktiar Karim, en las instalaciones del Laboratorio de la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins (Figura 6.6).



Figura 6.6. Conteo al microscopio de FCA en el colon de ratón ICR.

6.2.5 Análisis histopatológico.

Para el análisis histopatológico, el colon se fijó en formalina al 10% por 48 hrs. y luego se realizaron cortes, empleando un bisturí, del recto y del colon distal. Posteriormente se procesaron por la técnica clásica en parafina. Los cortes de microtomo de 5 μ m, su fijación en portaobjetos y su tinción con H&E se realizaron en el Laboratorio de Patología del Hospital Johns Hopkins. Las muestras se observaron al microscopio y se evaluaron a aumentos de 10X, 20X y 40X.

6.2.6 Niveles proteínicos de TNF α .

Los niveles del factor de necrosis tumoral alpha (**TNF α**) se determinó cuantitativamente con la ayuda del kit de ELISA eBioscience® en el colon homogenizado con solución PBS 1X.

6.2.7 Peroxidación de lípidos.

El nivel de peroxidación de lípidos (**PL**) en el colon homogenizado con PBS al 1X se determinó mediante las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), las cuales representan los niveles de malondialdehído, un producto final de la lipoperoxidación. Se empleó el método de separación HPLC, el cual se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del compuesto malonaldehído, formando un aducto (TBA-MDA) cromóforo rosado con un máximo de absorción de 515 a 553 nm. El análisis fue realizado por Bill Osburn, estudiante de doctorado del Departamento de Toxicología de la Escuela de Salud Pública, Universidad Johns Hopkins. Se utilizó una columna supelcosil LC-18, de dimensiones 0.46x25 cm, 5 μ m. La fase móvil consistió de 50 mM K₂PO₄ (pH 6.4), 52.5% de alcohol metílico. Los resultados se expresaron como nmoles / mg proteína (Rozowski y col., 2001).

6.2.8. Análisis estadístico.

Para determinar diferencias en el número lesiones preneoplásicas, tamaño del colon, peso de los animales, consumo de alimento, inducción enzimática, peroxidación de lípidos y los niveles de **TNF α** por efecto del tratamiento, se aplicó el método de ANOVA de un solo factor ($P < 0.05$), seguido de una comparación de medias por el método de Tukey.

Para determinar diferencias en la distribución del tamaño de lesiones preneoplásicas (**FCA**) a lo largo del colon por efecto del tratamiento, se aplicó la Prueba de X^2 para proporciones (tablas de contingencia).

Los resultados se expresaron como las medias \pm error estándar (EE) y para el caso del peso de los animales y el consumo de alimento se expresaron como medias \pm desviación estándar (DE).

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

7.1 Caracterización del modelo animal de cáncer-inflamación del colon.

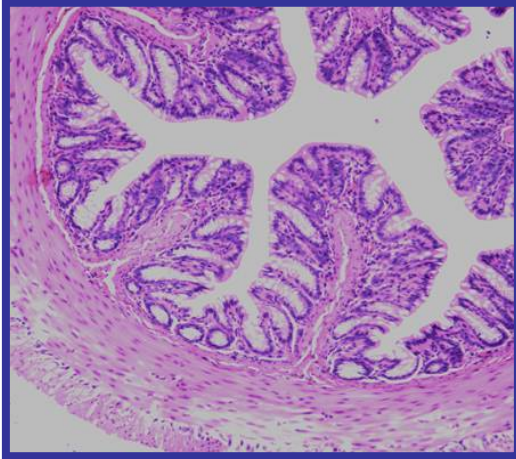
El enfoque de esta primera parte del proyecto consistió en caracterizar el efecto del carcinógeno AOM y del inductor de colitis DSS sobre el colon de los ratones ICR/CD1 tratados a diferentes tiempos, evaluando su impacto en el proceso de inflamación del tejido colónico mediante estudios histopatológicos y en el desarrollo de lesiones preneoplásicas.

Para determinar la presencia de células inflamatorias (neutrófilos) y células de infiltración (linfocitos), se realizaron cortes transversales del tejido colónico y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las siguientes imágenes corresponden a la tinción del corte de la sección del recto de ratones ICR, observadas a un aumento microscópico de 10 X (Figura 7.1.A). Se puede observar que en el colon de ratón, tratado con AOM y con 1% DSS (imagen A del grupo 1), no hay presencia de neutrófilos en la mucosa del recto. Sin embargo, si se esperaba encontrar estas células inflamatorias, ya que el DSS promueve la aparición de éstas. Suzuki y colaboradores (2004) demostraron que el tratamiento con el 1% o más de DSS y con AOM (10 mg/kg p.c.) posee la habilidad de promover el crecimiento de tumores a partir del desarrollo de la inflamación (infiltración de células tales como neutrófilos, linfocitos, macrófagos) en ratones macho ICR después de 14 semanas de experimentación. Estos mismos autores indicaron que el 1% DSS en el agua de beber es la menor dosis que puede promover una carcinogénesis del colon inducida con AOM en ratones macho ICR (2005).

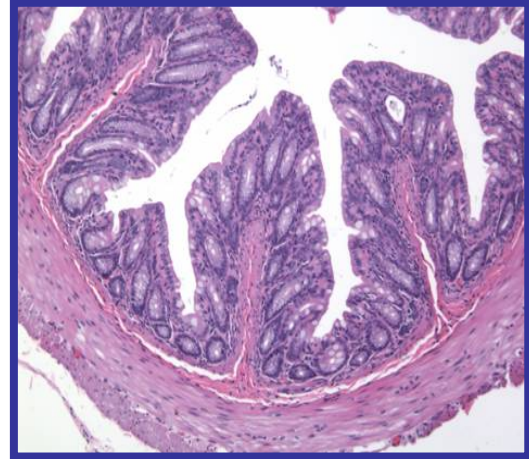
Sin embargo, en ambos grupos, en el tratado con AOM y 1% DSS y aquel con AOM, se observa la infiltración de linfocitos al tejido epitelial del colon, indicados en la figura 7.1.B. Se sugiere que esta migración celular se debió a la respuesta natural del organismo ante el daño ocasionado por el carcinógeno. Sin

embargo, no se identificó la presencia de una cantidad significativa de neutrófilos en el colon.

A)

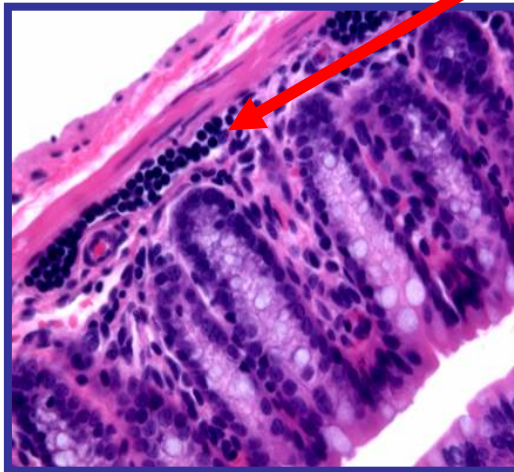


GRUPO 1: AOM + 1%DSS

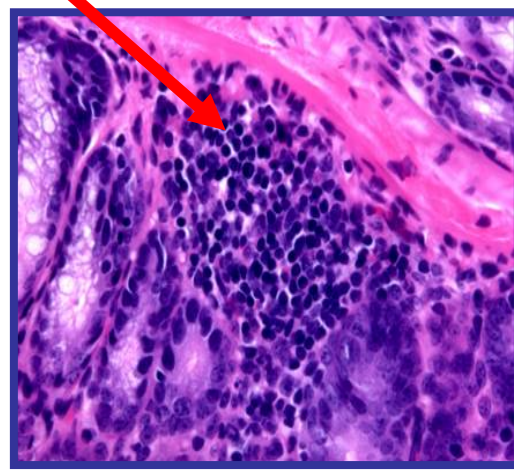


GRUPO 2: AOM

B)



GRUPO 1: AOM + 1% DSS



GRUPO 2: AOM

Linfocitos

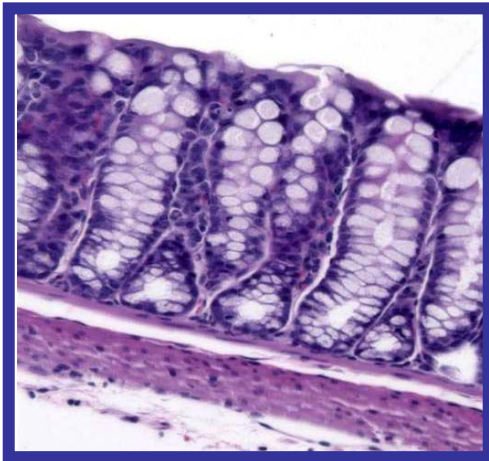
Figura 7.1. Cortes histológicos del A) recto y B) colon de ratones ICR tratados con 1% DSS y sacrificados a los 13 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis *i.p.*), 1% DSS y dieta control. Cada imagen es representativa de cada grupo (n = 3); aumento microscópico: A) 10X y B) 40X.

Por lo tanto, se requirió probar una dosis mayor de DSS (1.5%) para caracterizar el proceso de inflamación en el colon. Sin embargo, se encontró en condiciones aparentemente normales el tejido colónico de los animales tratados con 1.5% de DSS por sólo 3 días y sacrificados al día 10 de experimentación y alimentados con dieta control y con la dieta con nimesulide. No se encontró la infiltración de linfocitos, ni la presencia de neutrófilos y no se observó daño de la estructura de las fosas crípticas a causa de la inflamación (Figura 7.2.A). Por lo que se dedujo que el proceso de inflamación en el colon de los ratones debe ser evaluado a tiempos mayores de exposición con DSS.

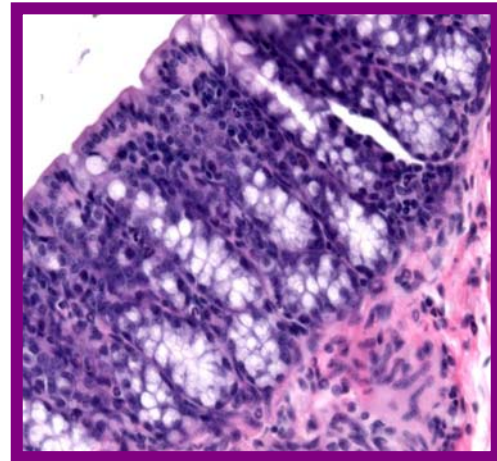
Posteriormente, cuando el tiempo de sacrificio se llevó hasta los 13 días, se observó en los cortes histológicos que los animales tratados con DSS al 1.5% presentaron destrucción de la estructura de las fosas crípticas (Figura 7.2.B). La destrucción de las fosas crípticas es un fenómeno que precede a la inflamación y comienza a suscitarse en el nivel de las células epiteliales durante el desarrollo de la colitis (Cooper y col., 1993). En estos cortes histológicos, también se presentaron los efectos de la inflamación, ya que se encontró la presencia de neutrófilos y linfocitos en el colon de los grupos alimentados con dieta control y los alimentados con nimesulide. Se observó que los cortes teñidos del tejido colónico expuestos a una dosis de DSS del 1.5% y sacrificados a los 13 días, presentaron daño causado por la inflamación y fue más evidente que en aquellos tratados con la dosis del 1% de DSS. En contraste, se ha demostrado que no hay diferencia significativa en cuanto al nivel de inflamación entre el grupo de ratones tratados con AOM (10 mg/kg p.c.) y con 2% DSS (valor de 2.25 ± 0.5 del nivel de inflamación) y aquel con AOM + 1% DSS (valor de 2.00 ± 0.71 del nivel de inflamación) durante 14 semanas (Suzuki y col., 2005). Los resultados de nuestro estudio se contraponen a lo demostrado por estos autores, ya que indican que si hay diferencia entre la inflamación producida por el tratamiento con 1% y con 1.5% de DSS. Además, la notable diferencia entre la inflamación ocasionada por 1% DSS contra 1.5% DSS en nuestro experimento, se ve influenciada por el tiempo de evaluación, ya que a los 14 días el nivel de inflamación es mayor que a las 14

semanas de experimentación con ratones macho ICR tratados con AOM y 2% DSS según Suzuki y sus colaboradores (2004). El tiempo de evaluación en nuestro experimento de 13 días influyó sobre la diferenciación del efecto del 1% y 1.5% DSS sobre el colon de ratones bajo el modelo de iniciación-promoción del cáncer.

A)

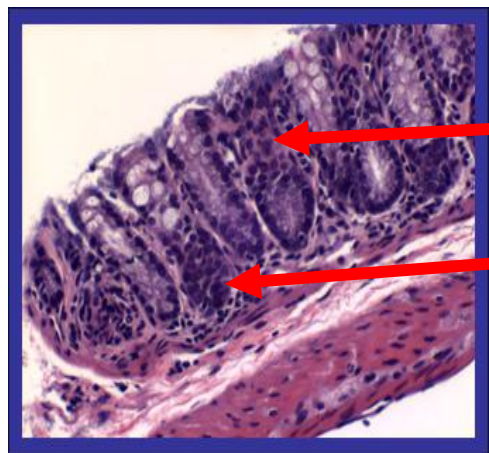


DIETA CONTROL



DIETA NIMESULIDE

B)

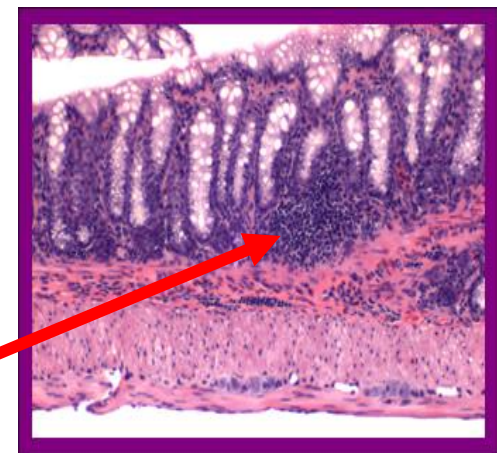


DIETA CONTROL

Destrucción de FC

Neutrófilos

Linfocitos



DIETA NIMESULIDE

Figura 7.2. Cortes histológicos del colon de ratones ICR tratados con 1.5% DSS y sacrificados a los A) 10 días y B) 13 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis *i.p.*), 1.5 % DSS y con dietas especiales: control y NIM al 0.04% p/p. Cada imagen es representativa de cada grupo (n = 5); aumento microscópico: A) 20X y B) 10X.

En cuanto al análisis del número de FCA presentes en el colon de los ratones (Cuadro 7.1), se encontró que en los grupos tratados con 1.5% DSS y AOM (grupos 4: 36.8 ± 4.3 y grupo 5: 46.4 ± 8.3), se elevó el número de FCA en comparación con el de aquellos tratados con 1% DSS (grupo 2: 17.8 ± 1.4 , grupo 3: 13.6 ± 1.4). Se observó una diferencia significativa entre los tratamientos, específicamente el tratamiento del grupo 5, mostró una diferencia marcada de los grupos 2 y 3.

Cuadro 7.1. Número de FCA encontradas en el colon de ratones ICR tratados durante 35 días.

Grupo	Tratamiento	n	FCA / colon	Peso corporal (g)
2	AOM + 1% DSS + control	10	17.8 ± 1.4^{ab}	24.4 ± 2.4^{ab}
3	AOM + 1% DSS + 0.04% nimesulide	10	13.6 ± 1.4^a	23.5 ± 2^a
4	AOM + 1.5% DSS + control	15	36.8 ± 4.3^{bc}	28.2 ± 0.5^c
5	AOM + 1.5% DSS + 0.04% nimesulide	15	46.4 ± 8.3^c	27.9 ± 0.5^{bc}

Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c. 1 dosis *i.p.*), 1 y 1.5% DSS y con dietas especiales: control y NIM al 0.04%. Los valores representan la media \pm EE. Letras diferentes por columna significan diferencias estadísticas entre tratamientos: $P < 0.05$ (analizado por Tukey). Consultar datos numéricos en la figura 1A del Anexo 3.

En el 2004, Suzuki y colaboradores encontraron una incidencia de displasias del 100% en el colon de ratones macho ICR tratados con DSS al 2% y AOM (10 mg/kg p.c) sacrificados a las 5 semanas. En nuestro experimento también se encontró el 100% de incidencia de FCA a las 5 semanas de tratamiento con el 1% y 1.5% de DSS. Estos resultados son comparables ya que las displasias son lesiones o cambios preneoplásicos al igual que las FCA.

Debido al efecto antiinflamatorio de la nimesulide, se esperaba encontrar en el colon de los ratones una disminución significativa en el número de FCA y un menor daño ocasionado por la inflamación en los grupos tratados con esta droga.

Rao y colaboradores (1999) encontraron que la NIM inhibe el desarrollo de las FCA en el colon de ratas F344. Así mismo, Watanabe y colaboradores (2000) consideran a la NIM como un agente quimiopreventivo capaz de reducir la incidencia de carcinomas en un 32% con 200 ppm en la dieta y un 25% con 400 ppm en el colon de ratones macho ICR bajo el tratamiento de AOM (10 mg/kg p.c., *i.p.*, 1 dosis semanal por seis semanas) durante un experimento de 30 días. Por otro lado, en ratones hembra ICR tratados con AOM (10 mg/kg p.c, 1 sola dosis), y con 2% DSS, después de 17 semanas de experimentación se demostró que la dieta con NIM al 0.04% p/p (400ppm) disminuyó la incidencia de adenomas en un 40% y también de carcinomas en un 60% en comparación con el grupo control (AOM + 2% DSS) (Kohno y col., 2005). Los datos de estos estudios, en contraste con nuestros resultados, indican que la NIM, a una concentración de 400 ppm o al 0.04% p/p, es más efectiva en la disminución de carcinomas que de FCA en comparación con el grupo tratado con la dieta control. Los resultados de nuestro estudio demuestran que la NIM actúa mejor como droga antiinflamatoria a bajas concentraciones (1%) del DSS y que su efecto no es tan marcado cuando se emplean altas concentraciones (1.5%), ya que la NIM tuvo una mejor respuesta para disminuir el número de lesiones preneoplásicas en el grupo tratado con 1% DSS que en aquel tratado con 1.5% DSS.

Considerando que la literatura reporta que el peso de ratones adultos cepa ICR es de 25 a 40 gramos, los pesos obtenidos de los 50 ratones sacrificados a las 5 semanas de edad, muestran un peso promedio de 27 gramos, es decir, su peso final cae dentro del intervalo de peso de un animal sin tratamiento, lo que se traduce en que los animales tuvieron un comportamiento normal, a pesar del daño ocasionado por el AOM y el DSS. El cuadro 7.1 muestra el peso en gramos de cada grupo tratado, el cual mostró diferencias significativas entre los tratamientos. La media del peso del grupo 2 (AOM + 1% DSS) es significativamente menor al grupo 4 (AOM + 1.5% DSS), así mismo el peso del grupo 3 (AOM + 1% DSS + NIM) es menor a los grupos 4 y 5 (AOM + 1.5% DSS + NIM). Si se considera el porcentaje de ganancia en peso (ganancia de peso = peso actual / peso inicial al

día cero x 100), los grupos tratados con 1% de DSS presentan un 24% de ganancia sobre su peso inicial después de 35 días de tratamiento. Por otro lado, los animales tratados con 1.5% de DSS y con la dieta control mostraron un incremento en peso del 23.5%, mientras que los alimentados con la dieta con nimesulide un 25.8%. En general, los cuatro grupos tratados tuvieron el mismo comportamiento al aumentar un 24% más sobre su peso al día cero de experimentación.

Debido a que se encontró un mayor número de lesiones con el tratamiento de 1.5% de DSS, se eligió esta dosis para inducir colitis y evaluar así el efecto quimioprotector de la moringa en los siguientes experimentos.

7.2 Evaluación del efecto quimioprotector de la moringa.

Los resultados de esta segunda parte del proyecto indican claramente que los animales, sin inducción de cáncer ni promoción de colitis, aceptaron las hojas deshidratadas de moringa incluidas en la dieta a diferentes concentraciones durante 6 días. Se observó también que el tratamiento con moringa no desarrolló efectos secundarios en los ratones, como por ejemplo la baja de peso a causa de una posible toxicidad de los diferentes porcentajes de moringa en las dietas administradas. Tampoco se observó ni ganancia ni pérdida significativa de peso en los animales alimentados con las dietas especiales (moringa y D3T) con respecto al control (Figura 7.3). Los animales del grupo control obtuvieron una ganancia promedio del 3% y los del grupo con D3T obtuvieron tan sólo el 1.8%, mientras que el grupo con moringa perdió 6.5% de su peso inicial, aún así por debajo del 10% de pérdida aceptado en los protocolos del manejo y cuidado de animales de experimentación.

El consumo estándar de alimento sólido y en polvo, medido en gramos por ratón, es de aproximadamente 5 gramos por día, según lo reportado en la literatura. En la Figura 7.4, se puede observar que por 6 días, los animales del grupo control, en promedio, comieron 4 g, el grupo tratado con D3T: 3.6 g y el

grupo tratado con moringa: 3.7 g, no observándose un efecto secundario o negativo de la dieta a base de moringa, ya que no perdieron una cantidad significativa de peso.

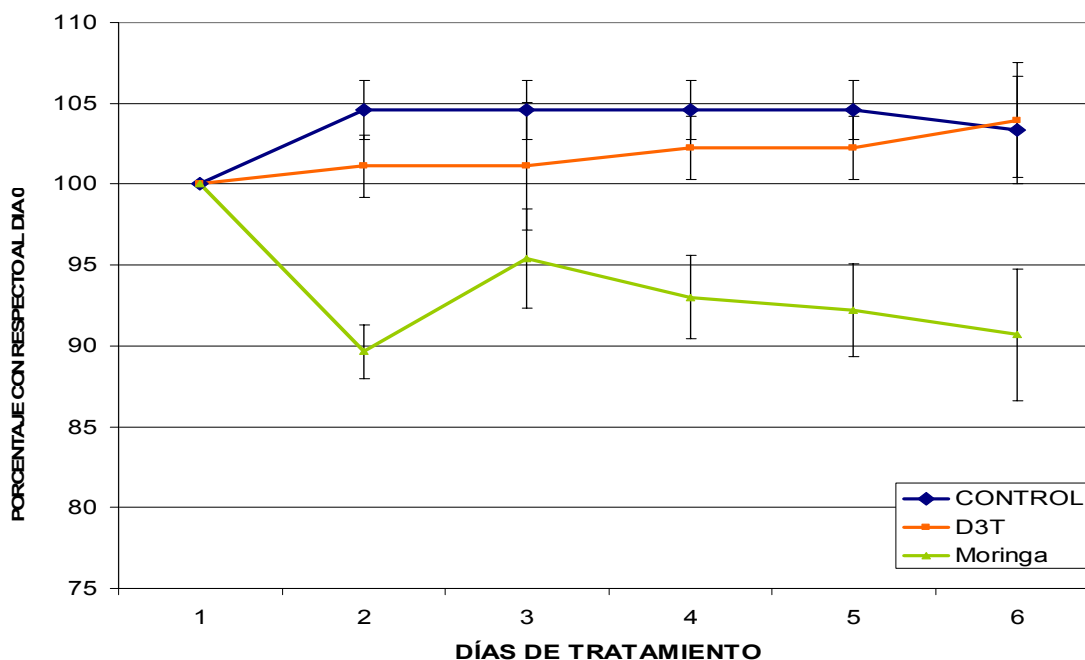


Figura 7.3. Cambios en el porcentaje de ganancia o pérdida de peso de ratones ICR tratados durante 6 días.

Los ratones macho ICR/CD-1 fueron tratados con dieta control, dieta con D3T al 0.03%, dieta con moringa al 100% el día 1, al 33% los días 2 y 3 y al 50% los días 4, 5 y 6. Los valores representan las medias del porcentaje del peso al día cero (n=3); barras, DE; los tratamientos NO son significativamente diferentes del control $P > 0.05$ (analizado por ANOVA). Consultar datos numéricos de peso en el cuadro 1A del Anexo 3.

Los animales tratados con la dieta de moringa en polvo al 100% al día 1, no consumieron nada de alimento, por lo que al día 2, se les administró una dieta en pellet con un menor porcentaje de moringa (33% moringa mezclado con el 67% de dieta control). Cuando se les administró una dieta con el 50% de moringa en polvo, los ratones consumieron más alimento al 4to. día, comparados con el control; sin embargo, defecaron más, por lo que probablemente no obtuvieron una ganancia significativa de peso. Los datos de consumo de alimento obtenidos en

este estudio, también reflejan que los animales aceptaron la dieta con moringa. Cabe señalar que aún no se han publicado datos sobre el consumo de la moringa, probado en un modelo animal, y que estos datos puedan ser útiles como referencia para compararlos con los encontrados en nuestro estudio.

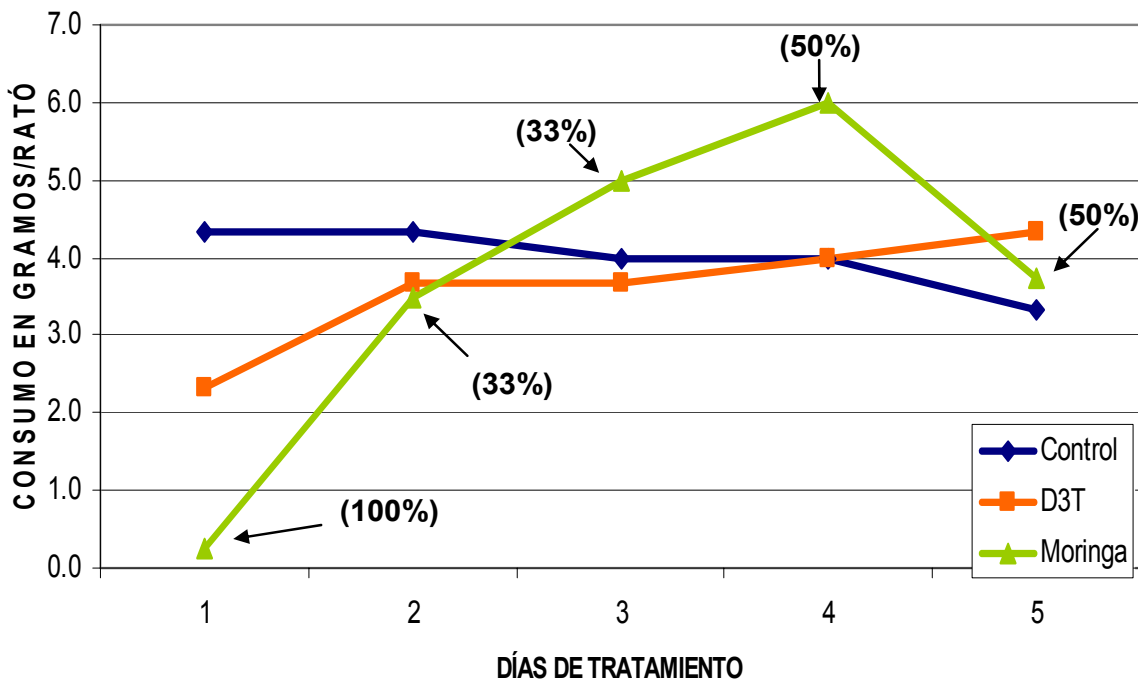


Figura 7.4. Consumo de alimento en gramos por ratón durante 6 días de tratamiento con diferentes dietas. Los ratones macho ICR/CD-1 fueron tratados con dieta control, dieta con D3T al 0.03%, dieta con moringa al 100% el día 1, al 33% los días 2 y 3, al 50% los días 4, 5 y 6. Los valores representan la media de los gramos consumidos por ratón ($n = 3$ en 1 jaula), los valores entre paréntesis representan el porcentaje de la dosis de moringa en la dieta; los tratamientos NO son significativamente diferentes del control $P > 0.05$ (analizado por ANOVA). Consultar datos numéricos de consumo en el cuadro 1A del Anexo 3.

Se eligió la determinación de la enzima quinona reductasa como modelo enzimático en hígado, puesto que la GST presenta actividad basal por encima de la actividad basal de NQO1 en animales tratados sólo con dieta control. Por lo tanto, el objetivo de determinar la actividad de NQO1 fue demostrar que la moringa es capaz de inducir a una enzima de fase 2 con bajos niveles de actividad

basal, así como determinar la concentración mínima de moringa capaz de inducir EF2. En este estudio de 6 días resultó que la actividad enzimática de NQO1 fue mayor en el colon de los ratones tratados con la dieta con D3T (26.3 mU/mg \pm 1.2), representando un nivel de inducción 4.44 veces mayor que el control (Figura 7.5). Este mismo tratamiento, en el intestino delgado, presentó una actividad de 9.25 veces más (6.6 mU/mg \pm 0.5) que la dieta control y que aquella con moringa. En contraste, la dieta con moringa indujo la actividad enzimática en el hígado y en el colon de manera significativa, observándose un mayor efecto en el hígado (15.6 mU/mg \pm 1.8) fue mayor 2.76 veces que el control.

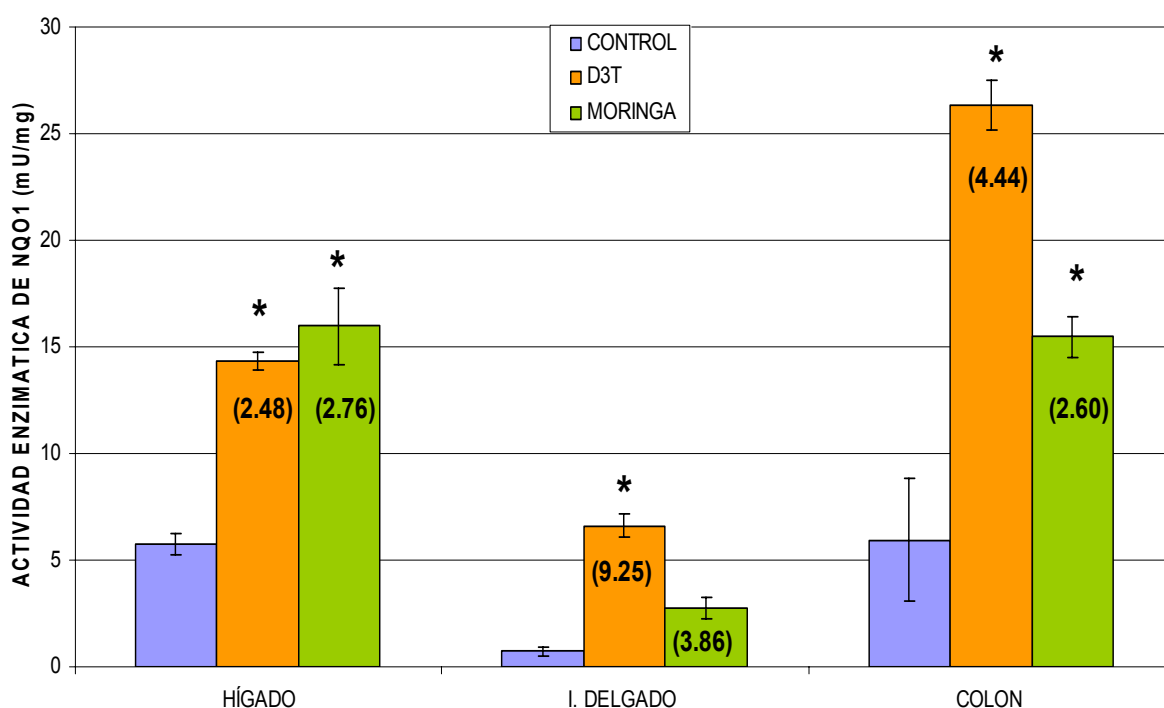


Figura 7.5. Actividad enzimática de NQO1 en diferentes órganos de ratones ICR tratados con dietas especiales durante 6 días. Los ratones macho ICR/CD-1 fueron tratados con dieta control; dieta con D3T al 0.03%; dieta con moringa al 100% el día 1, al 33% los días 2 y 3, al 50% los días 4, 5 y 6. Los valores representan las medias (n = 3); barras, EE; valores entre paréntesis, actividad enzimática normalizada con respecto al control; * los tratamientos son significativamente diferentes con respecto al control P < 0.05 (analizado por ANOVA). Consultar datos de actividad enzimática y nivel de inducción en Cuadro 7.2.

Considerando que no hay registros en la literatura acerca de la inducción enzimática de la moringa y que esta planta contiene glucosinolatos, los cuales son convertidos en isotiocianatos (productos de los glucosinolatos degradados por la enzima mirosinasa presente en las plantas), la actividad enzimática inducida por los isotiocianatos es información útil para compararla con la moringa. La enzima NQO1 es inducida 3.5 veces más en el hígado de ratones hembra ICR tratados con 15 $\mu\text{mol/kg}$ del 6-metilsulfinilhexil isotiocianato (6-HITC, 0.2 mg/ obtenidos por biotransformación del 6-HITC administrado vía intragástrica en ratón) durante 5 días, en comparación con el control (Morimitsu y col., 2001). La dieta con moringa al 50% alcanzó un nivel de inducción de la enzima NQO1 de 2.76 veces mayor que el control con la administración de 3.04 g/ratón del glucosinolato, si se considera que la moringa contiene 30 $\mu\text{mol/g}$ del glucosinolato 4 α L-ramnosiloxi-benzil isotiocianato. Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que se obtuvo un nivel de inducción similar cuando se comparan los tratamientos con ambos fitoquímicos, a pesar de que tanto las vías de administración, como las vías de absorción son diferentes. Se deduce que se requiere una dosis mayor de moringa (de 40% o más porcentaje en la dieta) para alcanzar un nivel de inducción de la enzima NQO1 por arriba del grupo control.

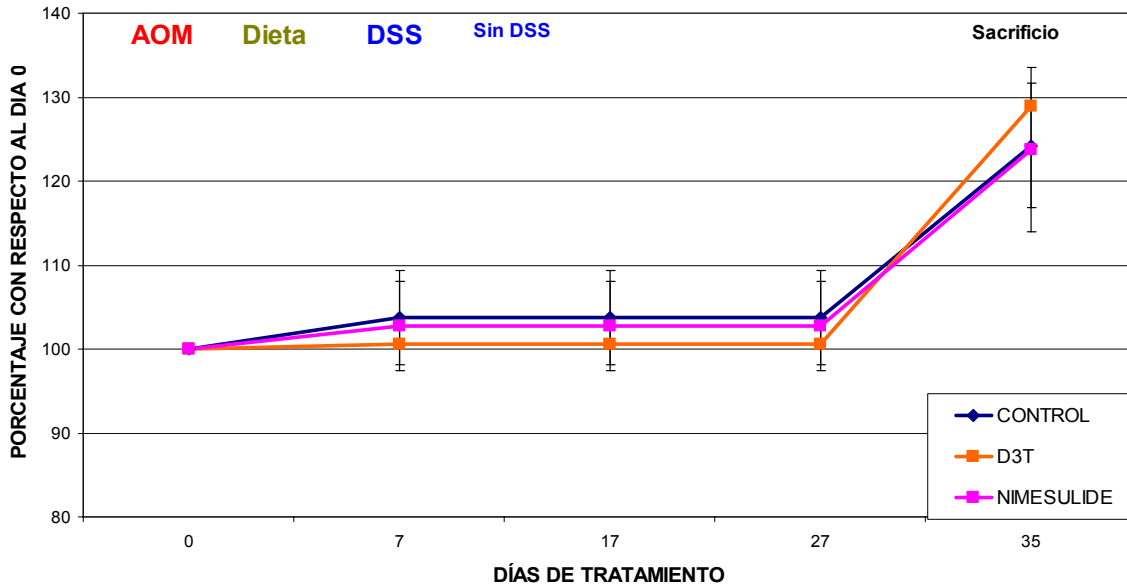
Con una concentración de D3T de 0.03% p/p y una dosis estimada de 1.5 mg de consumo por ratón, la actividad hepática de NQO1 inducida por el D3T (14.35 mU/mg \pm 0.8) fue 2.48 veces mayor que el control. Comparando estos datos con los obtenidos por Kwak y colaboradores (2001), con una dosis de D3T de 0.3 mmol/kg vía intragástrica (0.92 mg/ratón) administrada a ratones hembra ICR durante 3 días, la actividad de NQO1 se elevó 3 veces más que el control. Estos datos son similares en cuanto al nivel de inducción a los encontrados en nuestro estudio y remarcan que las vías de administración, dieta e intragástrica, provocaron una respuesta enzimática similar en el hígado de los ratones.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la moringa promueve la actividad de la enzima NQO1 preferentemente en el hígado y el D3T la promueve en el intestino delgado y grueso (colon). La actividad enzimática inducida por el D3T en el intestino delgado de ratas Sprague-Dawley fue demostrada por Munday y Munday (2004), donde ellos indicaron que a una dosis de 125 $\mu\text{mol/kg/día}$ (0.38 mg/rata) se incrementó significativamente la actividad de NQO1 en este órgano blanco, con un nivel de inducción de 5 veces más que el control.

Por medio del estudio del peso ganado por los ratones y su consumo de alimento, se identificó su comportamiento a lo largo de los 35 días de experimentación. Se encontró que no hubo diferencia significativa entre la ganancia en peso de los grupos de animales tratados con 1% de DSS y con las dietas especiales con respecto al grupo tratado con dieta control. El peso final de los ratones (26 g) cae dentro del rango de peso de un animal sin tratamiento (25 a 40 g), lo que indica que las dietas especiales de D3T y nimesulide no produjeron efectos secundarios en los ratones. La Figura 7.6.A muestra el porcentaje de ganancia en peso de cada grupo tratado, resultando una ganancia del 24% más sobre su peso inicial en los animales de los grupos con la dieta control y con dieta con nimesulide y para el grupo con la dieta con D3T, la ganancia fue del 29% después de 35 días de tratamiento. Las mediciones de peso en este experimento se registraron cada 7 días.

A los 35 días de experimentación, en los animales tratados con 1.5% de DSS por 7 días (Figura 7.6.B), se observó que no hubo diferencia significativa en la ganancia de peso entre los tratamientos ya que la dieta control presentó un incremento del 23.5%, la dieta con NIM un 25.8%, la dieta con moringa un 17.3% y por último, la dieta con D3T un 20.3%. En promedio, los cuatro grupos tratados aumentaron un 22% más sobre su peso al día cero de experimentación. El peso promedio de estos ratones a las 5 semanas de edad (28 g) también cayó dentro del intervalo del peso estándar de ratones adultos, lo que indica un comportamiento normal en estos animales.

A)



B)

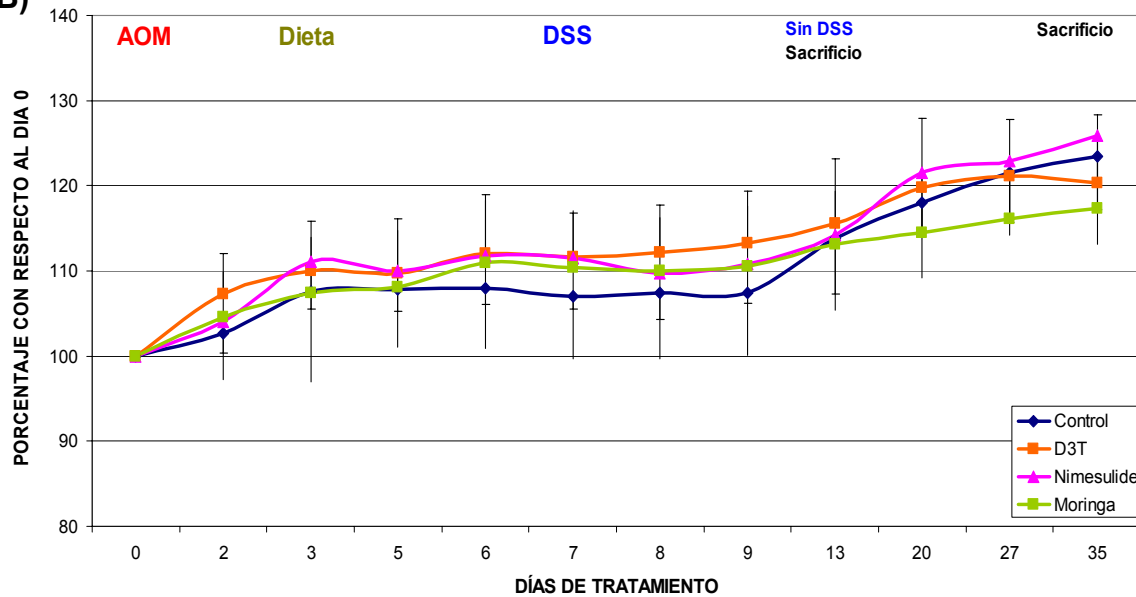


Figura 7.6. Cambios en el porcentaje de ganancia o pérdida de peso de ratones ICR tratados con A) 1% DSS y B) 1.5% DSS. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratadas con AOM (7.5 mg/kg p.c. 1 dosis *i.p.*), A) 1% DSS y con dietas especiales: control, D3T al 0.03%, NIM al 0.04%, B) 1.5% DSS y con dietas especiales: control, D3T al 0.03%, NIM al 0.04% y moringa al 40%. Días de experimentación: 35 días. Los valores representan las medias del porcentaje del peso al día cero A) n = 10 y B) n = 15; barras, DE; los tratamientos NO son significativamente diferentes del control $P > 0.05$ (analizado por ANOVA). Consultar datos numéricos de peso en cuadro A) 2A y B) 3A del Anexo 3.

Las mediciones del peso de los ratones se registraron diariamente durante la administración del tratamiento con dietas especiales y con el DSS, cuando este tratamiento terminó se realizaron cada 7 días hasta el día del sacrificio.

Es importante resaltar el efecto que tuvo el tratamiento con DSS, ya que mientras éste fue administrado no hubo ni incremento ni pérdida en el peso de los animales, tal y como se puede observar en la gráfica 7.6. A partir del día 14, los ratones incrementaron su peso de manera continua hasta el día del sacrificio. Es probable que los ratones no aumentaran de peso durante el tratamiento de DSS debido a que esta sal provoca irritación de la membrana y mucosa del colon y, en consecuencia, los ratones no consumieron alimento suficiente debido al malestar provocado por la administración del DSS en el agua de beber.

La Figura 7.7 muestra la cantidad en gramos de alimento consumido por los ratones durante los 35 días de experimentación. Se puede observar que los animales alimentados con la dieta de moringa tuvieron un mayor consumo de alimento y, al contrario, aquellos con la dieta de D3T consumieron una cantidad significativamente menor a los de la dieta control. A partir de estos resultados se sugiere que, bajo las condiciones en este modelo, la dieta con moringa al 40% fue aceptada por los animales.

Durante el transcurso de los 35 días de experimentación se observó el aspecto físico de las heces de los animales tratados con moringa y se encontró que eran notoriamente más oscuras que las heces de los animales con dieta control (Figura 7.8). No se sabe si el color oscuro de las heces se debe a la presencia de restos de sangre, pues se carece de este tipo de análisis que pueden revelar algún efecto abrasivo de la moringa sobre el colon de los ratones debido a su contenido de fibra (contiene el 27% de fibra).

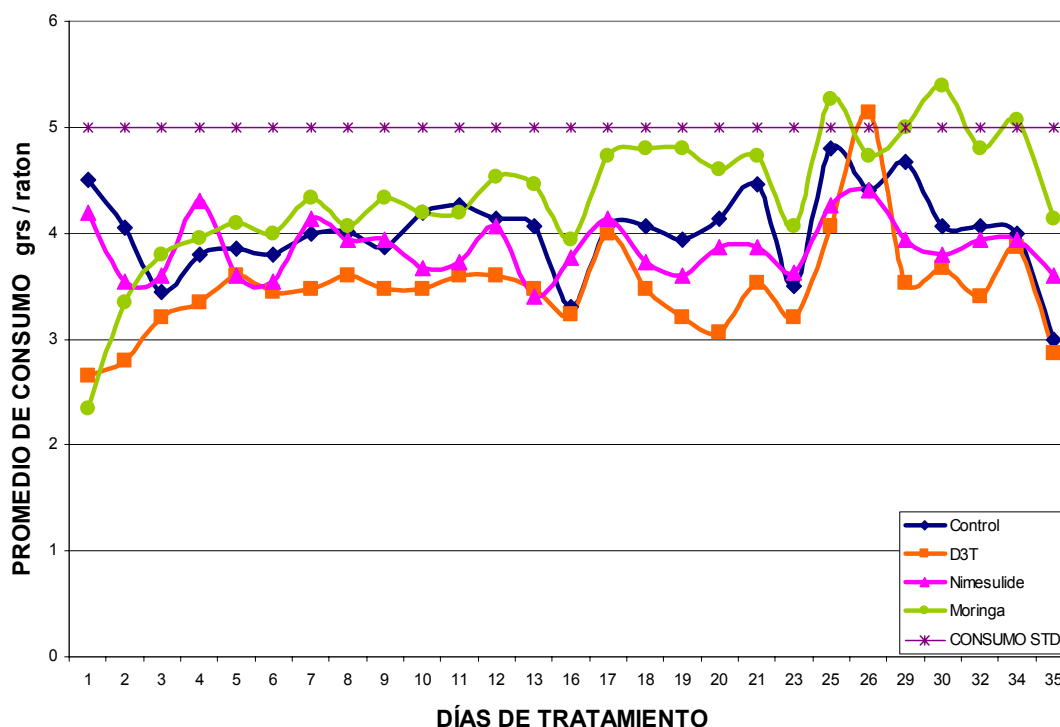


Figura 7.7. Consumo de alimento en gramos por ratón durante 35 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis *i.p.*), 1.5 % DSS y con dietas especiales: control, D3T al 0.03%, nimesulide al 0.04% y moringa al 40%. Los valores representan el promedio de gramos consumidos (n = 15); los tratamientos con moringa y D3T son significativamente diferentes del control P < 0.05 (analizado por ANOVA). Consultar datos numéricos de consumo en el cuadro 3A del Anexo 3.

Una posible causa de la presencia de sangre en las heces puede deberse al efecto sinérgico de la administración del DSS con la moringa, ya que el DSS causa irritación de la mucosa del colon. Por otro lado, el resto de los grupos no presentaron heces tan oscuras. Suzuki y colaboradores (2004), encontraron que ratones macho ICR presentaron heces con restos de sangre después de la administración del 1 o 2% de DSS y del AOM a la segunda semana de experimentación (10 mg/kg p.c.). La administración del DSS ocasiona irritación de la mucosa y membranas del colon y, por lo tanto, sangrado. En este sentido, se ha demostrado que el AOM ocasiona mutaciones en β -catenina y, en consecuencia, se induce la expresión de proteínas inflamatorias como la cicloxigenasa (COX-2) y de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), las cuales también generan un microambiente inflamatorio en el colon (Takahashi y Wakabayashi, 2004).



Figura 7.8. Aspecto físico de las heces de ratones ICR tratados durante 35 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis *i.p.*), 1.5 % DSS y con dieta con moringa al 40% y dieta control (n=15).

Por otro lado, no se observó ningún cambio en el comportamiento de los animales, ni tampoco ninguno de los animales tratados murió durante el periodo experimental.

Por otro lado, se determinó el efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de la enzima NQO1 en el hígado de ratones ICR. Cabe señalar que con la finalidad de comparar la capacidad de inducir EF2 entre los grupos alimentados con moringa y aquellos con dietas especiales, se emplearon las muestras provenientes de los grupos tratados con 1% de DSS y 1.5% de DSS. A los 35 días de tratamiento (AOM + 1% DSS), la actividad de NQO1 fue considerablemente mayor en los grupos tratados con el potente inductor D3T (23.2 mU/mg \pm 3.7) con un nivel de inducción de 1.89 veces mayor que el control. Por otro lado, la dieta con NIM (16.1 mU/mg \pm 1.6) incrementó la actividad 1.3 veces

más que el control. A los 13 días de tratamiento (AOM + 1.5% DSS), la actividad de NQO1 fue mayor en el grupo tratado con la dieta con D3T (102 mU/mg \pm 7.3) con un nivel de inducción 3.75 veces mayor que el grupo control. En el caso de la moringa el nivel de inducción fue de 2.34 veces por arriba del control (63.7 mU/mg \pm 9.7). La dieta con NIM (27.7 mU/mg \pm 1.3) presentó un nivel tan sólo 0.02 veces mayor que el control (27.2 mU/mg \pm 1.2) (Figura 7.9).

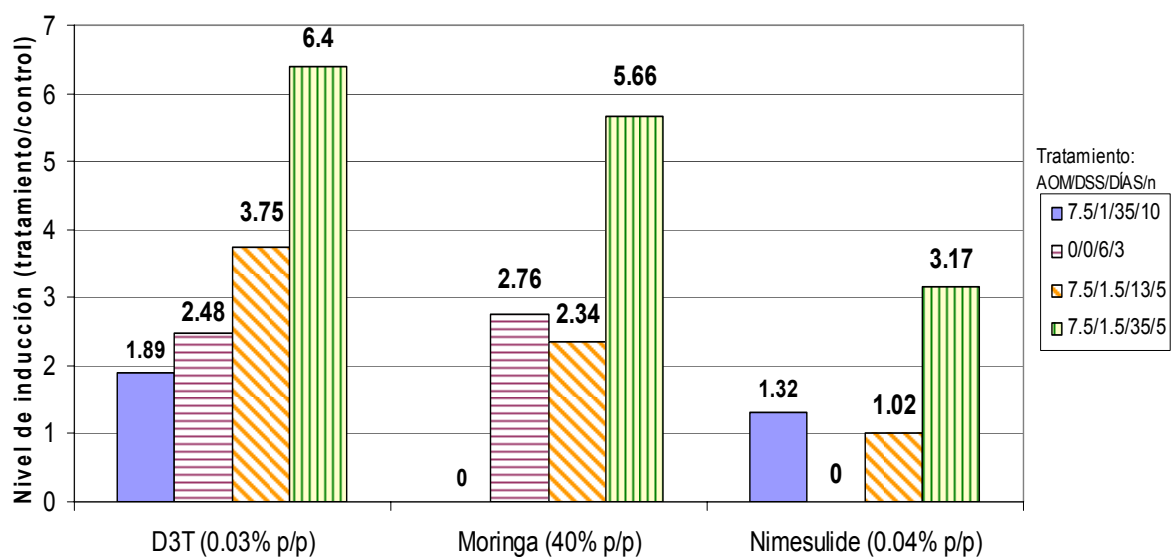


Figura 7.9. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de NQO1 en hígado de ratones ICR. Los valores representan el nivel de inducción enzimática normalizada con respecto al control. Cada estilo de barra representa a uno de los 4 diferentes tratamientos administrados a los ratones hembra ICR/CD-1: Dosis de AOM/ Concentración del DSS/ Período experimental/ Valor de n. Todos los tratamientos son significativamente diferentes del control: $P < 0.05$, a excepción del grupo tratado con nimesulide con AOM + 1.5% DSS + 13 días + 5 animales: $P > 0.05$ (analizado por ANOVA). Consultar datos numéricos en el cuadro 7.2.

Se puede observar en los datos del Cuadro 7.2 que la actividad enzimática de la NQO1 se incrementó significativamente en el hígado de los ratones tratados con la dieta de moringa. La moringa tuvo un comportamiento inductor similar al

grupo tratado con D3T, potente inductor de esta enzima. Lo anterior sugiere que la moringa tuvo la capacidad de inducir a las enzimas de fase 2 (NQO1) en este modelo.

En la figura 7.10 se muestran los valores de la actividad de la enzima GST en el hígado de ratón inducida por diferentes tratamientos. Entre los grupos tratados con AOM + 1%DSS + 35 días + 10 animales, se encontró que el tratamiento con D3T aumentó la actividad de esta enzima de manera significativa ($32.1 \text{ mU/mg} \pm 5.8$), representando 1.53 veces más la actividad por arriba del control. En una menor proporción, la dieta con NIM aumentó 1.16 veces más la actividad con respecto al control ($24.4 \text{ mU/mg} \pm 3.7$). Debido a la falta de información en la literatura acerca del efecto de la NIM en la inducción de enzimas de fase 2 (GST) en hígado de roedores, los resultados obtenidos en este experimento muestran por primera vez la capacidad inductora de la nimesulide sobre estas enzimas citoprotectoras.

Los resultados mostrados en la figura 7.10 de los grupos tratados con AOM + 1.5% DSS + 35 días + 5 animales, indican que el consumo constante durante 35 días de la dieta con moringa y con D3T tienen un efecto positivo al incrementar significativamente las actividades de GST en el hígado de los ratones.

La moringa presenta un nivel de inducción de 4.7 veces mayor que el control, mientras que el D3T muestra un nivel 5.3 veces por arriba del control, por lo que se puede concluir que la moringa tiene un efecto inductor sobre GST muy similar al D3T (Figura 7.10). La dieta con nimesulide tan sólo elevó la actividad 0.38 veces más que el control ($0.6 \text{ U/mg} \pm 0.04$ y $0.4 \text{ U/mg} \pm 0.03$, respectivamente). Los datos sobre la inducción enzimática de la moringa y del D3T en un modelo de cáncer-inflamación del colon son los primeros que han sido registrados, ya que no existe información o reportes al respecto en la literatura.

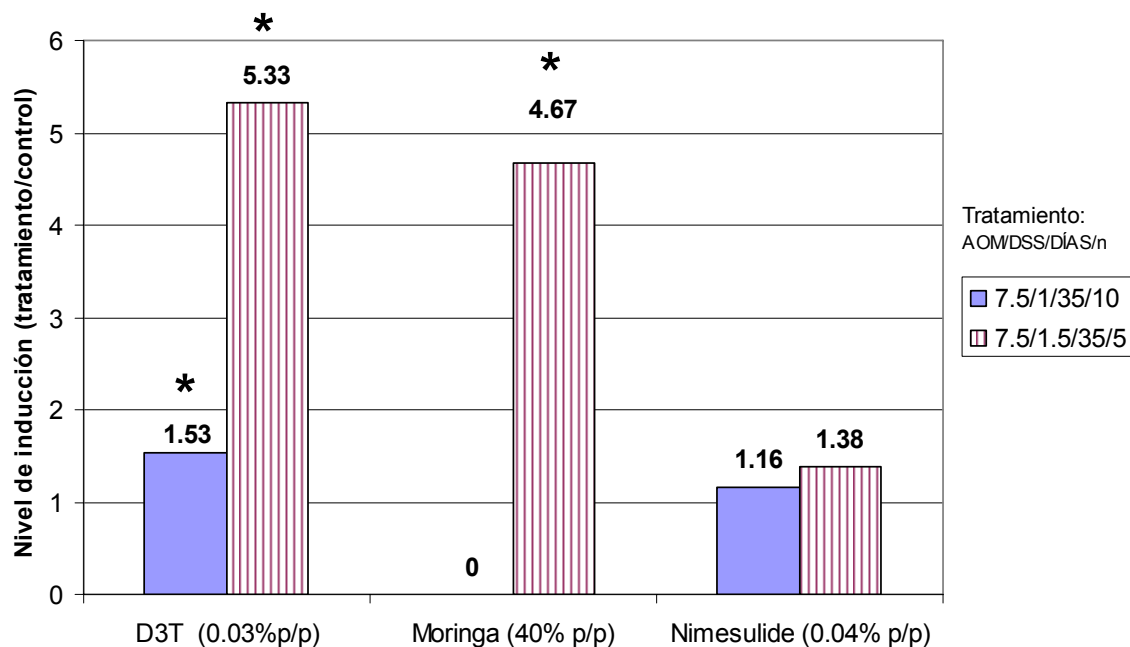


Figura 7.10. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de GST en hígado de ratones ICR. Los valores representan el nivel de inducción enzimática normalizada con respecto al control, considerando al grupo control con valor de 1 (n = 10, n = 5). Cada estilo de barra representa a uno de los 2 diferentes tratamientos administrados a los ratones hembra ICR/CD-1: Dosis de AOM/ Concentración del DSS/ Período experimental/ Valor de n. Las dietas especiales empleadas: D3T al 0.03%, moringa al 40%, NIM al 0.04%. * Los tratamientos son significativamente diferentes del control $P < 0.05$ (analizado por ANOVA). Consultar datos numéricos en el cuadro 7.3.

En general, estos resultados confirman que el D3T y los glucosinolatos poseen el poder inductor de enzimas de fase 2 a través de la promoción del factor de transcripción Nrf2 como ha sido probado por diversos autores (Itoh y col., 1997; Ramos-Gómez y col., 2001).

Cuadro 7.2. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de NQO1 en hígado de ratones ICR.

Tratamiento	n	Dieta especial (% mezclado con dieta control)	Nivel Inducción respecto al control	Actividad enzimática (mU/mg)
6 días	3	Control	1	5.8 ± 0.5
	3	D3T (0.03% p/p)	2.5 ± 0.06	14.4 ± 0.4
	3	Moringa (100, 33 y 50% p/p)	2.8 ± 0.30	16.0 ± 1.8
AOM + 1% DSS + 35 días	10	Control	1	12.3 ± 2.2
	10	D3T (0.03% p/p)	1.9 ± 0.30	23.2 ± 3.7
	10	NIM (0.04% p/p)	1.3 ± 0.10	16.1 ± 1.6
AOM + 1.5% DSS + 13 días	5	Control	1	27.2 ± 1.2
	5	D3T (0.03% p/p)	3.8 ± 0.30	102.0 ± 7.3
	5	Moringa(40% p/p)	2.3 ± 0.40	63.7 ± 9.7
	5	NIM (0.04% p/p)	1.1 ± 0.04	27.7 ± 1.3
AOM + 1.5% DSS + 35 días	5	Control	1	20.4 ± 1.1
	5	D3T (0.03% p/p)	6.4 ± 0.20	130.7 ± 3.0
	5	Moringa(40% p/p)	5.7 ± 0.30	115.5 ± 5.6
	5	NIM (0.04% p/p)	3.2 ± 0.30	64.7 ± 5.5

Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c. 1 dosis *i.p.*), DSS y con dietas especiales. Los valores representan la media ± EE. Todos los tratamientos son significativamente diferentes del control: P<0.05, a excepción del grupo tratado con AOM + 1.5% DSS + 13 días + NIM: P>0.05 (analizado por ANOVA).

Cuadro 7.3. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de GST en hígado de ratones ICR.

Tratamiento	n	Dieta especial (% mezclado con dieta control)	Nivel Inducción respecto al control	Actividad enzimática (mU/mg)
AOM + 1% DSS + 35 días	10	Control	1	157.8 ± 41.7
	10	D3T (0.03% p/p)	1.5 ± 0.6 ^a	240.6 ± 96.9
	10	NIM (0.04% p/p)	1.2 ± 0.4	183.0 ± 61.4
AOM + 1.5% DSS + 35 días	5	Control	1	204.4 ± 27.7
	5	D3T (0.03% p/p)	5.3 ± 0.2 ^a	1090.6 ± 44.8
	5	Moringa(40% p/p)	4.7 ± 1.1 ^a	954.6 ± 23.3
	5	NIM (0.04% p/p)	1.4 ± 0.2	281.3 ± 39.9

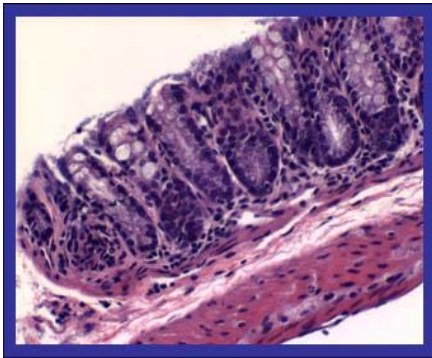
Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis *i.p*), DSS y con dietas especiales. Los valores representan la media ± EE. ^a Tratamientos significativamente diferentes del control P<0.05 (analizado por ANOVA).

Después de evaluar su capacidad inductora de EF2, se determinó el efecto de la moringa sobre el proceso inflamatorio y también sobre el desarrollo de lesiones preneoplásicas en el modelo de inflamación-cáncer del colon.

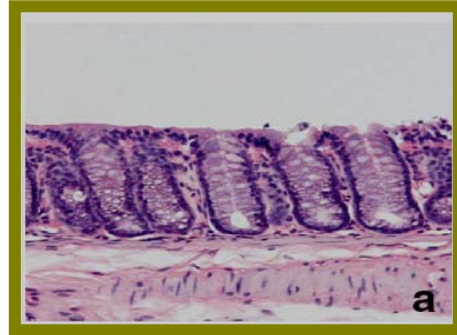
Con el propósito de monitorear el proceso inflamatorio se realizó un estudio histopatológico para observar las condiciones del tejido y buscar la presencia de células inflamatorias y de infiltración en la mucosa del colon de ratones tratados durante 13 días. En este experimento se encontró la presencia de células inflamatorias en el colon de todos los grupos tratados debido al daño por la inflamación. Así mismo, se observó que los animales tratados con moringa presentaban destrucción total de la estructura de las fosas crípticas (Figura 7.11). En cambio, en los animales tratados con D3T se encontró destrucción de un tercio de las fosas crípticas. Los cortes teñidos de tejido colónico de animales alimentados con dieta con D3T y moringa presentaron daño causado por la inflamación. Así como se mencionó anteriormente, también los animales tratados con dieta control y con nimesulide presentaron destrucción de un tercio de las fosas crípticas.

Se sugiere que el daño ocasionado por la dieta de moringa se debió a la combinación entre la moringa y el DSS, o bien a la cantidad de fibra contenida en la moringa. Considerando que el contenido de fibra en la moringa es del 27%, hay 10.8% de fibra en una dieta con moringa al 40%, la cual pudo funcionar como abrasivo del tejido del colon. A este respecto, el daño causado por el DSS en el tejido colónico, tal como se muestra en las imágenes al microscopio, se comenzó a reparar y debido a la regeneración celular, el tamaño del colon fue de mayor longitud en el grupo tratado con moringa que en el grupo control.

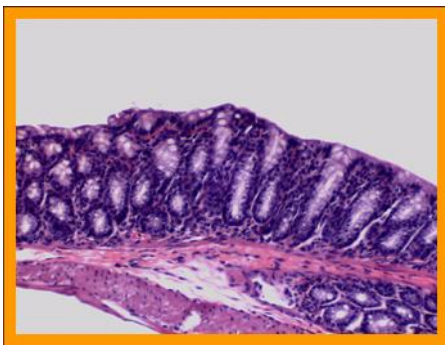
Para confirmar el desarrollo del proceso inflamatorio observado en los estudios histopatológicos del colon, se realizaron las determinaciones de los marcadores de inflamación: la enzima MPO y el TNF α y del indicador del daño oxidativo por medio de la peroxidación de lípidos.



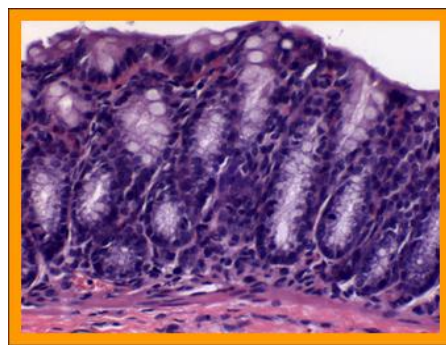
CONTROL 10X



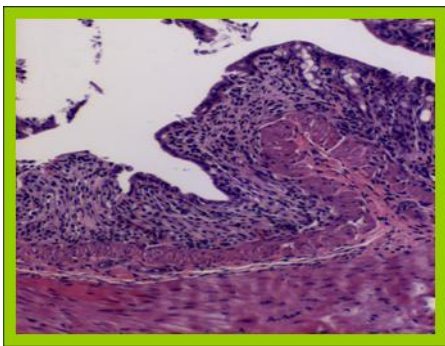
TEJIDO NORMAL 20X



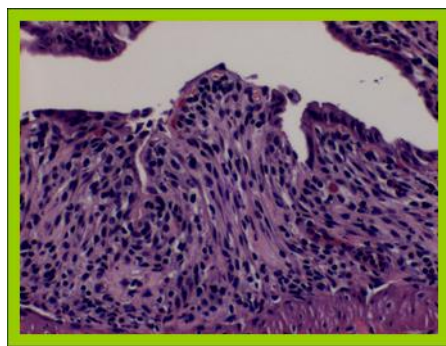
D3T 10X



D3T 20X



MORINGA 10X



MORINGA 20X

Figura 7.11. Cortes histológicos del colon de ratones ICR tratados durante 13 días.

Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis *i.p.*), 1.5 % DSS y con dietas especiales: control, D3T al 0.03% p/p, moringa al 40% p/p. Cada imagen es representativa de cada grupo (n = 5); aumento microscópico: 10X o 20X. Para fines de comparación, se incluyó el ejemplo del tejido normal sin tratamiento a un aumento de 20X.

En la determinación de la actividad de la enzima MPO en el colon de los ratones, se encontró que todos los grupos presentaron una mayor actividad de esta enzima. El nivel de inducción de MPO para la dieta con D3T ($6.7 \text{ mU/mg} \pm 2.8$) fue 2.96 veces mayor que el control ($2.3 \text{ mU/mg} \pm 1$), el de la dieta con moringa ($5.6 \text{ mU/mg} \pm 1.2$) fue de 2.49 veces y para la dieta con NIM ($6 \text{ mU/mg} \pm 1.2$) 2.66 veces más que el grupo control (Figura 7.12).

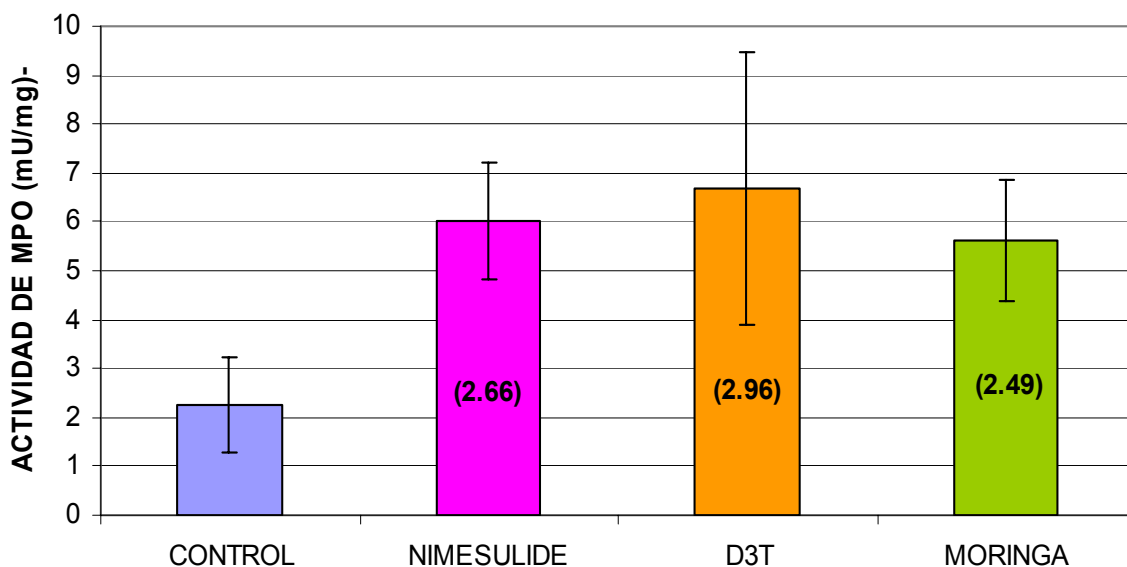


Figura 7.12. Actividad colónica de MPO en ratones ICR tratados durante 13 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c. , 1 dosis *i.p.*), 1.5 % DSS y con dietas especiales: control, D3T al 0.03%, moringa al 40%, NIM al 0.04% p/p. Los valores representan las medias ($n = 5$); barras, EE; valores entre paréntesis, actividad enzimática normalizada con respecto al control. Los tratamientos no son estadísticamente diferentes con respecto al control $P > 0.05$ (analizado por ANOVA seguido de la prueba de Tukey). Consultar datos numéricos de actividad enzimática y nivel de inducción en el cuadro 4A del Anexo 3.

Estos datos indican que a mayor actividad de la enzima MPO en los tres grupos tratados, hay una mayor acumulación de neutrófilos, confirmando en los cortes histológicos la presencia de células inflamatorias o neutrófilos observadas (Figura 7.11). Sin embargo, se puede observar que los animales tratados con la dieta con moringa presentaron una actividad de MPO menor comparada con las

otras dos dietas, aunque ésta no fue estadísticamente significativa con respecto al control. Así mismo, se esperaba que la dieta con NIM mostrara niveles bajos de actividad de MPO debido a su efecto antiinflamatorio. Por otro lado, los datos demuestran que el D3T no funge como agente antiinflamatorio.

En cuanto a la determinación de los niveles del factor TNF α en la mucosa del colon de los ratones, se encontró que los animales tratados con moringa presentaron niveles significativamente menores de TNF α (0.032 ng TNF α /mg proteína \pm 0.002), con respecto al grupo control (0.15 ng TNF α /mg proteína \pm 0.03) (Figura 7.13). Los niveles de la dieta con nimesulide y con D3T tuvieron valores similares (0.21 \pm 0.06 y 0.2 \pm 0.02, respectivamente) al control. El TNF α es una pieza clave en la regulación de la inflamación y funge como mediador. Por lo que estos resultados sugieren que la dieta de moringa disminuye los niveles de inflamación en comparación con la dieta control.

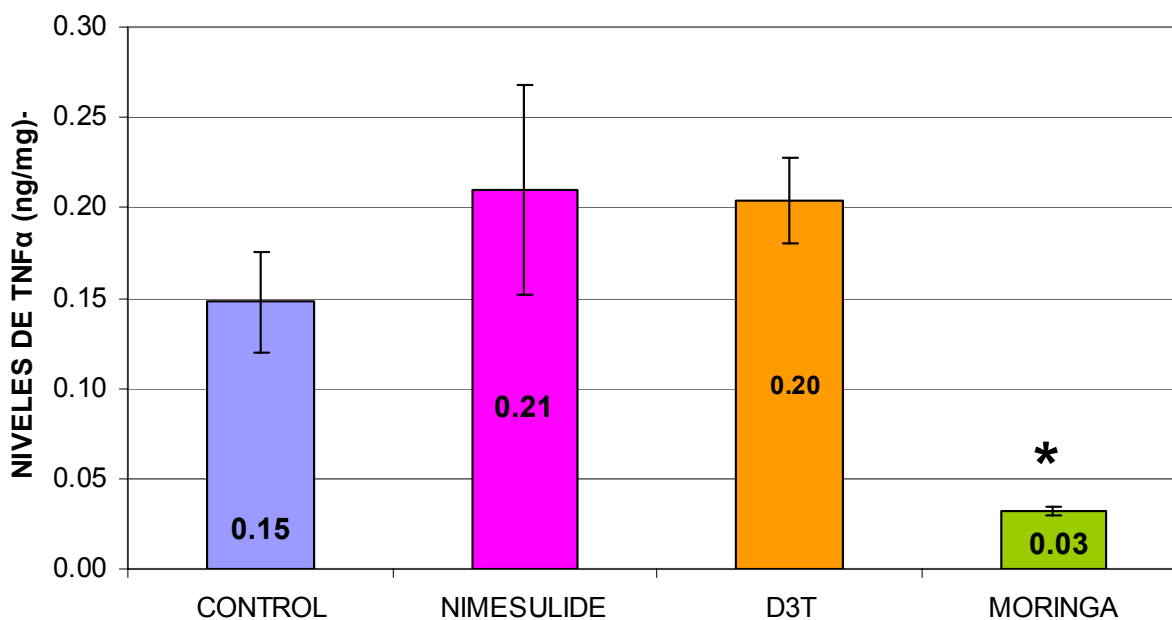


Figura 7.13. Niveles de TNF α en el colon de ratones ICR tratados durante 13 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis *i.p.*), 1.5 % DSS y con dietas especiales: control, D3T al 0.03%, moringa al 40%, NIM al 0.04% p/p. Los valores representan las medias (n = 5); barras, EE. *Los tratamientos son estadísticamente diferentes con respecto al control P < 0.05 (analizado por ANOVA seguido de la prueba de Tukey).

En la determinación del daño oxidativo en el colon de ratones, se encontró que todos los grupos tratados presentaron niveles de peroxidación de lípidos significativamente más bajos que el control (0.39 ± 0.03 nmol/mg de proteína) (Figura 7.14). La moringa mostró un nivel por debajo del resto de los grupos (0.14 ± 0.03), mientras que la nimesulide presentó un valor de 0.26 ± 0.05 y el D3T de 0.18 ± 0.05 nmol/mg de proteína. Esto indica que las dietas tuvieron un efecto protector sobre el daño oxidativo ocasionado por la inflamación.

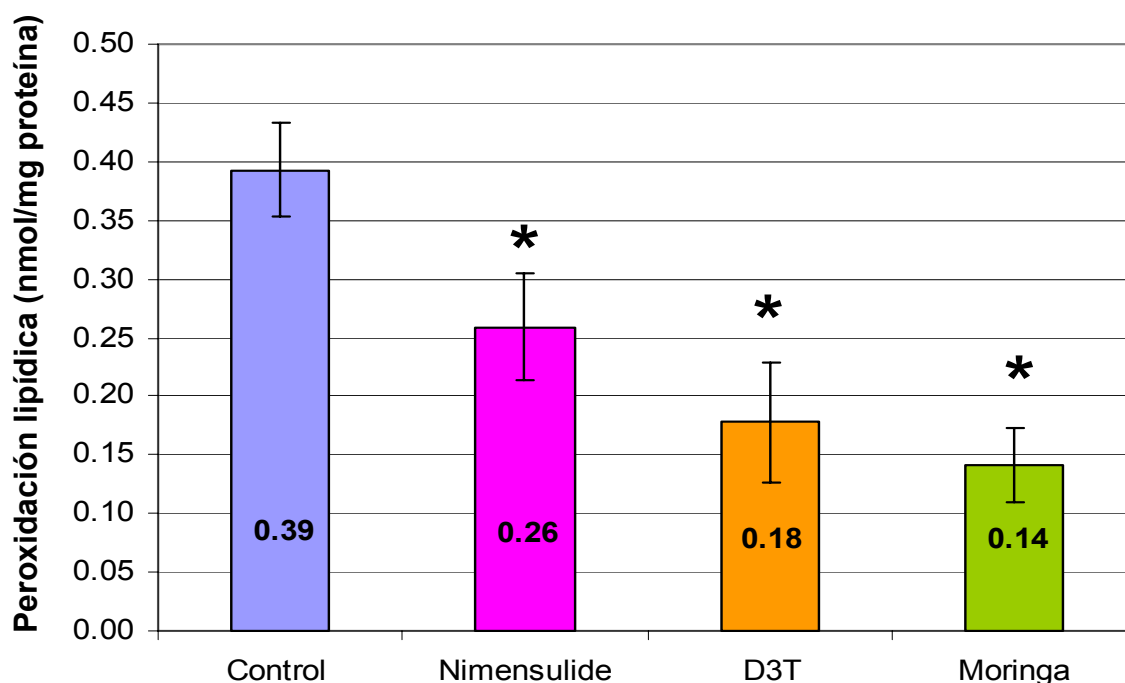


Figura 7.14. Peroxidación de lípidos en colon de ratones ICR durante 13 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis *i.p.*), 1.5 % DSS y con dietas especiales: control, D3T al 0.03%, moringa al 40%, NIM al 0.04% p/p. Los valores representan las medias (n=5); barras, EE; *Los tratamientos son significativamente diferentes con respecto al control $P < 0.05$ (analizado por ANOVA seguido de la prueba de Tukey).

En síntesis, la dieta con moringa mostró la capacidad de disminuir los niveles de TNF α (marcador de inflamación) y de la peroxidación de lípidos (daño oxidativo). Las dietas con D3T y NIM no mostraron actividad antiinflamatoria al no

disminuir los niveles de los marcadores de inflamación, pero si ejercieron un efecto protector sobre el daño oxidativo. Las imágenes de los cortes histológicos de las ratonas tratadas durante 13 días muestran el daño evidente ocasionado por el AOM y DSS, el cual provocó la destrucción de la estructura de las fosas crípticas, la destrucción total para los animales tratados con moringa y la destrucción de un tercio para los tratados con D3T y NIM (Figura 7.2.B y Figura 7.11). Estudios revelan que la destrucción de las fosas crípticas es un fenómeno que precede a la inflamación y comienza a suscitarse a nivel de las células epiteliales durante el desarrollo de la colitis (Cooper y col., 1993). Hechos similares a este fenómeno se detectaron en el colon de los animales tratados con moringa: se encontró de manera evidente la destrucción de las fosas crípticas, observada en las imágenes de los cortes histológicos y, por otro lado, este mismo grupo presentó menores niveles de inflamación. Los resultados de este experimento nos indican que este fenómeno de destrucción de fosas después del desarrollo de la colitis es inducido por el DSS a los 13 días de experimentación.

Por medio del conteo y tamaño de las FCA, identificadas al microscopio después de la tinción con azul de metileno y por medio de la longitud del colon, se identificó el efecto de la moringa sobre el desarrollo de las lesiones preneoplásicas a los 35 días de tratamiento. El cuadro 7.4 muestra que los ratones tratados con la dieta con moringa presentaron un intestino significativamente más largo (13.7 ± 0.3 cm) con respecto al control (12.5 ± 0.3 cm). Se sugiere que el incremento en la longitud del colon a los 35 días se debe posiblemente a una estimulación de la reparación del tejido dañado, cuyo daño fue ocasionado por el tratamiento con DSS y AOM. Es posible que ciertos componentes de la moringa actúen en sinergia con estos químicos, provocando que el tamaño del colon aumentara considerablemente.

Cuadro 7.4. Efecto de las dietas especiales sobre el desarrollo de las lesiones preneoplásicas en ratones ICR.

Gpo	Tratamiento	n	Longitud colon (cm)	FCA / colon	Distribución de FCA por tamaño (expresado en porcentaje)			
					< 1mm	1-2mm	2-3mm	> 3mm
1	AOM + 1% DSS + Control	10	n/a	17.8 ± 1.4	n/a	n/a	n/a	n/a
2	AOM + 1% DSS + 0.03% D3T	10	n/a	16.8 ± 2.1	n/a	n/a	n/a	n/a
3	AOM + 1% DSS + 0.04% NIM	10	n/a	13.6 ± 1.4	n/a	n/a	n/a	n/a
4	AOM + 1.5% DSS + Control	15	12.5 ± 0.3	36.8 ± 4.3	30.1 ± 4.7	7.7 ± 0.6	19.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2
5	AOM + 1.5% DSS + 40% moringa	15	13.7 ± 0.3*	25.1 ± 3.5	15.5 ± 3.3	6.7 ± 0.5	2.6 ± 0.4	0.3 ± 0.2
6	AOM + 1.5% DSS + 0.03% D3T	15	12.7 ± 0.7	42 ± 6.1	31.5 ± 6.1	6.9 ± 0.7	3.1 ± 0.3	0.5 ± 0.3
7	AOM + 1.5% DSS + 0.04% NIM	15	12.5 ± 0.2	46.4 ± 8.3	35.3 ± 8.2	8.1 ± 0.5	2.7 ± 0.3	0.3 ± 0.1

Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c. 1 dosis *i.p*), DSS y con dietas especiales. Los valores representan la media ± EE. n/a: No aplica. * Los tratamientos son significativamente diferentes de su respectivo control: P < 0.05 (analizado por ANOVA). Los datos sobre la distribución de FCA por tamaño fueron analizados por la Prueba de X² para proporciones. Consultar figuras 2A, 3A, 4A con los gráficos de longitud, FCA/colon y distribución en Anexo 3.

El alargamiento del intestino es un cambio toxicológico poco común ocasionado también en los animales tratados con D3T (Munday y Munday, 2004). La dieta con moringa presentó un efecto similar al D3T al alargar el tamaño del colon; sin embargo, no se presentó ningún otro efecto tóxico en los ratones tratados. Estos datos nos indican que en el grupo tratado con moringa tuvo mayor destrucción de las fosas crípticas (Figura 7.11) y un mayor tamaño del colon (Cuadro 7.4).

Los resultados del cuadro 7.4 también indican que los tratamientos administrados a los ratones no disminuyeron el número de FCA de manera significativa. Cabe mencionar que se obtuvo un 100% de incidencia de FCA en los ratones tratados con 1% DSS y con 1.5% DSS. Sin embargo, el tratamiento con 1% DSS promovió el desarrollo de un menor número de FCA que el tratamiento con 1.5% DSS. Las dietas especiales no disminuyeron el daño ocasionado por el AOM y el DSS en este modelo animal, lo que se ve reflejado en el número de FCA. Sin embargo, la dieta con moringa presentó un menor número de FCA que el resto de los grupos tratados con 1.5% DSS, aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa.

El tamaño de FCA se correlaciona con el riesgo a padecer cáncer ya que determinar este parámetro revela la progresión que poseen las lesiones preneoplásicas para convertirse en lesiones neoplásicas. Las FCA con tamaño menor a 1mm fueron las que tuvieron mayor presencia en el colon de los animales tratados con AOM y 1.5% DSS y las dietas especiales (Cuadro 7.4). En cambio, las lesiones de mayor tamaño (> 3 mm) tuvieron una menor presencia en el tejido colónico de los animales. Es posible que las lesiones de menor tamaño sean nódulos linfáticos, desarrollados durante el proceso de inflamación y no específicamente FCA. Además, se esperaba encontrar un número significativo de lesiones mayores a 3 mm, pues este tipo de lesiones se relaciona directamente con las lesiones presentes en las fosas crípticas, las cuales son precursores de los adenomas y del cáncer (Takayama, y col., 1998).

La figura 7.15 muestra la relación entre la inflamación y el desarrollo del cáncer. Esta figura resume los mecanismos que se han propuesto para entender la interacción entre los tratamientos y las determinaciones realizadas durante el estudio del efecto quimioprotector de la moringa a lo largo de este proyecto. El inicio lo encabeza la promoción de la inflamación a causa de la administración del DSS, cuyo efecto es el desarrollo de la colitis. Como respuesta a la inflamación, el sistema inmunológico recluta una amplia variedad de células a las zonas con inflamación, entre éstas se encuentran las células de infiltración o bien, linfocitos. Las células inflamatorias también liberadas como respuesta, son los neutrófilos y los macrófagos, quienes se encargan de iniciar la cascada de los mecanismos de inflamación. Los macrófagos y los neutrófilos inducen al factor $TNF\alpha$ y en consecuencia se producen especies reactivas de oxígeno y del nitrógeno, las cuales propician el daño oxidativo de las células y también un ambiente inflamatorio que facilita la promoción y progresión del cáncer. En este ambiente inflamatorio, los neutrófilos se encargan de fagocitar a las bacterias presentes con la ayuda de la enzima mieloperoxidasa. Por otro lado, la administración del AOM ocasiona la mutación de los genes *β -catenina* y *K-ras* y, cuyos efectos trascienden hasta generarse un daño en el ADN, primera fase en la iniciación del proceso del cáncer. Sin embargo, la inducción de enzimas de fase 2 (por ejemplo, GST y NQO1), a través de la activación del factor de transcripción Nrf2, es un mecanismo bloqueador de la iniciación y promoción del cáncer debido a su capacidad de desintoxicar o eliminar los carcinógenos biotransformados fuera de la célula y disminuir los efectos del cáncer.

La inflamación y el cáncer son procesos patológicos complicados que se encuentran bajo el control de diferentes rutas o mecanismos. Es por esto que para el estudio de ambas patologías es necesario considerar la interacción de factores de transcripción (Nrf2 y NF κ B), enzimas (GST, NQO1, HO-1), citoquinas ($TNF\alpha$), ciclooxigenasas (COX-2), marcadores de inflamación (MPO) y de cáncer (FCA), entre otros factores, para poder entender la relación entre ambos procesos tan complicados.

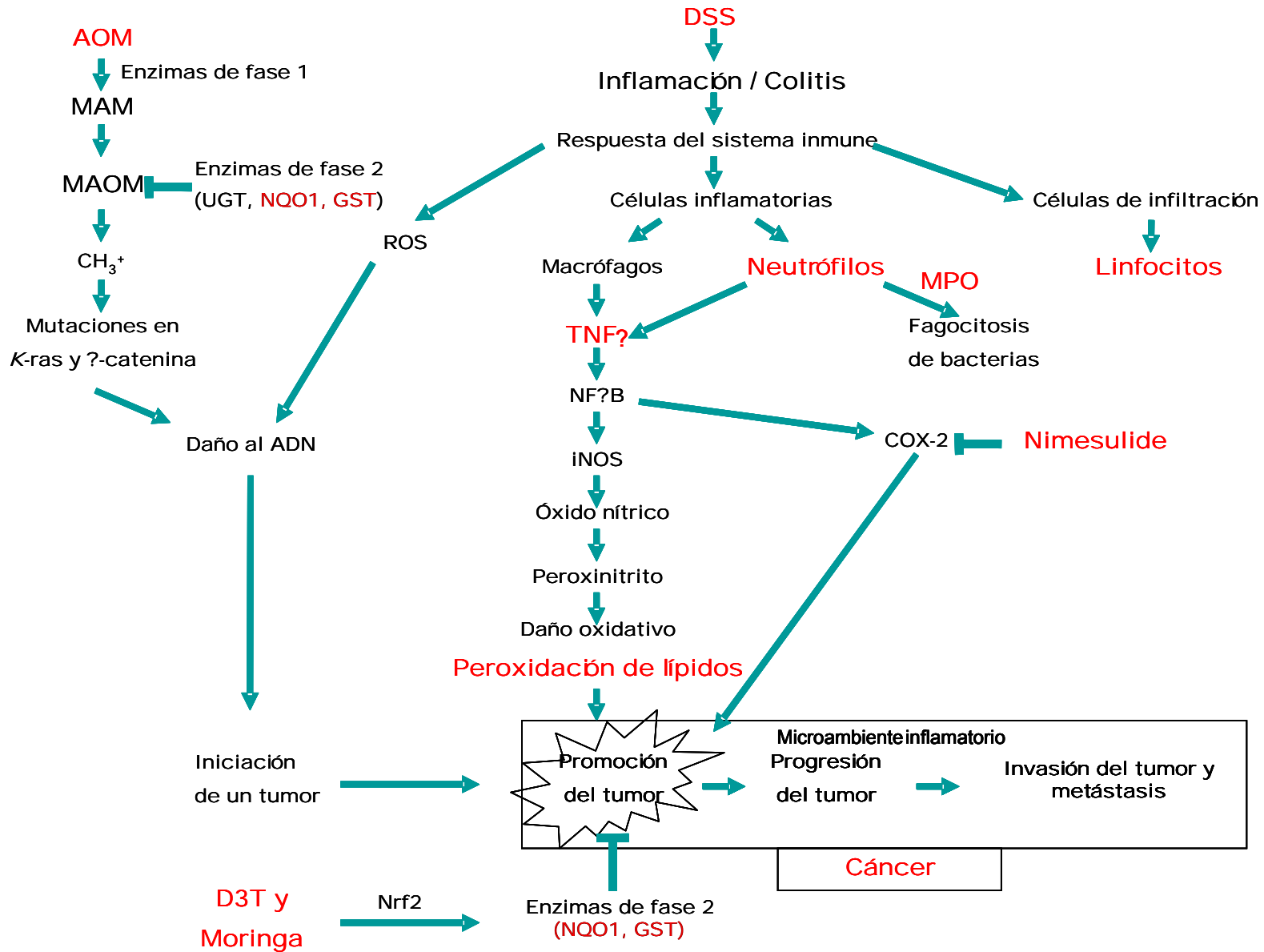


Figura 7.15. Resumen propuesto sobre los mecanismos de inflamación involucrados en el desarrollo de cáncer (Modificado de Kwak y col., 2001; Takahashi y col., 2004; Lu y col., 2006).

8. CONCLUSIONES.

En el modelo de cáncer-inflamación del colon, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con **AOM** y el grupo **AOM + 1% DSS**, ya que en ninguno de los dos grupos se encontró una mayor presencia de células inflamatorias y de infiltración. Por el contrario, con 1.5% de **DSS** se observó un mayor daño del colon, caracterizado por la alteración de las fosas crípticas y la presencia de células de infiltración y de inflamación. Los resultados anteriores sugieren el empleo de dosis de **1.5% de DSS** en futuras investigaciones.

Los resultados del presente trabajo indican que la **moringa** induce **enzimas de fase 2** (NQO1 y GST), después del tratamiento a corto y largo plazo, en el hígado, intestino delgado y en la mucosa del colon de ratón. A pesar de que esta capacidad inductora no tiene un efecto directo sobre la presencia de células inflamatorias (**neutrófilos**) y de infiltración (**linfocitos**), así como en el número de **FCA** en el colon de ratones, la dieta especial con moringa si disminuye el daño oxidativo (**peroxidación de lípidos**) y los niveles de marcadores de inflamación (**TNF α**). Lo anterior sugiere que la activación del factor **Nrf2**, medido como la inducción de la actividad de **EF2**, no influye sobre la respuesta a la inflamación promovida por la administración del DSS y el AOM, ni tampoco influye en la reducción de FCA, pero sí disminuye el daño oxidativo durante el proceso inflamatorio.

Como perspectiva a futuro, se requieren de otros estudios para complementar la caracterización de la moringa como agente protector en la dieta, a través de la determinación de la dosis-respuesta de la moringa y de la expresión de genes activados por su administración a una dosis adecuada y, por último, la evaluación de su efecto en el modelo de cáncer-inflamación a las 20 semanas de experimentación, en el cual se presentan lesiones de diferente magnitud.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Ansher, S.S., Dolan, P., Bueding, E. 1983. Chemoprotective effects of two dithiolthiones and butylhydroxyanisole against carbon tetrachloride and acetaminophen toxicity. *Hepatology*, 3:932-935.

Ariga T. 2005. Department of Agricultural and Biological Chemistry. Nihon University College of Biosource. Sciences Laboratory of Nutrition and Physiology. Japan. <http://hp.brs.nihon-u.ac.jp>.

Ates, N.A.; Tamer, L.; Ates, C.; Ercan, B.; Elipek, T.; Oecal, K.; Camdeviren, H. 2005. Glutathione S-Transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Bio. Genet.* 43: 149-163.

Babbs, C.F. 1990. Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 8: 191-200.

Bird, P.R, Good, C.K. 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol. Lett.* 112-113: 295-402.

Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78: 206-209.

Bullock, A.M., 1978. Laboratory Methods. Ed. Pathology, Bailliere Tindall, Londres, pp: 235–267.

Chadwik, R.W., George, S.E., Claxton, L.D. 1992. Role of the gastrointestinal mucosa and microflora in the bioactivation of dietary and environmental mutagens or carcinogens. *Drug. Metab. Rev.* 24: 425-492.

Chao, A., Thun, M.J., Jacobs, E.J., Henley, S.J., Rodriguez, C., Calle, E.E. 2000. Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the cancer prevention study II. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1888-1896.

Chen, K., Jiang, Q., He, H. 2005. Relationship between metabolic enzyme polymorphism and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 11: 331-335.

Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., Sedergran, D.J., 1993. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 69: 238-249.

Cooper, H.S., Murthy, S.N., Kido, K., Yoshitake, H., Flanigan, A. 2000. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-

associated neoplasia in the human: a study of histopathology, β -catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis*. 21: 757-768.

Corpet, D.E., Taché, S. **2002**. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr Cancer*. 43: 1-21.

Coussens, L.M., Werb, Z. **2002**. Inflammation and cancer. *Nat*. 420: 860-867.

De Vita, V., Hellman, S., Rosenberg, S. **2000**. Cáncer. Principios y práctica de oncología. 5ª. Edición. Editorial Médica Panamericana, España. Capítulo 1: 185-198, 559-583, 144-1185.

Doll, R. and Peto, R. **1987**. Oxford textbook of medicine. Editorial Oxford Univ. Press, UK, pp. 4.95-4.123.

Fahey, J.W, Haristoy, X., Dolan, P.M., Kensler, T.W., Scholtus, I., Stephenson K.K., Talalay, P., Lozniewski, A. **2002**. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7610-5.

Fahey, J.W, **2005**. *Moringa oleifera*: A Review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for Life Journal* www.TFLJournal.org.

Fiala E.S., Kulakis, C., Christiansen, G., Weisburger, J.H. **1978**. Inhibition of the metabolism of the colon carcinogen, azoxymethane by pyrazole. *Cancer Res*. 38:4515-4521.

Fuglie L.J. **1999**. The miracle tree: *Moringa oleifera*: Natural nutrition for the Tropics. Church World Service, Dakar. 68 pp.; revised in 2001 and published as The Miracle Tree: The multiple attributes of Moringa, pp: 172.

García, J.L., 2007. www.entornomedico.com.

Gamberini, M., Leite, L. **1997**. Proliferation of mouse fibroblasts induced by 1,2-dimethylhydrazine auto-oxidation: Role of iron and free radicals. *Biochem. Biophys. Res. Com*. 234: 44-47.

Graham, S. **1978**. Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 709-714.

Hirono, I., Kuhara, K., Yamaji, T., Hosaka, S., Goldber.g, L. **1992**. Induction of colorectal squamous cell carcinomas in rats by dextran sulfate sodium. *Carcinogenesis*. 3: 353-355.

INEGI. Vitales 2002, Base de datos y Estadísticas Demográficas 2002.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y. 1997. An Nrf2/small maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant responsive element. *Biochem Biophys Res Commun.* 236: 313-322.

Itzkowitz, S.; Yio, X. 2004. Inflammation and Cancer. IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, pp: G7-G17.

Izzotti, A., Camoirano, A., Cartiglia, C., Grubbs, C.J., Lubet, R.A., Kelloff, G.J., De Flora, S. 1999. Patterns of DNA adduct formation in liver and mammary epithelial cells of rats treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and selective effects of chemopreventive agents. *Cancer Res.* 59: 4285-4290.

Jackson, P.E., Cooper, D.P., Meyer, T.A., Wood, M., Povey, A.C., Margison, G.P. 2000. Formation and persistence of O⁶-methyl guanine in the mouse colon following treatment with 1-2DMH as measured by an O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase inactivation assay. *Toxicol. Letters.* 115:205-12.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases: the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.

Karp, G. 2003. Biología Celular y Molecular. 3^a. Edición McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México pp: 671-699.

Kensler, T.W., Groopman, J.D., Eaton, D.L., Curphey, T.J., Roebuck, B.D. 1992. Potent inhibition of aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis by the monofunctional enzyme inducer 1,2-dithiole-3-thione. *Carcinogenesis*, 13:95-100.

Kinoshita, K., Hori, M., Fujisawa, M., Sato, K., Ohama, T., Momotani, E., Ozaki, H. 2006. Role of TNF- α in muscularis inflammation and motility disorder in a TNBS-induced colitis model: clues from TNF- α -deficient mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 18: 578–588.

Kiss, I., Sandror, J., Pajkos, G., Bogner, B., Hegedus G., Ember I. 2000. Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. *Anticancer Res.* 20: 519-522.

Kiyohara, C. 2000. Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer. *J. Epidemiol.* 10: 349-360.

Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J. 1996. Chemical carcinogenesis. In: Cassarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. 5a. Ed., McGrawHill, New York. Chap. 14: 201-205.

Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tanaka, T. 2005. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC Cancer*. 5: 1471-2407.

Kuper, H., Adami, H.O., Trichopoulos, D. 2000. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J. Intern.* 248:171-183.

Kune, G.A., Vitetta, L. 1992. Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutr. Cancer*. 18:97-111.

Kwak, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Sutter, T.R., Kensler, T.W. 2001. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1,2-dithiole-3-thione. *Mol. Med.* 7: 135-145.

Kwak, M.K., Egner, P.A., Dolan, P.M., Ramos-Gomez, M., Groopman, J.D., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T.W. 2001. Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mutat Res.* 480-481:305-15.

Kwak, M., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., Kensler, T. 2003. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. *J. Biol. Chem.* 278: 8135-8145.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana. México. Cap. 24. pp: 1054-1082.

Maeda, H., Akaike, T. 1998. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry*. 63: 854-865.

Marugame, T., Tsuji, E., Inoue, H., Shinomiya, S., Kiyohara C., Onuma, K., Hamada, H., Koga, H., Handa, K., Hayabuchi, H., Kono, S. 2000. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of colorectal cancer risk. *Cancer Lett.* 151: 181-186.

Maskens, A.P. 1976. Histogenesis and growth pattern of 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon Adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 36: 1585-1592.

Maxuitenko, Y.Y., Curphey, T.J., Kensler, T.W., Roebuck, B.D. 1996. Protection against aflatoxin B1-induced hepatic toxicity as a short-term screen of cancer chemopreventive dithiolethiones. *Fund. Appl. Toxicol.* 32:250-259.

Miller, E.C., Miller, J.A. 1966. Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol Rev.* 18: 805-38.

Morimitsu, Y., Nakagawa, Y., Hayashi, K., Fujii, H., Kumagai, T., Osawa, T., Horio, F., Itoh, K., Iida, K., Yamamoto, M., Uchida, K., **2001**. A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 3456-3462.

Munday, R., Munday, C.M., **2004**. Induction of phase II enzymes by 3H-1,2-dithiole-3-thione: dose-response study in rats. *Carcinogenesis*. 25: 1721-1725.

Palada, M.C. **1996**. Moringa (*Moringa oleifera* Lam.): A versatile tree crop with horticultural potential in the subtropical United States. *Hort. Science* 31: 794-797.

Phillips, R.L. **1975**. Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among Seventh Day Adventists. *Cancer Res.* 35: 3513-3522.

Pitot, H.C., Dragan, Y.P. **1996**. Chemical carcinogenesis. In: Cassarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 5a edición. McGraw-Hill, New York. pp: 201-267.

Pinols- Felis, C., **1995**. Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-dimetilhidrazina. Barcelona. Universidad de Lleida. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias. pp: 15-20.

Prochaska, H.J., Talalay, P. **1988**. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* 48: 4776-82.

Prochaska, H.J., Santamaría, A.B., Talalay, P. **1992**. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogenesis. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2394-2398.

Ramos-Gómez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talay, P., Kensler, T.W. **2001**. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in Nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3410-5.

Rao, C.V., Reddy, B.S., Cooma, I., Simi, B., Kelloff, G.J., Steele, V.E. **1999**. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by cyclooxygenase inhibitors. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 40: 373.

Richter, F., Newmark, H., Richter, A., Leung, D., Lipkin, M. **1995**. Inhibition of western-diet induced hyperproliferation and hyperplasia in mouse colon by two sources of calcium. *Carcinogenesis*. 16: 2685-2689.

Roebuck, B.D., Curphey, T.J., Li, Y., Baumgartner, K.J., Bodreddigari, S., Yan, J., Gange, S.J., Kensler, T.W., Sutter, T.R. **2003**. Evaluation of the cancer

chemopreventive potency of dithiolethione analogs of oltipraz. *Carcinogenesis*. 24: 1919-1928.

Rozowski, N. J., Cuevas, M. A., Castillo, V. O. **2001**. Diferencias en antioxidantes plasmáticos según nivel socioeconómico en mujeres chilenas. *Rev. Méd. Chile*.129: 43-50.

SSA. Secretaría de Salud, **2005**. <http://www.salud.gob.mx/estadísticas>.

Shacter, E., Weitzman, S.A. **2002**. Chronic inflammation and cancer. *Oncology*. 16: 217-226.

Shanahan, J.C., St. Clair, E.W. **2002**. Tumor necrosis factor-alpha-blockade: a novel therapy for rheumatic disease. *Clin. Immunol.* 103: 231-242.

Sociedad Americana para el estudio del Cáncer (2003). Cancer facts and figures 2003, pp: 1–48. Atlanta: American Cancer Society.

Stone, W.L., Krishnan, K., Papas, A.M. **2002**. Oxidants and antioxidants in the pathology of colon cancer. *Cancer Det. Prev.* 22: 4971-512.

Stopera, S.A., Murphy, L.C., Bird, R.P. **1992**. Evidence for a *ras* gene mutation in azoxymethane-induced colonic aberrant crypts in Sprague-Dawley rats: earliest recognizable precursor lesions of experimental colon cancer. *Carcinogenesis*. 13: 2081-5.

Surh, Y.J. **2003**. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev.* 3: 768-780.

Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Tanaka, T. **2004**. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*. 95: 721-727.

Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Tanaka, T. **2005**. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. *Histol. Histopathol.* 20: 483-492.

Takahashi, M., Wakabayashi, K. **2004**. Gene mutations and altered gene expression in Azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci*. 95: 475-480.

Takayama, T., Itoh, K., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato, J., Kogawa, K., Miyake, H., Niitsu, Y. **1998**. Aberrant Crypt Foci of the Colon as Precursors of Adenoma and Cancer. *The N. Jour. of Med.* 339: 1277-1284.

Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Shimada, R., Kagami, S. 2000. Colitis-related rat colon carcinogenesis induces by 1-hydroxyanthraquinone and methylazoxymethanol acetate. *Oncol.* 7: 501-508.

Tanaka, T., Kohno, H., Yoshitani, S., Takashima, S., Okumura, A., Murakami, A. 2001. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and γ inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res.* 62: 2424-2428.

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., Mori, H. 2003. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 94: 965-973.

Toroella, M., Villa Treviño, S. 1998. Bases genéticas del cáncer. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. pp: 9-41.

Thune, I., Furberg, A.S. 2001. Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific. *Med. Sci. Sports Exercise.* 33: S530-550.

Venugopal, R. and Jaiswal, A.K. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NADP(H): quinone oxidoreductase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14960-65.

Wargovich, M. J. 2001. Colon cancer chemoprevention with ginseng and other botanicals. *J. Korean Med. Sci.* 16: 81-86.

Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S., Wakabayashi, K., 2000. COX-2 and iNOS, good targets for chemoprevention of colon cancer. *BioFactors.* 12: 129-133.

Whiteley, L.O., Hudson, L.J., Pretlow, T.P. 1996. Aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and nongenotoxic colon carcinogen. *Toxicol. Pathol.* 24: 681-689.

Wynder, E.L., Leveille, G.A., Weisburger, J.H., Livingston, G.E. 1983. Environmental aspects of cancer: The role of macro and micro components of foods. Food & Nutrition Press, Westport, Connecticut. pp: 15-20, 105-106.

Yang, H., Stuart, G.R., Glickman, B.W., de Boer, J.G. 2001. Modulation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mutation in the cecum and colon of Big Blue rats by conjugated linoleic acid and 1,2-dithiole-3-thione. *Nutr. Cancer.* 39: 259-266.

Yamanishi, Y. 2000. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 10025-10030.

Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C-G., Posner, G.H. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2399-2403.

10. ANEXO 1. INFORMACIÓN SOBRE LOS REACTIVOS.

Azoximetano (AOM):

Proveedor: Midwest Research Institute

#Lote: 8864-23-26

Fórmula Molecular: C₂H₆N₂O

Peso Molecular: 74.09

Densidad (molaridad): 0.991 g/mL

Soluble en agua, etanol y éter.

Líquido incoloro.

Dextrán sulfato de sodio. Sal grado reactivo (DSS):

Proveedor: MP Biomedicals, LLC, Aurora, Ohio, EUA.

#Lote: 6955H

CAT: 160110

Peso Molecular: 36,000 – 50,000

Irritante

3H-1,2 ditiol-3-tiona (D3T):

Proveedor: SRI Internacional

#Lote: 11581-JB73

Contenido neto: 10 g.

Nimesulide:

Proveedor: Sigma, St. Louis, MO, EUA

#Lote: CAS 51803-78-2

CAT: N1016-IG

Dañino

Dieta control (basal) en polvo:

Proveedor: Harlan Teklad

AIN 76 Dieta purificada con menadiona sin etoxiquina

Powder TD.80150.PWD

#Lote: RX239212

Contenido neto: 10 kgs.

Moringa:

Proveedor: Donada por el Laboratorio del Dr. Paul Talalay (Facultad de Medicina, Universidad Johns Hopkins)

Analizada: Dr. Jed W. Fahey del Laboratorio "Brassica Chemoprotection" (Facultad de Medicina de la Universidad Johns Hopkins)

Hojas de *Moringa oleifera* deshidratadas y molidas
Contenido glucosinolatos: 30 μmol / g peso seco.

Reactivos para la determinación de la actividad enzimática de GST:

Proveedor: Sigma, St. Louis, MO, EUA.

- Hidrocloruro de Trizma (Tris-HCl): # CAT: T-3253 / #Lote: 49H5411
- Cloruro de magnesio (MgCl_2): # CAT: M2670 / #Lote: 120K0114
- Cloruro de potasio (KCl): # CAT: P9333 / #Lote: 76H10391
- Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4): # CAT: S-8282 / #Lote: 59HO4591
- Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4): # CAT: S-7907 / #Lote: 89HO184
- Glutati3n reducido (GSH): # CAT: G6529 / #Lote: 121K12801
- 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB): # CAT: C6396 / #Lote: 72HO1061
- Seroalbúmina bovina (BSA): # CAT: A-8022 / #Lote: 124HO243

Proveedor: MP Biomedicals, LLC, Aurora, Ohio, EUA.

- Sacarosa Ultrapura: # CAT: 821721 / #Lote: 2748C

Reactivos para la determinación de la actividad enzimática de NQO1:

Proveedor: Sigma, St. Louis, MO, EUA.

- NaH_2PO_4 : # CAT: S-8282 / #Lote: 59HO4591
- Na_2HPO_4 : # CAT: S-7907 / #Lote: 89HO184
- Seroalbúmina bovina (BSA): # CAT: A-8022 / #Lote: 124HO243
- Tris-HCl: # CAT: T-3253 / #Lote: 49H5411
- Tween 20: #CAT: P7949 / #Lote: 014K0104
- Dicumarol: #Lote: PP02802LP / PM: 336,30
- Menadiona: #CAT: M-5625 / #Lote: 39f0686 / PM: 172,18
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD): #CAT: G6378 / #Lote: 123K7476
- Bromuro de tetrazolium tiazolil azul (MTT): #CAT: M5655-IG / #Lote: 104K5330
- Glucosa-6-fosfato (G6P): #CAT: G7879 / #Lote: 093K3789
- Nicotinamida-adenín fosfato dinucleótido (NADP): #CAT: N0505 / #Lote: 082K7050
- Flavin-adenín dinucleótido (FAD): #CAT: F6625 / #Lote: 63HO411

Proveedor: JT. Baker, Chemical Co., Phillisburg, NJ, EUA.

- Acetonitrilo: # CAT: 75-05-08

Reactivos para la determinación de proteína:

Proveedor: Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA.

- Reactivo A: #CAT: 23223 / #Lote: EF60989
- Reactivo B: #CAT: 23224 / #Lote: DB54757
- Albúmina 2 mg / mL: #CAT: 23209 / #Lote: GL100329

Reactivos para la tinción con hematoxilina y eosina:

Proveedor: Sigma, St. Louis, MO, EUA.

- Xileno: #CAT: 296325
- Hematoxilina: #CAT: H9627
- Eosina: #CAT: 861006
- Formalina al 10%: #CAT: F5554
- Etanol: #CAT: 459836

Reactivos para la tinción con azul de metileno:

Proveedor: Sigma, St. Louis, MO, EUA.

- Azul de metileno: #CAT: M9140
- Etanol: #CAT: 459836

Reactivos para la determinación del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α):

Proveedor: eBioscience, Wembley, UK.

- Kit ELISA TNF α : #CAT: 88-7346

Reactivos para la determinación de la enzima Mieloperoxidasa (MPO):

Proveedor: Sigma, St. Louis, MO, EUA.

- Fosfato de sodio (Na₃PO₄): #CAT: 342483
- Bromuro de hexa-dexil-trimetil-amonio (HTAB)
- Dihidrocloreuro de tetrametil benzidina (TMB): CAT: T8768 / #Lote: 104K2516
- Dimetil sulfóxido anhidro (DMSO): #CAT: 276855 / #Lote: 1197DD

Reactivos para la cuantificación de peroxidación de lípidos (TBARS):

Proveedor: JT. Baker, Chemical Co., Phillisburg, NJ, EUA.

- Ácido tricloroacético (TCA)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA)
- Butanol
- Metanol

Proveedor: Sigma, St. Louis, MO, EUA.

- K₂PO₄
- Solución salino de fosfatos (PBS)

- Inhibidor de proteasas (1 tab/ 50mL)
- Columna Supelcosil LC-18 de 0.46 cm x 25 cm, tamaño de partícula 5 µm.

11. ANEXO 2.

INFORMACIÓN SOBRE TÉCNICAS Y PROTOCOLOS EMPLEADOS.

Obtención de la fase citosólica a partir del tejido de ratón.

1. Pesar 1 g de tejido (hígado, mucosa del colon e intestino delgado). Colocarlo en tubos de plástico para centrifuga. Mantener los tubos en hielo.
2. Añadir 4 mL de solución de trabajo Tris-Sacarosa:

Para un litro de solución preparar:

- a.) 7.9 g Tris HCl
 - b.) 2.1 g MgCl₂.
 - c.) 1.9 g KCl
 - d.) 85.6 g Sacarosa ultrapura
 - e.) 451.25 mL H₂O miliQ (destilada y desmineralizada)
- Ajustar pH = 7.0. Refrigerar.

3. Homogenizar con politrón. Evitar que se sobrecaliente la muestra.
4. Centrifugar a 10,000 x g por 15 min.
5. Remover sobrenadante. Desechar pastilla.
6. Colocar sobrenadante en tubos para ultracentrifuga.
7. Ultracentrifugar a 100,000 x g por 50 min (45, 000 rpm).
8. Separar el sobrenadante (fracción citosólica) con pipetas Pasteur, colocarlo en tubos eppendorf y almacenarlo a -80°C hasta su análisis.

Determinación de la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST).

1. Preparar diluciones de las muestras de hígado (fracción citosólica): 1:20, 1:40, 1:100.
2. Colocar 50 µL del citosol y del blanco en cada pozo. Usar placas de 96 pozos.
3. Adicionar 100 µL de solución de trabajo de GSH 3 mM a cada pozo.

Para preparar solución de GSH (10 mL para 20 muestras):

- a.) 204 µL stock GSH (0.046 g GSH + 1 mL solución fosfatos)
- b.) 9.796 mL solución de fosfatos.

4. Adicionar 150 µL de solución de trabajo de CDNB 2 mM a cada pozo.

Para preparar solución de CDNB (15 mL para 20 muestras):

- a.) 517 µL stock CDNB (0.012 g CDNB + 1 mL 100% etanol)

- b.) 14.483 mL solución de fosfatos.
5. Reventar cualquier burbuja formada para evitar que altere la lectura en el lector de ELISA (Software Pro.5).
 6. Leer la placa inmediatamente a **340 nm** (programa: TIME DRIVE KINETICS por 2 min del lector de ELISA).

Determinación de la actividad de la enzima quinona reductasa (NQO1).

REACTIVOS A PREPARAR (antes de correr reacción enzimática):

Para preparar 500 mL de solución de trabajo Tris 0.025 mM (pH = 7.4):

- a.) 1.97 g Tris-HCl
- b.) 0.333 g BSA
- c.) 3.3 mL Tween 20 al 1.5%
- d.) 500 mL H₂O miliQ (destilada y desmineralizada)

Para preparar 150 mL de solución de trabajo con cofactores (para 10 placas):

- a.) FAD: 0.0062 g FAD + 1 mL solución de trabajo. Tomar 100 µL y añadirlos a los 150 mL de solución de trabajo.
- b.) NADP: 0.038 g NADP + 1 mL solución de trabajo. Tomar 90 µL y añadirlos a los 150 mL de solución de trabajo.
- c.) G6P: 0.0423 g agregarlos al solución de trabajo.
- d.) MTT: 0.045 g agregarlos a la solución de trabajo.
- e.) G6PD: 300 unidades agregarlas a la solución de trabajo.

Para preparar solución de menadiona:

- a.) 0.0086 g menadiona
- b.) 1 mL acetonitrilo

Para preparar solución de dicumarol (solución STOP):

- a.) 0.02 g dicumarol
- b.) 1 mL NaOH 1N

Tomar 100 µL de esta solución y diluir en 20 mL de solución fosfatos.

1. Colocar 50 µL de las muestras diluidas de hígado, mucosa del colon y del intestino delgado (fracción citosólica) y del blanco en cada pozo (placa 96 pozos).
2. Añadir 200 µL de la solución de 15 mL de solución de trabajo con cofactores + 15 µL de solución de menadiona.
3. Agitar la placa. Reventar rápidamente las burbujas formadas para evitar que alteren la lectura de la absorbancia.
4. A los 5 min agregar la solución de dicumarol.
5. Agitar la placa.
6. Leer inmediatamente en el lector de ELISA a **610 nm** (programa: endpoint).

Determinación del contenido de proteína por el método del ácido bicíncónico
(BCA)

REACTIVOS A PREPARAR:

Para preparar el reactivo de trabajo:

- a.) 50 mL reactivo A (kit BCA Pierce Protein)
- b.) 1 mL reactivo B (idem)

Para preparar los estándares para la curva estándar de proteína, agregar:

ALBUMINA (2 mg/mL)	+	H ₂ O	=	[proteína]
270 µL		180 µL		60 g/ 50 µL
180 µL		270 µL		40 g/ 50 µL
90 µL		360 µL		20 g/ 50 µL
45 µL		405 µL		10 g/ 50 µL
22.5 µL		428 µL		5 g/ 50 µL
11.3 µL		439 µL		2.5 g/ 50 µL
5.6 µL		444 µL		1.25 g/ 50 µL
0 µL		500 µL		0 g/ 50 µL

1. Colocar 50 µL de cada estándar y de fracción citosólica (diluciones: 1:20, 1:40, 1:100).
2. Agregar 250 µL del reactivo de trabajo.
3. Incubar a 37°C por 30 min o a temperatura ambiente por 1 h.
4. Leer en el lector de ELISA a **562 nm** (programa: BCA standard curve).

Fijación del tejido en parafina.

La fijación del tejido se realiza según Bullock (1978). El proceso de fijación incluye deshidratación con alcohol de alta graduación, aclarándolo con agentes como xileno y el cloroformo que permiten la posterior impregnación con cera.

1. Deshidratar los tejidos previamente fijados en formol con una solución de alcohol 50–70° en agua y luego transferirlos a un baño de alcohol absoluto para completar la deshidratación. Clarificar los tejidos durante la noche con cloroformo y luego en dos etapas de media hora cada una con xileno.
2. La inclusión en parafina se realiza en envases de vidrio o porcelana, enfriando y endureciendo la parafina con trozos de tejido en el interior.
3. Se evapora la parafina fundida en el molde.
4. Por medio de una pinza calentada se transfiere el cassette, identificado y con los cortes de tejido.
5. Luego de su solidificación completa, el bloque de parafina se saca del molde y se monta sobre bloques de madera para realizar los cortes.
6. Por medio de un microtomo se realizan cortes de bloques de 5 µm o de 5-7 µm con un cuchillo limpio y afilado.
7. Se hacen flotar las secciones en un baño maría a 48°C.

8. Se colocan en portaobjetos limpios químicamente cubiertos con una fina capa de sustancia adhesiva como albúmina o glicerina.
9. Para desparafinar las secciones, se deberán transferir a dos baños de xileno cada uno de 5–10 minutos de duración, luego a graduaciones descendentes de alcohol absoluto (90°, 70°, 50°) y finalmente a agua.

Tinción con hematoxilina y eosina para histología general.

1. Lavar las secciones con agua corriente
2. Teñir con hematoxilina durante 5–20 minutos, dependiendo de la tinción que se utilice (se recomienda la hematoxilina de Lendrum).
3. Lavar en agua corriente durante 2 minutos.
4. Diferenciar en 0.5% alcohol ácido por algunos segundos. Verificar el nivel de diferenciación bajo microscopio.
5. Lavar las secciones en H₂O.
6. Teñir en 1% de eosina alcohólica durante 3–5 minutos.
7. Retirar el exceso de eosina enjuagando las secciones en alcohol absoluto.
8. Verificar la tinción con eosina y si fuera satisfactoria, aclarar con xileno.
9. Montar en un medio de resina sintética y recubrir con un cubreobjeto.
10. Resultados: Núcleos azules; citoplasma, tejidos conjuntivos, células de sangre y músculos: rojo/rosado.

ELISA para la determinación de la actividad del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α).

REACTIVOS A PREPARAR:

Para preparar el diluyente de trabajo 1X:

- a.) 10 mL 5x diluyente (kit ELISA TNF α)
- b.) 40 mL H₂O miliQ (destilada y desmineralizada)

Para preparar solución de lavado:

- a.) 250 μ L Tween 20
- b.) 500 mL PBS 1X

Para preparar solución STOP:

- a.) 1 mL H₃PO₄
- b.) 15 mL H₂O miliQ (destilada y desmineralizada)

Para preparar diluciones seriales y estándares:

Del estándar TNF α de 1 μ g/mL, preparar una dilución 1:100 con PBS 1X para obtener una concentración de 10 ng/mL.

STD 1: Dilución 1:10 de 10 ng/mL = 1 ng/mL

STD 2: Dilución 1:2 de 1 ng/mL = 0.5 ng/mL

STD 3: Dilución 1:2 de 0.5 ng/mL = 0.25 ng/mL

STD 4: Dilución 1:2 de 0.25 ng/mL = 0.125 ng/mL

STD 5: Dilución 1:2 de 0.125 ng/mL = 0.062 ng/mL
STD 6: Dilución 1:2 de 0.062 ng/mL = 0.031 ng/mL
STD 7: Dilución 1:2 de 0.031 ng/mL = 0.015 ng/mL
STD 8: PBS 1X como blanco

Para preparar homogenizado de colon:

- a.) Homogenizar el colon: 0.1g de tejido/1 mL de PBS 1X + 2 tabletas de inhibidor de proteasas (1 tab/ 50mL). Dividir en alícuotas de 500 µL. Conservar a -80°C hasta su análisis.
- b.) Centrifugar las muestras de colon a 12,000 x g a 4°C por 10 min.
- c.) Preparar dilución 1:3 del sobrenadante de cada muestra de colon.

1. En cada pozo (placa 96 pozos), agregar 100 µL del anticuerpo Coat Corning Costar No. 9018 diluido en solución propio del anticuerpo. Sellar placa.
2. Incubar toda la noche a 4°C.
3. Remover el líquido.
4. Lavar 3 veces con 300 µL con solución de lavado.
5. Remover cualquier residuo de solución con papel absorbente.
6. Añadir 200 µL del diluyente de trabajo 1X.
7. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
8. Remover líquido. Lavar 3 veces con 300 µL con solución de lavado.
9. Añadir 100 µL de cada uno de los estándares y de cada una de las muestras homogenizadas de colon.
10. Sellar placa e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
11. Remover líquido. Lavar 5 veces con 300 µL con solución de lavado.
12. Agregar 100 µL de anticuerpo de detección diluido en diluyente de trabajo 1X.
13. Sellar placa e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
14. Remover líquido. Lavar 3 veces con 300 µL con solución de lavado.
15. Agregar 100 µL del anticuerpo avidina acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (AVIDIN-HRP) diluido en diluyente de trabajo 1X.
16. Sellar placa e incubar a temperatura ambiente por 30 min.
17. Remover líquido. Lavar 5 veces con 300 µL con solución de lavado, esperando 1-2 min entre cada lavado.
18. Agregar 100 µL de la solución sustrato.
19. Incubar a temperatura ambiente por 15 min.
20. Agregar 50 µL de la solución STOP.
21. Leer placa a **450 nm** y a **570 nm** (programa: 2 wavelength endpoint).

Determinación de la actividad de la enzima Mieloperoxidasa (MPO).

1. Homogenizar el colon: 0.1 g de tejido/1 mL de PBS 1X + 2 tabletas de inhibidor de proteasas (1 tab/50mL). Dividir en alícuotas de 500 µL y conservar a -80°C.

2. Someter las muestras a 3 ciclos de descongelamiento a 37°C por 5 min y congelación en nitrógeno líquido.
3. Centrifugar a 10,000 x g por 15 min a 4°C.
4. Remover sobrenadante y almacenarlo a -80°C
5. Añadir a la pastilla 200 µL de 50 mM Na₃PO₄ (pH = 6.0) con 0.5% HTMAB
6. Sonicar por 15 seg a un poder de 3.5.
7. Centrifugar a 10,000 x g por 15 min a 4°C. Remover la pastilla.
8. Medir la actividad de la MPO en 20 µL del sobrenadante en placas de 96 pozos.
9. Añadir 80 µL del solución de trabajo:

Para preparar 10 mL de solución:

- a.) 1 mL de 50 mM Na₃PO₄ (pH = 6.0) + 0.5% HTMAB
(25 mL Na₃PO₄ + 125 mg HTMAB + calor por 15 min)
- b.) 9 mL de la solución de 7.2 mg/mL de tetrametilbenzidin (TMB) en 1mL de dimetil sulfóxido anhidro (DMSO).

10. Incubar por 5 min a 37°C en el lector de ELISA o en incubadora.
11. Añadir 20 µL de H₂O₂.
12. Monitorear absorbancia a 650 nm por 5 min. Utilizar programa: Basic Kinetics en el lector de ELISA.

Cuantificación de la peroxidación de lípidos (TBARS).

1. Homogenizar el colon: 0.1 g de tejido/1 mL de PBS 1X + 2 tabletas de inhibidor de proteasas (1 tab/ 50mL). Dividir en alícuotas de 500 µL y conservar a -80°C.
2. Centrifugar el homogenado a 12,000 x g por 10 min a 4°C. Remover la pastilla.
3. Añadir a cada pozo 50 µL del blanco y del sobrenadante de cada muestra (placas de 96 pozos).
4. Añadir 20 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en agua.
5. Añadir 200 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA).
6. Incubar a 95°C por 45 min.
7. Añadir 300 µL de butanol
8. Centrifugar a 12,500 x g por 3 min.
9. Inyectar 50 µL de fase orgánica al HPLC:
 - a.) columna: Supelcosil LC-18 de 0.46 cm x 25 cm y un tamaño de partícula de 5 µm.
 - b.) fase móvil: 50 mM K₂PO₄ (pH = 6.4) en una solución de 52.5% metanol: agua 97.5:2.5, a un flujo de 1 mL/min.
 - c.) Detector de fluorescencia: 515 nm de excitación y 553 nm de emisión.

Manejo de animales.

El método a seguir en cuanto al manejo de animales es el establecido en el laboratorio de Toxicología del Departamento de Ciencias de Salud Ambiental, de la Universidad Johns Hopkins.

MANEJO DE ANIMALES PARA MARCARLOS, INYECTARLOS Y DARLES DOSIS VIA INTRAGASTRICA: Se requiere del control total del animal para estas actividades. Las siguientes instrucciones pueden ayudar para inmovilizar al ratón con su mano izquierda y conservar la mano derecha libre. Coloque al ratón en la rejilla de la jaula, con las barras en sentido de izquierda a derecha. Tome al ratón de la cola con su mano derecha y arrastre el pelaje del ratón. Agarre toda la piel suelta alrededor de la parte trasera del cuello del ratón, utilice el dedo índice y el pulgar para sostenerla. La piel de la espalda del ratón puede sostenerse con el resto de los dedos y la palma de la mano. Para que el ratón quede inmovilizado para recibir tratamientos, ya sea vía intragástrica o vía subcutánea, es necesario estirar el cuerpo del ratón al jalarle la cola con la mano derecha y sostenerla con el dedo meñique de la mano izquierda.

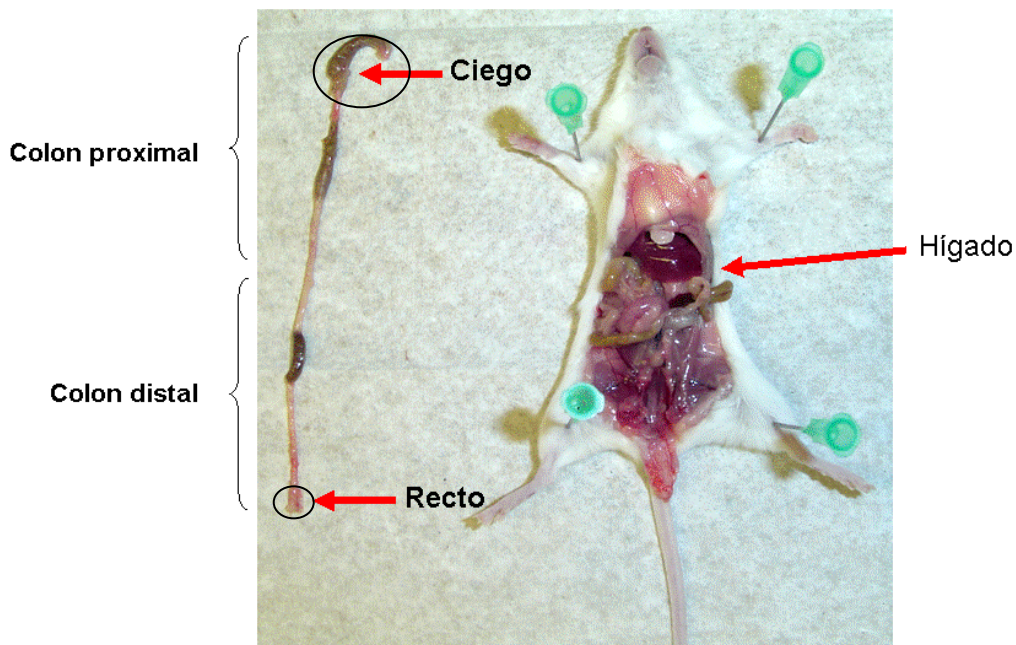
TRANSFERIR A LOS RATONES DE UNA JAULA A OTRA: Tomar al ratón por la cola con las manos protegidas con guantes. Relájese y tome suavemente al ratón, en estas condiciones, el ratón si intenta morderlo será una mordida sutil que no dolerá. No utilizar forceps a menos de que sea necesario para protegerse.

1. Se recomienda trabajar con los ratones en la mañana o al mediodía. Los ratones son más activos cuando el día oscurece y es más difícil manejarlos.
2. Identificar cada jaula con la fecha de recepción, nombre del bioterio donde se adquirieron, número de animales, tratamiento recibido, cepa, genotipo, edad, sexo, persona a cargo del proyecto, observaciones.
3. Colocar una cama de aserrín de 1.5 cm de grosor, aproximadamente.
4. Colocar una botella de agua fresca y potable a cada jaula.
5. Colocar a 5 animales por jaula como máximo.
6. Acomodar cada jaula en un estante o rack para fácil manejo y control de los animales.
7. Cambiar las jaulas, el aserrín y la botella de agua una vez a la semana.
8. Mantener a los animales en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas c/u.
9. Controlar la temperatura y la humedad de la habitación y mantenerla a 25°C y a un 50% de humedad.
10. Supervisar diariamente la cantidad de agua y alimento de los animales.

Método de Sacrificio.

El método a seguir en cuanto al sacrificio de animales, es el establecido en el laboratorio de Toxicología, del Departamento de Ciencias de Salud Ambiental, de la Universidad Johns Hopkins.

El sacrificio de los ratones se realiza por inhalación de CO₂. Los animales se colocan en una cámara sellada, conectada a un tanque de CO₂. Primero se debe permitir el flujo del gas durante un minuto para que se llene la cámara. Mantenerla cerrada durante 5 minutos para asegurar la muerte de los ratones. No colocar más de cinco animales en la cámara. Cuando los animales se encuentren dentro de la cámara, se debe abrir el tanque de CO₂ de manera gradual hasta observar que los animales ya no respiren y sus ojos hayan cambiado de color. Cerrar el tanque y proceder a abrir a los ratones con material quirúrgico. Fijar al animal en la tabla de disección. El abdomen de los ratones se sostiene con pinzas y se realiza una incisión al nivel del abdomen bajo, para continuar la apertura por ambos costados del ratón. Expuesta la cavidad abdominal, como se muestra en la figura, se retira el tejido adiposo, y procede a separar el colon para extraerlo, lavarlo con solución salina de fosfatos, y procesarlo dependiendo del análisis a realizar (extraer mucosa, congelar, realizar cortes transversales, fijarlo en formalina al 10%).



Cavidad abdominal, colon e hígado de ratón ICR

Medición de pesos y consumos.

El aumento de peso de cada ratón se registra diariamente. Cada uno de los animales se pesa diariamente, siguiendo los lineamientos del manejo de animales, anteriormente descritos. Se registra el peso en gramos, el número del animal, el grupo o número de jaula al que pertenece, así como también el tratamiento que recibe. Se calcula el porcentaje de la ganancia en peso según la fórmula:

$$\text{Ganancia} = \text{peso actual} / \text{peso inicial} * 100$$

Peso actual = peso registrado a diario

Peso inicial = peso registrado al día cero (día de administración del AOM), considerado como el 100%.

El formato a emplear se muestra a continuación:

TRATAMIENTO	# ANIMAL	FECHA
GRUPO		Peso en g
		Peso en g
		Peso en g
		Peso en g
		Peso en g

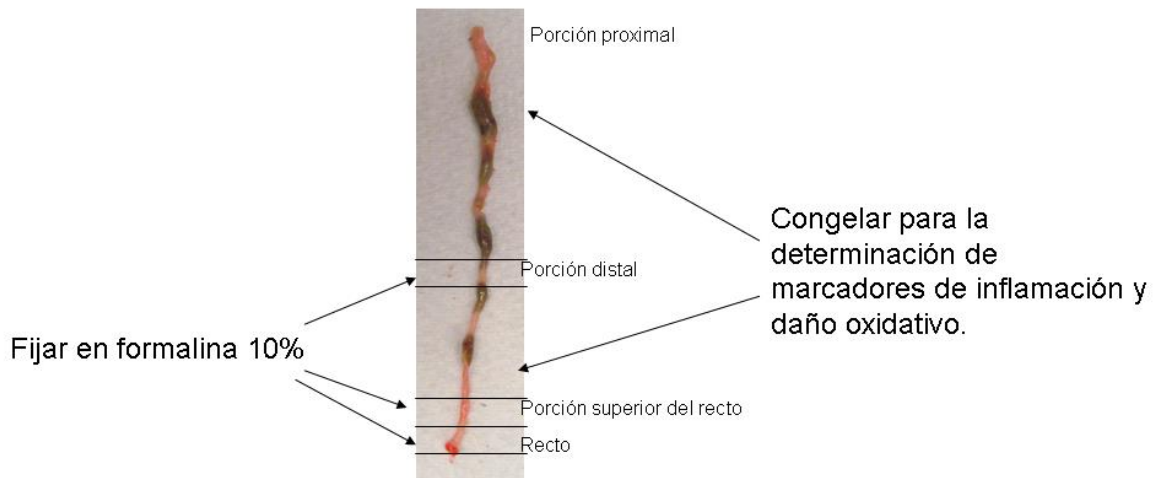
El consumo se calcula diariamente, con base al alimento consumido por los ratones. Se registra la diferencia del peso del comedero al añadir el alimento fresco (peso inicial) menos el peso del comedero a las 24 horas posteriores (peso final). Se pueden emplear comederos de aluminio para evitar la oxidación temprana del alimento. Se estima el peso en gramos consumido por ratón, en base al valor estándar del consumo de 5 g de alimento, por ratón, por día. El formato a emplear se muestra a continuación:

GRUPO	TRATAMIENTO
	FECHA
Peso inicial	
Peso final	
Peso consumido	
g	
consumidos/ratón	
Peso comedero	

Cortes transversales del colon de ratón.

Después de que la cavidad abdominal del ratón sea expuesta, y el colon extraído y lavado, se procede a conservarlo en frascos con formalina al 10% por 48 horas. Al término de este plazo, se secciona el colon para ser sometido a análisis histopatológicos, o bien, a análisis bioquímicos. Con la ayuda de un bisturí, se separa el colon proximal del distal, se hacen cortes transversales de 2-3mm de longitud del recto, otro más de la porción cercana o superior al recto y el último, del colon distal. Los cortes se colocan en casillas con almohadillas para ser analizados por el Laboratorio de Patología del Hospital Johns Hopkins. El resto del colon se congela para su análisis bioquímico.

Cortes de diferentes segmentos del colon para análisis histopatológicos y para análisis bioquímicos.



12. ANEXO 3.
GRÁFICAS Y CUADROS CON RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS.

Cuadro 1A. Consumo de alimento por ratón y peso de ratones ICR tratados con dietas especiales durante 6 días.

Gpo	Tratamiento	n	Peso (g)	Consumo de alimento (g/ratón)
1	Control	3	30.1 ± 0.7	4 ± 0.4
2	0.03% D3T	3	29.9 ± 0.5	3.6 ± 0.8
3	100, 33 y 50% moringa	3	28.4 ± 1.5	3.7 ± 2.2

Los ratones macho ICR/CD-1 fueron tratados con dietas especiales: control, D3T al 0.03% y moringa al 100, 33 y 50%. Los valores representan las medias ± DE. Los tratamientos NO son significativamente diferentes del control P < 0.05 (analizado por ANOVA).

Cuadro 2A. Peso de ratones ICR tratados con AOM, 1% DSS y dietas especiales durante 35 días.

Gpo	Tratamiento	n	Peso corporal (g)
1	AOM + 1%DSS + Control	10	24.9 ± 7.5
2	AOM + 1%DSS + 0.03% D3T	10	28.8 ± 10.4
3	AOM + 1%DSS + 0.04% NIM	10	23.5 ± 6.1

Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c. 1 dosis *i.p.*), 1% DSS y con dietas especiales: control, D3T al 0.03% y NIM al 0.04%. Los valores representan las medias ± DE. Los tratamientos NO son significativamente diferentes del control; P < 0.05 (analizado por ANOVA).

Cuadro 3A. Consumo de alimento por ratón y peso de ratones ICR tratados con AOM, 1.5% DSS y dietas especiales durante 35 días,

Gpo	Tratamiento	n	Peso (g)	Consumo de alimento (g/ratón)
4	AOM + 1.5%DSS + Control	15	28.2 ± 1.7	4 ± 0.4
5	AOM + 1.5%DSS + 40% moringa	15	27 ± 1.3	4.4 ± 0.6
6	AOM + 1.5%DSS + 0.03% D3T	15	27.1 ± 1.2	3.5 ± 0.5
7	AOM + 1.5%DSS + 0.04% NIM	15	27.9 ± 1.7	3.9 ± 0.3

Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c. 1 dosis *i.p*), 1.5% DSS y con dietas especiales: control, moringa al 40%, D3T al 0.03% y NIM al 0.04%. Los valores representan las medias ± DE. Los tratamientos NO son significativamente diferentes del control; P < 0.05 (analizado por ANOVA).

Cuadro 4A. Actividad colónica de MPO en ratones ICR tratados con AOM, 1.5% DSS y dietas especiales durante 13 días.

Gpo	Tratamiento	n	Nivel inducción respecto al control	Actividad enzimática (mU/mg)
4	AOM + 1.5%DSS + Control	5	1	2.25 ± 0.1
5	AOM + 1.5%DSS + 40% moringa	5	2.5 ± 0.5	5.6 ± 1.2
6	AOM + 1.5%DSS + 0.03% D3T	5	3 ± 1.2	6.7 ± 2.8
7	AOM + 1.5%DSS + 0.04% NIM	5	2.7 ± 0.5	6 ± 1.2

Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c. 1 dosis *i.p.*), 1.5% DSS y con dietas especiales: control, moringa al 40%, D3T al 0.03% y NIM al 0.04%. Los valores representan las medias ± EE. Los tratamientos NO son significativamente diferentes del control; P < 0.05 (analizado por ANOVA).

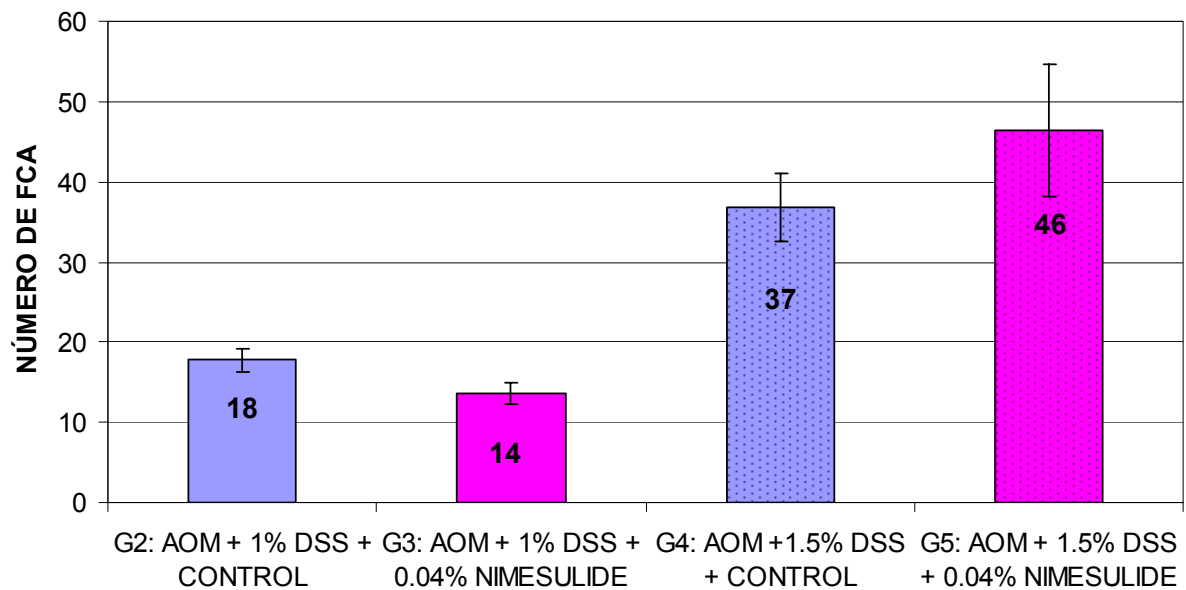


Figura 1A. Número de FCA encontradas en el colon de ratones ICR tratados durante 35 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c. 1 dosis *i.p.*), 1 y 1.5% DSS y con dietas especiales: control y NIM al 0.04%. Los valores representan la media (n = 10 y n = 15); barras, EE. Letras diferentes por columna significan diferencias estadísticas entre tratamientos: ^aestadísticamente diferente del grupo G3, P < 0.05; ^bestadísticamente diferente de los grupos G2 y G3, P < 0.05 (analizado por ANOVA).

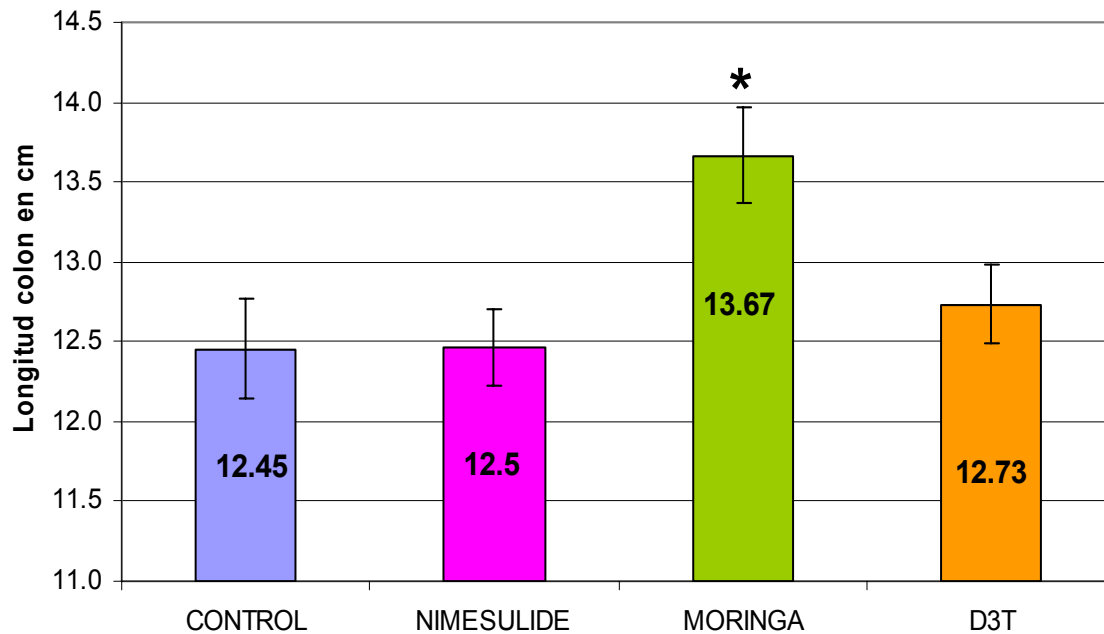


Figura 2A. Longitud del colon de ratones tratados durante 35 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis *i.p.*), 1.5% DSS y con dietas especiales: control, NIM al 0.04%, moringa al 40% y D3T al 0.03%. Los valores representan las medias (n = 15); barras, EE; *Los tratamientos son significativamente diferentes del control; P < 0.05 (analizado por ANOVA).

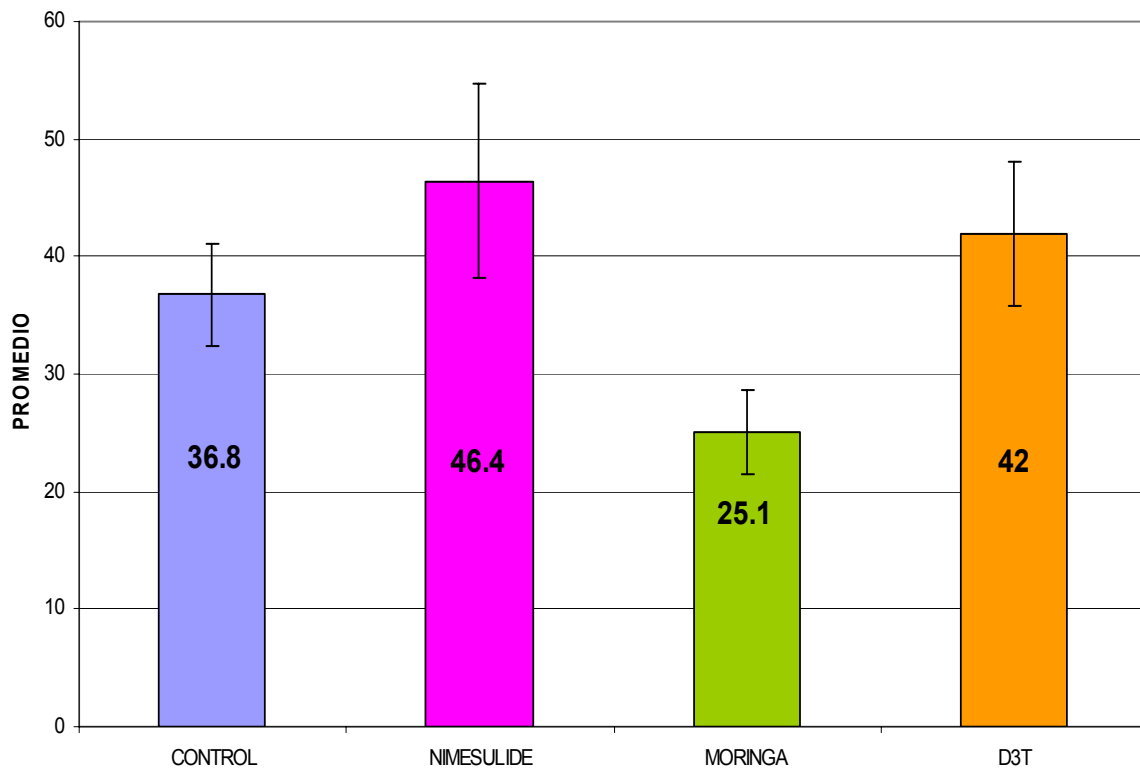


Figura 3A. Número de FCA en el colon de ratones tratados durante 35 días.

Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis i.p.), 1.5% DSS y con dietas especiales: control, NIM al 0.04%, moringa al 40% y D3T al 0.03%. Los valores representan las medias (n = 15); barras, EE. Los tratamientos NO son significativamente diferentes del control; $P > 0.05$ (analizado por ANOVA).

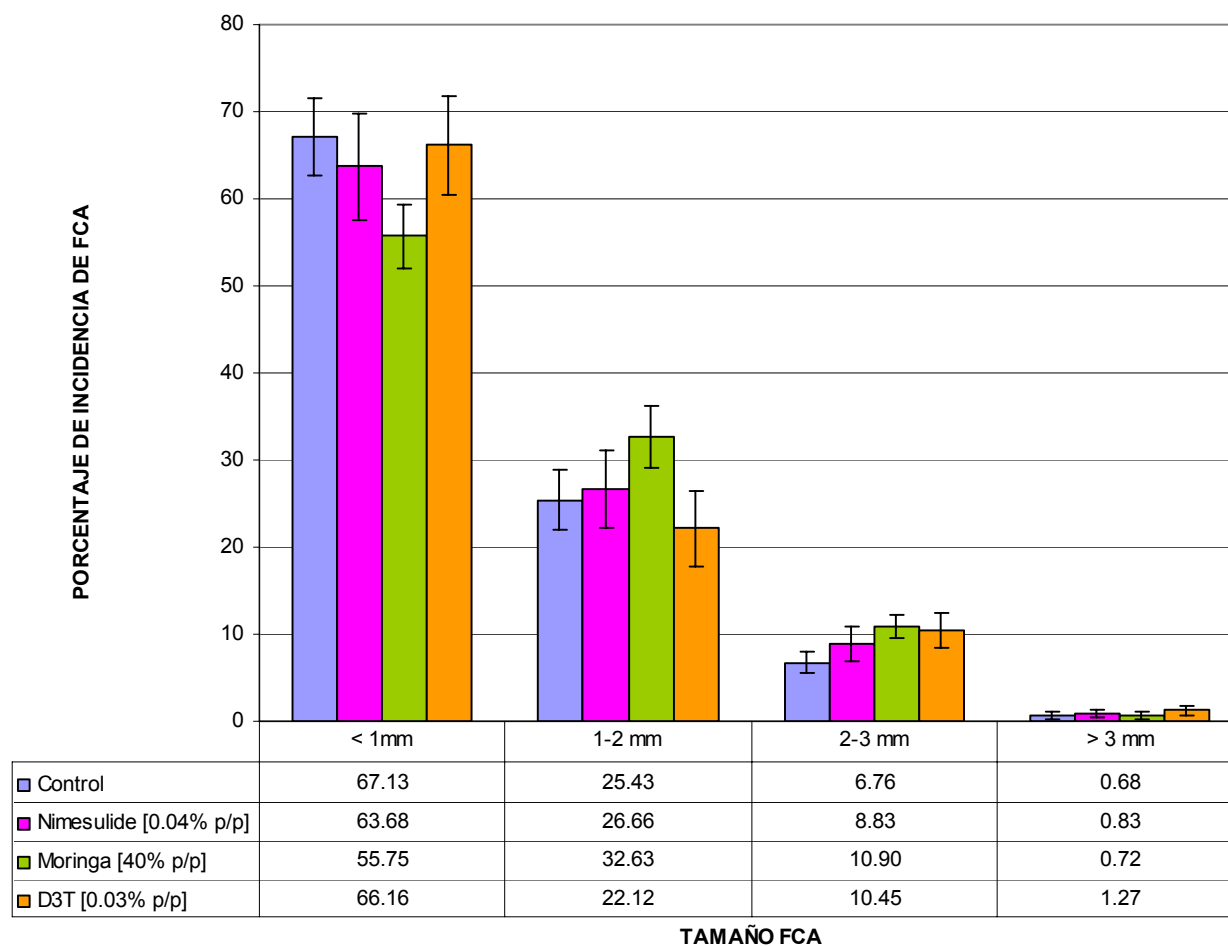


Figura 4A. Distribución de FCA por tamaño en el colon de ratones tratados durante 35 días. Los ratones hembra ICR/CD-1 fueron tratados con AOM (7.5 mg/kg p.c., 1 dosis i.p.), 1.5 % DSS y con dietas especiales: control, NIM al 0.04%, moringa al 40% y D3T al 0.03%. Los valores representan las medias de los porcentajes de incidencia (n = 15); barras, EE. Los tratamientos NO son significativamente diferentes del control; P > 0.05 (analizado por ANOVA).